



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

“AISLAMIENTO, CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL  
cDNA DE LA(S) 5 $\alpha$ -ESTEROIDE REDUCTASA(S) DE  
HÁMSTER”

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

### DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**M. en C. LUIS RAMOS TAVERA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FELIPE DE JESÚS VILCHIS URIBE

COMITÉ TUTOR: DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON  
DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

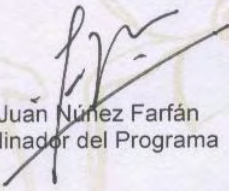
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de marzo de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **RAMOS TAVERA LUIS** con número de cuenta **91338624** con la tesis titulada: **"AISLAMIENTO, CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL DNA(c) DE LA (s) 5-ALFA ESTEROIDE REDUCTASA(s) DE HÁMSTER"**.

Realizada bajo la dirección del **DR. FELIPE DE JESÚS VILCHIS URIBE**:

Presidente:	DRA. MARTHA ALICIA MENJIVAR IRAHETA
Vocal:	DRA. ELIZABETH LANGLEY MCCARRON
Vocal:	DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNEIRA ASTEGUIANO
Vocal:	DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Secretario:	DR. FELIPE DE JESÚS VILCHIS URIBE
Suplente:	DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA
Suplente:	DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F. a 05 de enero de 2010.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

## AGRADECIMIENTOS

---

*Mi agradecimiento enorme al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la misma Universidad por todo el apoyo otorgado durante el desarrollo de mi formación académica.*

Al CONACYT (167215) dedico la presente como agradecimiento al apoyo brindado durante estos años de estudio y como un reconocimiento de gratitud al haber finalizado mis estudios.

En agradecimiento a mi director de tesis y al comité tutorial por todo el apoyo brindado a través de mis estudios y con la promesa de seguir siempre adelante:

Dr. Felipe de Jesús Vilchis Uribe

Dra. Elizabeth Langley McCarron

Dr. Federico Martínez Montes

*Mi agradecimiento al  
Dr. Felipe Vilchis  
Por el valioso apoyo otorgado durante la realización del presente proyecto y por el que  
me continua otorgando.*

*Mi agradecimiento a la  
Dra. Bertha Chávez  
Por todo su apoyo incondicional.*

*Un agradecimiento enorme a mi comité tutorial  
Dra. Elizabeth Langley McCarron  
Dr. Federico Martínez Montes  
Por sus comentarios, críticas y el tiempo dedicado.*

*Un profundo agradecimiento a los revisores de mi tesis  
Dr. Enrique Antonio Pedernera Asteguiano  
Dra. Leticia Rocha Zavaleta  
Dra. Gabriela Morali de la Brena  
Dra Marta Menjivar Iraheta  
Por sus críticas y sugerencias.*

## *A mi familia y amigos*

*El trabajo experimental del presente estudio se llevo a cabo en el laboratorio de  
Bioquímica Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto  
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ANTECEDENTES.....	4
Función Biológica de los andrógenos.....	4
Enzimas esteroideogénicas.....	6
Biosíntesis de hormonas androgénicas.....	10
5 $\alpha$ -reductasas.....	16
5 $\alpha$ -reductasa tipo 1.....	18
5 $\alpha$ -reductasa tipo 2.....	19
Glándula Harderiana.....	22
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
Animales y tejidos.....	28
Extracción de RNA total.....	28
Preparación de cDNA.....	28
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
Purificación de los productos de PCR.....	30
Amplificación de los extremos 5' y 3' mediante RACE.....	30
Secuenciación.....	32
Clonación del cDNA de las 5 $\alpha$ -reductasas.....	33
Purificación del plásmido.....	34
Transfección del cDNA de las 5 $\alpha$ -reductasa tipo y tipo 2.....	35
Actividad de 5 $\alpha$ -reductasa en células HEK-293.....	36
Análisis mediante Northern blot.....	37
Marcaje e hibridación de ácidos nucleicos.....	38
RT-PCR en tiempo real.....	38
RESULTADOS.....	40
DISCUSIÓN.....	55
REFERENCIAS.....	64

## RESUMEN

La conversión de testosterona (T) a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) parece ser un paso clave en la vía de señalización de los andrógenos en glándula Harderiana (HG). A la fecha se han identificado dos distintas isoenzimas  $5\alpha$ -reductasa (tipo 1 y tipo 2) que pueden catalizar esta reacción metabólica. En hámster Sirio, la HG exhibe un marcado dimorfismo sexual, el cual se cree depende de la acción de DHT; no obstante, aun se desconoce si la HG contiene una o más  $5\alpha$ -reductasas y si estas enzimas exhiben una regulación diferente en HG de machos y hembras. En el presente estudio, se aislaron los cDNAs que codifican para la  $5\alpha$ -esteroide reductasa tipo 1 (Srd5a1) y la  $5\alpha$ -esteroide reductasa tipo 2 (Srd5a2), se determinaron además sus secuencias nucleotídicas y se investigaron sus expresiones específicas en las HGs de ambos sexos.

Los cDNAs completos para las  $5\alpha$ -reductasas tipo 1 y tipo 2 fueron obtenidos mediante el procedimiento de RT-PCR acoplado a la amplificación rápida de los extremos 5' y 3' del cDNA (RACE). Los resultados demostraron que el cDNA de la Srd5a1, contiene un marco abierto de lectura (ORF) de 937-pb que codifica una proteína de 255 aminoácidos, mientras que el cDNA completo (1253-pb) de la Srd5a2 codifica una proteína de 254 aminoácidos. En las secuencias del cDNA de ambas  $5\alpha$ -reductasas se detectaron señales de poliadenilación no canónicas. Las secuencias de aminoácidos de las  $5\alpha$ -reductasas de hámster comparten un porcentaje alto (62-86%) de homología con las  $5\alpha$ -reductasas del humano, mono y rata. Los análisis de comparación de secuencias de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 revelaron la presencia de dominios funcionales importantes para la unión al NADPH y la unión al sustrato. La región C-terminal de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 presentó varios aminoácidos (D163, P180, G192, G195) importantes para la unión al NADPH. Adicional a esto, se pudo detectar una señal de localización nuclear (I-G-A-L-T-L) ubicada en la región N-terminal.

Mediante la transformación de [ $^3$ H]T a [ $^3$ H]DHT se demostró que los cDNAs aislados y transfectados transitoriamente en células HEK-293 codifican polipéptidos funcionales con actividad de  $5\alpha$ -esteroide reductasa. En ensayos de expresión la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 exhibió actividad enzimática en un rango amplio de pH (6.5 a 8) mientras que la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 tuvo un pH óptimo de 5.5. De igual forma, se determinó que el valor de la  $K_m$  para la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 (7.14  $\mu$ mol/L) fue mayor al de la  $K_m$  aparente para la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 (1.96  $\mu$ mol/L).

En ensayos de Northern blot se pudo detectar el transcrito de  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 en tejidos como el hígado y la HG de macho y hembra, mientras que el mRNA de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 se



detectó preferencialmente en epidídimo. Adicional a esto, la castración incrementó los niveles de mRNA para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 en la HG, mientras que la administración de T restableció los niveles normales del mensajero. Los análisis de PCR tiempo-real (RT-qPCR) revelaron que tanto la Srd5a1 como la Srd5a2 se expresan en la HG sin claras diferencias entre machos y hembras. En hembras intactas, la expresión de ambas isoenzimas mostró variaciones durante el ciclo estral; al parecer, el reemplazo hormonal con 17 $\beta$ -estradiol induce también una regulación a la alta en los niveles del mRNA de la isoenzima tipo 2.

En conjunto, los datos moleculares obtenidos, revelaron que las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster, presentan alto grado de similitud estructural, mientras que las diferencias en la actividad catalítica y expresión de estas isoenzimas sugieren funciones fisiológicas diferentes. Las características bioquímicas y patrones de expresión de estas 5 $\alpha$ -esteroide reductasas, apoyan la hipótesis de que ambas isoformas juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del fenotipo sexual de este órgano intraorbital.



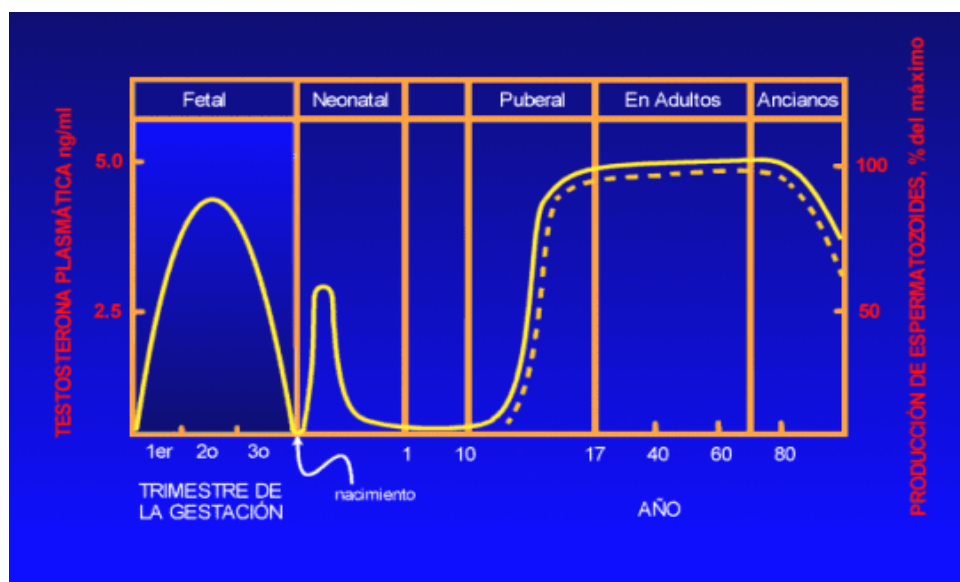
## ABSTRACT

The conversion of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT) appears to be a key step in androgen signaling in the Harderian gland (HG). To date, two 5 $\alpha$ -reductase isoenzymes (type 1 and type 2) that perform this reduction have been identified. In hamsters, the HGs exhibit a marked sexual dimorphism, which is thought to depend on DHT; however, it is unclear whether they contain one or both isoenzymes and whether these isoenzymes are differentially expressed in males and females. In this study, we isolated specific cDNAs for 5 $\alpha$ -reductase 1 (Srd5a1) and 5 $\alpha$ -reductase 2 (Srd5a2), determined their sequences and investigated their expression in Harderian tissue. Isozyme-1, cloned from liver mRNA, encodes a protein of 255 amino acids (a.a.); isozyme-2 cDNA, isolated from the epididymis, encodes a 254-a.a. protein. The percent of sequence identity between the hamster isozymes and the rat and mouse enzymes was 82% (for Srd5a1) and 84% (for Srd5a2), on average. When assayed in transfected HEK-293 cells, the type 1 isozyme displayed enzyme activity over a broad pH range (6.5 -8), while isozyme 2 had a pH optimum of 5.5. Both isozymes efficiently catalyzed the *in vitro* transformation of T into DHT, with apparent  $K_m$  values of 7.1 and 1.9  $\mu\text{mol/L}$  for Srd5a1 and Srd5a2, respectively. Real-time PCR analysis revealed higher mRNA levels for Srd5a1 than for Srd5a2. Expression of both isozymes increased slightly in HGs of castrated-males and showed variations during the estrous cycle in females. Hormonal replacement with 17 $\beta$ -estradiol administered to spayed females induced the up-regulation of Srd5a2 mRNA levels. Altogether, our results show that both Srd5a1 and Srd5a2 are expressed in HGs without clear differences between males and females. The biochemical characteristics and relative expression of these 5 $\alpha$ -steroid reductases support the view that both isozymes may play an important role in mediating androgen signaling in HG.

## ANTECEDENTES

### FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS ANDRÓGENOS

Los andrógenos tienen diferentes funciones durante las distintas etapas de la vida de una especie. Durante el desarrollo embrionario los andrógenos, testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT), contribuyen a la diferenciación del sistema reproductor, así como también al desarrollo del fenotipo masculino (Mooradian et al., 1987; Wilson et al., 1981). En mamíferos, la diferenciación sexual masculina es un mecanismo dependiente de andrógenos secretados primordialmente por las células de Leydig del testículo (Hiort & Holterhus, 2000; Hughes, 2001; MacLaughlin & Donahoe, 2004). La participación de los andrógenos durante la etapa neonatal aun no se ha definido (Fig. 1), aunque podría estar vinculada al desarrollo del sistema nervioso central. En la pubertad los andrógenos permiten el desarrollo del dimorfismo sexual, desarrollo de caracteres sexuales secundarios y controlan la reproducción (Bardin & Catterall, 1981; Wilson, 1999). En el humano, al inicio de la pubertad los andrógenos regulan la espermatogénesis, causan un incremento en el desarrollo de la musculatura esquelética y una proliferación de glándulas sebáceas; así como una estimulación del vello axilar y púbico. Los andrógenos también pueden generar, en cierta medida, la conducta agresiva y sexual en el sexo masculino, y en algunas especies los efectos organizacionales del cerebro durante la vida prenatal o postnatal temprana (Mooradian et al., 1987).



**Fig. 1.** Representación esquemática de las concentraciones plasmáticas de T (línea continua) y espermatogénesis (línea punteada) durante las diferentes etapas de la vida masculina en el humano.

Los andrógenos ejercen sus efectos sobre los testículos y sobre las estructuras accesorias masculinas. Asimismo, los testículos en desarrollo también producen una hormona proteica, denominada sustancia inhibidora de los conductos de Müller, la cual origina la regresión de los conductos de Müller fetales. Después, bajo la influencia de la T, los conductos de Wolff se diferencian hacia epidídimo, conducto deferente y vesículas seminales. La DHT causa la fusión y alargamiento del pliegue labioescrotal hasta originar el desarrollo de la uretra, pene y escroto, así como la virilización del seno urogenital hasta formar la próstata.

Se ha observado que la T unida a su receptor ejerce efectos importantes durante el desarrollo prepuberal, estimulando la proliferación y diferenciación de las células peritubulares del testículo y de las células de Sertoli (Bremner et al., 1994; Vornberger et al., 1994; van Rooijen et al., 1995; Schlatt et al., 1997). En el momento de la pubertad y a partir de entonces, los andrógenos ejercen un efecto directo sobre los testículos. Se requiere de la acción de los andrógenos para la espermatogénesis en los túbulos seminíferos, así como para la maduración de los espermatozoides durante su paso a través del epidídimo y el conducto deferente.

Al respecto, el proceso de maduración espermática es realizado en las diversas regiones del epidídimo y en este sentido se ha observado que proteínas sintetizadas en el epidídimo y que se unen al espermatozoide son importantes para su funcionamiento. Se ha observado que estas proteínas son reguladas de una manera andrógeno-dependiente (Ungefroren et al., 1997; Yenugu et al., 2004). Por ejemplo, la expresión de proteínas sintetizadas en el epidídimo (las cuales participan en la reabsorción de fluidos y solutos para la adecuada maduración espermática) son moduladas mediante la actividad androgénica (Pastor-Soler et al., 2002). Asimismo, se ha observado que en el epidídimo de roedores castrados, los niveles de apoptosis aumentan y que la administración de andrógenos disminuye esta tasa de muerte celular programada (Fan & Robaire, 1998; Takagi-Morishita et al., 2002). Recientemente, se ha mencionado que este tejido presenta abundante expresión de  $5\alpha$ -reductasa 2 y que la DHT es el andrógeno predominantemente sintetizado en el núcleo de células del epidídimo (Robaire & Henderson, 2006). Estos estudios han establecido que el epidídimo requiere de los andrógenos y primordialmente de DHT para el desarrollo y el mantenimiento de este tejido.

La dependencia androgénica ha sido observada en otros órganos sexuales, por ejemplo en las vesículas o glándulas seminales. La diferenciación y proliferación del epitelio celular de estas glándulas ha mostrado una dependencia hacia la T, pero no a la DHT (Burns et al., 1979). Se ha observado que en humanos y en ratas el incremento en las concentraciones de T incrementa la

actividad secretora de las vesículas seminales (Gonzales, 2001). Asimismo, en la vesícula seminal del cerdo, Harvey et al., (1995) reportaron la presencia de una proteasa epitelial cuya actividad es rápida y específicamente regulada por andrógenos.

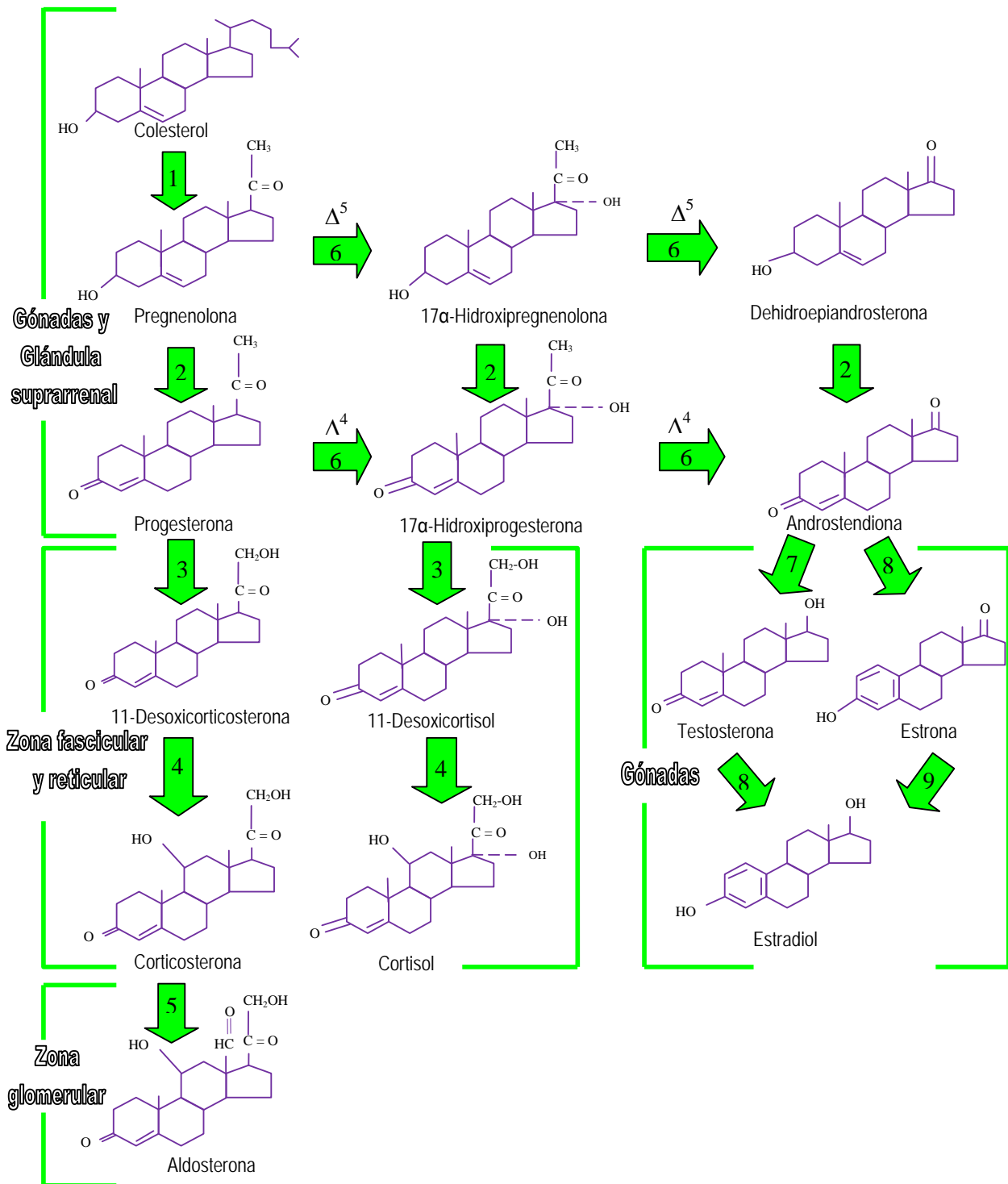
Numerosos trabajos realizados en euterios, han demostrado que el desarrollo y el crecimiento de la glándula prostática es regulada por la DHT (Thompson, 2001). No obstante esto, en mamíferos metaterios la formación de la próstata es regulada por un derivado  $5\alpha$  reducido ( $5\alpha$ -androstano- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol) de la DHT (Shaw et al., 2000; Leihy et al., 2001); y se ha observado que este  $5\alpha$ -adiol es en su mayoría de origen testicular (Wilson et al., 2003). En la próstata, la T es convertida a DHT predominantemente por la enzima  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 y se ha observado que esta conversión se lleva a cabo principalmente en las células basales y del estroma de este tejido (Steers, 2001). Estudios moleculares han concluido que los andrógenos regulan de manera específica la proliferación, la diferenciación y la apoptosis prostática; de tal manera que a la fecha se han descrito varios genes regulados a través de andrógenos que participan en el control de estos procesos celulares (Evans-Storms & Cidlowski, 1995; Wang et al., 1997; Wright et al., 1999; Kwong et al., 2000; Xu et al., 2000). La dependencia del crecimiento prostático en función de la DHT, ha llevado consigo al desarrollo de diversos inhibidores para la  $5\alpha$ -reductasa, esto con la finalidad de ser utilizados como agentes terapéuticos en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y en el tratamiento del cáncer prostático (Silver et al., 1994a).

En mamíferos euterios, la organogénesis normal del pene y de la uretra es dependiente de T y DHT (Kim et al., 2002). Se ha observado que la castración en la rata adolescente induce el decremento en el tamaño del pene e induce anormalidades morfológicas en la estructura del cuerpo cavernoso y de la túnica albugínea (Shen et al., 2003); mientras que en mamíferos metaterios se ha determinado que el desarrollo del pene es dependiente del andrógeno  $5\alpha$ -reducido,  $5\alpha$ -androstano- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol (Leihy et al., 2004).

## **ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICAS**

La biosíntesis de hormonas esteroides (como progestinas, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos y andrógenos) a partir del colesterol involucra la presencia de varias enzimas esteroideogénicas. Estas enzimas son primordialmente 6 citocromos P450 y varias hidroxisteroide deshidrogenasas. La Fig. 2 ilustra las enzimas involucradas en la formación de esteroides. Estas hormonas esteroides son muy similares estructuralmente, no obstante esto, se encargan de regular diversos procesos fisiológicos en vertebrados (Miller, 1988; Conley & Bird,

1997). Las hormonas esteroides se unen a uno o más receptores hormonales esteroideos específicos. Este complejo hormona receptor puede unirse a secuencias consenso del DNA, denominados elementos de respuesta a hormonas esteroides y de esta manera estimular la biogénesis de proteínas esteroide-reguladas (Truss & Beato, 1993; Beato & Sánchez-Pacheco, 1996; Whitfield et al., 1999). Un ejemplo típico de este mecanismo de acción ha sido descrito para el receptor de andrógenos (AR). Al respecto, se ha observado que los andrógenos se unen intracelularmente al AR, este complejo andrógeno-receptor puede unirse a los elementos de respuesta a andrógenos topológicamente localizados en o junto a la región promotora de genes andrógeno-regulados, las cuales inducen efectos sobre la diferenciación, el crecimiento y el metabolismo (Fig. 3) (Heinlein & Chang, 2002).



**Fig. 2.** Biosíntesis de hormonas esteroides en tejidos esteroideogénicos como las gónadas y la glándula suprarrenal. Los números indican las enzimas involucradas en cada reacción. **1.** CYP11A, **2.** 3 $\beta$ HSD, **3.** CYP21, **4.** CYP11B1, **5.** CYP11B2, **6.** CYP17, **7.** 17HSD3, **8.** CYP19, **9.** 17HSD1.

Los citocromos P450 son una superfamilia de enzimas oxidativas, todas ellos consisten de aproximadamente 500 aminoácidos y contienen un único grupo prostético hemo en su sitio activo. Estas enzimas desempeñan un papel fundamental en el catabolismo de algunas drogas, metabolismo de eicosanoides, ácido araquidónico, colesterol, ácidos biliares, esteroides, vitamina D<sub>3</sub> e hidroxilación del ácido retinoico. Las enzimas P450 involucradas en la biosíntesis de hormonas esteroides son proteínas asociadas a la membrana y bioquímicamente existen dos clases de enzimas P450, las enzimas tipo I como CYP11A, CYP11B1 y CYP11B2, las cuales están asociados a la membrana mitocondrial y las enzimas tipo II como CYP17, CYP19 y CYP21, las cuales se encuentran asociadas al retículo endoplasmático (microsomales). Durante la diferenciación sexual del borde urogenital en la embriogénesis, el factor de transcripción SF1, un miembro de la superfamilia de receptores nucleares, regula la expresión de los genes P450 implicados en la esteroidogénesis y estudios moleculares recientes han reportado que las mutaciones en estos genes causan alteraciones innatas del metabolismo y contribuyen a muchas anomalías clínicamente relevantes (Payne & Hales, 2004).

La transformación de compuestos  $\Delta^5,3\beta$ -hidroxiesteroides a sus correspondientes metabolitos reducidos  $\Delta^4,3$ -ceto-esteroides es una etapa esencial para la biosíntesis de todas las clases de esteroides activos. Hasta este momento, se han identificado, clonado y caracterizado siete isoformas de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerasa ( $3\beta$ -HSD I-VII), principalmente en rata (I, II, III, IV, VII), ratón (I, II, III, IV, V, VI, VII) y humano (I, II, VII). Asimismo, se han caracterizado otras  $3\beta$ -HSD en especies como el mono (I, II, III y IV), bovino (I, II, III y IV), hámster (I, II, III), perro (I). Estas isoenzimas son codificadas por distintos genes y se ha observado que presentan un alto porcentaje de homología en su secuencia de aminoácidos. Las  $3\beta$ -HSD son enzimas asociadas a la membrana mitocondrial o microsomal dependiendo del tipo celular en donde se estén expresando (Penning, 1997). En humanos se ha observado que su deficiencia genera una forma rara de hiperplasia adrenal congénita en ambos sexos, además de provocar una masculinización incompleta de los genitales externos en hombres con cariotipo 46,XY (Simard et al., 2005).

Las  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas ( $17\beta$ -HSD) regulan las concentraciones de andrógenos y estrógenos en mamíferos. Esta reacción se lleva a cabo a través de la reducción de 17-ceto esteroides o la oxidación de 17-beta esteroides utilizando NAD(P)H o NAD(P)(+) como cofactor. La  $17\beta$ -HSD ha sido clonada a partir de diversas especies y se han caracterizado nueve diferentes isoenzimas (1-9), todas ellas codificadas por diferentes genes. Estas isoenzimas han sido clonadas ampliamente a partir de diversas especies como el humano (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8), rata (1, 2, 3,



4, 7, 8, 9), ratón (1, 2, 3, 4, 5, 7, 9) y mono (1, 2, 3, 5, 7, 8). Además de esto, se han clonado otras isoenzimas en otras especies como el hámster (3), rana (7,8), gallo (4) y conejo (1). A diferencia de las  $3\beta$ -HSD, se ha observado que las  $17\beta$ -HSD presentan un bajo porcentaje de homología en su secuencia de aminoácidos. Además de la conversión a andrógenos, estas enzimas son importantes para la inter-conversión de estrógenos. Las alteraciones en las  $17\beta$ -HSD generan anomalías en la diferenciación sexual, además de estar involucradas en ciertas enfermedades neuronales y en la patogénesis de varios tipos de cáncer (Mindnich et al., 2004).

La regulación de la esteroidogénesis generalmente se lleva a cabo bajo el control de las hormonas proteicas secretadas a partir de la glándula hipofisaria, por ejemplo en la glándula suprarrenal la esteroidogénesis es estimulada por la adrenocorticotropina (ACTH) (LeHoux et al., 1992) y la esteroidogénesis gonadal es estimulada mediante las gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), estas hormonas tróficas viajan por la circulación hasta el testículo e incrementan la disponibilidad del colesterol y estimulan la expresión de genes esteroidogénicos. El incremento en la expresión de las enzimas esteroidogénicas induce niveles altos de secreción de T. Estos niveles altos de T inhiben la secreción de GnRH y gonadotropinas. Reportes recientes han expandido nuestro conocimiento sobre la regulación de la esteroidogénesis y quizás el mecanismo de regulación más estudiado sea el del factor esteroidogénico SF1, un factor de transcripción tejido específico que regula las hidroxilasas P450 (Honda et al., 1993; Morohashi et al., 1996). Adicional a esto, la proteína StAR (proteína reguladora esteroidogénica aguda) regula la esteroidogénesis de manera aguda, esta regulación es inducida por hormonas de origen hipofisario y depende únicamente de la disponibilidad del colesterol. Otro nivel de regulación se ha observado a nivel de eficiencia catalítica de las enzimas esteroidogénicas, las cuales son reguladas por el sistema de transferencia de electrones (Mesiano & Jaffe, 1997; Ehrhart-Bornstein et al., 1998).

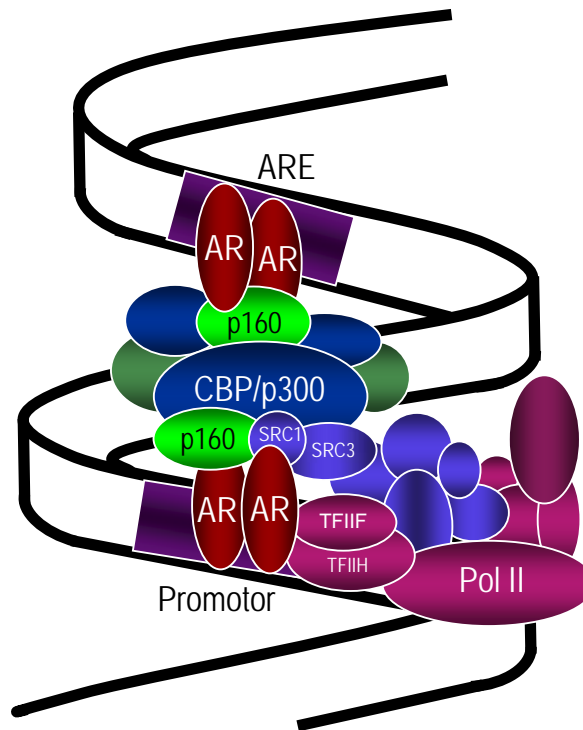
## **BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ANDROGÉNICAS**

Las hormonas esteroides son moléculas sintetizadas a partir del colesterol. En mamíferos estas hormonas son producidas por las gónadas (ovario y testículo), por la corteza suprarrenal y por la placenta (Hanukoglu, 1992; Keegan & Hammer, 2002). La conversión del colesterol a pregnenolona es la etapa limitante en la síntesis de todas las hormonas esteroides, esta conversión involucra una  $20\alpha$ -hidroxilación, una  $22$  hidroxilación y la eliminación de la cadena lateral del colesterol entre el carbono 20 y 22; estas reacciones son catalizadas por el citocromo CYP11A1 (Simpson, 1979; Voutilainen et al., 1986; Di Blasio et al., 1987; Miller, 1988; Jefcoate et al., 1992).

La pregnenolona puede ser metabolizada a diferentes esteroides mediante dos vías diferentes. En la vía  $\Delta^4$ , la pregnenolona es convertida a progesterona por la  $3\beta$ -HSD para formar un doble enlace en el carbón 4, después la progesterona es biotransformada a androstendiona. En la vía  $\Delta^5$ , la progesterona puede ser metabolizada directamente a dehidroepiandrosterona (DHEA) mediante el CYP17 (Fig. 2).

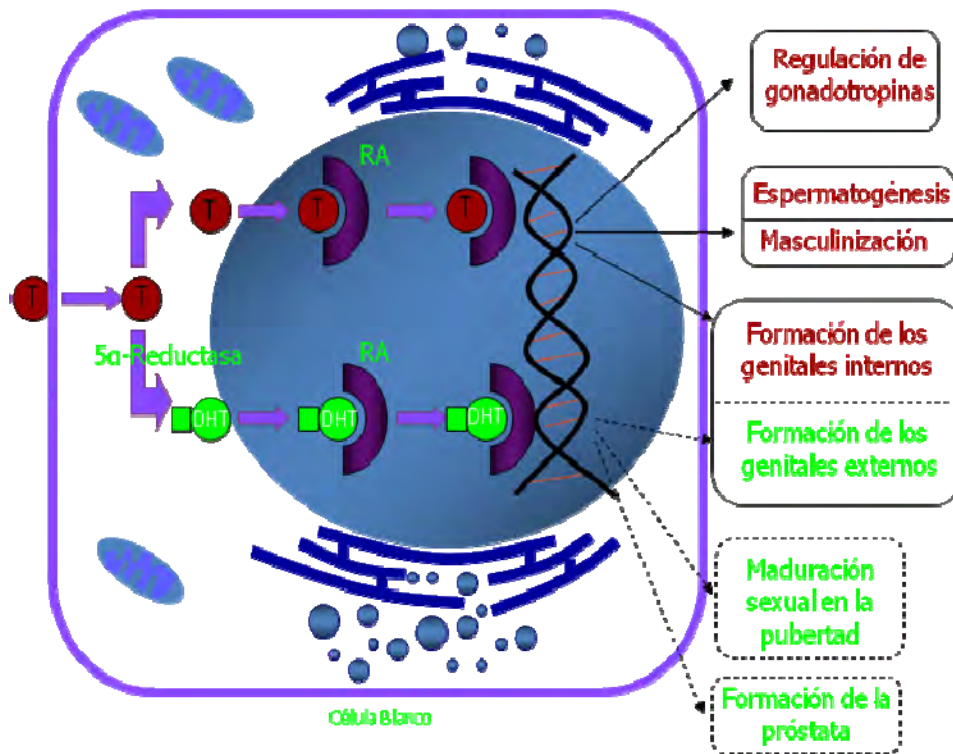
Se ha reportado que la T y la DHT son las hormonas androgénicas con mayor efecto biológico, mientras que la androstendiona y la DHEA son andrógenos débiles sintetizados en la glándula suprarrenal (Wilson et al., 1993; Quigley et al., 1995). La biosíntesis de T a partir del colesterol involucra la presencia de 5 enzimas esenciales para su conversión: CYP11A1 (enzima que rompe la cadena lateral del colesterol),  $3\beta$ -HSD ( $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa), CYP17 ( $17\alpha$ -hidroxilasa), CYP17 (17,20 liasa) y  $17\beta$ -HSD ( $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa) (Nebert & Russell, 2002); mientras que la formación de DHT a partir de T es metabolizada por la enzima  $5\alpha$ -reductasa (Wilson, 2001). La expresión tejido-específico de estas enzimas está bajo el control de las hormonas sintetizadas en la hipófisis y se ha observado que la región promotora de los citocromos P450 presenta secuencias de respuesta a Adenosin monofosfato cíclico (cAMP), elementos Ad4 y secuencias ricas en GC; la presencia de estas secuencias son necesarias para la expresión génica tejido-específico y cAMP-dependientes (Simpson et al., 1991; Omura & Morohashi, 1995).

La biosíntesis de T se lleva a cabo principalmente en las células de Leydig del testículo y es regulada mediante la LH (Payne & Youngblood, 1995), la cual puede unirse a su receptor transmembranal; esta unión induce el acoplamiento a proteínas G y de esta manera estimula la señalización celular por segundos mensajeros, como el cAMP (Shupnik & Schreihofner, 1997). Una vez sintetizada la T, ésta es secretada a la circulación general y es transportada por la albúmina y la globulina transportadora de hormonas esteroides sexuales. En tejidos periféricos, la T entra por difusión pasiva donde puede ser transformada a DHT por la acción de la  $5\alpha$ -reductasa (Fig. 3), o convertida a estradiol por la aromatasa CYP19 en tejido periférico, tal es el caso del tejido adiposo. Esta etapa es importante para la producción de esteroides sexuales femeninos. Tanto T como DHT se unen al AR, este receptor pertenece a una superfamilia de transactivadores nucleares ligando-dependientes (Whitfield et al., 1999). El complejo andrógeno-AR unido a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) induce la interacción con algunos factores de la maquinaria transcripcional, además de inducir el reclutamiento selectivo de co-reguladores y activar genes andrógeno-dependientes.



**Fig. 3.** Control transcripcional inducido por el complejo andrógeno-AR-coreguladores. El AR unido a los elementos de respuesta recluta de manera ordenada y coordinada proteínas coactivadoras para formar el complejo transcripcional.

La acción de los andrógenos (T y DHT) difiere con la de otras hormonas esteroideas, al respecto se ha determinado que tanto T como DHT interactúan con un mismo receptor y ejercen efectos fisiológicos diferentes. Se sabe que la interacción T-receptor es responsable de la regulación de la producción de gonadotropinas, de la espermatogénesis y de la formación de los genitales internos (conductos deferentes, vesícula seminal y epidídimo) a partir del anlage de los ductos Wolffianos durante la diferenciación sexual fenotípica del embrión masculino (Fig. 4). En contraste, la DHT unida al mismo receptor induce la formación de los genitales externos (escroto, pene) y la próstata, a partir del primordio del seno urogenital durante la embriogénesis masculina, asimismo la DHT también es requerida para la maduración sexual durante la pubertad (Wilson et al., 1981).



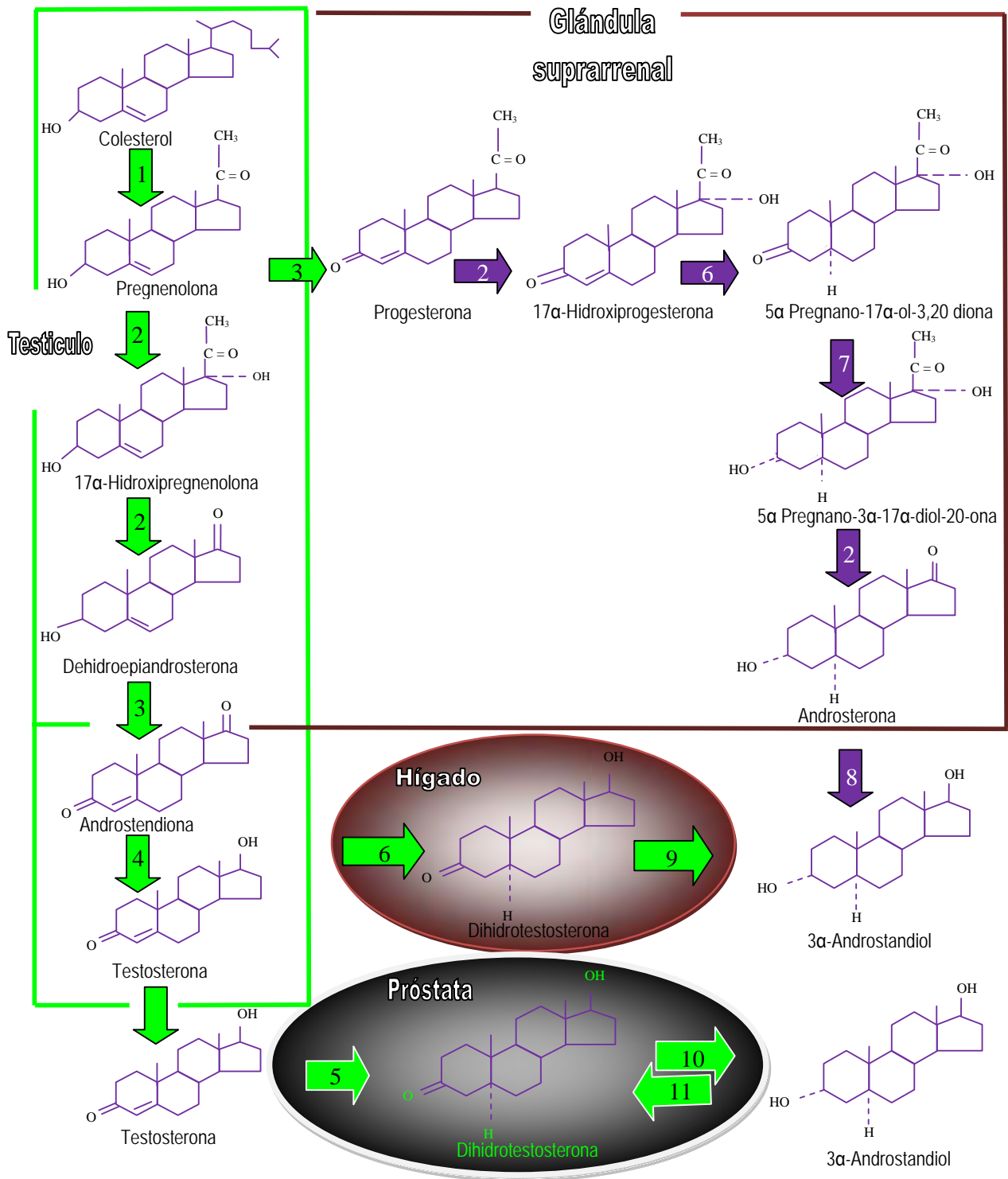
**Fig. 4.** Biosíntesis de T en las células de Leydig y acción biológica de los andrógenos (T y DHT). El complejo andrógeno-AR es trasladado al núcleo y unido a los ARE para regular la transcripción génica.

La noción de que ambos esteroides se unen al mismo receptor, se apoya en la observación de que las mutaciones en el gen del AR, conlleva al desarrollo de anomalías en procesos fisiológicos dependientes tanto de T como de DHT (Quigley et al., 1995). Existe evidencia adicional, que apoya el rol distinto de T y DHT en la acción de los andrógenos. Ésta proviene del análisis de pacientes con un defecto genético en la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 (Wilson et al., 1993; Canto et al., 1997; Vilchis et al., 1997a, b; 2000) y de animales en los cuales la actividad de la enzima ha sido inhibida *in utero* (Imperato et al., 1986). En ambas especies, la falla en la conversión de T a DHT resulta en un tipo de pseudohermafroditismo masculino, en el cual los genitales externos masculinos y la próstata no se desarrollan. En el adulto, los fármacos que inhiben la actividad de la enzima como el finasteride y otros inhibidores inducen la reducción en tamaño de la próstata. Esta involución ocurre en presencia de niveles normales de T, indicando así el papel directo de la DHT en órganos blanco (Luo et al., 2003).

El mecanismo por el cual dos diferentes hormonas (T y DHT) se unen al mismo receptor, pero ejercen efectos fisiológicos diferentes, solo se conoce parcialmente. Así, se sabe que la T se une con menor afinidad que la DHT al AR, al parecer debido a su velocidad de disociación más lenta. Por otro lado, el complejo AR-DHT es transformado más fácilmente a un estado activo que le

permite unirse al DNA. El resultado final, es que la formación neta de DHT, amplifica una señal que es más débil. En consecuencia, la formación de DHT puede desempeñar dos funciones en la acción de los andrógenos; esto es, una amplificación general y una función específica en la regulación de algunos genes (Fang et al., 1969).

Debido a la importancia de DHT en mantener la estructura de la próstata se ha descrito que los niveles intraprostáticos de esta hormona son regulados mediante las  $3\alpha/3\beta$ -HSDs. Estas enzimas reducen la DHT para generar  $3\alpha$ -diol, el cual presenta poca afinidad por el AR, o  $3\beta$ -diol el cual es un potente ligando para el receptor de estrógenos  $\beta$  (Weihua et al., 2002; Guerini et al., 2005). Estudios realizados en la rata, perro, marsupial y humano han demostrado que el  $3\alpha$ -diol puede ser oxidado a DHT (Shaw et al., 2000; Leihy et al., 2001; Penning et al., 2007; 2008). Se ha reportado que un 50% de una dosis de  $3\alpha$ -androstano-17 $\beta$ -diol en humanos puede ser convertida a DHT en la próstata, indicando que la conversión es significativa en la acción biológica de los andrógenos (Fig. 5). La vía alterna para sintetizar DHT usando  $3\alpha$ -androstano-17 $\beta$ -diol como un precursor ha sido propuesta recientemente (Auchus, 2004; Penning et al., 2008).



**Fig. 5.** Biosíntesis de andrógenos en el adulto. La caja en verde muestra la esteroidogénesis en las células de Leydig del testículo y la caja en rojo muestra la esteroidogénesis en la glándula suprarrenal. Las flechas en morado indican la vía alterna para la formación de DHT a través del 3α-diol. **1.** CYP11A1, **2.** CYP17, **3.** 3βHSD, **4.** 17HSD3, **5.** 5α-reductasa 2, **6.** 5α-reductasa 1, **7.** AKR1C1/2, **8.** AKR1C3, **9.** AKR1C4, **10.** AKR1C2, **11.** RL-HSD.

La inactivación de T involucra una serie de reacciones como hidroxilación, reducción y conjugación. Al respecto, la 17 $\beta$ -HSD juega un papel importante en la inactivación de T, convirtiendo T en androstendiona y después ser reducida en tres esteroides: androsterona, epiandrosterona y eticolanolona. Estos esteroides son 17-cetoesteroides urinarios secretados después de su conjugación con el ácido glucurónico en el hidroxilo 3.

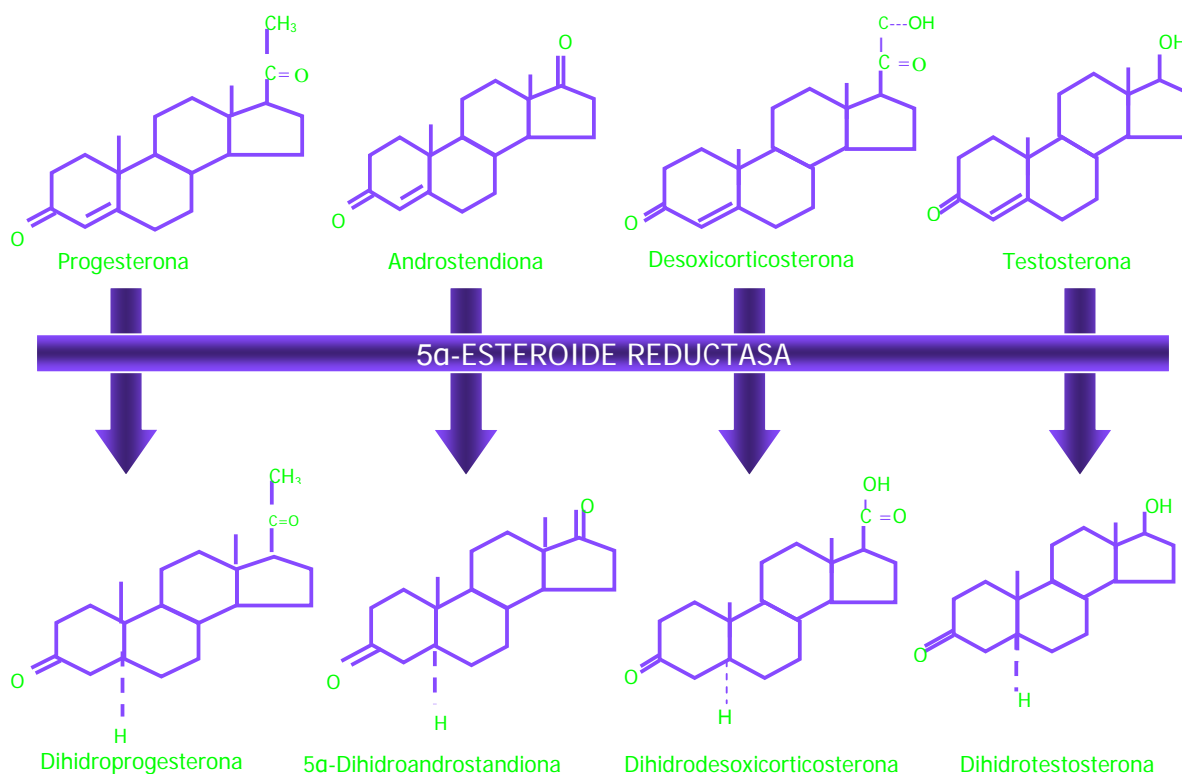
### **5 $\alpha$ -REDUCTASAS**

Las 5 $\alpha$ -reductasas son isoenzimas membranales dependientes de NADPH, que catalizan la reducción de la doble ligadura  $\Delta^4$ - $\Delta^5$  de T, androstendiona, progesterona y otros esteroides  $\Delta^4$ , 3-ceto a sus correspondientes metabolitos reducidos 5 $\alpha$ -dihidro-3-ceto. La reducción en 5 $\alpha$  juega un papel determinante para la acción de los andrógenos a través de la conversión de T a DHT, un esteroide con mayor potencia biológica (Fig. 5 y 6).

La reacción de DHT es irreversible y es mediada por dos isoenzimas codificadas cada una por diferente gen. Las 5 $\alpha$ -reductasas comparten genes estructuralmente similares (Andersson et al., 1991, Thigpen et al., 1993). La actividad y expresión de las 5 $\alpha$ -reductasas ha sido caracterizada en diferentes tejidos reproductivos y periféricos de diversos vertebrados (Normington & Russell, 1992; Thigpen et al., 1993; Hoppe et al., 2006; Urbatzka et al., 2007).

La 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 desempeña un papel importante en el metabolismo de andrógenos en tejidos periféricos como la glándula sebácea, sistema nervioso central y el hígado en donde se propone que los niveles elevados de expresión y actividad podrían estar relacionados a la degradación de T; mientras que la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 desempeña un papel importante en la virilización de los genitales externos y seno urogenital durante la embriogénesis masculina. Los mecanismos moleculares responsables que regulan la expresión génica de estas isoenzimas con respecto al tejido, edad y tipo celular no han sido reportados completamente (Vilchis & Chávez, 2002a).





**Fig. 6.** Biosíntesis de metabolitos reducidos 5 $\alpha$ -dihidro, 3-ceto a partir de compuestos  $\Delta^4$ , 3-ceto. La 5 $\alpha$ -reductasa cataliza esta conversión en tejidos reproductivos (próstata, epidídimo) y periféricos (hígado, sistema nervioso central).

Hace ya más de tres décadas, varios reportes sobre el metabolismo de esteroides, sugirieron la existencia de varias 5 $\alpha$ -reductasas en tejidos reproductivos y periféricos de mamífero (McGuire & Tomkins, 1960; McGuire et al., 1960; Anderson & Liao, 1968; Jaffe, 1969; Martini, 1982; Thigpen et al., 1993). En la actualidad, únicamente se han identificado dos isoenzimas con propiedades bioquímicas y farmacológicas diferentes, y cuya estructura primaria fue determinada a partir de sus respectivos cDNA (Russell & Wilson, 1994). Las características funcionales de las isoenzimas tipo 1 (SRD5A1) y tipo 2 (SRD5A2) han sido estudiadas en humano, rata y mono ya que en otras especies su secuencia es conocida solo parcialmente (Russell & Wilson, 1994, Levy et al., 1995). Sin embargo, recientemente se ha reportado la identificación de un nuevo gen localizado en el cromosoma 4q12 el cual codifica para una 5 $\alpha$ -reductasa, esta enzima biotransforma *in vitro* DHT a partir de T y ha sido denominada como 5 $\alpha$ -reductasa tipo 3 (SRD5A3). Esta isoenzima fue detectada en células de cáncer prostático hormono-refractario (HRPC), en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata y tejidos periféricos (Uemura et al., 2008). Los resultados obtenidos demuestran que la 5 $\alpha$ -reductasa 3 está asociada con la producción de DHT y mantenimiento de la activación a través del complejo AR-andrógenos en células HRPC.

## 5 $\alpha$ -REDUCTASA TIPO 1

La 5 $\alpha$ -reductasa 1 humana (EC 1.3.99.5) es una proteína hidrofóbica de 259 aminoácidos y peso molecular de 29,462 Da. Su expresión ha sido detectada en células de piel y del cuero cabelludo, además se ha reportado su localización en el tracto urogenital, respiratorio, gastrointestinal, sistema nervioso central, sistema endocrino y placenta (Tabla 1). En el feto esta isoenzima no ha sido detectada, mientras que en el recién nacido es expresada transitoriamente en la piel y en cuero cabelludo; en la pubertad es permanentemente expresada en la piel (Thigpen et al., 1993). En el hígado como en la mayoría de los tejidos, la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 tiene una distribución celular predominantemente nuclear y se encuentra asociada con la matriz nuclear (Aumuller et al., 1996).

El gen que codifica la isoenzima tipo 1 de humano (SRD5A1) se localiza en el cromosoma 5 (banda p15) y estructuralmente está constituido de 5 exones y 4 intrones que abarcan cerca de 35 kb en el DNA. Además un pseudogen (SRD5AP1) que no contiene intrones, ha sido identificado sobre el brazo largo del cromosoma X (Andersson & Russell, 1990). Recientemente, la región 5' del gen 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 de la rata fue clonado y de esta manera se pudo definir su promotor. Esta región presenta todas las características de una isla CpG y presenta numerosos sitios de unión a Sp1. Además mediante ensayos de transfección transitoria se demostró que en esta región el promotor presenta una actividad bidireccional. No obstante estos resultados, la importancia fisiológica de este promotor bidireccional aun no está determinada (Blanchard et al., 2007). La 5 $\alpha$ -reductasa 1 de la rata, exhibe cierta similitud con la isoenzima tipo 1 humana, su estructura está constituida por 5 exones y 4 intrones, que codifican para una proteína de 255 aminoácidos y 26,000 Da de peso molecular (Andersson et al., 1991) y su localización ha sido detectada predominantemente en la membrana nuclear (Moore & Wilson, 1972). Las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 de humano y de rata comparten 60% de identidad en su secuencia de aminoácidos.

Ensayos experimentales en los que el cDNA de la isoenzima tipo 1 a partir de diferentes especies (rata, humano y mono) es transfectado en líneas celulares, muestran una proteína funcional con propiedades cinéticas conservadas, con una  $K_m$  aparente para T de 1-5  $\mu$ M y una  $V_{max}$  de entre 0.7 y 3.6 nmol. La 5 $\alpha$ -reductasa 1 es la isoforma predominante en hígado y piel y a diferencia de la tipo 2, ésta exhibe un pH óptimo básico muy amplio (Vilchis & Chávez, 2002a). Se piensa que en tejidos blanco la isoenzima 1 es regulada por DHT, su principal producto de conversión, no obstante su tipo de regulación no ha sido esclarecido del todo, debido en parte a las variaciones encontradas en tejidos periféricos (Andersson et al., 1991; Normington & Russell, 1992; Viger &

Robaire, 1996). Si bien, se ha sugerido que esta isoenzima podría servir para catabolizar esteroides en tejidos periféricos y que también podría estar involucrada en la producción de sebo y algunas alteraciones fisiológicas, a la fecha se conoce poco del papel funcional de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 en la fisiología animal. De hecho, estudios de genética molecular encaminados a determinar su papel funcional han dado resultados limitados. Los datos obtenidos muestran, por ejemplo, que ratones hembra con una disrupción en el gen *Srd5a1* solo presentan distocia mientras que los machos con el alelo nulo son completamente normales (Mahendroo et al., 1996; 1999). Aun más, estudios recientes indican que los animales con el alelo nulo para ambas 5 $\alpha$ -reductasas presentan un fenotipo casi normal o muy parecido a su contraparte *Srd5a1* [-] (Mahendroo et al., 2001). Estos hallazgos han llevado a considerar al ratón como modelo poco confiable para el estudio de las 5 $\alpha$ -reductasas.

## 5 $\alpha$ -REDUCTASA TIPO 2

La 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 (EC 1.3.1.22) exhibe una afinidad más alta por los substratos  $\Delta^4$ , 3-ceto que la isoenzima 1, además de presentar un pH óptimo ácido muy estrecho (4.5-5.5). La isoenzima 2 se expresa preferencialmente en tejidos reproductivos como la próstata, epidídimo, vesícula seminal, así como en el folículo piloso (Tabla 1). La reductasa tipo 2 se encuentra asociada con el citoplasma perinuclear (Normington & Russell, 1992; Silver et al., 1994b; Vilchis & Chávez, 2002a). Estudios de expresión génica mediante PCR en tiempo real han detectado niveles altos inusuales de expresión del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 en la glándula suprarrenal del ratón; lo que sugiere que la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 está involucrada en la reducción del exceso de esteroides  $\Delta^4$ , 3-ceto en este tejido (como progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides) en sus correspondientes esteroides 5 $\alpha$ -reducidos. La isoenzima tipo 2 exhibe también un tipo de regulación tejido-específico que depende al parecer de los niveles circulantes de andrógenos (George et al., 1991).

El gen de la 5 $\alpha$ -reductasa humana tipo 2 (*SRD5A2*), está localizado en el cromosoma 2 (banda p23) y está constituido por 5 exones separados por 4 intrones que abarcan cerca de 40 kb del DNA. Los mecanismos moleculares responsables de la expresión génica de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 son desconocidos. Sin embargo, recientemente estudios de clonación han demostrado que la región promotora del gen tipo 2 de la rata presenta sitios de unión para Sp1 y Sp3, por lo que estos factores de transcripción pueden formar la base para estudios futuros de regulación transcripcional de este gen (Seenundun & Robaire, 2005).

El SRD5A2 codifica para una proteína de 254 aminoácidos (28,398 Da) con un contenido considerablemente alto de residuos hidrofóbicos (Russell et al., 1994; Wilson et al., 1993). Se sabe que la deficiencia heredada de la 5 $\alpha$ -reductasa 2, resulta en una forma específica de pseudohermafroditismo masculino, en donde los individuos 46,XY afectados, presentan micropene, testículos criptorquídicos e hipospadias con pseudovagina. En esta alteración autosómica recesiva, la conversión de T a DHT está disminuida debido a mutaciones en el gen SRD5A2. El mecanismo por el cual estas lesiones génicas dañan la actividad enzimática parece estar relacionado a una disminución en la afinidad de la enzima, ya sea por el cofactor NADPH o por el sustrato (Russell & Wilson, 1994; Vilchis et al., 1997a, b; Chávez et al., 2000). El análisis de las propiedades cinéticas de las 5 $\alpha$ -reductasas, indica que la isoenzima tipo 2 tiene una  $K_m$  aparente para T, progesterona y androstendiona, de 12 a 44 veces más baja que la tipo 1. Así los patrones de distribución tisular y las diferentes afinidades de las isoenzimas sugieren que la isoenzima 2 desempeña un rol anabólico en el metabolismo de los andrógenos y otros esteroides  $\Delta^4$ , 3-ceto (Russell et al., 1994).

El porcentaje de identidad para las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 es de aproximadamente del 70% y para las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 2 es del 80%. Cuando las dos 5 $\alpha$ -reductasas son comparadas, se observa un 47% de identidad entre ellas (Russell & Wilson, 1994). Además de esto, se ha observado que el gen DET2 de *Arabidopsis* comparte aproximadamente un 40% de identidad con la 5 $\alpha$ -reductasa de mamíferos y se ha reportado que este gen es un homólogo funcional de la 5 $\alpha$ -reductasa de mamífero capaz de actuar sobre la progesterona y la T (Li et al., 1997).

HUMANO						
Enzima	Localización	Gen	Talla (aa)	Peso Mol (kDa)	Expresión	pH
5 $\alpha$ -reductasa 1	5p15	SRD5A1	259	29.46	Hígado, piel	Básico
5 $\alpha$ -reductasa 2	2p23	SRD5A2	254	28.39	Epidídimo, próstata	Acídico

RATA						
Enzima	Localización	Gen	Talla (aa)	Peso Mol (kDa)	Expresión	pH
5 $\alpha$ -reductasa 1	1p11-q12	Srd5a1	255	29.0	Hígado	Básico
5 $\alpha$ -reductasa 2	6q13	Srd5a2	254	28.39	Epidídimo	Acídico

**Tabla 1.** Comparación de algunas de las características de las 5 $\alpha$ -reductasas del humano y de la rata.

La regulación de las 5 $\alpha$ -reductasas, ha sido examinada en diversos sistemas biológicos (Silver et al., 1994a; Berman et al., 1995). Con base en reportes previos, en la actualidad se acepta que la expresión de las 5 $\alpha$ -reductasas es regulada por andrógenos en forma diferencial en un número de tejidos y especies. Sin embargo, la interpretación de los datos reportados en estudios pioneros, se complicó debido a la existencia de dos isoenzimas que catalizan la misma reacción; así, en la mayoría de los casos se asumió que solamente una actividad enzimática estaba siendo determinada. Los estudios posteriores se han enfocado básicamente a establecer en qué tejidos y tipos celulares se expresa una u otra isoenzima y el impacto de la manipulación hormonal sobre la expresión.

En los últimos años, ha existido un interés en comprender los mecanismos de regulación controlados por andrógenos. Al respecto, se han realizado una serie de estudios bioquímicos y de análisis mutacional de dos genes directamente relacionados, como lo son el AR y el SRD5A2 (Vilchis et al., 1997a, b, 2003; Chávez et al., 2000; Canto et al., 1997). El AR presumiblemente está regulando la actividad del SRD5A2, sin embargo, se han encontrado ciertas inconsistencias en lo referente a sus respectivas regulaciones, y que no se han podido llegar a comprender del todo. Por ejemplo, se ha observado que en fibroblastos mutantes de pacientes con resistencia completa a los andrógenos, en los que el AR no es funcional, la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa es completamente normal. Si se ha observado que la T y/o la DHT regulan a través del AR tanto la actividad del AR como de la 5 $\alpha$ -reductasa se esperaría una desregulación funcional en los fibroblastos mutantes, lo cual no ocurre. En contra parte, observaciones hechas en fibroblastos mutantes con lesiones génicas inactivantes del SRD5A2, muestran que la actividad de unión del AR en estas células es prácticamente idéntica a la de células normales. Más recientemente el hallazgo de que fibroblastos derivados de piel de área genital de pacientes con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2, desarrollan una actividad enzimática normal no atribuible a la isoenzima 1, y que los niveles del mRNA de las isoenzimas 1 y 2 son igualmente detectados, ha llevado a reconsiderar la idea de una regulación tejido-específica para estos genes, y que el estatus hormonal y otros factores tejido-específicos intervienen en el control de su actividad. Debido a las limitaciones, anteriormente descritas, que ofrece el modelo del fibroblasto humano normal y mutante para realizar estudios más amplios sobre regulación de 5 $\alpha$ -reductasa, en este proyecto se plantea la posibilidad de abordar este problema implementando una estrategia alterna al utilizar como modelo experimental a la HG del hámster Sirio, la cual ha mostrado ser altamente sensible a la manipulación androgénica. En estudios bioquímicos previos, hemos observado que esta glándula exhibe un marcado dimorfismo sexual en términos de actividad esteroidogénica y respuesta a andrógenos (Vilchis et al., 1992, 1994, 1996). A diferencia de lo reportado en otras especies, se ha encontrado que la glándula del hámster expresa al

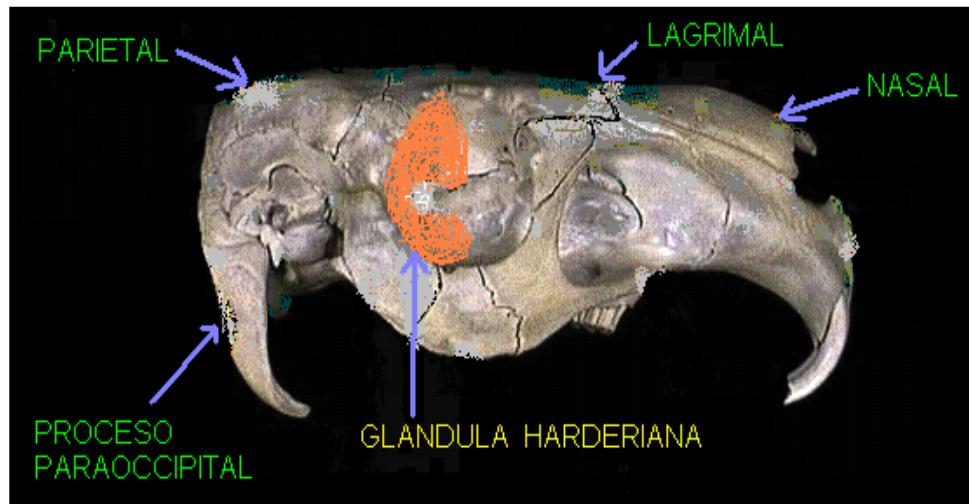
parecer una sola actividad de 5 $\alpha$ -reductasa. Adicionalmente, esta actividad enzimática muestra un tipo de regulación a la baja (down regulation), que es distinta a la autorregulación (feed-forward regulation) descrita en otras especies. En este caso la castración del macho resulta en un incremento gradual en la actividad enzimática, mientras que la administración de T, DHT, 3 $\alpha$  y 3 $\beta$ -androstanoles en machos castrados, induce una disminución significativa en la actividad de la isoenzima. Lo más notable de la isoenzima del hámster, es que su actividad catalítica se desarrolla aún en ausencia de NADPH exógeno y a un pH ácido estrecho (Vilchis et al., 1994). Estas características, no encontradas en otras especies, hacen de la HG del hámster un modelo único y atractivo para estudiar los elementos que intervienen en la reducción irreversible de T. Hasta ahora, no existen estudios que evalúen los elementos que intervienen en la regulación de las 5 $\alpha$ -reductasas. En la literatura existen reportes sobre modelos experimentales que no dejan clara la perspectiva en cuanto a la participación local e interacción de los distintos factores que modulan la expresión génica del sistema de la 5 $\alpha$  reducción.

## **GLÁNDULA HARDERIANA**

La glándula de Harder o harderiana (HG) es una estructura túbulo-alveolar localizada en la cavidad ocular de algunos anfibios, reptiles, aves y mamíferos, especialmente aquellos que poseen membrana nictitante (Fig. 7); en algunas ocasiones la HG es más grande que el globo ocular. No obstante su amplia distribución en tetrápodos esta glándula exocrina está ausente en quirópteros, perisodáctilos, carnívoros terrestres y primates; en el mono es una estructura rudimentaria y en el humano es una estructura vestigial en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Estudios de microscopia en la HG de la musaraña y de cetáceos, han demostrado que este tejido está bien desarrollado y presenta similitudes con otras glándulas de mamíferos (Pradidarcheep et al., 2003; Ortiz et al., 2007).

Las funciones de esta glándula son muy diversas y aunque en general se ha sugerido que esta estructura lubrica y humedece la córnea y la nasofaringe; en reptiles se ha descrito que este tejido es un sitio de osmoregulación; en aves se ha reportado que esta glándula actúa como un sitio de respuesta inmune; mientras que en muchos mamíferos funciona como una fuente productora de feromonas (Payne, 1994); fotoprotección y fotorecepción mediante la producción exocrina de porfirinas (Wetterberg et al., 1970). Además de todo esto, diversos reportes han propuesto a esta glándula como una parte integral de un eje conformado por la retina-pineal-HG-gónada (Wetterberg et al., 1970; Reiter & Klein, 1971). Recientes estudios han sugerido la posibilidad de que este tejido puede sintetizar hormonas esteroideas a partir del colesterol como ocurre en tejidos periféricos

(Vilchis et al., 2002b). No obstante esto, se conoce muy poco acerca de los factores que regulan su función, aunque al respecto se ha reportado que la biosíntesis de porfirinas, lípidos e indolaminas está regulada por factores endocrinos.



**Fig. 7.** Localización esquemática de la HG en el área ocular del hámster.

En algunos roedores y específicamente en el hámster, la HG ha sido utilizada como modelo para estudiar los efectos de las hormonas gonadales sobre la estructura y la actividad en la HG. En esta especie la HG exhibe un marcado dimorfismo sexual a nivel morfológico y molecular caracterizado por presentar 2 tipos celulares epiteliales en el macho denominados tipo I y tipo II (el tipo celular epitelial I se caracteriza por presentar pequeñas vacuolas secretoras de lípidos y el tipo celular II presenta grandes vacuolas secretoras de lípidos) y un solo tipo celular en la hembra denominado tipo I. La HG del macho presenta un complejo politubular derivado del retículo endoplasmático liso mientras que en la hembra este complejo politubular está ausente; los cuerpos lamelares derivados del retículo endoplasmático rugoso están presentes en la HG de la hembra y ausentes en la del macho; la HG de la hembra presenta 40 veces más mastocitos que la HG del macho; (Payne et al., 1982; 1992); así mismo, la concentración de sodio, manganeso y calcio es menor en el macho que en la glándula de la hembra, mientras que el hierro y molibdeno se encuentra más elevado en el macho (Hoffman & Jones, 1981); existe una hemoproteína de 156 kDa en el macho y que está ausente en la hembra (Vilchis et al., 1996); los niveles de porfirinas y la actividad de las enzimas porfirinogénicas son más elevadas en la glándula de la hembra que en la del macho (Hoffman, 1971; Thompson et al., 1984; Rodríguez et al., 1993). En general, existe una



tendencia en la HG de algunos roedores caracterizada por la presencia de altas concentraciones de porfirinas en las hembras y bajas concentraciones de porfirinas en los machos (Shirama et al., 1981; Johnston et al., 1983; 1985; Thompson et al., 1984), la actividad enzimática para la formación de melatonina es más elevada en la hembra que en el macho (Menéndez-Pelaez & Buzzell, 1992) y por último la actividad enzimática de la 5 $\alpha$ -reductasa es más elevada en la hembra que en el macho (Vilchis et al., 1994). Se ha observado que en la HG del hámster macho castrado la actividad de 5 $\alpha$ -reductasa incrementa gradualmente y transcurrido el tiempo alcanza valores similares a la actividad de la hembra intacta; mientras que la administración de andrógenos (T y DHT) a hembras ovariectomizadas durante varios días consecutivos reduce la actividad enzimática de 5 $\alpha$ -reductasa hembra (Vilchis et al., 1994).

En general, se ha determinado que estas marcadas diferencias sexuales son reguladas de manera androgénica. Al respecto se ha observado que la gonadectomía en machos suprime este dimorfismo sexual y la HG masculina se feminiza, mientras que la administración de andrógenos (como T, DHT y  $\Delta^4$ -androstendiona) puede prevenir esta feminización glandular (Payne & cols., 1975). Por otro lado, se ha reportado que en la hembra, la ovariectomía no genera masculinización de la HG (Hoffman, 1971; Spike & cols., 1985) y sus efectos son menos dramáticos sobre la actividad y estructura de la HG (Spike & cols., 1986), no obstante esto, cuando se les administra T a las hembras, la HG adquiere características de la glándula masculina (Sun & Nadakavukaren, 1980; Spike & cols., 1985). El efecto de los andrógenos y la localización del AR en la HG del hámster (Vilchis et al., 1992) directamente sugieren una influencia androgénica sobre este tejido. De acuerdo a estos antecedentes, el objetivo inicial de este estudio es el de aislar el cDNA de la o las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster, esto con la finalidad de determinar su secuencia nucleotídica, verificar si estas secuencias codifican para una proteína con actividad de 5 $\alpha$ -reducción, diseñar sondas específicas y posteriormente analizar la expresión génica de estas enzimas en la HG del hámster.

## **HIPÓTESIS**

La 5 $\alpha$ -esteroide reductasa tipo 1 y tipo 2 es diferencialmente expresada en la HG del hámster macho y hembra.

### **OBJETIVO GENERAL**

Aislar el cDNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster y determinar la isoforma dominante en la HG

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de una o ambas 5 $\alpha$ -reductasas.

Determinar la actividad enzimática mediante estudios de transfección transitoria en líneas celulares eucariontes transfectadas con el o los cDNAs insertados en vectores de expresión, midiendo la conversión de T a DHT y establecer las propiedades cinéticas en cada caso.

Generar sondas para determinar si la expresión de la o las 5 $\alpha$ -reductasas presenta un patrón sexual dimórfico en los diferentes tejidos bajo distintas condiciones endocrinas (p. Ej. Gonadectomizados, ciclo estral).

Complementario al punto anterior, analizar mediante ensayos de northern blot y RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), si el tipo de regulación (a la alta o a la baja) de los mRNA para la o las 5 $\alpha$ -reductasas se encuentra bajo control hormonal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ANIMALES Y TEJIDOS

Se utilizaron hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*), hembras y machos adultos intactos (5 animales por condición fisiológica), los cuales fueron mantenidos en condiciones de luz: 12 h, oscuridad: 12 h, con agua y alimento *ad libitum*. Cuando fue necesario, se castraron bajo anestesia con éter. Se utilizaron hámsters macho de 7, 42 y 60 días de castración, machos castrados de 7 días y tratados durante 7 días con T (1 mg/50  $\mu$ l), hembras ovariectomizadas de 7 días. Además se utilizaron hembras ovariectomizadas de 7 días y tratadas durante 7 días con T (1 mg/50  $\mu$ l), 17 $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ g/ $\mu$ l), progesterona (1 mg/50  $\mu$ l) y estradiol (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) más progesterona (1 mg/50  $\mu$ l). En 20 hembras, se estableció la fase del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) mediante frotis vaginal. Los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se obtuvieron los diferentes tejidos, los cuales se limpiaron en papel filtro y se congelaron sobre hielo seco. Estos se usaron inmediatamente o se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Los tejidos se pesaron y se les agregó 1 ml de TRizol reagent (Invitrogen, Life technologies, Grand Island, NY) por cada 50 mg de tejido. Los tejidos fueron homogenizados en un politrón (Brinkmann Instruments Co) y los homogenados se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (TA); al término de la incubación se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de solución inicial. Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 12000 xg durante 15 min a 4°C, se obtuvo la fase acuosa y se le adicionaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de solución inicial. Las mezclas se dejaron reposar durante 10 min a TA y se centrifugaron a 12000 xg durante 10 min a 4°C, al terminar la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de solución inicial. Se centrifugó a 12000 xg durante 10 min a 4°C y al terminar se desechó el sobrenadante y se permitió que se evaporara el etanol remanente. El RNA precipitado se disolvió en H<sub>2</sub>O dd tratada con DEPC (0.1%) y se cuantificó espectrofotométricamente.

### PREPARACIÓN DE cDNA

Se utilizó el estuche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis para preparar el cDNA (Roche). Para efectuar la reacción se preparó una mezcla de RNA (1-3  $\mu$ g), 1  $\mu$ l de Oligo (dT)<sub>12-18</sub>

(0.5 µg/µl) y se llevó a 13 µl con H<sub>2</sub>O dd tratada con DEPC. Las reacciones se incubaron a 65°C durante 10 min, se colocaron en hielo y se agregaron 7.0 µl de la siguiente mezcla: 4 µl de solución Transcriptor RT 5X, 0.5 µl de Protector RNase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl de Deoxynucleotide Mix (10 mM) y 0.5 µl de Transcriptor Reverse Transcriptase. Las reacciones se incubaron a 55°C durante 30 min, se inactivaron a 85°C durante 5 min y se colocaron en hielo. Se colectó la reacción por centrifugación. Las reacciones se colocaron en hielo y se almacenaron a -20°C.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones se efectuaron mezclando solución de reacción de Perkin Elmer (MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8.3 10 mM), mezcla de dNTPs 25 µM, oligonucleótido cebador 5' 1.5 µM específico para la 5α-reductasa tipo I y II, oligonucleótido cebador 3' 1.5 µM específico para la 5α-reductasa tipo I y II, dimetil sulfóxido (4% v/v), 2.5 U de Taq (DNA) polimerasa (Ampli-Taq) y 1.5 µl de cDNA, llevadas a un volumen total de 25 µl con H<sub>2</sub>O dd. Las muestras fueron colocadas en un termociclador Perkin Elmer modelo 480 con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 30 seg a 80°C, 90 seg a 94°C; 25 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a la temperatura específica del oligonucleótido, 45 seg a 72°C y 1 ciclo de 45 seg a 94°C, 45 seg a la temperatura específica del oligonucleótido y 3 min a 72°C. Alícuotas de 5 µl de los productos de PCR mezclados con 3 µl de solución de carga [azul de bromofenol 0.25% (p/v), xilen cianol 0.25% (p/v), Ficoll 400 15% (p/v) en H<sub>2</sub>O dd] se depositaron en geles de agarosa al 1% (1 g de agarosa disuelta en 100 ml de TBE 1X [Tris 0.045 M, ácido bórico 0.045 M, EDTA 0.001 M pH 8]) con 1 µl de bromuro de etidio y se corrieron a 100 volts usando como solución de corrida TBE 1X. Los geles se observaron en un transiluminador y se tomaron fotos.

### Oligonucleótidos utilizados para aislar el cDNA de la 5α-reductasa tipo 1

5'-CAC/T ATC/T CTA/G AGG AAT CTG/C A/CGA AAC-3'

5'-ACT TG/TG GA/GT AA/CT CTT CAA AC/TT TC-3'

5'-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3'

5'-AGT GTA TTC ATA CAG CGG CCA AGC CAT-3'

5'-CAG CAT CAC CAG TGG TAC CAT GAG-3'

5'-GCT GTA ACG ATA CGC TAC GTA ACG-3'

5'-GCA CGC TGC TCG ACC TCA ACT-3'

5'-CCC ATT TGT GCT TTA ACT GCT TT-3'

---

**Oligonucleótidos utilizados para aislar el cDNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2**


---

5'-GTG CTG GCA GGC/T AGC GCC ACA/T TTG G-3'  
 5'-GCT GGG AG/CG GAC CAA/C GTA/G GCC AA/GG-3'  
 5'-CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA-3'  
 5'-GTG TTT CCC ATA GCT GGT GGG TTT-3'  
 5'-GGT GGC TTG TTT AAG TAT GTC TCC G-3'  
 5'-GCT GTA ACG ATA CGC TAC GTA ACG-3'  
 5'-GAG CAA GCT TCT ACG GGA AAA C-3'  
 5'-GCT ACT CCT TAT AGA AGC TTC TCC-3'

---

### **PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR**

Cuando fue necesario se purificaron los productos de PCR, se prepararon 3 reacciones de 25  $\mu$ l cada una, las cuales se reunieron y aplicaron en un gel preparativo de agarosa al 1%. Se corrió la electroforesis, se visualizaron las bandas en un transiluminador y se cortaron con un bisturí. Las bandas se electroeluyeron en TBE 1X usando bolsas de diálisis (Spectra). El eluido se depositó directamente en columnas Centricon® 30 (Amicom Bioseparations, Millipore) y se llevó a un volumen de 2 ml con H<sub>2</sub>O dd. Las columnas se centrifugaron a 6600 xg durante 30 min a 4°C, al terminar se agregaron otros 2 ml de H<sub>2</sub>O dd y se centrifugó en las mismas condiciones. La columna se invirtió sobre un tubo cónico y se centrifugó a 2000 xg durante 5 min a 4°C. El producto obtenido se cuantificó espectrofotométricamente y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

### **AMPLIFICACIÓN DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' MEDIANTE RACE (RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS)**

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el estuche GeneRacer de Invitrogen [For full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RLM-RACE), Carlsbad CA]. El RNA usado se verificó que no estuviera degradado en un gel de agarosa y se efectuaron los siguientes pasos:



### 1) Desfosforilación del RNA

Se preparó la siguiente reacción en un tubo de 0.5 ml: 4 µg de RNA total, 1 µl de solución CIP 10X, 1 µl de RNase OUT™ (40 U/µl) y 1 µl de CIP (10 U/µl). Se llevó a un volumen final de 10 µl con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC y se mezcló suavemente por pipeteo, se incubó a 50°C durante 1 h. Al término de la incubación las reacciones se centrifugaron y se colocaron sobre hielo.

### 2) Precipitación del RNA

Se adicionaron 90 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, 100 µl de fenol:cloroformo (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico [25:24:1] y 0.1% de 8-hidroxiquinoleína), se agitó vigorosamente durante 30 seg y se centrifugó a máxima velocidad (micro centrifuga) por 5 min a TA. La fase acuosa (sobrenadante) fue transferida a otro tubo y se le adicionaron 2 µl de mussel glycogen (10 mg/ml en H<sub>2</sub>O tratada con DEPC), 10 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se mezcló. Se adicionaron 220 µl de etanol al 95% y se agitó. Las muestras fueron colocadas sobre hielo por 10 min. Las reacciones se centrifugaron (microcentrifuga) a máxima velocidad durante 20 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 500 µl de etanol al 75% y se mezcló por inversión. Se centrifugó (microcentrifuga) a máxima velocidad durante 2 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante por pipeteo y se retuvo el precipitado. Se centrifugó en condiciones similares a las anteriores, se eliminó el sobrenadante por pipeteo y se retuvo el precipitado. El exceso de etanol del precipitado fue eliminado usando aire seco o vacío por 2 min a TA, el precipitado fue resuspendido en 7 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.

### 3) Eliminación del Cap del mRNA

Se preparó la siguiente reacción: 6 ó 7 µl de RNA desfosforilado, 1 µl de Solución TAP 10X, 1 µl de RNaseOUT™ (40 U/µl) y 1 ó 2 µl de TAP (0.5 U/µl) para un volumen final de 10 µl. La reacción se mezcló brevemente y se incubó a 37°C durante 1 h. Al término de la incubación la reacción se colocó sobre hielo. El RNA se precipitó como anteriormente se describió.

### 4) Ligación del RNA oligo al mRNA sin el Cap

Se adicionaron 7 µl de RNA desfosforilado y sin el Cap, al tubo que contiene el prealícuotado liofilizado GeneRacer™ RNA oligo (0.25 µg). Se pipeteo varias veces para mezclar y resuspender el oligonucleótido. La reacción se incubó a 65°C durante 5 min para relajar la estructura secundaria del RNA. Al término de la incubación se colocó sobre hielo por 2 min. A la reacción anterior se le adicionó lo siguiente: 1 µl de solución ligase 10X, 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl de RNaseOut™ (40 U/µl) y 1 µl de T4 RNA ligase (5 U/µl) para un volumen final de 10 µl. La

reacción se mezcló brevemente y se incubó a 37°C durante 1 h. Al término de la incubación se colocó sobre hielo. El RNA se precipitó como se describió anteriormente.

### 5) Transcripción reversa del mRNA

Se adicionó 1 µl del oligonucleótido específico (Gene Racer Oligo dT Primer) al RNA ligado (10 µl) y 1 µl de dNTPs 25 mM de cada uno, se incubó a 65°C durante 5 min y se colocó sobre hielo durante 2 min. Se adicionaron los siguientes reactivos al RNA ligado y al Gene Racer Oligo dT Primer para iniciar la reacción de transcripción reversa: 4 µl de solución RT 5X, 1 µl AMV-RT (15 U/µl), 1 µl de RNase OUT™ (40 U/µl) y se llevó a un volumen final de 20 µl con H<sub>2</sub>O dd. La reacción se incubó a 45°C por 1 h y a 85°C por 15 min para inactivar la AMV-RT, se centrifugó brevemente y se usó inmediatamente para la amplificación por PCR. La amplificación de los extremos del cDNA se llevó a cabo por PCR de la siguiente manera:

Para la amplificación del extremo 5' del cDNA se adicionaron 5 µl de solución de reacción (MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.3), 1 µl de mezcla de dNTPs 25 mM, 3 µl oligonucleótido GeneRacer 5' 10 µM, 1 µl oligonucleótido específico del gen 5' 1.5 µM, 2 µl de dimetil sulfóxido (4 % v/v), 2.5 U de Taq (DNA) polimerasa (Ampli-Taq) y 2 µl de templete de RT llevadas a un volumen total de 50 µl con H<sub>2</sub>O dd. Para la amplificación del extremo 3' del cDNA se utilizaron las mismas condiciones anteriores con la excepción de que se utilizó el oligonucleótido GeneRacer 3' 10 µM. Las reacciones fueron colocadas en un termociclador Perkin-Elmer modelo 480 con las siguientes condiciones: un ciclo de 2 min a 94°C; 5 ciclos de 30 seg a 94°C y 1 min a 72°C; 5 ciclos de 30 seg a 94°C y 1 min a 70°C; 25 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 65°C y 1 min a 72°C y por último un ciclo de 10 min a 72°C. Al finalizar la reacción de PCR las muestras se analizaron en un gel de agarosa con bromuro de etidio.

### SECUENCIACIÓN

Las reacciones se realizaron con el estuche de secuenciación de USB Corporation (OH, USA). Estas reacciones contenían desoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) en una concentración de 0.75 µM cada uno; didesoxinucleótidos marcados radiactivamente [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] (ddGTP, ddATP, ddTTP ó ddCTP) 0.225 µCi de cada uno; cDNA purificado (100 ng); oligonucleótido cebador (16 pmol); termosecuensasa DNA polimerasa (8 U); todo lo anterior en una solución Tris-HCl 26 mM pH 9.5 y MgCl<sub>2</sub> 6.5 mM. El volumen final fue de 20 µl el cual se alcanzó con H<sub>2</sub>O dd. Las reacciones fueron sometidas a ciclos de 80°C durante 30 seg, 94°C/90 seg; 30

ciclos de 94°C/45 seg, 58°C/45 seg; 72°C/45 seg y un último ciclo con las mismas condiciones anteriores pero con la última temperatura de 72°C durante 3 min. Al terminar las reacciones, se adicionaron a cada tubo 4 µl de solución para detener la reacción (formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y cianol xileno FF al 0.005%). Las muestras se calentaron a 70°C por 5 min y posteriormente se llevaron a hielo por 5 min. Se prepararon geles de acrilamida-urea al 6% (Acrilamida 5.7 g, Bisacrilamida 0.3 g, Urea 42 g, TTE 10X 10 ml en 100 ml de H<sub>2</sub>O dd, 1 ml de persulfato de amonio al 10% y 25 µl de TEMED), se dejaron polimerizar al menos 1 h. Los geles acrilamida-urea se montaron en cámaras de electroforesis, se usó como solución de corrida TTE 1X (TTE 10X; Tris base 108 g, Taurina 36 g, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 2 g, llevadas a 1 L con H<sub>2</sub>O dd) y se precalentaron a 1800 V hasta alcanzar 50°C. Se depositaron 3 µl de cada muestra. Se corrió la electroforesis a 1800 V. Los geles se transfirieron a papel 3 MM, y se secaron durante 60 min a 75°C con vacío (Savant). Los geles adheridos al papel 3 MM se expusieron a placas de rayos X, [Bio Max-MR, (Kodak)] en cartuchos con pantallas intensificadoras. Se dejaron a TA de 12 a 16 h y se revelaron las placas. Se analizó la secuencia.

### CLONACIÓN DEL cDNA DE LAS 5 $\alpha$ -REDUCTASAS

Para la clonación de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster, se preparó inicialmente un PCR utilizando dos oligonucleótidos específicos a partir de cada 5 $\alpha$ -reductasa aislada (para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 5'-GCA CGC TGC TCG ACC TCA ACT-3' y 5'-AAA GCA GTT AAA GCA CAA ATG GG-3') (para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 5'-AGC TGT GAA CAC CGG CGA GAT-3' 5'-TTA CAG TTG ATA GTC TCG GCA GCT GGG-3'). Las reacciones de clonación se llevaron a cabo utilizando el estuche TOPO Cloning pc DNA 3.1/CT-GFP-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Life Technologies).

La transformación celular TOPO cloning se llevó de la siguiente manera: se mezclaron 4 µl del cDNA de cada 5 $\alpha$ -reductasa, 1 µl de solución salina (NaCl 1.2 M; MgCl<sub>2</sub> 0.06 M), 1 µl del vector TOPO (10 ng/µl de plásmido en: glicerol al 50%, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, Tritón X-100 0.1%, BSA 100 µg/ml y rojo de fenol). La mezcla se incubó 5 min a TA y se colocó sobre hielo. Se adicionaron 2 µl de la reacción TOPO cloning a una estirpe de células competentes [One shot chemically competent *E. coli*], se mezcló suavemente y se mantuvo 20 min sobre hielo. Las células se calentaron a 42°C durante 30 seg sin agitación e inmediatamente se transfirieron a hielo. Se adicionaron 250 µl de medio SOC (Tripton al 2%, Extracto de levaduras al 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM) a TA. Los

tubos se agitaron a 200 rpm (Brinkmann incubator 1000 orbimix 1010, Germany) durante 1 h a 37°C. Se sembraron de 25-250 µl de células transformadas en cajas petri con medio Luria-Bertani-Agar (5 g de Bacto-yeast extract, 10 g de peptona, 10 g de NaCl, 15 g de bacto agar, llevar a pH 7 y llevar a 1 L con H<sub>2</sub>O dd) y se incubaron toda la noche a 37°C. Como control se usaron placas con o sin antibiótico (100 µg/ml de ampicilina) con o sin bacterias. Se eligieron 10 colonias para cultivar en medio líquido y obtener el plásmido.

## PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

Se inocularon 5 ml de medio LB con una sola colonia bacteriológica por tubo. Se incubaron toda la noche a 37°C con agitación. Al terminar la incubación se tomaron 1.5 ml de medio y se centrifugaron 20 seg a TA a velocidad máxima (micro centrífuga), se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 100 µl de solución GTE (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, esterilizar por autoclave y almacenar a 4°C) y se dejó reposar 5 min a TA. Se adicionaron 200 µl de solución NaOH/SDS [NaOH 0.2 N, dodecil sulfato de sodio (SDS) 1% p/v], se mezcló con agitación suave y se colocó sobre hielo durante 5 min. Se adicionaron 150 µl de solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8, se agitó durante 2 seg y se colocó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a velocidad máxima (micro centrífuga) durante 3 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo y se mezcló con 0.8 ml de etanol al 95%, se mantuvo en reposo 5-10 min a TA para precipitar los ácidos nucleicos, se centrifugó a velocidad máxima (micro centrifuga) por 1 min a TA, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El precipitado fue resuspendido en TE (30-50 µl) y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Los plásmidos se digirieron a 37°C durante 2 h [2.5 µl de solución 1X (Tris HCl 10 mM pH 7.5, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, tritón X-100 al 0.002 %, BSA 200 µg/ml y glicerol al 50%), 4 µl de DNA plasmídico, 15 U de Kpn I (10U/µl) para la 5α-reductasa tipo 1, 15 U de Sma I (10 U/µl) para la 5α-reductasa tipo 2 y se llevó a 20 µl con H<sub>2</sub>O dd]. Para verificar la orientación del inserto se preparó un PCR utilizando dos oligonucleótidos específicos, uno del plásmido T7 y otro del fragmento clonado (REVR1 para la tipo 1 y R2MR para la 5α-reductasa tipo 2). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Se seleccionaron las colonias que tuvieran el inserto orientado adecuadamente.

Una alícuota de 1 ml de cada clona comprobada, se inoculó en 500 ml de medio LB/ampicilina y se incubó toda la noche en agitación (200 rpm) a 37°C. El medio con el cultivo bacteriano se centrifugó a 2000 xg durante 10 min a TA, el precipitado se resuspendió en 3 ml de

TES (Tris-base 10 mM pH 7.8, EDTA 1 mM, glucosa 50 mM), se adicionó 1 ml de lisozima (8 mg/ml en TES pH 8) y se dejó en reposo a 4°C durante 10 min. Se agregaron 6 ml de solución (SDS 1%/NaOH 0.2 N) y se dejó en reposo en hielo 10 min, posteriormente se agregaron 4.5 ml de acetato de potasio 5 M pH 4.8 y se dejó en hielo 10 min más. La mezcla se centrifugó a 19000 xg durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos corex, se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12000 xg 20 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%, se centrifugó a 12000 xg durante 10 min, se tiró el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a TA durante 10 min. Se agregaron 4.5 ml de TE y se resuspendió el precipitado, se agregaron y disolvieron 4.5 g de CsCl y 0.45 ml de bromuro de etidio (1 mg/ml). La solución se centrifugó a 3000 xg durante 10 min a TA. El sobrenadante se depositó en tubos de ultra centrifuga y se centrifugaron a 322000 xg durante 18 h a 20°C. Al terminar la centrifugación, se visualizaron dos bandas mediante luz UV, se colectaron punzando el tubo con agujas del #18 y se depositaron en tubos corex. Se extrajo el bromuro de etidio de las muestras con 4 volúmenes de N-butanol (saturado con TE) y se repitió la extracción hasta quedar una solución incolora (4 o 5 veces). Se adicionaron 3 volúmenes de TE, se mezcló, se agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol y se dejó en reposo a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 12000 xg durante 20 min a 4°C, se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 12000 xg durante 30 min a 4°C. El precipitado se dejó secar durante 25 min y se resuspendió en 0.5 ml de TE. Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente y analizadas en un gel de agarosa con bromuro de etidio. Se realizó una restricción con 1.5 µl de Kpn I, 1.5 µl de Sma I, 4 µl del plásmido, 2 µl de solución 1X (Tris HCl 10 mM pH 7.5, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, tritón X-100 al 0.002 %, BSA 200 µg/ml y glicerol al 50%), se llevó a un volumen total de 20 µl con H<sub>2</sub>O dd. Se incubó durante 1 h a 37°C y se analizaron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

## **TRANSFECCIÓN DEL cDNA DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA TIPO 1 Y TIPO 2**

Se sembraron 1,700,000 células HEK-293 24 h antes de la transfección en cajas petri de 10 cm, las cuales contenían 7 ml de DMEM (Invitrogen) más suero fetal de ternera al 10% (SFT). Para cada transfección se adicionaron 4 ml de DMEM más SFT al 10%. En un tubo eppendorf de 1 ml se adicionaron 2.5 µg de DNA plasmídico conteniendo 0.5 ml de DMEM. En otro tubo eppendorf se adicionaron 20 µl de lipofectamina<sup>tm</sup> 2000 (Invitrogen) conteniendo 0.5 ml de DMEM y se incubaron durante 5 min a TA. Al termino de la incubación, se mezcló el DNA plasmídico con la lipofectamina (volumen total de 1 ml) y se incubaron durante 20 min a TA. La mezcla se adicionó a las células, las cuales fueron incubadas a 37° durante 4 h en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al finalizar la

incubación el medio fue cambiado por DMEM más SFT al 10% y se continuo incubando en las mismas condiciones durante 18-48 h.

### ACTIVIDAD DE 5 $\alpha$ -REDUCTASA EN CÉLULAS HEK-293

Las células HEK-293 se obtuvieron utilizando un policía 48 h después de finalizada la transfección. Las células fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el pellet celular fue resuspendido en 1.2 ml de SSI. Las células se sonicaron 3 veces durante 5 seg a 4°C.

Para calcular la actividad catalítica óptima en función del pH para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2, se hizo la siguiente mezcla: 90  $\mu$ l del sonicado celular en un rango de pH de 4.5-9 usando solución Tris-Citrato 0.1 M, NADPH 0.5 mM, 0.5  $\mu$ Ci de [ $^3$ H]T y T no radiactiva 1  $\mu$ M.

Para determinar las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ , el sonicado celular para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 fue incubado de la siguiente manera: 90  $\mu$ l del sonicado celular a un pH de 7 usando solución Tris-Citrato 0.1 M, NADPH 0.5 mM, 0.5  $\mu$ Ci de [ $^3$ H]T y T no radiactiva en un rango de 0.125-32  $\mu$ M.

Para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 el sonicado celular fue incubado de la siguiente manera: 90  $\mu$ l del sonicado celular a un pH de 5.5 usando solución Tris-Citrato 0.1 M, NADPH 0.5 mM, 0.5  $\mu$ Ci de [ $^3$ H]T y T no radiactiva en un rango de 0.125-32  $\mu$ M.

La mezcla se llevo a un volumen final de 0.2 ml y se incubo a 37°C con agitación continua durante 10 min. Finalizada la incubación, a cada tubo se le adicionó 1 ml de acetato de etilo saturado con SSI. La muestra fue agitada vigorosamente durante 1 min y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a T recuperando la fase orgánica en un solo tubo. La extracción se llevo a cabo tres veces, las muestras fueron evaporadas bajo corriente de nitrógeno. Posteriormente se adicionaron 500  $\mu$ l de metanol. Para medir la recuperación de los esteroides se tomo una alícuota de 10  $\mu$ l y se agregaron a la mezcla 5 ml de líquido de centelleo. La radiactividad fue cuantificada en un contador de centelleo (Packard Tri-Lab 2660). A partir de la medición radiactiva se tomaron 100,000 dpm de los extractos y se depositaron en tubos cónicos a los cuales se les adicionaron 100  $\mu$ l (10  $\mu$ g/5  $\mu$ l) de una mezcla de acarreadores (T, 5 $\alpha$ -androstendiona,  $\Delta^4$  androstendiona, 3 $\alpha$  y 3 $\beta$  androstandiol). Las muestras se dejaron evaporar toda la noche a TA.

Para concentrar los esteroides se adicionó una solución de  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$  (1:1). Los esteroides fueron aplicados con capilares a placas de cromatografía en capa fina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y posteriormente fueron colocados en cámaras de cromatografía saturadas: una con  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (98:2.5) y otra con  $\text{CHCl}_3:(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$  (90:10). Las cámaras se dejaron correr al frente en el primer sistema, se permitió que se secase y se colocó en el segundo sistema. Se dejó correr al frente. Para visualizar los esteroides, la placa fue rociada con una solución que contenía paranisaldehído 0.5 ml, ácido acético 50 ml, ácido sulfúrico 1 ml y se calentó durante 3 min. Los fragmentos correspondientes a cada esteroide fueron recortados y colocados en viales. Se le adicionó 1 ml de etanol a cada vial y se agitó con el vortex. Posteriormente, se adicionaron 5 ml de líquido de centelleo y se agitaron. La radiactividad fue cuantificada en un contador de líquido de centelleo (Packard Tri-Lab 2660). A partir de estos datos se analizó la conversión de T a DHT.

### **ANÁLISIS MEDIANTE NORTHERN BLOT**

Las muestras de RNA (20-30  $\mu\text{g}$  en 7  $\mu\text{l}$ ) se mezclaron con 13  $\mu\text{l}$  de solución desnaturalizante (10  $\mu\text{l}$  de formamida, 1.0  $\mu\text{l}$  de formaldehído al 37%, 2.0  $\mu\text{l}$  de MOPS 10X [41.8 g de MOPS, 20 ml de acetato de sodio 1 M pH 7 y 20 ml de EDTA 0.5 M; pH 8, llevados a 1000 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  dd, esterilizada por filtración]) y 1  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio (1 mg/ml). Las muestras se calentaron a 85°C durante 10 min a baño maría, al término de la incubación las muestras se depositaron en hielo durante 10 min. A cada muestra se le adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de solución de carga [glicerol al 50% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (p/v), xilen cianol FF 0.25% (p/v), EDTA 10 mM pH 8 en  $\text{H}_2\text{O}$  dd]. Las muestras se depositaron en un gel de agarosa al 1.5% (1.5 g de agarosa, 72 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  dd, 10 ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehído al 37%) y se corrieron a 40 volts durante 4-5 h, usando MOPS 1X como solución de corrida. Al terminar la corrida, el gel se lavó varias veces en  $\text{H}_2\text{O}$  dd y los ácidos nucleicos se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham, UK), usando una solución SSC 10X (87.65 g de NaCl, 44.1 g de citrato de sodio, pH 7 en 500 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  dd, esterilizada en autoclave). Al terminar la transferencia (16-20 h), la membrana se lavó con una solución SSC 2X y se dejó secar a TA (aproximadamente 20 min). Los ácidos nucleicos fueron fijados con luz UV (UV Stratagene 1800, la Jolla CA) (Sambrook & Russell 2001).

## MARCAJE E HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Después de la clonación del cDNA de cada 5 $\alpha$ -reductasa, se elaboraron sondas específicas que se amplificaron mediante PCR y que corresponden a un fragmento de 700 pb de la 5 $\alpha$ -reductasa del hámster. Para el marcaje de las sondas, se usó el estuche RadPrime DNA labeling system (Invitrogen life technologies Carlsbad, CA) y desoxicitidina trifosfato [ $\alpha^{32}$ P] (dCTP), actividad específica 3000 Ci/mmol (Perkin Elmer® Life and Analytical Sciences Boston, MA). Se desnaturalizaron 25 ng de DNA (sonda) en 20  $\mu$ l de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.4), durante 5 min a 95°C y se dejó enfriar, se agregaron 3  $\mu$ l de una mezcla de dATP, dGTP, dTTP (500  $\mu$ M), 20  $\mu$ l de una solución random primer 2.5X, 5  $\mu$ l (~50  $\mu$ Ci) de [ $\alpha^{32}$ P] dCTP, se llevó a 49  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O dd y se agregó 1  $\mu$ l del fragmento Klenow (5 U). Se incubó a 37°C durante 10 min. Se agregaron 5  $\mu$ l de solución de terminación (EDTA 0.5 M pH 8), se desnaturalizó a 95°C durante 5 min, se transfirió rápidamente a hielo y se usó toda la mezcla para hibridar las membranas. Las membranas se pre-hibridaron durante 60 min a 65°C en solución de hibridar (150  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>) [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25M/SDS 7%]. Se cambió la solución de pre-hibridar por una fresca y se agregó la sonda marcada y desnaturalizada. Se hibridó durante 24 h a 65°C. Al finalizar se hicieron varios lavados a la membrana: Un lavado con SSC 2X/SDS 0.1% durante 20 min a TA, un lavado con SSC 1X/SDS0.1% a 65°C durante 15 min y un lavado con SSC 0.1X/SDS0.1% a 65°C durante 15 min. La membrana se expuso a placa de rayos X (X-OMAT, Kodak) por diferentes períodos de tiempo a -70°C.

## RT-PCR EN TIEMPO REAL

La cuantificación de la expresión de los mRNAs para cada 5 $\alpha$ -reductasa fue llevada a cabo en un termociclador LightCycler® Carousel-Based System (Roche Applied Science) y utilizando sondas de hidrólisis TaqMan (Roche Applied Science). El RNA total se aisló a partir de HG de macho y de hembra bajo diferentes condiciones hormonales y utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Inc) como se menciona anteriormente. La integridad del RNA total fue analizada en geles de agarosa que contenían 6% de formaldehído. Para sintetizar el cDNA se utilizó 1  $\mu$ g de RNA total y el estuche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Applied Science). La reacción de PCR dio inicio al mezclar 4  $\mu$ l de TaqMan Master LightCycler 5X, 0.2  $\mu$ l de cada oligonucleótido (20  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ l de Probe library (10  $\mu$ M), 5  $\mu$ l de cDNA y la reacción se llevó a un volumen final de 15  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O dd. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 10 s y 72°C por 1 s, finalmente 1 ciclo de



40°C durante 30 s. Los oligonucleótidos utilizados para la Srd5a1 fueron 5'-GCTTGGCCGCTGTATGAA-3' y 5'-CCTTTGAACGTAGTGGATCAGA-3'. El amplicon fue detectado usando la sonda universal #18 (04-686-918-001). Los oligonucleótidos utilizados para la Srd5a2 fueron 5'-TTA GGGAAACCCACCAGCTA-3' y 5'-CGAAGGAGGGAAGTTCCTG-3'. El amplicon fue detectado usando la sonda universal #76 (04-688-996-001). La expresión relativa las 5 $\alpha$ -reductasas fue calculada para cada tejido y normalizada con la  $\beta$ -actina. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de  $\beta$ -actina (Número de acceso en el GenBank. AJ312092) fueron 5'-AGCTATGAGCTGCCTGATGG-3' y 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAA-3'; la sonda fluorogénica utilizada fue #9 (04-685-075-001). Cada muestra fue analizada independientemente 5 veces. Los resultados fueron analizados usando el método de cuantificación relativa proporcionado en el software LightCycler (versión 4.5).

## RESULTADOS

### *Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de las 5 $\alpha$ -reductasas*

Con la finalidad de clonar el cDNA de las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 y tipo 2 del hámster Sirio, inicialmente se obtuvo el RNA total a partir del hígado y epidídimo. El RNA total fue transcrito a cDNA. La amplificación rápida de los extremos 5' y 3' del cDNA (RACE) de las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 y tipo 2 se llevó a cabo utilizando el cDNA de hígado y epidídimo, respectivamente. Un fragmento de cDNA para las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 y tipo 2 fueron amplificados por PCR utilizando un par de oligonucleótidos sintéticos degenerados. Estos oligonucleótidos sintéticos degenerados fueron obtenidos a partir del análisis múltiple de secuencias para las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 y tipo 2 del humano, rata y mono (<http://clustalw.genome.ad.jp/>). De esta manera se obtuvieron dos fragmentos específicos de PCR para cada isoenzima. Estos productos de PCR fueron analizados mediante secuenciación directa. A partir de esta secuenciación se diseñaron oligonucleótidos específicos para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados con la finalidad de analizar mediante PCR y secuenciación directa la región 5' y 3' de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2. A partir de esta secuenciación se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar por PCR el cDNA total de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y dos oligonucleótidos para amplificar el cDNA total de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2. Cada producto de PCR fue ligado a un vector de clonación. Los plásmidos fueron amplificados, purificados e individualmente analizados mediante restricción. Estos productos de PCR fueron analizados mediante secuenciación directa. La secuencia nucleotídica obtenida a partir del cDNA total para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 es de 937 pares de bases (pb), con un marco de lectura abierto (ORF) de 765 pb, presenta un codón típico de iniciación ATG y una señal de terminación TAA. La región 5' no traducida (UTR) consiste de 30 pb, mientras que la UTR 3' contiene 142 pb, esta región muestra dos señales de poliadenilación no canónicas AATTAA y AGTAAA. El ORF de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 codifica para una proteína de 255 aminoácidos con un peso molecular estimado de 29.3 kDa (Fig. 8). El análisis de composición de aminoácidos indica que en la isoenzima tipo 1 un 57.5% de los residuos son hidrofóbicos, 23.6% son polares, 12.2 % y 6.7% son residuos cargados positiva y negativamente, respectivamente. La secuencia nucleotídica obtenida a partir del cDNA total para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 es de 1253 pb de longitud, con un ORF de 762 pb y un peso molecular de 28.7 kDa. Esta secuencia presenta un codón de iniciación ATG y una señal de terminación TAA. Contiene una UTR 5' de 39 pb y una UTR 3' de 452 pb. La UTR 3' carece de una típica señal de poliadenilación AATAAA, pero alternativamente presenta 3 señales de poliadenilación no canónicas AATGAA, AATGAA y GATAAA. Esta secuencia codifica para una proteína de 254 aminoácidos (Fig. 9).

-30 ggggatggagcacgctgctcgacctcaact

ATG GAC TTG GAC GAG TTT CGC CTG CTG GAT GCG TTC ACC TAC TTA GAG GGT CTC TTG GCC	60
Met Asp Leu Asp Glu Phe Arg Leu Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Leu Glu Gly Leu Leu Ala	20
TTC GTG GTC TTA GTG TTT CTC ACT TTG GTA GGC TCT CCC TAC GGT CGC TAC TCG GCG CAG	120
Phe Val Val Leu Val Phe Leu Thr Leu Val Gly Ser Pro Tyr Gly Arg Tyr Ser Ala Gln	40
CAT CCC GGC CTC CAG TTG CCG GCG AGA CCC GCC TGG TTC CTG CAG GAG CTG CCC TCG ATG	180
His Pro Gly Leu Gln Leu Pro Ala Arg Pro Ala Trp Phe Leu Gln Glu Leu Pro Ser Met	60
GCT TGG CCG CTG TAT GAA TAC ACT CGC CCT GCA GCC GCG CGC CTC GGC AGC ATG CCC AAC	240
Ala Trp Pro Leu Tyr Glu Tyr Thr Arg Pro Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ser Met Pro Asn	80
CGG GTC CTG CTG GCG ATG TTT CTG ATC CAC TAC GTT CAA AGG ACT TTG ATT TTC CCA GTC	300
Arg Val Leu Leu Ala Met Phe Leu Ile His Tyr Val Gln Arg Thr Leu Ile Phe Pro Val	100
CTG ATC CGA GGA GGA AAA CCC ACA CCC ATG TTT TCC TTT GCT GCT GCA GTC CTG TTC TGC	360
Leu Ile Arg Gly Gly Lys Pro Thr Pro Met Phe Ser Phe Ala Ala Val Leu Phe Cys	120
ACC TTC AAC GGC TAC TTG CAG AGC AGG TAC TTG AGC CAG TTT GCA GTG TAC ACC GAA GAC	420
Thr Phe Asn Gly Tyr Leu Gln Ser Arg Tyr Leu Ser Gln Phe Ala Val Tyr Thr Glu Asp	140
TGG GTG GCC CAT CCC TGT TTC CTG ACT GGT TTT ACC ATG TGG TTT GTG GGC ATG GTG ATA	480
Trp Val Ala His Pro Cys Phe Leu Thr Gly Phe Thr Met Trp Phe Val Gly Met Val Ile	160
AAT ATC CAT TCA GAC CAC ATC CTG AGG AAT CTG AGA AAA CCC GGG GAA ACA GGA TAC AAG	540
Asn Ile His Ser Asp His Ile Leu Arg Asn Leu Arg Lys Pro Gly Glu Thr Gly Tyr Lys	180
ATC CCC AGA GGA GGC TTG TTT GAA TAC GTC TCT GCA GCC AAC TAC TTT GGG GAG ATC ATG	600
Ile Pro Arg Gly Gly Leu Phe Glu Tyr Val Ser Ala Ala Asn Tyr Phe Gly Glu Ile Met	200
GAG TGG TGT GGC TTT GCG CTG GCC AGC AGG TCC CTC CAG GGT GGA GTG TTT GCC CTG TTC	660
Glu Trp Cys Gly Phe Ala Leu Ala Ser Arg Ser Leu Gln Gly Gly Val Phe Ala Leu Phe	220
ACA TTC AGC ACA CTG TTC ACC AGG GCG AAG CAG CAT CAC CAG TGG TAC CAT GAG AAG TTT	720
Thr Phe Ser Thr Leu Phe Thr Arg Ala Lys Gln His His Gln Trp Tyr His Glu Lys Phe	240
GAA GAT TAC CCC AAA TCA AGA AAA ATA CTG ATC CCA TTT GTG CTT TAA	765
Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Arg Lys Ile Leu Ile Pro Phe Val Leu ***	255

ctgctttcagttaccattgccttagaaaaagatccttcctcatgaggctgtctggacacttgaaaaattaaattgttttct  
 taattctcatgcagctccattgttttcaggaagggctggtaaagcagtaaacgattgtaaacataaaaaaaaaa

**Fig. 8.** Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del cDNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 del hámster. En la secuencia, el codón de iniciación ATG para la primera metionina es indicado con el número 1 y el codón de terminación es indicado con tres asteriscos. Las señales de poliadenilación en la UTR 3' AATTAA y AGTAAA están subrayadas. Los números a la derecha hacen referencia al último nucleótido y aminoácido. El número de acceso en el GenBank para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 es **FJ851158**.

-39 gggggcgggctgcagccaccagctgtgaacaccgcgag

ATG CCG ACT GTG TGC CAC CAG GGC CCG GTG CTA GCA GGT AGC GCC ACT TTG GCT ACC ATA	60
Met Pro Thr Val Cys His Gln Gly Pro Val Leu Ala Gly Ser Ala Thr Leu Ala Thr Ile	20
GGG GCC CTG ACC CTG TAC TTA GGG AAA CCC ACC AGC TAT GGG AAA CAC AGC CAG AGT GTG	120
Gly Ala Leu Thr Leu Tyr Leu Gly Lys Pro Thr Ser Tyr Gly Lys His Ser Gln Ser Val	40
TCG TCG GGT CCC CTC CTG CCG GCA CGC GTC GCC TGG TTC CTG CAG GAA CTT CCC TCC TTC	180
Ser Ser Gly Pro Leu Leu Pro Ala Arg Val Ala Trp Phe Leu Gln Glu Leu Pro Ser Phe	60
GTG GTG CCT GTA GGG ATG CTG GCT TGG CAG TCC CGC TCC CTC TTC GGA CAG CCC GGG AAT	240
Val Val Pro Val Gly Met Leu Ala Trp Gln Ser Arg Ser Leu Phe Gly Gln Pro Gly Asn	80
GTG CTG CTG GGT CTC TTC TCT GCA CAT TAC TTC CAC AGG ACG TTT ATT TAC TCC TTG CTC	300
Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Ala His Tyr Phe His Arg Thr Phe Ile Tyr Ser Leu Leu	100
ACC AGA GGG AGG CCT TTC CCT GTG ATG CTG TTT CTG AGA GCG ATT GCC TTC TGC ATC GGA	360
Thr Arg Gly Arg Pro Phe Pro Val Met Leu Phe Leu Arg Ala Ile Ala Phe Cys Ile Gly	120
AAT GGA TTT CTT CAA GCC TAC TAT CTG ATT TAC TGC GCA GAA TAT CCC AAG GAG TGG TAC	420
Asn Gly Phe Leu Gln Ala Tyr Tyr Leu Ile Tyr Cys Ala Glu Tyr Pro Lys Glu Trp Tyr	140
ACA GAT GTC AGG TTT AGC GTG GGT GTC TTC CTG TTT ATT TTG GGA ATG GGA ATC AAC ATC	480
Thr Asp Val Arg Phe Ser Val Gly Val Phe Leu Phe Ile Leu Gly Met Gly Ile Asn Ile	160
CAT AGT GAC TAC CTG CTG CGC CAG CTT AGG AAG CCC GGA GAA ATC ATC TAT AAG ATC CCA	540
His Ser Asp Tyr Leu Leu Arg Gln Leu Arg Lys Pro Gly Glu Ile Ile Tyr Lys Ile Pro	180
CGA GGT GGC TTG TTT AAG TAT GTC TCC GGA GCC AAC TTC CTG GGC GAG ATC ACG GAA TGG	600
Arg Gly Gly Leu Phe Lys Tyr Val Ser Gly Ala Asn Phe Leu Gly Glu Ile Thr Glu Trp	200
ATG GGC TAT GCC TTG GCC TCC TGG TCC ATC CCA GCC TTT GCG TTT GCA TTT TCT TCA CTC	660
Met Gly Tyr Ala Leu Ala Ser Trp Ser Ile Pro Ala Phe Ala Phe Ala Phe Ser Ser Leu	220
TGC TTC CTT GGG GTC CAA GCT TTT TAC CAC CAC CAC AGG TTC TAC CTC AAG ATG TTT AAG	720
Cys Phe Leu Gly Val Gln Ala Phe Tyr His His His Arg Phe Tyr Leu Lys Met Phe Lys	240
GAC TAC CCC AAA TCT AGG AGA GCG CTT ATT CCA TTC ATC TTT TAA agaaccccgattttaagga	762
Asp Tyr Pro Lys Ser Arg Arg Ala Leu Ile Pro Phe Ile Phe ***	254

gcaaagcttctacgggaaaaccgcccagctgccgagactatcaactgtaaactataactgagctgtcttgatcacatgt  
gtacatatgatgatgtgtgatattaggctctgtactctggttgccctgaggcatgctgagtcagctgactgcctagcat  
tttctcctgtacctaaacttctgttgagcttcatagaggccctccatggatttctccttagctactcctatagaag  
cttctccattccccatgggttttccccctcattgtatgatctgaagacatgtgacttttctcgtactctgtatcaattg  
tgggaagtcttcagtcaaaaccctttgggctgacataatgaaaaatgaaagccataaacgtttgcaggcaagtgggtaga  
actggaaattgttatattaaccgactcagaaaagataaacattgcatgtctttctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

**Fig. 9.** Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del cDNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 del hámster. En la secuencia, el codón de iniciación ATG para la primera metionina es indicado con el número 1 y el codón de terminación es indicado con tres asteriscos. Las tres señales de poliadenilación en la UTR 3' AATGAA, AATGAA y GATAAA están subrayadas. Los números a la derecha hacen referencia al último nucleótido y aminoácido. El número de acceso en el GenBank para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 es **FJ851159**.

Al utilizar los bancos de información de secuencias genómicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) se comparó y se analizó la secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos de las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 (Fig. 10) y tipo 2 (Fig. 11) del hámster con las 5 $\alpha$ -reductasas descritas para el grupo vertebrata, los resultados mostraron que la secuencia de aminoácidos de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 presenta un porcentaje de identidad del 83% con la rata (*Rattus norvegicus* NM\_017070); 81% con el ratón (*Mus musculus* NM\_175283); 64% con el perro (*Canis familiaris* XM\_535799); 62% con el humano (*Homo sapiens* NM\_001047) y 62% con el mono (*Macaca fascicularis* S77162). Mientras que los resultados para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 mostraron un porcentaje de identidad del 85% con la secuencia de la rata (NM\_022711), 84% con el ratón (NM\_053188), 75% con el cerdo (*Sus scrofa* NM\_213988), 74% con el perro (XM\_532922), 74% con el bovino (*Bos taurus* XM\_605410), 74% con el humano (NM\_000348) y 73% con el mono (S77165).

Similar a la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 de la rata, la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 del hámster presenta el dominio de unión al NADPH identificado en los residuos 160-190. Asimismo, la 5 $\alpha$ -reductasa de la rata tiene un dominio de unión al esteroide que ha sido asignado como -L-E-G-F- correspondiente a los residuos 15-18, mientras que en el dominio de unión al esteroide de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 del hámster el cuarto aminoácido es reemplazado por una leucina -L-E-G-L-. Comparando las 5 $\alpha$ -reductasas de humano y rata, nosotros identificamos tres residuos de histidinas, H231 y H232 altamente conservados y un residuo H236 en la región C-terminal de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1, estos residuos al parecer están involucrados en la unión al sustrato y actividad catalítica.

Al igual que la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 del humano, la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 del hámster muestra una región C-terminal altamente conservada, la cual tiene varios aminoácidos (R144, D163, R170, P180, G182, N192, G195, and R245) importantes para la unión del NADPH. Asimismo, los resultados identificaron una histidina 230 localizada en la región C-terminal involucrada en la actividad catalítica y la afinidad al sustrato T. Estos datos indican que las 5 $\alpha$ -reductasas de mamíferos son proteínas altamente conservadas y mantienen la 5 $\alpha$ -reducción como una función fisiológica común para estas especies, además nos sugieren que estas isoenzimas son proteínas homologas y que comparten un ancestro común. Usando el programa NetNES (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>), nosotros identificamos una señal de localización nuclear designada como -I-G-A-L-T-L- en la región N-terminal de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 del hámster. Asimismo, esta señal de localización nuclear fue localizada en la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 de humano, bovino y cerdo (datos no mostrados).

```

Rata      -----MELDELCLLDMLVYLEGFMAFVSVGLRSVGSPLYGRYSPOWP
Ratón     -----MELDELRLLDALVYLEGFLAFVAVFVGLQVMGSSYGRYSSQWS
Hámster   -----MDLDEFRLLDAFYLLKLLAFVVLVFLTLVGSPLYGRYSAQHP
Humano    ---MATATGVAEERLLAALAYLQCAVGCASFARNRQTNSVYGRHALPSH
Mono      MATAVAEELLLAEERMLAALAYLQCAVGCASVLAARNRETNLAYGRHASPSF
Perro     -----MEPAEVSRLHALAYLQCALGLFGLSLLRQAASSYGRYASPGA
          *   *   :. **:  :.   .   ***:;

Rata      GIRVPARPAWFIQELPSMAWPLYEYIRPAAARLGNLPNRVLLAMFLIHVY
Ratón     GRRVPARPAWFLQELPSMAWPLYECIRPAAARLGNLPNRVLLAMFLIHVY
Hámster   GLQLPARPAWFLQELPSMAWPLYEYTRPAAARLGSMPNRVLLAMFLIHVY
Humano    RLRVPARAAAWVQELPSLALPLYQYASESAPRLRSAPNCILLAMFLVHYG
Mono      RVRVPARAAAWVQELPSLALPLYQYASESAPRLRSAPNCILLAMFLVHYG
Perro     AFGVPARAAAWLQELPSLAVPLVWCARTAAERLRRAPNRILLAMFLLHYA
          :***. ** :*****: * ** : * ** ** :*****: **

Rata      QRTLVPVFLIRGGKPTLLVTFVLAFLFCTFNQYVQSRYSLSQFAVYAEWDV
Ratón     QRTLVPVFLIRGGKPTLLTFVLAFLFCTLNQYLSQSRYSLSQFAVYAEWDV
Hámster   QRTLIFPVLIRGGKPTPMFSFAAAVLFCTFNQYLSQSRYSLSQFAVYTEDVW
Humano    HRCLIFPFLMRGGKPMPLLACTMAIMFCTCNQYLSQSRYSLSHCAVYADDVW
Mono      HRCLIFPFLMRGGKPMPLLACTMAIMFCTFNQYLSQSRYSLSHWAVYADDVW
Perro     QRSLIFPFLIRGGKPMPLYTCVLAFTFCVYNGYLSQSRYSLSQYAVYADDVW
          : * * : * . : * * * * * : : . * . * * . * * : * * * * * : * * : * * *

Rata      THPCFLTGFALWLVGMVINIHSDHILRNLRKPGETGYKIPRGGLFEYVSA
Ratón     THPCFLTGFALWLVGMVINIHSDHILRNLRKPGETGYKIPRGGLFEYVSS
Hámster   AHPFLTGFMTWVGMVINIHSDHILRNLRKPGETGYKIPRGGLFEYVSA
Humano    TDPRLFIFGLWLTGMLINIHSDHILRNLRKPGDTGYKIPRGGLFEYVTA
Mono      TDPRLFIFGLWLAGMLINIHSDHILRNLRKPGDTGYKIPRGGLFEYVTA
Perro     TDPRLFVGFCLWLGMLINIHSDHILRNLRKPGETGYKIPRGGLFEYVTA
          : . * ** ** : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Rata      ANYFGELVEWCGFALASWSLQGVVFALFTLSTLLTRAKQHHQWYHEKFED
Ratón     ANYFGELVEWCGFALASWSLQGVVFALFTLCLFTRARQHHQWYLEKFED
Hámster   ANYFGEIMEWCGFALASRSIQGVVFALFTFSTLFTRAKQHHQWYHEKFED
Humano    ANYFGEIMEWCGYALASWSVQGAFAFFTFCFLSGRAKEHHEWYLRKFEE
Mono      ANYFGEIMEWCGYALASWSVQGAFAFFTFCFLSGRAKEHHRWYLRKFEE
Perro     ANYFGEVVEWCYGLASWSIQGGAFALFTFCILLTRAQQHHRWYLEKFED
          * * * * * : * * * . * * * * . * * : * * * . * * : * * . * * : * * * . * * .

Rata      YPKSRKILIPFVL
Ratón     YPKTRKILIPFLL
Hámster   YPKSRKILIPFVL
Humano    YPKFRKIIIPFLF
Mono      YPKFRKILIPFLF
Perro     YPKFRKIIIPFLF
          ***:***:***. :

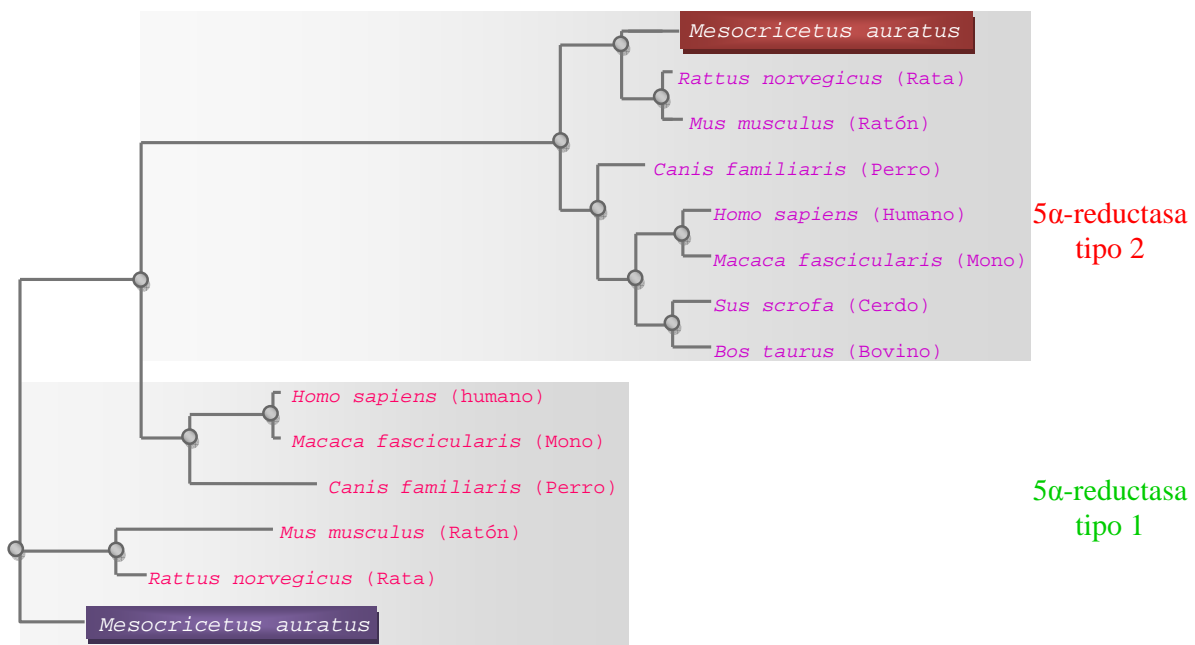
```

**Fig. 10.** La secuencia deducida de aminoácidos de la 5α-reductasa tipo 1 del hámster fue comparada con las 5α-reductasas tipo 1 de mamíferos. Las secuencias para la rata, ratón, humano, mono y perro fueron obtenidas a partir del banco de genes del NCBI y fueron alineadas usando el programa ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>). Los dominios putativos de unión al NADPH y de unión al esteroide están marcados en amarillo y verde, respectivamente.

Humano	MQVQCQSPVLAGSATLVALGALALYVAKPSGYGKHTESLKPAATRLPAR
Mono	MQVQCQSPVLAGSATLVALGALVLYVAKPSGYGKHTESLKPAATRLPAR
Cerdo	MPVRCQSPVLAGSATLAALGALALYFAEPSGYGKYTESLTPAAILRLPAR
Bovino	MSVRCQSPVLAGSATLAALGALVLYLAEPSGYGKYSENLMPVAIRLPAR
Perro	MPIRCQSPVLAGSAALAAMGALFLYLAKPSGYGKYSEGLTPAAPRLPAR
Ratón	MPIVCHQVPVLAGSATLATMGTLLILCFGKPPASYGKHSESVSSGVPLPAR
Rata	MQIVCHQVPVLAGSATLATMGTLLILCLGKPPASYGKHTESVSSGVPLPAR
<b>Hámster</b>	<b>MPTVCHQGPVLAGSATLATIGALTLVYLGKPTSYGKHSQSVSS-GPLLPAR</b>
	* :*: *****:.*.:*:* * ..*.:*.*.*.:*.:* . *****
Humano	AAWFLQELPSFAVPAGILARQPLSLFGPPGTVLLGLFCLHYFHRTFVYSL
Mono	AAWFLQELPSFAVPAGILARQPLSLFGPPGTVLLGLFCVHYFHRTFVYSL
Cerdo	AAWFLQELPSFVVPAGILAGQPRSLFGPPATVLLGLFCAHYFHRTFVYSL
Bovino	AAWFLQELPSFAVPAGILAGQPSLLGPPATVLLGLFCAHYFHRTFVYSL
Perro	AAWLLQELPSFAVPAGILARQPRALLGQPATVLLGLFCAHYFHRTFIYSL
Ratón	IAWFLQELPSFVVSVMGLAWQPRSLFGPPGNVLLGLFSAHYFHRTFIYSL
Rata	IAWFLQELPSFVVSVMGLAWQPRSLFGPPGNVLLGLFSAHYFHRTFIYSL
<b>Hámster</b>	<b>VAWFLQELPSFVVPVGMGLAWQSRSLFGQPGNVLLGLFSAHYFHRTFIYSL</b>
	*:*****.*.:*:* * .:.*: * ..*.*.*.*. *****:***
Humano	LNRGRYPAILLIRGTAFTCTGNGVLQGYLLIYCAEYPDGWYTDIRFSLGV
Mono	LNRGRYPAVLIFRGI AFCAGNGFLQSYLLIYCAEYPDGWYTDIRFCLGV
Cerdo	LTRGRPFVFLFRGFVFCMGNLLQGYLLVYCAEYPAEWYTDIRFSLGV
Bovino	LTRGRPFVFLFRGFVFCMGNLLQGYLLVYCAEYPAEWYTDIRFSLGI
Perro	LTRGRPFVFLFRGFVFCMGNLLQGYLLIYCAEYPAEWYMDVRFSLGI
Ratón	LTRGRPLSAVIFLKATAFCIGNGLLQAYLLVYCAEYPEEWYTDVRFVSVGV
Rata	LTRGRPFPAVLFLRATAFCIGNGLLQAYLLVYCAEYPEEWYTDVRFVSGV
<b>Hámster</b>	<b>LTRGRPFVFLFRRAIAFCIGNGLQAYLLIYCAEYKWEYTDVRFVSGV</b>
	*.***** ..*.:*.* *
Humano	FLFILGMGINIHSYILRQLRKPEIYRIKGGGLFTYVSGANFLGEIE
Mono	FLFILGMGVNIHSDYILRQLRKPEIYRIKGGGLFTYVSGANFLGEIE
Cerdo	FLFILGMGINIHSYILRQLRKPEVIYRIKGGGLFTYVSGANFLGEIE
Bovino	FLFILGMGINIHSYILRQLRKPEIYRIKGGGLFTYVSGANFLGEIE
Perro	FLFILGMGINIHSYILRQLRKPEVIYRIKGGGLFTYVSGANFLGEIE
Ratón	FFFILGMGINIHSYILRQLRKPEVIYRIKGGGLFTYVSGANFLGEIE
Rata	FLFILGMGINIHSYTLRQLRKPEVIYRIKGGGLFTYVSGANFLGEIE
<b>Hámster</b>	<b>FLFILGMGINIHSYLLRQLRKPEIYRIKGGGLFKYVSGANFLGEITE</b>
	*:*****:***** :*:*:*.*.*.*****:***
Humano	WIGYALATWSLPALAFAFSLCFLGLRAFHHHR-FYLMKFEDYPKSRKAL
Mono	WIGYALATWSLPALAFAFSLCFLGLRAFHHHR-FYLMKFEDYPKSRKAL
Cerdo	WIGYALATWSLPALAFAFSLCFLGLRAFHHHR-FYVKMFEDYPKSRKAL
Bovino	WIGYALASWSLPALAFAFSLCFLGLRAFHHHR-FYLMKFDDYPKSRRAL
Perro	WIGYALATWSLPALAFAFSLCFLGLRAFHHHR-FYLMKFEDYPKSRKAL
Ratón	WMGYALATWSVPAFAFAFSLCFLGMQAFYHHR-FYLMKFKDYPKSRKAL
Rata	WIGYALATWSVPAFAFAFSLCFLGMQAFYHHR-FYLMKFKDYPKSRKAL
<b>Hámster</b>	<b>WMGYALASWSIPAFAFAFSLCFLGVQAFYHHRFYLMKFKDYPKSRRAL</b>
	*:*****:*:*:*:*.*.*.***** :*:*:*:*.*.*.*****:***
Humano	IPFIF
Mono	IPFIF
Cerdo	IPFIF
Bovino	IPFIF
Perro	IPFLF
Ratón	IPFIF
Rata	IPFIF
<b>Hámster</b>	<b>IPFIF</b>
	*:*:*

**Fig. 11.** La secuencia deducida de aminoácidos de la 5α-reductasa tipo 2 del hámster fue comparada con las 5α-reductasas tipo 2 de mamíferos. Las secuencias para la rata, ratón, humano, mono, perro, bovino y cerdo fueron obtenidas a partir del banco de genes del NCBI y fueron alineadas usando el programa ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>). La afinidad de la enzima por el sustrato NADPH está marcada por los aminoácidos en verde.

El análisis filogenético utilizando los programas del paquete PHYLIP indicó que ambas  $5\alpha$ -reductasas del hámster se encuentran más estrechamente relacionadas con las  $5\alpha$ -reductasas obtenidas del genbank a partir de la rata y el ratón que con las secuencias de aminoácidos de las  $5\alpha$ -reductasas de otros mamíferos, tal es el caso de las  $5\alpha$ -reductasas del humano; de hecho, la comparación de las secuencias demuestran una fuerte conservación de aminoácidos entre las  $5\alpha$ -reductasas del orden Rodentia. Adicional a esto, se pudo observar que el árbol filogenético consiste de dos grandes grupos. Una primera ramificación para el grupo de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 del hámster que incluye a las demás  $5\alpha$ -reductasas tipo 2 de mamíferos y la segunda ramificación para la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 del hámster que consiste de las  $5\alpha$ -reductasas tipo 1 de mamíferos (Fig. 12).

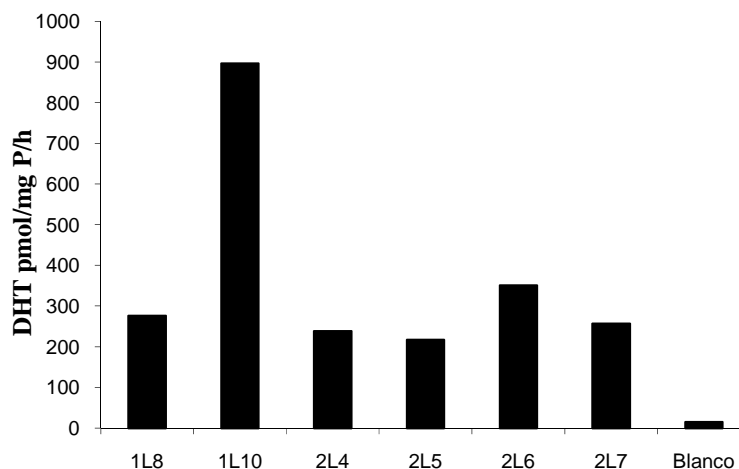


**Fig. 12.** Árbol filogenético de la secuencia deducida de aminoácidos de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster (*Mesocricetus auratus*) comparada con las  $5\alpha$ -reductasas de otros mamíferos. El programa “ClustalW” (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) fue utilizado para desarrollar el alineamiento múltiple de las secuencias. Los árboles fueron diseñados usando el método “likelihood” con el modelo JTT y el programa “protdist”. La fiabilidad de las ramificaciones del árbol fueron estimadas usando el remuestreo “bootstrap” (1000 veces) dentro del paquete PHYLIP (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phylip-uk.html>). La longitud de las ramificaciones representa el número estimado de sustituciones a lo largo de cada rama.



### *Actividad in vitro de las 5 $\alpha$ -reductasas en células HEK-293*

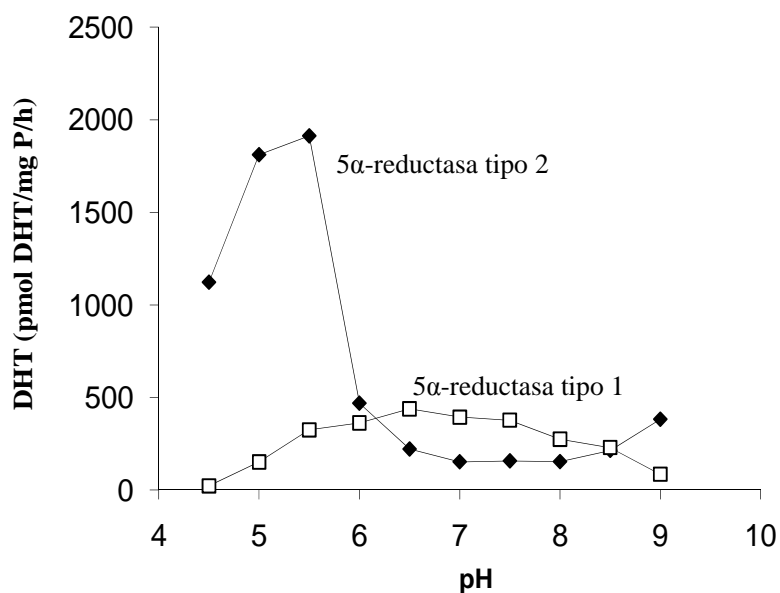
Para analizar la actividad catalítica de las 5 $\alpha$ -reductasas en cada una de las clonas obtenidas mediante transformación celular, se utilizaron células HEK-293 transfectadas con cada clona obtenida para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 (1L8 y 1L10) y para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 (2L4, 2L5, 2L6 y 2L7). Se pudo observar la formación de DHT a partir de [<sup>3</sup>H]T en todas las clonas probadas (Fig. 13). Los resultados obtenidos utilizando los plásmidos que contenían los cDNA para las 5 $\alpha$ -reductasas presentaron actividad de 5 $\alpha$ -reducción. Este resultado se pudo comprobar al observar la conversión de T a DHT en células HEK-293 transfectadas.



**Fig. 13.** Actividad de 5 $\alpha$ -reductasa. 1L8 y 1L10 indican las clonas que contenían la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1. 2L4, 2L5, 2L6 y 2L7 indican las clonas que contenían la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2.

### *Actividad in vitro de las 5 $\alpha$ -reductasa a diferentes pH*

Para caracterizar los parámetros cinéticos de estas isoenzimas, inicialmente se determinó la actividad catalítica de las 5 $\alpha$ -reductasas en función del pH. Como se muestra en la figura 14, la conversión máxima de T a su derivado 5 $\alpha$ -reducido fue llevada a cabo a un pH muy amplio de 6.0 a 7.5, utilizando células HEK-293 transfectadas con el constructo para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1; mientras que en la figura 14 se pudo observar que la actividad óptima para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 era a un pH ácido (5.5).

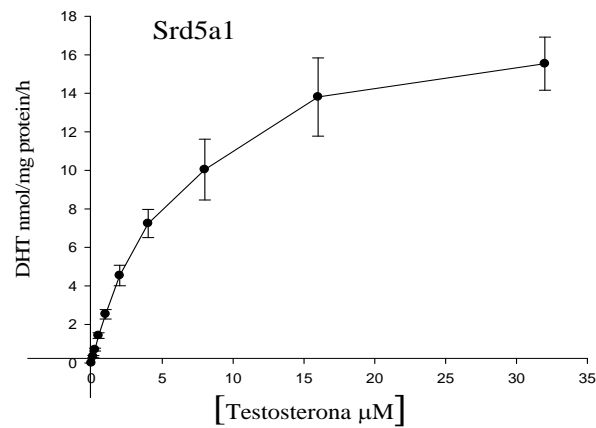


**Fig. 14.** Actividad de las 5α-reductasas del hámster a diferentes pHs usando sonicados de células transfectadas. Todos los experimentos fueron desarrollados tres veces y se muestra una gráfica representativa de la actividad de las 5α-reductasas.

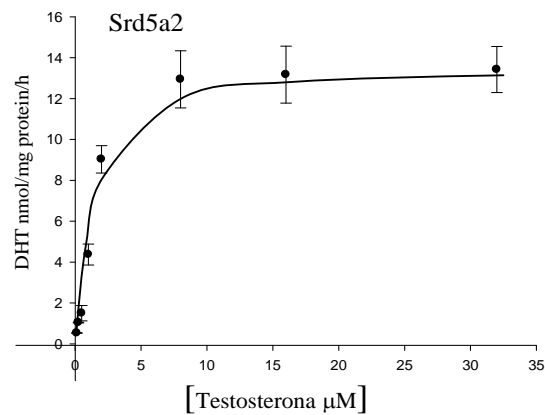
#### *Caracterización cinética de las 5α-reductasas*

Similar a la 5α-reductasa tipo 2 de mamíferos, la 5α-reductasa tipo 2 del hámster tiene una menor  $K_m$  por T que la 5α-reductasa tipo 1 (Fig. 15), el resultado sugiere que probablemente la afinidad diferencial por T está dictada por diferentes aminoácidos localizados en el dominio de unión al esteroide. Las comparaciones de los valores de  $K_m$ ,  $V_{max}$  y pH de las 5α-reductasas del hámster y otras 5α-reductasas caracterizadas cinéticamente son indicadas en la tabla 2.

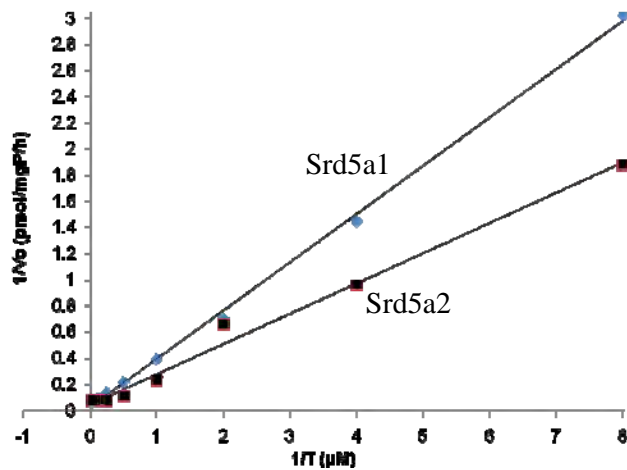
A)



B)



C)



**Fig. 15.** Actividad catalítica de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster. A) y B) Formación de DHT a diferentes concentraciones de [ $^3$ H]T. C) Los resultados para la actividad de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 fueron linealizados mediante una gráfica de doble recíproca o Lineweaver-Burk. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  obtenidos a partir de estas gráficas son mostrados y comparados en la tabla 2. Todos los experimentos fueron realizados tres veces.

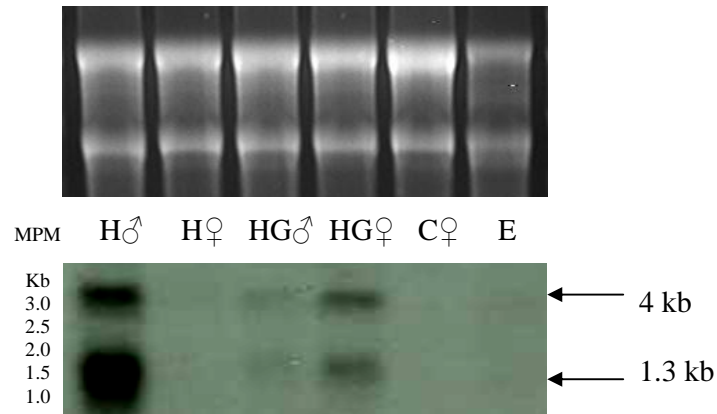
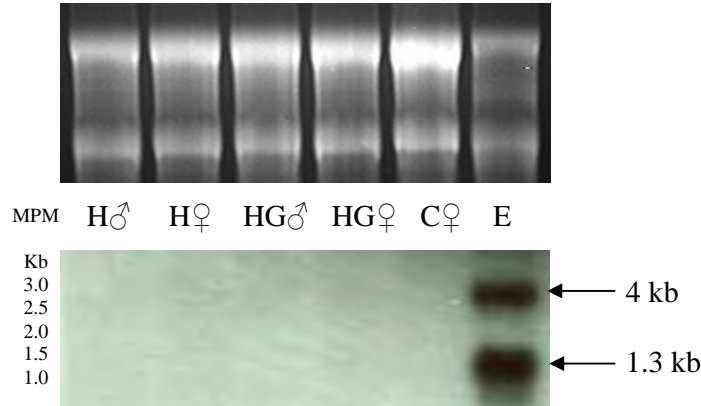
Enzima	pH óptimo	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (pmol/mg P/min)	Línea celular
<b>Tipo 1</b>				
Hámster	6 a 7.5	7.14	314	HEK-293
Rata	5.5 a 7.5	1-2.5	1300	COS, HEK-293
Humano	6 a 8	3.5-5.2	220	COS
Mono	6.5 a 8	2	245	CHO
<b>Tipo 2</b>				
Hámster	5.5	1.964	248	HEK-293
Rata	5	0.075	300	HEK-293
Humano	5.5	0.7	88	HEK-293
Mono	5	0.2	86	CHO

**Tabla 2.** Caracterización *in vitro* de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster y de diferentes mamíferos expresadas en diferentes líneas celulares.

#### *Expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 en diferentes tejidos de hámster*

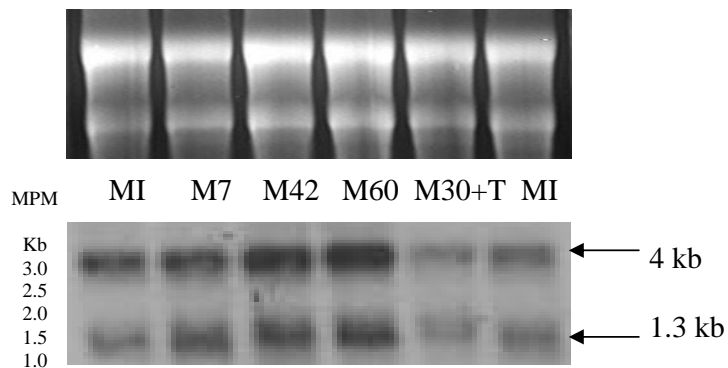
Los resultados de northern blot demostraron que en tejidos reproductivos masculinos dependientes de andrógenos, como el epidídimo, existe una predominancia del mRNA para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 (Fig. 16B), mientras que en tejidos que no son andrógeno-dependientes (tal es el caso del hígado) se expresa exclusivamente el transcrito para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 (Fig. 16A). Estas observaciones demuestran un claro ejemplo de la expresión diferencial para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster.

La figura 16A muestra que el mRNA para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 de hígado está presente en machos pero no en hembras. Además de esto, se pudo observar que en la HG del macho hay una menor expresión del mRNA para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 que en la HG de la hembra. Estos datos pueden sugerir que existen diferencias sexuales asociadas a la expresión del mRNA para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 en el hígado y en la HG del hámster. Las diferencias sexuales en la expresión del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 son de suma importancia para la regulación diferencial ejercida por los andrógenos sobre la fisiología de la HG masculina y femenina.

**(A) 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1****(B) 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2**

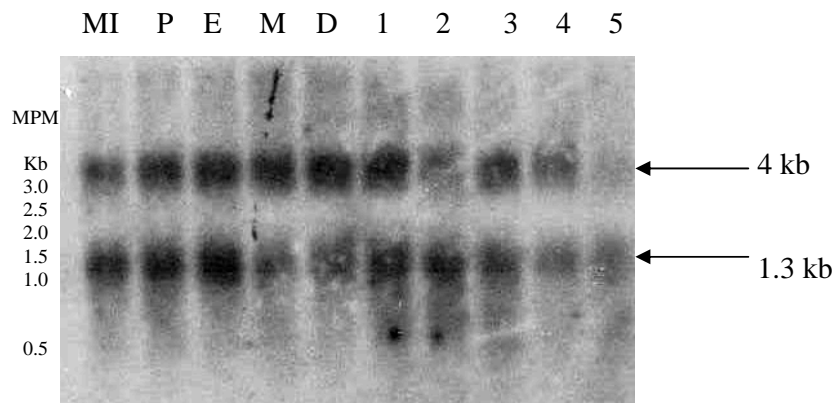
**Fig. 16.** Análisis por northern blot de la expresión del mRNA de las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 (A) y tipo 2 (B) en diferentes tejidos del hámster. H= hígado, HG= glándula harderiana, C= corazón y E= epidídimo. Las fechas indican la detección del transcrito para las 5 $\alpha$ -reductasas. La cantidad y calidad del RNA total fue determinada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mediante la visualización del rRNA 18S (1900 pb) y 28S (4700 pb). La ciclofilina fue utilizada como control endógeno. MPM= marcador de peso molecular. Cada experimento fue repetido al menos 3 veces.

Con la finalidad de valorar la influencia de los esteroides sexuales sobre la expresión del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1, se llevaron a cabo experimentos de northern blot a partir de la HG del hámster utilizando sondas para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1. Los resultados mostraron que la expresión del mRNA fue menor en la HG del macho intacto y del macho castrado por 30 días más T, asimismo los datos demostraron que el incremento en el tiempo de castración genera un incremento gradual del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 (Fig. 17).



**Fig. 17.** Análisis por northern blot del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 en la HG de hámster de macho intacto (MI), macho castrado de 7 días (M7), macho castrado de 42 días (M42), macho castrado de 60 días (M60), macho castrado de 30 días más T (M30+T) y macho intacto (MI). Las fechas indican la detección del transcrito para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1. La cantidad y calidad del RNA total fue determinada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mediante la visualización del rRNA 18S (1900 pb) y 28S (4700). MPM= marcador de peso molecular. La ciclofilina fue utilizada como control. Cada experimento fue repetido al menos 3 veces.

Posteriormente, se analizó la influencia que ejerce el ciclo estral, la ovariectomía y la administración de diferentes esteroides sexuales sobre la expresión del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1. Los resultados obtenidos mostraron que en la HG femenina la expresión del mRNA para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 tiene variaciones menos drásticas durante las fases del ciclo estral (Fig. 18). La ovariectomía presenta muy pocos efectos sobre la expresión del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1, no obstante esto, en hembras ovariectomizadas existe una menor expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 comparadas con las diferentes fases del ciclo estral. No existió evidencia de masculinización sobre la expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 a través de la ovariectomía más los diferentes tratamientos hormonales, excepto para la administración de andrógenos en donde la expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 fue disminuida.

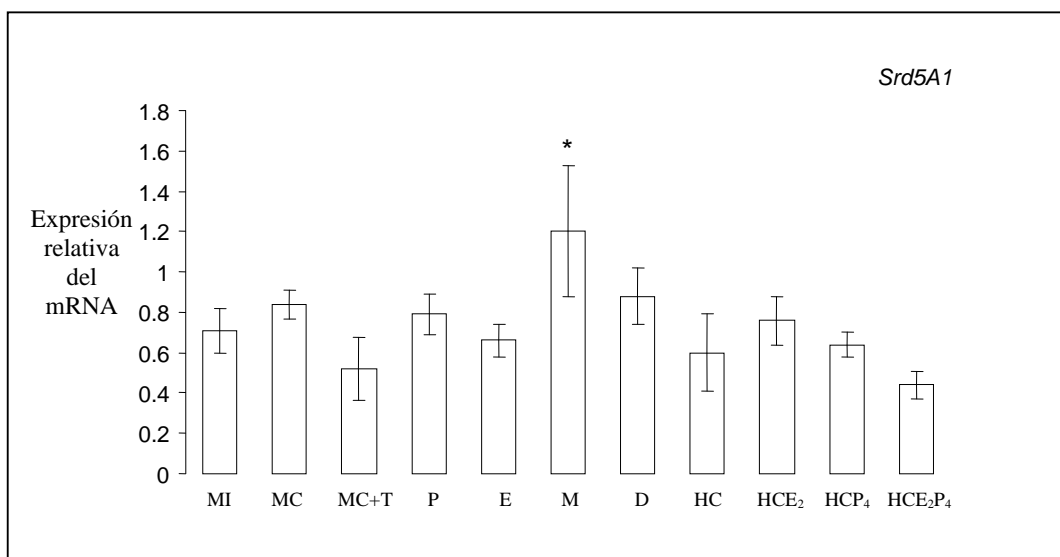


**Fig. 18.** Análisis por northern blot del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 en la HG del hámster hembra en las diferentes fases del ciclo estral y bajo el tratamiento de diferentes esteroides sexuales. P= proestro, E= estro, M= metaestro, D= diestro, 1= hembra ovariectomizada de 7 días, 2= hembra ovariectomizada de 7 días más 17 $\beta$ -estradiol, 3= hembra ovariectomizada de 7 días más progesterona, 4= hembra ovariectomizada de 7 días más 17 $\beta$ -estradiol y progesterona y 5= hembra ovariectomizada de 5 días más T. Las flechas indican la detección del transcrito para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1. La ciclofilina fue utilizada como control. MPM= marcador de peso molecular. Cada experimento fue repetido al menos 3 veces.

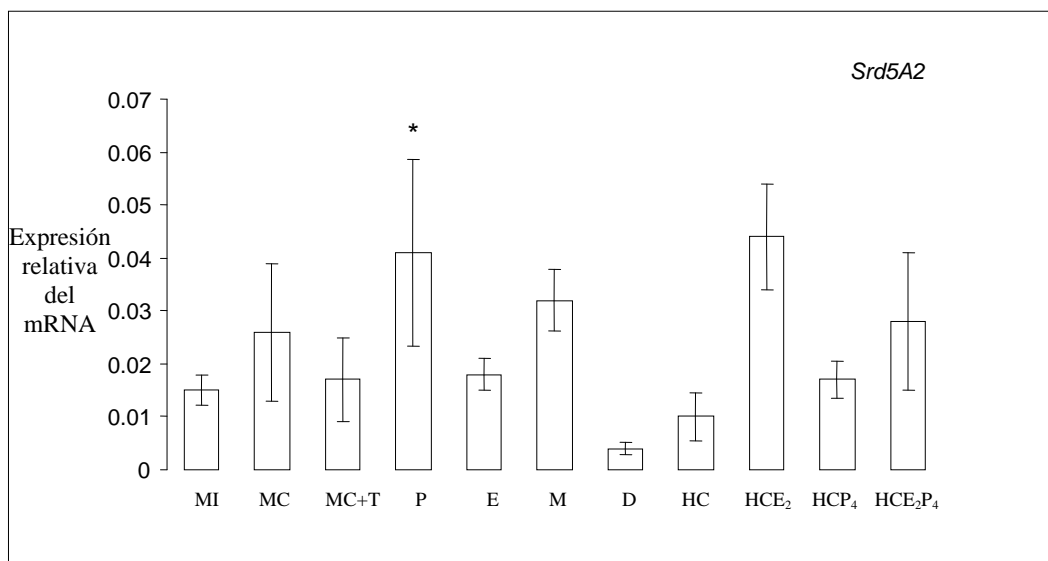
#### *Expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 en HG de hámster*

Se determinó cuantitativamente la expresión relativa de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 en la HG utilizando el RT-qPCR; al respecto, se observó una notable diferencia en los niveles de expresión del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 en la HG (Fig. 19 y 20), siendo 10 veces más elevada para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1. Estos resultados sugieren diferencias entre la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2.

Asimismo, la expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 fue ligeramente más abundante en machos castrados que en machos intactos, mientras que la administración de T generó un efecto menor. En la HG de hembra la expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 mostró variaciones durante el ciclo estral, observándose un incremento de la expresión del mRNA en el metaestro. La expresión en esta fase fue significativamente mayor que en el macho intacto. La administración de hormonas esteroides (E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>) no tuvo efectos significativos sobre la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 (Fig. 19); aunque se pudo observar que el tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol a hembras castradas incrementa los niveles del mRNA para Srd5a2 (Fig. 20). Los niveles de expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 incrementaron en la HG de machos castrados, aunque este incremento no fue significativo. La expresión de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 mostró variaciones durante el ciclo estral y se observó un incremento significativo del mRNA en el proestro.



**Fig. 19.** Expresión del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 (Srd5a1) en HG de hámsters. Los niveles de mRNA fueron cuantificados mediante RT-PCR tiempo-real y posteriormente normalizados contra el transcrito de  $\beta$ -actina para obtener una relación Srd5a1/ $\beta$ -actina. La cuantificación de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 se realizó simultáneamente usando el cDNA de los siguientes grupos experimentales: machos intactos (MI), machos castrados por 7 días (MC), machos castrados y tratados con propionato de testosterona (1mg/día/7días) (MC+T), hembras intactas en proestro (P), estró (E), metaestro (M) y diestro (D). Hembras castradas (HC), hembras castradas más 17 $\beta$ -estradiol (HCE<sub>2</sub>), hembras castradas más progesterona (HCP<sub>4</sub>) y hembras castradas más 17 $\beta$ -estradiol y progesterona (HCE<sub>2</sub>P<sub>4</sub>). Cada barra muestra el valor promedio  $\pm$ EEM de 5 determinaciones independientes.



**Fig. 20.** Expresión del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 (Srd5a2) en HG de hámsters. Los niveles de mRNA fueron cuantificados mediante RT-PCR tiempo-real y posteriormente normalizados contra el transcrito de  $\beta$ -actina para obtener una relación Srd5a2/ $\beta$ -actina. La cuantificación de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 se realizó simultáneamente usando el cDNA de los siguientes grupos experimentales: machos intactos (MI), machos castrados por 7 días (MC), machos castrados y tratados con propionato de testosterona (1mg/día/7días) (MC+T), hembras intactas en proestro (P), estró (E), metaestro (M) y diestro (D). Hembras castradas (HC), hembras castradas más 17 $\beta$ -estradiol (HCE<sub>2</sub>), hembras castradas más progesterona (HCP<sub>4</sub>) y hembras castradas más 17 $\beta$ -estradiol y progesterona (HCE<sub>2</sub>P<sub>4</sub>). Cada barra muestra el valor promedio  $\pm$ EEM de 5 determinaciones independientes.



## DISCUSIÓN

Las  $5\alpha$ -reductasas catalizan la reducción de la doble ligadura  $\Delta^{4-5}$  de esteroides como T, androstendiona y progesterona a sus correspondientes metabolitos reducidos  $5\alpha$ -dihidro-3ceto. Las  $5\alpha$ -reductasas son enzimas membranales dependientes de NADPH. La reducción en  $5\alpha$  juega un papel determinante para la acción de los andrógenos a través de la conversión de T a DHT, un esteroide con mayor potencia biológica. A finales de los 80s e inicios de los 90s, dos isoformas de la  $5\alpha$ -reductasa fueron clonadas y caracterizadas a partir de la rata y del humano, de esta manera se pudo detectar su expresión en diversos tejidos. Estos estudios demostraron que la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 es ampliamente expresada en piel y en hígado en donde se ha propuesto que cataboliza esteroides; mientras que la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 es ampliamente expresada en la próstata, vesículas seminales y epidídimo, en donde juega un papel anabólico. Estas isoformas son productos de diferentes genes y poseen diferentes propiedades bioquímicas y fisiológicas. Evidencias clínicas y experimentales han demostrado la importancia fisiológica de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 en la diferenciación sexual de los genitales externos masculinos en etapas tempranas del desarrollo embrionario y en el mantenimiento de tejidos andrógeno-dependientes en adultos. En el adulto, las variantes genéticas codificadas por el gen SRDA2 han sido asociadas con el desarrollo y progresión del cáncer de próstata.

La regulación de las  $5\alpha$ -reductasas, ha sido examinada en varios sistemas biológicos y con base en estos reportes, en la actualidad se acepta que la expresión de estas enzimas esteroidogénicas es regulada por andrógenos en algunos tejidos y especies. Sin embargo, con el aislamiento y secuenciación de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2, la interpretación de los datos reportados en estos estudios pioneros se complicó debido a la existencia de dos isoenzimas que catalizan la misma reacción. Así, en la mayoría de los casos se asumió que solamente una actividad enzimática estaba siendo determinada. Los estudios posteriores se han enfocado básicamente a establecer en qué tejidos y tipos celulares se expresa una u otra isoenzima y el impacto hormonal sobre la expresión.

Hasta ahora, no existen estudios que evalúen los elementos que intervienen en la regulación de las  $5\alpha$ -reductasas. En la literatura se pueden encontrar reportes sobre modelos experimentales que no dejan clara la perspectiva en cuanto a la participación local e interacción de los distintos factores que regulan la expresión génica de las  $5\alpha$ -reductasas.

En este proyecto se plantea la posibilidad de abordar este problema implementando una estrategia alterna, al utilizar como modelo experimental a la HG del hámster Sirio, la cual ha

mostrado ser altamente sensible a la manipulación androgénica. En estudios bioquímicos previos, se ha observado que la HG exhibe un marcado dimorfismo sexual en términos de respuesta a andrógenos. Al respecto existe evidencia la cual demuestra que este tejido presenta actividad de  $5\alpha$ -reductasa y los estudios dejan en claro que esta enzima presenta un dimorfismo sexual con respecto a su actividad, siendo mucho más alta en hembras que en machos (Vilchis et al., 1994).

Considerando lo anterior, es muy importante examinar la estructura de las isoenzimas para obtener un mejor entendimiento del papel de las  $5\alpha$ -reductasas y su regulación en los diversos tejidos. Por lo tanto, el objetivo inicial de este estudio fue el de aislar el cDNA de las  $5\alpha$ -reductasas del hámster Sirio, esto con la finalidad de determinar su secuencia nucleotídica y posteriormente analizar la regulación de la expresión de estas isoenzimas.

El análisis de las secuencias del hámster indicó, que existen dos genes relacionados, designados como  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2. Ambos genes comparten identidad en sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos con las otras  $5\alpha$ -reductasas descritas hasta este momento. La secuencia deducida de aminoácidos y el análisis comparativo demostró que el dominio de unión al ligando de las  $5\alpha$ -reductasas del hámster es una región altamente conservada y está localizada en la región carboxilo terminal de las  $5\alpha$ -reductasas. Una vez aisladas las secuencias, la actividad de  $5\alpha$ -reductasa de cada isoenzima fue confirmada mediante la expresión del cDNA en células HEK-293. Los resultados obtenidos demostraron que las  $5\alpha$ -reductasas aisladas presentaban actividad de  $5\alpha$ -reducción, esto se pudo comprobar mediante la transformación de [ $^3\text{H}$ ]T a [ $^3\text{H}$ ]DHT.

Varios estudios han demostrado que el mecanismo de inicio de la traducción de un gen difiere entre especies procariontes y eucariontes (Kochetov, 2005). Al respecto, muchos mRNAs eucariontes contienen una secuencia de reconocimiento corta, que facilita la unión inicial del mRNA a la subunidad pequeña del ribosoma. En el 95% de los casos la secuencia consenso para el inicio de la traducción en vertebrados es una secuencia RCCAUGG (donde R es una purina). La selección del sitio de inicio de la traducción en casi todos los mRNAs de eucariontes depende de la posición en -3 de una purina altamente conservada y una guanina en la posición +4 alrededor del codón de inicio AUG. Este efecto de posición se ha observado que regula y activa el inicio de la traducción de varios genes (Kozak, 2002). De acuerdo a esta regla y al uso de programas para identificar y caracterizar el sitio de inicio de la traducción, en este estudio nosotros pudimos seleccionar el codón de inicio AUG de las  $5\alpha$ -reductasas del hámster y a partir de esto se pudo obtener la secuencia deducida de aminoácidos de cada isoenzima (Fig. 8 y 9).

La selección del codón AUG en la región 5' de las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster facilitó la deducción de la estructura primaria de la proteína y con esto se pudieron realizar los estudios de análisis comparativo y obtención de los porcentajes de identidad y/o similitud con las 5 $\alpha$ -reductasas de vertebrados descritas hasta este momento (Fig. 10 y 11). De acuerdo a estos porcentajes altos de identidad se pudo inferir que tal vez estas isoenzimas presentaban la función de 5 $\alpha$ -reducción idéntica o similar a las 5 $\alpha$ -reductasas descritas anteriormente y que quizás estas secuencias tienen una estructura común como las otras secuencias, como por ejemplo dominios o motivos estructurales con una función definida. Con estos resultados comparativos se pudo inferir que las 5 $\alpha$ -reductasas de la clase mammalia son un conjunto de isoenzimas altamente conservadas y el hecho de que estos mamíferos presenten dos isoenzimas nos está sugiriendo que quizás el evento de duplicación y divergencia, el cual dio origen a la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2, ocurrió en etapas tempranas de la evolución de mamíferos.

Los análisis filogenéticos de las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster fueron utilizados no, únicamente para obtener la filogenia entre el grupo de vertebrados mamíferos, sino también para delimitar y hacer referencia a la relación entre genes ortólogos y genes parálogos entre la familia de secuencias homologas de las 5 $\alpha$ -reductasas que han sido caracterizadas mediante la secuenciación del genoma de diferentes especies. En este trabajo nosotros determinamos que los genes ortólogos están representados por dos grupos, el grupo de genes ortólogos para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y el grupo de genes para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2; mientras que los genes parálogos están siendo ejemplificados por la similitud encontrada entre la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster. Estos análisis filogenéticos sugieren que los genes parálogos para las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster surgieron mediante un proceso de duplicación génica por un gen ancestral común. Es importante mencionar que en este modelo clásico de duplicación génica uno de los genes duplicados usualmente degenera en pocos millones de años mediante la acumulación de mutaciones deletéreas, mientras que el otro gen duplicado retiene la función original. Este modelo además predice que en algunas ocasiones el gen duplicado adquiere nuevas funciones adaptativas generando una subfuncionalidad o nueva funcionalidad, de tal manera que la nueva copia génica adquiere una nueva funcionalidad, mientras la segunda copia mantiene la función original, de tal forma que se retienen ambas copias de los genes duplicados en el genoma (Ohno, 1970; Force et al., 1999). Nuestros resultados apoyan el modelo teórico de neofuncionalidad en donde los genes parálogos para las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster mantienen dos funciones génicas después de su duplicación. Estos resultados adicionalmente indican los niveles altos de conservación de los genes de las 5 $\alpha$ -reductasas, tal y como se refleja en su secuencia génica y su organización. Al determinar estas relaciones evolutivas se puede llegar a predecir la función de

estas isoenzimas esteroideogénicas y a su vez mapear ciertos dominios estructurales conservados que estén asociados a una función determinada.

Asimismo, utilizando las secuencias deducidas de aminoácidos de las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster y el programa para identificar señales de exporte nuclear (NES) se pudo determinar que únicamente la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 presentaba una NES ubicada en la región N-terminal, sugiriendo que quizás esta isoenzima es transportada subcelularmente, de tal forma que en este sitio pueda ejercer su efecto biológico de 5 $\alpha$ -reducción; al respecto se puede sugerir que no únicamente los aminoácidos hidrofóbicos de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 (61%) son importantes para definir una señal de exporte nuclear, por lo que existe una combinación de factores (como son una señal de exporte y el perfil hidrofóbico) que están regulando el transporte de esta isoenzima a su sitio de acción. Mediante el uso de este programa esta señal de exporte nuclear se pudo identificar en las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 2 de mamíferos, como la del humano, cerdo y bovino (datos no mostrados).

Diversos estudios han demostrado que la reacción de poliadenilación de los pre-mRNAs en mamíferos consiste esencialmente de dos etapas: el rompimiento endonucleolítico de los pre-mRNA y la subsecuente adición de una secuencia poli(A) en el extremo 3'. Este mecanismo de poliadenilación depende de un elemento regulador que consiste en la mayoría de los casos de un hexámero AATAAA altamente conservado. Un segundo elemento reportado es un dominio rico en GU (Colgan & Manley, 1997; Zadunaya et al., 2003). Sin embargo, recientes análisis estadísticos utilizando las secuencias disponibles en el GenBank y las regiones UTRs 3' de los mRNAs han revelado que estas señales de poliadenilación canónicas no son del todo universales. De tal manera que algunos trabajos han reportado la existencia de hexámeros alternos o señales de poliadenilación no canónicas que podrían estar involucrados preferencialmente en el proceso de poliadenilación. Estas señales de poliadenilación no canónicas han sido identificadas y caracterizadas en diversos genes y se ha demostrado que son funcionalmente activas (Graber et al., 1999; MacDonald & Redondo J-L, 2002; Kawamoto et al., 2000). En este trabajo, el análisis de la secuencia UTR 3' de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster demostró la presencia de varias señales de poliadenilación no canónicas. En este sentido, la presencia de más de una señal de poliadenilación no canónica en la secuencia UTR de estas isoenzimas sugiere dos puntos muy importantes, el primero es que el uso diferencial de múltiples señales podría amplificar la eficiencia de poliadenilación del mRNA y asimismo se podría evitar que la poliadenilación de los pre-mRNAs se pierda con facilidad debido a diversos factores mutagénicos y segundo que quizás este único gen podría estar generando mRNAs de diferentes tamaños. En este proyecto, nuestros resultados de northern blot demuestran que la presencia de diferentes señales de poliadenilación no canónicas no

está afectando el tamaño del mRNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2, lo cual sugiere que quizás las diversas señales de poliadenilación no canónicas en las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster podrían probablemente potencializar este mecanismo al utilizar múltiples señales.

La identificación de dominios dentro de las proteínas que puedan influir en la unión al sustrato y al cofactor y para que subsecuentemente puedan afectar o jugar un papel determinante en la catálisis es importante para el entendimiento de la relación estructura-función en cualquier sistema enzimático. En el caso de las 5 $\alpha$ -reductasas, diversos trabajos han mostrado dominios importantes para el óptimo funcionamiento catalítico. De las dos 5 $\alpha$ -reductasas descritas hasta este momento, el papel fisiológico de la isoenzima tipo 2 es el mejor conocido, esto es debido a la presencia de mutaciones naturales en el gen SRD5A2 que codifica para la isoenzima tipo 2 (Vilchis & Chávez, 2002; Vilchis et al., 2008). Wigley et al., (1994) identificaron mutaciones en el gen SRD5A2 en individuos con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 y mediante estudios bioquímicos determinaron que estas mutaciones afectaron principalmente la unión al NADPH y al sustrato T. De las mutaciones reportadas en el humano, la mayoría fueron localizadas en las regiones altamente conservadas del dominio carboxilo terminal y de acuerdo a nuestro estudio, esta región comparte un alto porcentaje de identidad con la secuencia deducida de aminoácidos de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 del hámster. Por ejemplo, se ha reportado que algunos de estos residuos conservados como R145, R171, P181, G183, N193, G196 y R246 son importantes para la afinidad de la enzima por el cofactor NADPH; mientras que el residuo H231 es importante para que la enzima se una al sustrato T. De este análisis nosotros podemos concluir que ambas isoenzimas tipo 2 del hámster y del humano comparten aminoácidos funcionalmente importantes para la actividad catalítica, la unión al NADPH y al sustrato T.

Por otro lado, aunque hasta este momento aun no se ha reportado la aparición de mutaciones naturales en la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1, esta isoenzima ha sido sujeta a estudios de mutagénesis dirigida en rata y de acuerdo a estos reportes (Bhattacharyya et al., 1999; Bhattacharyya & Collins, 2001) se ha concluido que esta isoenzima presenta una región altamente conservada la cual contiene residuos cargados negativamente que probablemente contribuyen a la estabilidad de la enzima. Además de esto, en la rata se ha reportado que esta región contiene un par de histidinas que han sido reportadas como residuos involucrados en la unión al sustrato e importantes para la actividad catalítica de esta isoenzima. Esta región carboxilo terminal altamente conservada se ha observado que presenta un alto porcentaje de similitud con la región carboxilo del hámster y del humano, por lo que a partir de estos estudios y la similitud entre las 5 $\alpha$ -reductasas tipo 1 de estas especies se podría sugerir que

estos residuos de aminoácidos están desempeñando un papel importante sobre la actividad catalítica y unión al sustrato muy similar a lo que ocurre en la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 de la rata.

Estudios moleculares y bioquímicos han demostrado la existencia de dos 5 $\alpha$ -reductasas distribuidas en tejidos reproductivos y periféricos de mamíferos. Los reportes demuestran que estas 5 $\alpha$ -reductasas son codificadas por distintos genes y difieren en su estructura molecular, propiedades cinéticas y pH óptimo. En este trabajo, los resultados obtenidos mediante transfección transitoria utilizando los cDNAs clonados para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster demostraron que la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 presenta una mayor afinidad por T que la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1. Esta afinidad diferencial para T ha sido reportada para las 5 $\alpha$ -reductasas del humano, rata y mono. Las razones por las cuales la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 tiene una afinidad más elevada que la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 son desconocidas, aunque a partir de estos resultados se podría sugerir que algunos aminoácidos presentes en la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 (regiones no idénticas de la secuencia) le están confiriendo esta alta afinidad para T. En términos fisiológicos estos resultados tienen muchas implicaciones en pacientes con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2. Estudios moleculares recientes han identificado que esta alteración es generada por mutaciones en el gen SRD5A2, el cual codifica para la enzima responsable de la conversión de T a DHT y se ha reportado que esta deficiencia genera una inadecuada biotransformación de DHT durante la embriogénesis; por lo que se ha concluido que algunas de estas mutaciones están generando una disminución en la afinidad por el sustrato T.

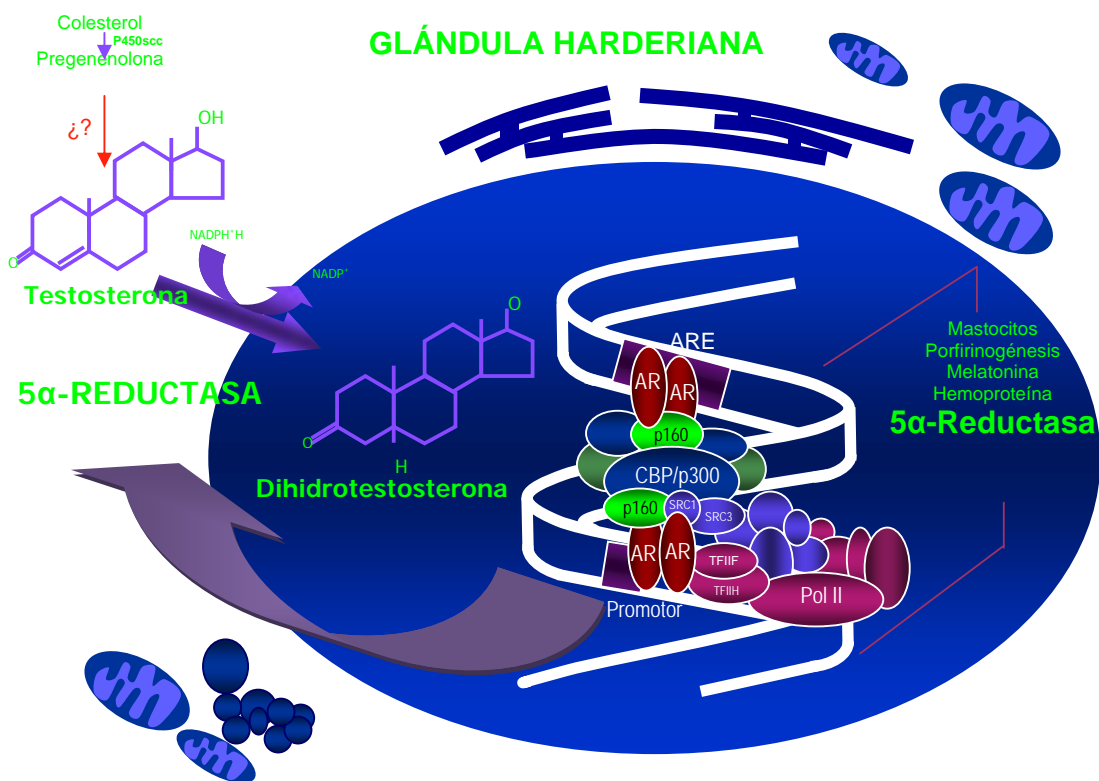
Por otro lado, el pH específico para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster sugiere que un pequeño número de aminoácidos, presumiblemente los no conservados, dan lugar a este fenómeno diferencial *In vitro*. Las diferencias reportadas en este trabajo son un indicativo de que estas enzimas presentan una alta sensibilidad al pH y debido a que estas isoenzimas son finamente sensibles al pH, se puede sugerir que el pH de cada organelo determina críticamente la reacción catalítica para cada isoenzima. La conservación evolutiva del pH neutro y ácido entre la isoenzima tipo 1 y tipo 2 respectivamente, de la rata, humano y hámster sugiere que esta característica es muy importante, aunque la razón de este argumento es aún desconocida.

Con la finalidad de determinar en qué tejidos se expresa la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster, inicialmente se aislaron los RNAs y posteriormente fueron sometidos a ensayos de transferencia northern. Los resultados de expresión revelaron dos observaciones interesantes: por un lado una expresión diferencial tejido-específico y por el otro una expresión sexualmente dimórfica del transcrito para estas isoenzimas. Esta expresión diferencial ha sido observada en otras 5 $\alpha$ -reductasas de mamífero, pero sorprendentemente y en contraste a la expresión hepática de la 5 $\alpha$ -

reductasa tipo 1 en ratas hembras, la expresión de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 en el hámster fue únicamente detectada en el hígado del macho, sugiriendo un papel catabólico en el tejido hepático del macho. La expresión de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 predominó en tejidos reproductivos como el epidídimo, este resultado apoya la idea de que la  $5\alpha$ -reductasa tipo 2 es la enzima predominante en el tracto reproductivo masculino y está desempeñando un papel anabólico en los tejidos reproductivos. Igualmente, mediante transferencia northern se pudo determinar una mayor expresión del mRNA de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 en la HG de hembras que en la harderiana de machos, el significado funcional de este dimorfismo sexual sugiere que estas diferencias encontradas son de gran importancia para la regulación diferencial ejercida por los andrógenos sobre la fisiología de la HG masculina y femenina. Con estos resultados se puede concluir que la expresión génica de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster exhibe diferencias sexuales asociadas al género y que estas isoenzimas presentan una expresión tejido-dependiente. Adicionalmente, se puede sugerir que la respuesta específica del sexo en la HG a T requiere la biotransformación a DHT a través de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1. Estos resultados nos indican de manera contundente que la biotransformación de T a DHT en la HG es llevada a cabo a través de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1; aunque es muy probable que la Srd5a2 sea la isoenzima asociada al desarrollo y mantenimiento del fenotipo sexual de este órgano.

Históricamente diversos trabajos han demostrado que la HG del hámster presenta un marcado dimorfismo sexual y se ha reportado que algunos genes son diferencialmente expresados en el macho y en la hembra. De este modo diversos trabajos han propuesto que los andrógenos en la HG son los responsables para el establecimiento y mantenimiento de este dimorfismo sexual en este tejido (Vilchis et al., 1996; Santillo et al., 2008). Un claro ejemplo de este dimorfismo se ha observado en la enzima  $5\alpha$ -reductasa, los resultados en estos ensayos han demostrado que esta isoenzima es más activa en la hembra que en el macho (Vilchis et al., 1994). Al respecto se ha observado que este dimorfismo sexual se modifica con la castración de los machos y la administración de andrógenos a las hembras, por lo que en la actualidad la HG ha sido considerada como un modelo apropiado para el estudio de genes andrógeno-regulados. Considerando estos antecedentes nosotros utilizamos como modelo de estudio a la HG del hámster para analizar la regulación de las  $5\alpha$ -reductasas mediante andrógenos. En este proyecto se ha demostrado que la castración en el hámster macho afecta la expresión de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 glandular incrementando su expresión mientras que la administración de T restablece los niveles normales de expresión de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1. Asimismo, durante las fases del ciclo estral se pudo observar que los esteroides de origen ovárico tienen efectos menos drásticos sobre la expresión del mRNA tipo 1, esto se determinó al observar que la ovariectomía no genera efectos sobre la expresión de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1. La administración de T a hembras ovariectomizadas disminuye

considerablemente la expresión de esta isoenzima. De cualquier manera la administración de  $17\beta$ -estradiol modificó la expresión de ambas  $5\alpha$ -reductasas. Los resultados antes mencionados sugieren que los andrógenos están regulando la actividad transcripcional de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 en la HG del hámster y que la  $5\alpha$ -reducción de T a DHT es una reacción importante para mantener la actividad, morfología y la fisiología de la HG. Con estos resultados obtenidos se puede concluir que la presencia o ausencia de andrógenos, presumiblemente DHT, está determinando si la glándula presenta una estructura masculina o femenina (Fig. 19). Estos resultados son consistentes con los reportes anteriores sobre la presencia del receptor de andrógenos en ambas glándulas, además de que este receptor se une a DHT con mucha mayor afinidad que a T. Sin embargo, debido a que tanto T como DHT se unen a una misma molécula receptora (receptor de andrógenos), no se puede excluir la posibilidad de que T este ejerciendo efectos sobre la fisiología de la glándula. En este caso quizás sea de interés estudiar los efectos de distintos inhibidores para las  $5\alpha$ -reductasas y poder evaluar los efectos de cada esteroide sobre este tejido.



**Fig. 21.** Representación esquemática de los mecanismos de acción de los andrógenos sobre la HG. La biotransformación de T a DHT mediante las  $5\alpha$ -reductasas podría estar determinando la morfología masculina o femenina de este tejido.

Diversos trabajos han demostrado que el splicing alternativo es un fenómeno frecuente en el transcriptoma y es extremadamente importante debido a su significado biológico para generar



variabilidad en el proteoma de mamíferos (Clark & Thanaraj, 2002; Ladd & Cooper, 2002). En la literatura se ha reportado la presencia de cuatro tipos de splicing alternativo: selección de promotores alternativos, selección de sitios de poliadenilación alternativos, splicing de exones y retención de intrones (Galante et al., 2004). Al respecto, se ha argumentado que la frecuencia de retención de intrones está asociada con genes que poseen intrones más cortos que los exones o quizás por intrones individuales que tienen sitios débiles de splicing (Sakabe & de Souza, 2007). En este estudio los ensayos de transferencia northern determinaron la presencia de dos distintas isoformas de mRNA (1.35 y 4 kb) de las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster. La banda de 1.35 kb localizada para cada isoenzima corresponde al cDNA aislado para la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 secuenciado anteriormente; mientras que sugerimos que la segunda banda de 4 kb probablemente corresponde a un mRNA no procesado o sin splicing. En el caso de las 5 $\alpha$ -reductasas del hámster sugerimos que quizás estas especies de pre-mRNA de 4 kb podrían ser generadas probablemente por un mecanismo de retención de intrones. Esta forma rara de splicing alternativo se ha sugerido que es generada mediante pre-mRNAs con un splicing parcial o sin splicing. El significado biológico del mecanismo de retención de intrones es desconocido. No obstante, estudios en el receptor de vitamina D de la rata y en la hormona del crecimiento del bovino han demostrado que estas variantes de mRNA con splicing alternativo son funcionalmente significativas (Dirksen et al., 1995; Ebihara et al., 1996). Sin embargo, en humanos se ha observado que este mecanismo de retención de intrones es el responsable de ciertas enfermedades genéticas (Nichols et al., 1996; Mine et al., 2003). Los análisis de restricción y secuenciación génica en pacientes con hiperplasia adrenal congénita lipóide han demostrado la retención de intrones en el gen StAR (González et al., 2004).

En conclusión, en este proyecto se clonó y se secuenció el cDNA de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 del hámster, se determinaron las propiedades cinéticas de las 5 $\alpha$ -reductasas y se determinó la expresión del mRNA. Las secuencias nucleotídicas y deducidas de aminoácidos obtenidas de las 5 $\alpha$ -reductasas aisladas a partir del hámster presentaron porcentajes de identidad muy altos con las 5 $\alpha$ -reductasas descritas hasta este momento. Estos resultados demostraron la presencia de dominios funcionalmente activos muy conservados en la región carboxilo terminal y de unión al esteroide. La actividad catalítica de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 fue confirmada en cultivos celulares y se demostraron sus características bioquímicas. Las observaciones en este estudio indican que en la HG, la expresión de las 5 $\alpha$ -reductasas es regulada mediante andrógenos y que la biotransformación de T a DHT por ambas 5 $\alpha$ -reductasas pueden estar estimulando o controlando la estructura y la actividad secretora glandular. Los resultados reportados en este trabajo demuestran que no solo los andrógenos, sino que también los estrógenos regulan la expresión de los genes de las 5 $\alpha$ -reductasas.

**REFERENCIAS**

Anderson KM & Liao S (1968) Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. **Nature 219: 277-279.**

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: 3640-3644.**

Andersson S, Berman DM, Jenkins EP & Russell DW (1991) Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. **Nature 354: 159-161.**

Auchus RJ (2004) The backdoor pathway to dihydrotestosterone. **Trends Endocrinol Metab 15: 432-438.**

Aumuller G, Eicheler W, Renneberg H, Adermann K, Vilja P & Forssmann WG (1996) Immunocytochemical evidence for differential subcellular localization of 5 alpha-reductase isoenzymes in human tissues. **Acta Anat 156: 241-252.**

Bardin CW & Catterall JF (1981) Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism. **Science 211: 1285-1294.**

Beato M & Sanchez-Pacheco A (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. **Endocr Rev 17: 587-609.**

Berman DM, Tian H & Russell DW (1995) Expression and regulation of steroid 5 $\alpha$ -reductase in the urogenital tract of the fetal rat. **Mol Endocrinol 9: 1561-1570.**

Bhattacharyya AK, Wang M, Rajagopalan K, Taylor MF, Hiipakka R, Liao S & Collins DC (1999) Analysis of the steroid binding domain of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase (Isozyme-1). The steroid D-ring binding domain of 5 $\alpha$ -reductase. **Steroids 64: 197-204.**

Bhattacharyya AK & Collins DC (2001) Site-directed mutagenesis studies of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase (isozyme-1): mutation of residues in the cofactor binding and C-terminal regions. **J Steroid Biochem Mol Biol 77: 177-182.**

Blanchard Y, Seenundun S & Robaire B (2007) The promoter of the rat 5 $\alpha$ -reductase type 1 gene is bidirectional and Sp1-dependent. **Mol Cell Endocrinol** **264**: 171-183.

Bremner WJ, Millar MA, Sharpe RM & Saunders PTK (1994) Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation of androgens. **Endocrinology** **135**: 1227-1234.

Burns JM, Weinberger MJ & Veneziale CM (1979) Sex-steroid responses and binding in seminal vesicle epithelium. **J Biol Chem** **254**: 2258-2264.

Canto P, Vilchis F, Chávez B, Mutchinick O, Imperato-McGinley J, Pérez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A & Méndez JP (1997) Mutations of the 5 $\alpha$ -reductase type 2 gene in eight mexican patients from six different pedigrees with 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **Clin Endocrinol** **46**: 155-160.

Clark F & Thanaraj TA (2002) Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced intrones and exons from human. **Hum Mol Genet** **11**: 451-464.

Colgan DF & Manley JL (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. **Genes Dev** **11**: 2755-2766.

Conley AJ & Bird IM (1997) The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. **Biol Reprod** **56**: 789-799.

Di Blasio AM, Voutilainen R, Jaffe RB & Millar WL (1987) Hormonal regulation of messenger ribonucleic acids for P450<sub>scc</sub> (cholesterol side-chain cleavage enzyme) and P450<sub>c17</sub> (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human fetal adrenal cells. **J Clin Endocrinol Metab** **65**: 170-175.

Dirksen WP, Sun Q & Rottman FM (1995) Multiple splicing signals control alternative intron retention of bovine growth hormone pre-mRNA. **J Biol Chem** **270**: 5346-5352.

Ebihara K, Masuhiro Y, Kitamoto T, Suzawa M, Uematsu Y, Yoshizawa T, Ono T, Harada H, Matsuda K, Hasegawa T, Masushige S & Kato S (1996) Intron retention generates a novel isoform of the murine vitamin D receptor that acts in a dominant negative way on the vitamin D signaling pathway. **Mol Cell Biol** **16**: 3393-3400.

Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA & Vinson GP (1998) Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. **Endocr Rev** **19**: 101-43.

Evans-Storms RB & Cidlowski JA (1995) Regulation of apoptosis by steroid hormones. **J Steroid Biochem Molec Biol** **53**: 1-8.

Fan X & Robaire B (1998) Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. **Endocrinology** **139**: 2128-2136.

Fang S, Anderson KM & Liao S (1969) Receptor proteins for androgens. **J Biol Chem** **244**: 6584-6595.

Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan Y-L & Postlethwait J (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. **Genetics** **151**: 1531-1545.

Galante PAF, Sakabe N, Kirschbaum-Slager N & Souza SJ (2004) Detection and evaluation of intron retention events in human transcriptome. **RNA** **10**: 757-765.

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**: 8044-8047.

González GF (2001) Function of seminal vesicles and their role on male fertility. **Asian J Androl** **3**: 251-258.

González AA, Reyes ML, Carvajal CA, Tobar JA, Mosso LM, Baquedano P, Solar A, Venegas A & Fardella CE (2004) Congenital lipid adrenal hyperplasia caused by a novel splicing mutation in the gene for the steroidogenic acute regulatory protein. **J Clin Endocrinol Metab** **89**: 946-951.

Graber JH, Cantor CR, Mohr SC & Smith TF (1999) In silico detection of control signals: mRNA3'-end-processing sequences in diverse species. **Proc Natl Acad Sci USA 96: 14055-14060.**

Guerini V, Sau D, Scaccianoce E, Rusmini P, Ciana P, Maggi A, Martini PG, Katzenellenbogen BS, Martini L, Motta M & Poletti A (2005) The androgen derivate 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor  $\beta$  subtype. **Cancer Res 65: 5445-5453.**

Hanukoglu I (1992) Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **J Steroid Biochem Molec Biol 43: 779-804.**

Harvey S, Vrabel A, Smith S & Wieben E (1995) Androgen regulation of a elastase-like protease activity in the seminal vesicle. **Biol Reprod 52: 1059-1065.**

Heinlein CA & Chang C (2002) Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocr Rev 23: 175-200.**

Hiort O & Holterhus P-M (2000) The molecular basis of male sexual differentiation. **Eur J Endocrinol 142: 101-110.**

Hoffman RA (1971) Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the histology and porphyrins of the Harderian glands of golden hamsters. **Am J Anat 132: 463-478.**

Hoffman RA & Jones JW (1981) Concentrations of metals in the Harderian glands of male and female hamsters. **Comp Biochem Physiol 69: 153-156.**

Honda S, Morohashi K, Nomura M (1993) AdBP4 regulating steroidogenic P-450 is a member of steroid hormone receptor superfamily. **J Biol Chem 268: 7494-7502.**

Hoppe U, Holterhus P-M, Wunsch, Jocham D, Drechsler T, Thiele S, Marschke C & Hiort O (2006) Tissue-specific transcription profiles of sex steroid biosynthesis enzymes and the androgen receptor. **J Mol Med 84: 651-659.**

Hughes IA (2001) Minireview: Sex differentiation. **Endocrinology** **142**: 3281-3287.

Imperato-McGinley J, Binienda Z, Gedney J & Vaughan ED Jr (1986) Nipple differentiation in fetal male rats treated with an inhibitor of the enzyme 5 alpha-reductase: definition of a selective role for dihydrotestosterone. **Endocrinology** **18**: 132-137.

Jaffe RB (1969) Testosterone metabolism in target tissues: Hypothalamic and pituitary tissues of the adult rat and human fetus, and the immature rat epiphysis. **Steroids** **14**:5 483-498.

Jefcoate CR, McNamara BC, Artemenko I & Yamazaki T (1992) Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450<sub>scc</sub> in steroid hormone synthesis. **J Steroid Biochem Molec Biol** **43**: 751-767.

Johnston HS, McGadey J, Thompson GG, Moore MR & Payne AP (1983) The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Anat** **137**: 615-630.

Johnston HS, McGadey J, Thompson GG, Moore MR, Breed WG & Payne AP (1985) The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the plains mouse (*Pseudomys australis*). **J Anat** **140**: 337-350.

Kawamoto S, Yoshii J, Mizuno K, Ito K, Miyamoto Y, Ohnishi T, Matoba R, Hori N, Matsumoto Y, Okumura T, Nakao Y, Yoshii H, Arimoto J, Ohashi H, Nakanishi H, Ohno I, Hashimoto J, Shimizu K, Maeda K, Kuriyama H, Nishida K, Shimizu-Matsumoto A, Adachi W, Ito R, Kawasaki S, Chae KS, Murakawa K, Yokoyama M, Fukushima A, Hishiki T, Nakaya A, Sese J, Monma N, Nikaido H, Morishita S, Matsubara K, Okubo K 2000 BodyMap: A collection of 3' ESTs for analysis of human gene expression information. **Genome Res** **10**:1817-1827.

Keegan CE & Hammer GD (2002) Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. **Trends Endocrinol Metab** **13**: 200-208.

Kim KS, Liu W, Cunha GR, Russell DW, Huang H, Shapiro E & Baskin LS (2002) Expression of the androgen receptor and 5 $\alpha$ -reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. **Cell Tissue Res** **307**: 145-153.

Kochetov AV (2005) AUG codons at the beginning of protein coding sequences are frequent in eukaryotic mRNAs with a suboptimal start codon context. **Bioinformatics 21: 837-840.**

Kozak M (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. **Gene 299: 1-34.**

Kwong J, Xuan JW, Chan PSF, Ho S-M & Chan FL (2000) A comparative study of hormonal regulation of three secretory proteins (prostatic secretory protein-PSP94, probasin, and seminal vesicle secretion II) in rat lateral prostate. **Endocrinology 141: 4543-4551.**

Ladd AN & Cooper TA (2002) Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. **Genome Biol 3: 1-16.**

LeHoux JG, Mason JI & Ducharme L (1992) In vivo effects of adrenocorticotropin on hamster adrenal steroidogenic enzymes. **Endocrinology 131: 1874-1882.**

Leihy MW, Shaw G, Wilson JD & Renfree MB (2001) Virilization of the urogenital sinus of the tammar wallaby is not unique to  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol. **Mol Cell Endocrinol 181: 111-115.**

Leihy MW, Shaw G, Wilson JD & Renfree MB (2004) Penile development is initiated in the tammar wallaby pouch young during the period when  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol is secreted by the testes. **Endocrinology 145: 3346-3352.**

Levy MA, Brandt M, Sheedy KM, Holt DA, Heaslip JI, Trill JJ, Ryan PJ, Morris RA, Garrison LM & Bergsma DJ (1995) Cloning, expression and functional characterization of type 1 and type 2 steroid  $5\alpha$ -reductases from *Cynomolgus* Monkey: Comparisons with human and rat isoenzymes. **J Steroid Biochem Molec Biol 52: 307-319.**

Li J, Biswas MG, Chao A, Russell DW & Chory J (1997) Conservation of function between mammalian and plant steroid  $5\alpha$ -reductases. **Proc Natl Acad Sci USA 94: 3554-3559.**

Luo J, Dunn TA, Ewing CM, Walsh PC & Isaacs WB (2003) Decreased gene expression of steroid 5 alpha-reductase 2 in human prostate cancer: implications for finasteride therapy of prostate carcinoma. **Prostate 57: 134-139.**

MacDonald CC & Redondo J-L (2002) Reexamining the polyadenylation signal: were we wrong about AAUAAA?. **Mol Cell Endocrinol 190: 1-8.**

MacLaughlin DT & Donahoe PK (2004) Sex determination and differentiation. **N Engl J Med 350: 367-378.**

Mahendroo MS, Cala KM & Russell DW (1996) 5 $\alpha$ -reduced androgens play a key role in murine parturition. **Mol Endocrinol 10: 380-392.**

Mahendroo MS & Russell DW (1999) Male and female isoenzymes of steroid 5 $\alpha$ -reductase. **Rev Reprod 4: 179-183.**

Mahendroo MS, Cala KM, Hess DL & Russell DW (2001) Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5 $\alpha$ -reductase enzymes. **Endocrinology 142: 4652-4662.**

Martini L (1982) The 5 $\alpha$ -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. **Endocr Rev 3: 1-25.**

McGuire JS & Tomkins GM (1960) The heterogeneity of  $\Delta^4$ -3-ketosteroid reductases (5 $\alpha$ ). **J Biol Chem 235: 1634-1638.**

McGuire JS, Hollis VW & Tomkins GM (1960) Some characteristics of the microsomal steroid reductases (5 $\alpha$ ) of rat liver. **J Biol Chem 235: 3112-3117.**

Menendez-Pelaez A & Buzzell GR (1992) Harderian gland indoles. In **“Harderian glands: Porphyrin metabolism, behavioral and endocrine effects”**. (S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo, and R.J. Reiter, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp 219-234.

Mesiano S & Jaffe RB (1997) Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endocr Rev 18: 378-403.**



Mindnich R, Moller G & Adamski j (2004) The role of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. **Mol Cell Endocrinol 218: 7-20.**

Miller WL (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocr Rev 9: 295-318.**

Mine M, Brivet M, Touati G, Grabowski P, Abitbol M & Marsc C (2003) Splicing Error in E1 $\alpha$  Pyruvate Dehydrogenase mRNA Caused by Novel Intronic Mutation Responsible for Lactic Acidosis and Mental Retardation. **J Biol Chem 278: 11768-11772.**

Mooradian AD, Morley JE & Korenman SG (1987) Biological actions of androgens. **Endocr Rev 8: 1-28.**

Moore RJ & Wilson JD (1972) Localization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate:  $\Delta^4$ -3-ketosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase in the nuclear membrane of the rat ventral prostate. **J Biol Chem 247: 958-967.**

Morohashi K & Omura T (1996) AdBP4/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. **FASEB J 10: 1569-1577.**

Nebert DW & Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. **Lancet 360: 1155-1162.**

Nichols RC, Rudolphi O, Ek B, Exelbert R, Plotz PH & Raben N (1996) Glycogenosis Type VII (Tarui Disease) in a Swedish Family: Two Novel Mutations in Muscle Phosphofructokinase Gene (PFK-M) Resulting in Intron Retentions. **Am J Hum Genet 59: 59-65.**

Normington K & Russell DW (1992) Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes. **J Biol Chem 267: 19548-19554.**

Ohno S 1970 Evolution by gene duplication. **Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.**

Omura T & Morohashi K-I (1995) Gene regulation of steroidogenesis. **J Steroid Biochem Molec Biol 53: 19-25.**

Ortiz GG, Feria-Velazco A, Tarpley RL, Bitzer-Quintero OK, Rosales-Corral SA, Velázquez-Brizuela IE, López-Navarro OG & Reiter R (2007) The orbital Harderian gland of the male atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): A morphology study. **Anat Histol Embryol** **36**: 209-214.

Pastor-Soler N, Isnard-Bagnis C, Herak-Kramberger C, Sabolic I, Van Hoek A, Brown D, Breton S (2002) Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. **Biol Reprod** **66**:1716-1722.

Payne AP, McGadey J, Moore MR & Thompson GG (1975) The effects of androgen manipulation on cell types and porphyrin content of the Harderian gland in the male golden hamster. **J Anat** **120**: 615-616.

Payne AP, McGadey J, Johnston HS, Moore MR & Thompson GG (1982) Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrin. **J Anat** **135**: 451-461.

Payne AP, McGadey J & Johnston HS (1992) The structure of the harderian gland of the golden hamster In “Harderian glands: Porphyrin metabolism, Behavioral and endocrine effects” (ed. S.M. Webb, RA Hoffman, M.L. Puig-Domingo & R.J. Reiter) Berlin: Springer-Verlag, pp 53-67.

Payne AP (1994) The Harderian gland: a tercentennial review. **J Anat** **185**: 1-49.

Payne AH & Youngblood GL (1995) Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. **Biol Reprod** **52**: 217-225.

Payne AH & Hale DB (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol active steroid hormone. **Endocr Rev** **25**: 947-970.

Penning TM (1997) Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. **Endocr Rev** **18**: 281-305.

Penning TM, Bauman DR, Jin Y & Rizner TL (2007) Identification of the molecular switch that regulates access of 5 $\alpha$ -DHT to the androgen receptor. **Mol Cell Endocrinol** **265-266**: 77-82.

Penning TM, Jin Y, Rizner TL & Bauman DR (2008) Pre-receptor regulation of the androgen receptor. **Mol Cell Endocrinol** **281**: 1-8.

Pradidarcheep W, Asavapongpatana S, Mingsakul T, Poonkhum R, Nilbu-nga S & Somana R (2003) Microscopic anatomy of the orbital Harderian gland in the common tree shrew (*Tupaia glis*). **J Morphol** **255**: 328-336.

Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM & French FS (1995) Androgen receptor defects: Historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocr Rev** **16**: 271-321.

Reiter RJ & Klein DC (1971) Observations on the pineal gland, Harderian gland, the retina and the reproductive organs of adult female rats exposed to continuous light. **J Endocr** **51**: 117-125.

Robaire B & Henderson NA (2006) Actions of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors on the epididymis. **Mol Cell Endocrinol** **250**: 190-195.

Rodríguez C, Menéndez-Peláez A, Vaughan MK & Reiter RJ (1993) Gender-associated differences in the development of 5-aminolevulinic synthase gene expression in the Harderian gland of syrian hamster. **Mol Cell Endocrinol** **93**: 167-173.

Russell DW, Berman DM, Bryant JT, Cala KM, Davis DL, Landrum CP, Prihoda JS, Silver RI, Thigpen AE & Wigley WC (1994) The molecular genetics of steroid 5 alpha-reductases. **Rec Prog Horm Res** **49**: 275-284.

Russell DW & Wilson JD (1994) Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. **Annu Rev Biochem** **63**: 25-61.

Sakabe NJ & Souza SJ (2007) Sequence features responsible for intron retention in human. **BMC Genomics** **8**: 59-72.

Sambrook J & Russell DW (2001) **Molecular Cloning a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Lab Press, New York.

Santillo A, Monteforte S, De Lange P, Lanni A, Farina P & Baccardi GC (2008) Dimorphic expression of uncoupling protein-3 in golden hamster Harderian gland: Effects of castration and testosterone administration. **J Cell Physiol** 215: 481-487.

Schlatt S, Meinhardt A & Nieschlag E (1997) Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **Eur J Endocrinol** 137: 107-117.

Seenundun S & Robaire B (2005) Cloning and characterization of the 5 $\alpha$ -reductase type 2 promoter in the rat epididymis. **Biol Reprod** 72: 851-861.

Shaw G, Renfree MB, Leihy MW, Shackleton CHL, Roitman E & Wilson JD (2000) Prostate formation in a marsupial is mediated by the testicular androgen 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol. **Proc Natl Acad Sci USA** 97: 12256-12259.

Shen Z-J, Zhou X-L, Lu Y-L & Chen Z-D (2003) Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. **Asian J Androl** 5: 33-36.

Shirama K, Furuya T, Takeo Y, Shimizu K & Maekawa K (1981) Influences of some endocrine glands and of hormone replacement on the porphyrins of the Harderian glands of mice. **J Endocrinol** 91: 305-311.

Shupnik MA & Schreihof DA (1997) Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. **J Andrology** 18: 341-344.

Silver RI, Wiley EL, Davis DL, Thigpen AE, Russell DW & McConnell JD (1994a) Expression and regulation of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 in prostate disease. **J Urol** 152: 433-437.

Silver RI, Wiley EL, Thigpen AE, Guileyardo JM, McConnell JD & Russell DW (1994b) Cell type specific expression of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2. **J Urol** 152: 438-442.

Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA & Melner MH (2005) Molecular biology of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. **Endocr Rev** 26: 525-82.

Simpson ER (1979) Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450, and the control of steroidogenesis. **Mol Cell Endocrinol 13: 213-227.**

Simpson E, Lauber M, Demeter M, Stirling D, Rodgers R, Means G, Mahendroo M, Kilgore M, Mendelson C & Waterman M (1991) Regulation of expression of the genes encoding steroidogenic enzymes. **J Steroid Biochem Molec Biol 40: 45-52.**

Spike RC, Johnston HS, McGadey J, Moore MR, Thompson GG & Payne AP (1985) Quantitative studies on the effects of hormones on the structure and porphyrin biosynthesis in the harderian gland of the female golden hamster. I. The effects of ovariectomy and androgen administration. **J Anat 142: 59-72.**

Spike RC, Johnston HS, McGadey J, Moore MR, Thompson GG & Payne AP (1986) Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the harderian gland of the female golden hamster. II. The time course of changes after ovariectomy. **J Anat 145: 67-77.**

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

Sun CY & Nadakavukaren (1980) Effect of testosterone on the female hamster harderian gland pigmentation and ultrastructure. **Cell Tissue Res 207: 511-517.**

Takagi-Morishita Y, Kuhara A, Sugihara A, Yamada N, Yamamoto R, Iwasaki T, Tsujimura T, Tanji N, Terada N (2002) Castration induces apoptosis in the mouse epididymis during postnatal development. **Endocrinol J 49: 75-84.**

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: 903-910.**

Thompson AA (2001) Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. **Reproduction 121: 187-195.**



Contents lists available at ScienceDirect

## General and Comparative Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ygcen](http://www.elsevier.com/locate/ygcen)

## Cloning and differential expression of steroid 5 $\alpha$ -reductase type 1 (Srd5a1) and type 2 (Srd5a2) from the Harderian glands of hamsters

Luis Ramos, Bertha Chávez, Felipe Vilchis\*

Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 October 2009

Revised 8 December 2009

Accepted 10 December 2009

Available online xxx

## Keywords:

5 $\alpha$ -reductase

Harderian glands

DHT

Testosterone

Androgen metabolism

## ABSTRACT

In hamsters, the Harderian glands (HG) exhibit a marked sexual dimorphism which is thought to depend on dihydrotestosterone (DHT); however, it is unclear whether hamster HGs contain one or more 5 $\alpha$ -reductases and whether these enzymes are differentially expressed in males and females. In this study, we isolated specific cDNAs for 5 $\alpha$ -reductase 1 (Srd5a1) and 5 $\alpha$ -reductase 2 (Srd5a2), determined their sequences and investigated their expression in the HG of both sexes. Isozyme 1, cloned from liver mRNA, encodes a protein of 255 amino acids (aa); isozyme 2 cDNA, isolated from the epididymis encodes a 254-aa protein. When assayed in transfected HEK-293 cells, the type 1 isozyme displayed activity over a broad pH range (6.5–8), while isozyme 2 had a pH optimum of 5.5. Both isoenzymes efficiently catalyzed the *in vitro* transformation of T into DHT, with apparent  $K_m$  values of 7.1 and 1.9  $\mu\text{mol/L}$  for Srd5a1 and Srd5a2, respectively. Real-time PCR analysis revealed higher mRNA levels for Srd5a1 than for Srd5a2. Expression of both isoenzymes increased slightly in HGs of castrated males and showed variations during the estrous cycle in females. Hormonal replacement with 17 $\beta$ -estradiol administered to spayed females induced the up-regulation of Srd5a2 mRNA levels. Altogether, our results demonstrated that both Srd5a1 and Srd5a2 are expressed in HGs without clear differences between males and females. The biochemical characteristics and relative expression of these 5 $\alpha$ -reductases support the view that both isozymes may play a relevant role in modulating androgen signaling in HG.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Androgens play a relevant physiological role in growth and differentiation of the Harderian gland (HG). In Syrian hamsters, these intraorbital glands exhibit marked sex-related histological and biochemical differences, including a dimorphic cellular pattern characterized by two distinct types of alveolar cells in males and a single cell type in females (Hoffman, 1971). The HG is larger in males and contains more lipids (Buzzell et al., 1995), *N*-acetyltransferase (Menendez-Pelaez et al., 1988), receptors for dihydroxyindole (Kumar et al., 1992) and hormone-induced proteins (Vilchis et al., 1996; Santillo et al., 2008) than the HG in females. In contrast, the female gland synthesizes and stores large amounts of protoporphyrins which can be up to 1000 times more abundant than in males (Payne, 1994). In fact, the activity of six of the seven porphyrinogenic enzymes (including 5-aminolaevulinic acid synthetase 1) is much higher in females (Thompson et al., 1984; Vilchis et al., 2006). Similarly, the intraglandular content of melatonin (Hoffman et al., 1985), somatostatin (Puig-Domingo

et al., 1988) and thyroid hormone receptors (Vilchis et al., 1992a), as well as the number of mast cells, is higher in females (Payne, 1994). Most of these sexual differences start to be evident around the fourth week of postnatal development (Lopez et al., 1992), the time at which the hamsters reach puberty. Interestingly, many of these characteristic features can be easily reversed by means of castration of males or by androgen administration to females. Data from experimental observations have pointed out that androgens alone can induce the formation of the male-type gland in both males and females (Hoffman, 1971; Payne, 1994). In line with this view, available evidence indicates that dihydrotestosterone (DHT) is the bioactive androgen in Harderian tissue (Vilchis et al., 1994; Rubio et al., 1996). At the target organ level, DHT is formed by the reduction of T by a steroid 5 $\alpha$ -reductase (E.C. 1.3.99.5). Two steroid 5 $\alpha$ -reductase isoenzymes have been identified and are encoded by distinct genes, *SRD5A1/srd5a1* and *SRD5A2/srd5a2*. These microsomal proteins play a central role in sexual differentiation and androgen physiology. The two isoenzymes differ in their biochemical and pharmacological properties and in their levels of expression (Russell et al., 1994). In regard to HG, there are few data documenting the activity of 5 $\alpha$ -reductase; the results from biochemical studies using whole gland homogenates, showed a maximal conversion of T to DHT at acidic pH (5.5) with a low  $K_m$  value for T ( $4.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$ ) which suggested

\* Corresponding author. Address: Department of Reproductive Biology, Instituto, Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S.Z., Vasco de Quiroga # 15, Del. Tlalpan C.P. 14000, México D.F., Mexico. Fax: +52 525 6559859.

E-mail address: vilchisuf@prodigy.net.mx (F. Vilchis).

the presence of only one  $5\alpha$ -reductase in this tissue (Vilchis et al., 1994). In the current study, we used RT-PCR coupled to the 5',3' RACE method in order to isolate steroid  $5\alpha$ -reductase genes from hamsters and to determine the dominant isoform in HG. Two specific cDNA sequences were identified encoding the type 1 and type 2  $5\alpha$ -reductases. These isoenzymes were found to share a high sequence homology and kinetic properties with the corresponding rat and human enzymes. Srd5a1 appears to predominate over Srd5a2 in the HG of males and females, and the expression of these enzymes is influenced by sex steroid hormones.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and Tissues

Throughout the study, animals had free access to food and water and were housed under a 12 h light/12 h dark cycle. Male and female adult Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), weighing 130–150 g were grouped according to treatments, including intact controls, castrated males and spayed females. The animals were operated on light ether anesthesia and were allowed seven days to recover before the study. Castrated males were intra-muscularly injected with a daily dose of testosterone (0.5 mg) or vehicle alone (50  $\mu$ L corn oil) for six consecutive days. Spayed females were injected with a daily dose of  $17\beta$ -estradiol (10  $\mu$ g), progesterone (0.5 mg),  $17\beta$ -estradiol plus progesterone (10  $\mu$ g + 0.5 mg), or vehicle alone (50  $\mu$ L corn oil) for six days. Other groups of intact females were monitored daily by vaginal smears to determine their reproductive phase (proestrus, estrus, metaestrus, diestrus). Experimental procedures using animals were approved by the Ethical Committee for Research in Animals of our Institute (INCMNSZ).

### 2.2. RNA isolation and cDNA synthesis

Total cellular RNA was extracted from different hamster tissues with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). The purity and integrity of the RNAs were checked both by spectroscopy and by gel electrophoresis prior to use in experimental procedures. In all cases, the complementary DNA (cDNA) was synthesized from the corresponding RNA (1.0  $\mu$ g) using the Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany) following the supplier's guidelines.

### 2.3. Cloning of specific cDNAs by RT-PCR and 5', 3'-RACE

To obtain the full-length cDNAs encoding the hamster reductases, two sets of degenerate oligonucleotides designed from the sequences of the rat (NM\_017070; NM\_022711) and human (NM\_001047; NM\_000348) reductase genes were initially used to amplify specific cDNA segments using PCR. The forward and reverse primers were as follows: 5'-CAC/TATC/TCTA/GAGGAATCTG/CA/CGAAAC-3' and 5'-ACTTG/TGGA/GTAA/CTCTTCAAAC/TTTC-3', for Srd5a1 and; 5'-GTGCTGGCAGGC/TAGCGCCACA/TTTGG-3' and 5'-GCTGGGAG/CG GACCAA/CGTA/GGCCAA/GG-3' for Srd5a2. Samples of cDNA synthesized from mRNA from the liver and the epididymis were used as templates to isolate the type 1 and type 2  $5\alpha$ -reductases, respectively. Gene-specific primers (GSPs) derived from these sequences were used in further procedures to determine the 5'- and 3'-end regions by rapid amplification of the cDNA ends (5', 3'-RACE). In both cases, first-strand cDNA synthesis was performed with the SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA). The GSPs used to generate the 5'- and 3'-RACE regions were as follows: 1R5 (5'-AGTGATTCATACAGCGG CCAAGCCAT-3') and; 1R3 (5'-CAGC ATCACCAGTGGTACCATGAG-3') for  $5\alpha$ -reductase 1 and 2R5 (5'-GAGC AAGCTTCTACGGGAAAC-3') and; 2R3 (5'-GCTACTCTTATA GAAGC

TTCTCC-3') for  $5\alpha$ -reductase 2. The full-length coding sequence of each reductase was obtained from RACE-ready cDNA by means of PCR using the following GSPs: NRED1F 5'-GCACGCTGCTCGACTCAACTATG-3' and REV1R 5'-AAAGCAGTTAAAGCACAAA TGG-3' to synthesize Srd5a1 and; LRT25 5'-AGCTGTGAACACCGGCGAGAT-3' and LRT23 5'-TTACA GTTGATAGTCTCCGCGAGCTGGG-3' to synthesize Srd5a2. PCR was performed using 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 65 °C and 3 min at 72 °C, followed by a 7 min extension at 72 °C. PCR-amplified products were purified and cloned into the pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Life Tech., Carlsbad, CA). The nucleotide sequences of the final clones, pcDNA3.1/hSrd5a1 and pcDNA3.1/hSrd5a2, were determined by automated sequencing using an ABI-PRISM 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### 2.4. Steroid $5\alpha$ -reductase activity in transfected HEK-293 cells

Cell culture and transfection conditions were performed basically as described elsewhere (Chavez et al., 2009). The plasmids pcDNA3.1/hSRD5a1 and pcDNA3.1/hSrd5a2 were transfected into HEK-293 cells at a concentration of 2.0  $\mu$ g per plate using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen Co., Carlsbad CA). Cells were rinsed with PBS, harvested and processed for enzymatic studies 48 h after transfection. To determine the optimal pH of each isoenzyme, the activity of  $5\alpha$ -reductase was measured in cellular homogenates using [ $^3$ H]testosterone ([1,2,6,7- $^3$ H(N)]T; Amersham, GE Health Co., UK) and Tris-citrate buffer (100 mmol/L Tris-HCl; 100 mmol/L sodium citrate) at different pHs. Enzyme activity assays to determine kinetic features were done at pH 7.5 for the type 1 enzyme and at pH 5.5 for the type 2 enzyme. Reaction mixtures contained cell extract preparations (1–2 mg protein/ml),  $8 \times 10^5$  dpm [ $^3$ H]T (sp.act., 3.6 TBq/mmol), increasing concentrations of unlabeled T (0.125–32  $\mu$ mol/L) and NADPH (500  $\mu$ mol/L) in a final incubation volume of 200  $\mu$ L. Assays were carried out for 10 min with continuous shaking at 37 °C. After incubation, the steroids were subjected to thin layer chromatography and scintillation counting as previously described (Vilchis et al., 1994). Experiments were repeated at least twice, and the results were expressed as nanomoles of DHT formed per milligram of protein per hour (nmol/mg/h). The calculated kinetic values for  $K_m$  (Michaelis constant) and  $V_{max}$  (maximum velocity) were derived from Eadie-Hofstee plots (Zivin and Waud, 1982).

### 2.5. Real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Samples of total cellular RNA extracted from the HGs of the different experimental groups were reverse transcribed using an oligo(dT) primer as described above. Expression of Srd5a1 and Srd5a2 was analyzed by RT-qPCR in 20  $\mu$ L reaction volumes using a LightCycler 2.0 from Roche (Applied Science), the LightCycler TaqMan master mix (Roche Diagnostics, Mannheim Germany) and pre-validated TaqMan hydrolysis probes (Roche Diagnostics). Forward and reverse primers for Srd5a1 mRNA detection were: 5'-GCTTGGCCGCTGTAT GAA-3' and 5'-CCTTTGAACGTAAGTGCATCAGA-3'. The amplicon was detected using universal probe #18 (04-686-918-001). The primers and the probe for the Srd5a2 amplicon were: 5'-TTA GGGAAACC CACCAGCTA-3' and; 5'-CGAAGGAGGGAAGTTCCTG-3' and universal probe #76 (04-688-996-001), respectively. The primers used to amplify hamster  $\beta$ -actin (GenBank accession No. AJ312092) were: 5'-AGCT ATGAGTGCCTGATGG-3' (forward) and 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGA AA-3' (reverse); the fluorogenic probe used was #9 (04-685-075-001). PCR amplifications were performed with preheating at 94 °C for 10 min followed by 40 cycles of 94 °C for 10 s, an annealing step at 60 °C for 30 s and an extension step at 72 °C for 1 s with a final cooling step at 40 °C. After each run, the PCR transcripts were verified on a 2% agarose gel. To determine the relative levels of mRNA in each sample, the values of the target genes (*Srd5a1*, *Srd5a2*) were compared with

the values of an internal reference gene ( $\beta$ -Actin) via a ratio. The results were analyzed using the relative quantification method provided by the LightCycler software (version 4.5).

2.6. Statistical analysis

Data are presented as the mean values  $\pm$  S.D. of five independent RT-qPCR runs. Comparisons between groups were assessed using Dunnett's test (Dunnett, 1964). Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

3. Results

3.1. Protein and mRNA sequences of the steroid  $5\alpha$ -reductase isozymes

Fig. 1 shows the sequence of the cDNA insert and the deduced amino acid sequence for  $5\alpha$ -reductase 1. The entire isolated sequence comprised 937 bp, with a 768 bp open reading frame (ORF) as well as a short 3' untranslated region (UTR) of 142 bp containing two non-canonical polyadenylation signals (AGUAAA, AAUAAA). The predicted translation product was 255 amino acids long with a calculated molecular weight of 29,355 Da. Overall, the hamster enzyme shared 83% identity with rat Srd5a1 and 81% identity with mouse Srd5a1 (Fig. 3A). The nucleotide sequence corresponding to  $5\alpha$ -reductase type 2 was 1257 bp long (Fig. 2), including an ORF of 765 bp which encoded for a protein of 254 amino acids with an estimated molecular weight of 28,733 Da. Three potential polyadenylation signals were present within a 3'-UTR of 471 bp. Alignment of the predicted hamster  $5\alpha$ -reductase type 2 amino acid sequences with its rat and mouse counterparts showed that these isoenzymes all had the same length; the overall homologies of hamster Srd5a2 with rat and mouse Srd5a2

were 84% and 85%, respectively (Fig. 3B). Further alignment analyses also showed that both  $5\alpha$ -reductase 1 and  $5\alpha$ -reductase 2 of hamsters shared a high percentage of homology with the corresponding reductases of other mammals (Table 1).

3.2. In vitro activity of Srd5a1 and Srd5a2 in HEK-293 cells

In order to determine the biochemical properties of the cloned  $5\alpha$ -reductases, we assessed their catalytic abilities through transfection assays. First, we searched for the optimal pH for each isoenzyme and determined their kinetic constants. Enzyme activity was measured at different pHs in cellular homogenates from HEK-293 cells transfected with either pcDNA3.1/hSrd5a1 or pcDNA3.1/hSrd5a2. The results from these assays showed that the hamster type 1 enzyme displayed activity over a pH range between 6.5 and 7.5, while the type 2 enzyme had maximal activity at an acidic pH (Fig. 4, upper panel). Saturation curves showing the ability of the cloned enzymes to transform T into DHT are shown in Fig. 4. Eadie-Hofstee analyses revealed an apparent  $K_m$  for T of 7.0 (Fig. 4, middle panel) and 1.9  $\mu\text{mol/L}$  (Fig. 4, lower panel), for the types 1 and 2 reductases, respectively. The values for pH,  $K_m$  and  $V_{max}$  of the  $5\alpha$ -reductases of hamster and other mammalian species are shown in Table 2. In this case, the  $V_{max}$  values are presented as pmol/mg protein/min for comparative purposes.

3.3. Expression of Srd5a1 and Srd5a2 in hamster HG

To examine the relative expression of the type 1 and 2  $5\alpha$ -reductases, total RNA was extracted from HGs and then reverse transcribed into cDNA and subjected to RT-qPCR using  $\beta$ -actin as the internal reference gene. As shown in Fig. 5, Srd5a1 mRNA was slightly more abundant in castrated males than in intact



Fig. 1. The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of steroid  $5\alpha$ -reductase type 1 from the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). Both sequences are numbered with respect to the putative initiating methionine (ATG). The open reading frame of Srd5a1 ends with a TAA stop codon (\*\*\*). Primer positions for mRNA detection by RT-qPCR are boxed. Two non-canonical polyadenylation signals are underlined. (GenBank accession number FJ851158).



```

ggggggggggctgcaagccaccagctgtgaacaccccccag -1
atg cag act gtg tgc cac cag gcc cag gtg cta gca ggt agc gcc act ttg gct acc ata 60
Met Pro Thr Val Cys His Gln Gly Pro Val Leu Ala Gly Ser Ala Thr Leu Ala Thr Ile 20
ggg gcc ctg acc ctg tac TTA ggg aaa ccc acc agc tat ggg aaa cac agc cag agt gtg 120
Gly Ala Leu Thr Leu Tyr Leu Gly Lys Pro Thr Ser Tyr Gly Lys His Ser Gln Ser Val 40
tgg tgg ggt ccc ctc ctg ccg gca ccc gtc gct tgg ttc ctg caa gaa ctt ccc tcc ttc 180
Ser Ser Gly Pro Leu Leu Pro Ala Arg Val Ala Trp Phe Leu Gln Glu Leu Pro Ser Phe 60
ctg gtg cct gta ggg atg ctg gct tgg cag tcc cgc tcc ctc ttc gga cag ccc ggt aat 240
Val Val Pro Val Gly Met Leu Ala Trp Gln Ser Arg Ser Leu Phe Gly Gln Pro Gly Asn 80
ggg ctg ctg ggt ctc ttc tct gca cat tac ttc cac agg acg ttt att tac tcc tlg ctc 300
Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Ala His Tyr Phe His Arg Thr Phe Ile Tyr Ser Leu Leu 100
acc aga ggg agg cct ttc cct gtg atg ctg ttt ctg aga gcc att gcc ttc tgc atc gga 360
Thr Arg Gly Arg Pro Phe Pro Val Met Leu Phe Leu Arg Ala Ile Ala Phe Cys Ile Gly 120
aat gga ttt ctt caa gcc tac tat cng att tac tgc gca gaa tat ccc aag gag tgg tac 420
Asn Gly Phe Leu Gln Ala Tyr Tyr Leu Ile Tyr Cys Ala Glu Tyr Pro Lys Glu Trp Tyr 140
aca gat gtc agg ttt agc gtg ggt gtc tcc ctg ttt att ttg gga atg gga atc aat ac 480
Thr Asp Val Arg Phe Ser Val Gly Val Phe Leu Phe Ile Leu Gly Met Gly Ile Asn Ile 160
cat agt gac tac ctg ctg cgc cag ctt agg aag ccc gga gaa atc atc tat aag atc cca 540
His Ser Asp Tyr Leu Leu Arg Gln Leu Arg Lys Pro Gly Glu Ile Ile Tyr Lys Ile Pro 180
cga ggt gcc ttg ttt aag tat gtc tcc gga gcc aac ttc ctg gcc gag atc acg gaa tgg 600
Arg Gly Gly Leu Phe Lys Tyr Val Ser Gly Ala Asn Phe Leu Gly Glu Ile Thr Glu Trp 200
atg gcc tat gcc ttg gcc tcc tgg tcc atc cca gcc ttt gag ttt gca ttc tct tca ctc 660
Met Gly Tyr Ala Leu Ala Ser Trp Ser Ile Pro Ala Phe Ala Phe Ala Phe Ser Ser Leu 220
tgc ttc ctt ggg gtc caa gct ttt tac cac cac cac agg ttc tac ctc aag atg ttt aag 720
Cys Phe Leu Gly Val Gln Ala Phe Tyr His His His Arg Phe Tyr Leu Lys Met Phe Lys 240
gac tac ccc aaa tct agg aga gcc ctt att cca ttc atc ttt aag acaaccocagtttcaagga 784
Asp Tyr Pro Lys Ser Arg Arg Ala Leu Ile Pro Phe Ile Phe *** 254
gcaaaagcttctacagggaaacaccccccagctgcccagaaclatcnaactgtaaacat aactggcgtctttgatcacatgt 863
gtacatcatgatgatgtgtgtgataataggtctctgtactctagttgctgaggcagctgtagtcabactgcttagcat 942
ttctctctgactcaacttctctgtggagcctcctagaggccctccatggatcttctcttagctactctctatagaag 1021
cttcccaatcccccaggttttccccctcattgctgatctgaggacatgtgactttctcgtactctgtatcaatttg 1100
tggaaagtctctcaactcaaaaccccttccgctgacatcaatgaaaaatgagccatcaacttccagggcagtgagatga 1179
actggaaaattgtttatcttaaccgactcagaagatcaacatgycatgctcttctcaaaaaaa..... 1274

```

**Fig. 2.** The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 from the Syrian hamster (*M. auratus*). Both sequences are numbered with respect to the putative initiating methionine (ATG). The open reading frame of Srd5a2 ends with a TAA stop codon (\*\*\*). Primer positions for mRNA detection by RT-qPCR are boxed. Three potential polyadenylation signals are underlined. (GenBank accession number FJ851159).

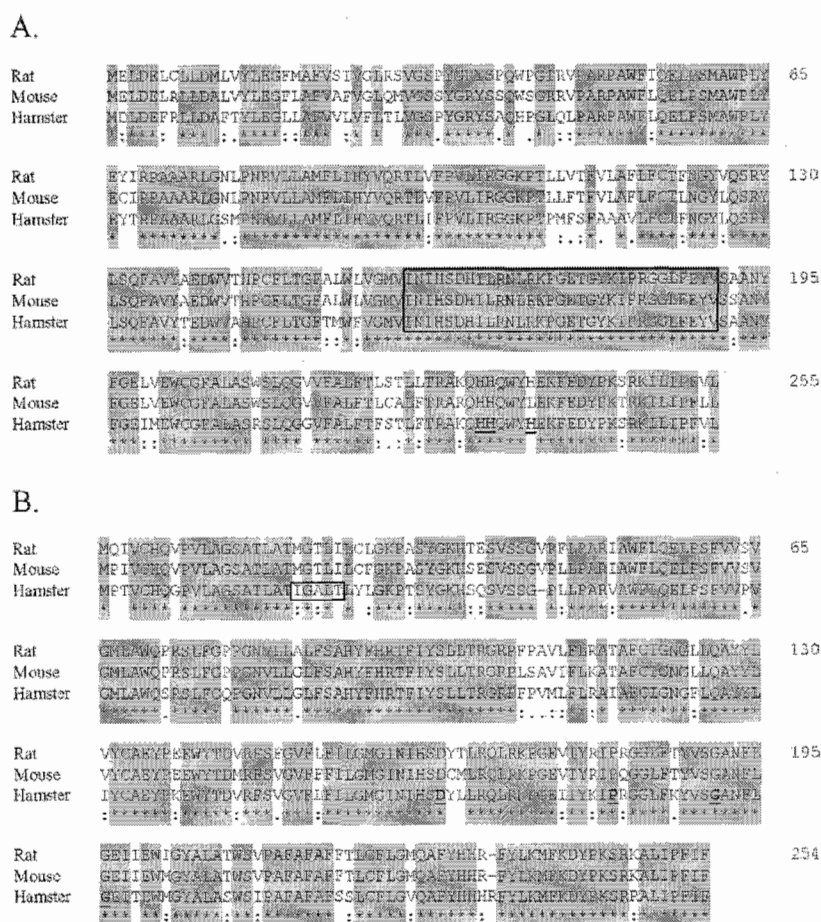
males, while the treatment with testosterone had little effect on mRNA levels. Regarding female HGs, the expression patterns showed variations during the estrous cycle; the highest levels of expression occurred at metestrus. At this phase, the amount of Srd5a1 mRNA was significantly higher than in intact males ( $P < 0.05$ ). Administration of female sex steroids to spayed females had no significant effect on the expression of Srd5a1. On the other hand, according to relative quantification analyses, 5 $\alpha$ -reductase 2 mRNA was less abundant than 5 $\alpha$ -reductase 1 mRNA. As shown in Fig. 6, the Srd5a2 mRNA levels increased in the HGs of castrated males, though such increases were not significant. Expression of this isozyme also showed variations throughout the different phases of the estrous cycle, and the amount of mRNA was significantly higher in females at proestrus than in intact males ( $P < 0.05$ ). Similar mRNA levels were also observed in estrogen-treated spayed females, suggesting that estradiol may be up-regulating the expression of 5 $\alpha$ -reductase 2 in Harderian tissue (Fig. 6).

#### 4. Discussion

We isolated and characterized cDNA clones containing the whole sequences corresponding to the hamster 5 $\alpha$ -reductases. Our results establish that this species possesses at least two 5 $\alpha$ -reductase genes that encode homologs of the human type 1 and type 2 isoenzymes. Data from this study show that when these cDNAs are expressed in transfected HEK-293 cells they yield functional proteins that are able to reduce T to produce 5 $\alpha$ -DHT. The two enzymes share a high degree of homology with their respective counterparts in other mammals and also exhibit biochemical and structural properties

similar to those displayed by other previously described steroid reductases (Russell and Wilson, 1994). Similar to the rat and mouse cDNAs, the hamster cDNAs code for proteins of 254 and 255 amino acids, with a high content (>57%) of hydrophobic residues in their sequences, which is consistent with the membranal location of this group of enzymes (Russell et al., 1994). At the amino acid level, the percentage of similarity between the hamster types 1 and 2 reductases was approximately 39%. Results from site-directed mutagenesis and molecular genetics have highlighted the functional structure of the steroid reductases, which seem to contain functional domains important for both substrate and cofactor binding (Andersson and Russell, 1990; Russell and Wilson, 1994).

Comparison of the hamster isozyme 1 sequence with that of the corresponding rat and mouse sequences revealed significant regions of similarity, including a putative NADPH-binding domain. This NADPH-binding domain was tentatively identified within a stretch of 30 amino acids (residues 160–190), which represents the most highly conserved region of the polypeptide (Fig. 3A). Further sequence analyses also showed that Srd5a1 contains three conserved histidine residues (H230, H231, H236) within the C-terminal portion, that are considered important in substrate binding and catalytic activity (Bhattacharyya and Collins, 2001). According to its amino acid composition, 5 $\alpha$ -reductase 2 has a well-conserved C-terminal region that contains various amino acids (i.e., 163D, 180P, 192C, 195G) important for binding to NADPH. Using the NetNES program (<http://www.cbsdtu.dk/services/>) a putative nuclear localization signal composed by residues I–G–A–L–T was identified toward the N-terminal region (Fig. 3B). Such a motif is also found in the type 2 5 $\alpha$ -reductases of humans, pigs, and cows (data not shown).



**Fig. 3.** Amino acid sequence comparison of hamster 5 $\alpha$ -reductase 1 (A) and 5 $\alpha$ -reductase 2 (B) to the rat and mouse isozymes. The sequences are shown in single-letter code. Conserved residues among these species are shaded light grey (asterisks). Amino acid numbering is on the right. Histidine residues (H230, H231, H236), important for substrate binding are underlined. The putative NADPH-binding domain is boxed (upper panel). In these three species, the total number of amino acids is 255 and 254 for Srd5a1 and Srd5a2, respectively. A potential nuclear localization signal is boxed. Amino acid residues implicated in substrate binding are underlined (lower panel). Alignment was performed with the ClustalW multiple alignment program (<http://clustalw.genome.jp/>).

**Table 1**  
Percent identity of nucleotide and amino acid sequences of the steroid 5 $\alpha$ -reductases in various mammalian species.

Organism	#A.A. Srd5a1	% Nucleotides Srd5a1	% Amino acids Srd5a1	Accession No. Srd5a1	# A.A. Srd5a2	% Nucleotides Srd5a2	% Amino acids Srd5a2	Accession No. Srd5a2
Hamster	255	100	100	FJ851158	254	100	100	FJ851159
Rat	255	85	83	NM_017070	254	86	85	NM_022711
Mouse	255	82	81	NM_175283	254	85	84	NM_053188
Dog	255	75	64	XM_535799	254	79	73	XM_532922
Pig	–	–	–	–	254	80	75	AF008440
Cow	257	74	66	BC142219	254	79	75	XM_605410
Horse	196*	78	74	XM_001501216	254	80	77	XM_001501522
Monkey	263	74	62	S77162	254	80	74	S77165
Human	259	73	62	NM_001047	254	80	74	MN_000348

#A.A = number of amino acid residues.  
\* Predicted sequence.

With regard to their biochemical properties, the two hamster 5 $\alpha$ -reductases exhibited distinctive features resembling those displayed by the rat or human isozymes expressed in cultured cells. Thus, while 5 $\alpha$ -reductase type 1 works at a broad pH that spans the alkaline range (6.5–9), the 5 $\alpha$ -reductase type 2 is only active at acidic pHs. Likewise, the kinetic analyses showed that the type 2 isoenzyme has an apparent  $K_m$  for testosterone that is lower than the value for the type 1 isozyme (Table 2). Based on numerous

studies of tissue distribution patterns and different substrate affinities of the two isoenzymes, Normington and Russell (1992) proposed that Srd5a1 plays a catabolic role and that Srd5a2 plays an anabolic role in the metabolism of T and other steroid hormones. Tissue distribution studies demonstrated clear differences in the expression patterns and the regulation of each 5 $\alpha$ -reductase. For example, it was found that 5 $\alpha$ -reductase 2 is expressed preferentially in fetal organs, such as the prostate and male accessory sex

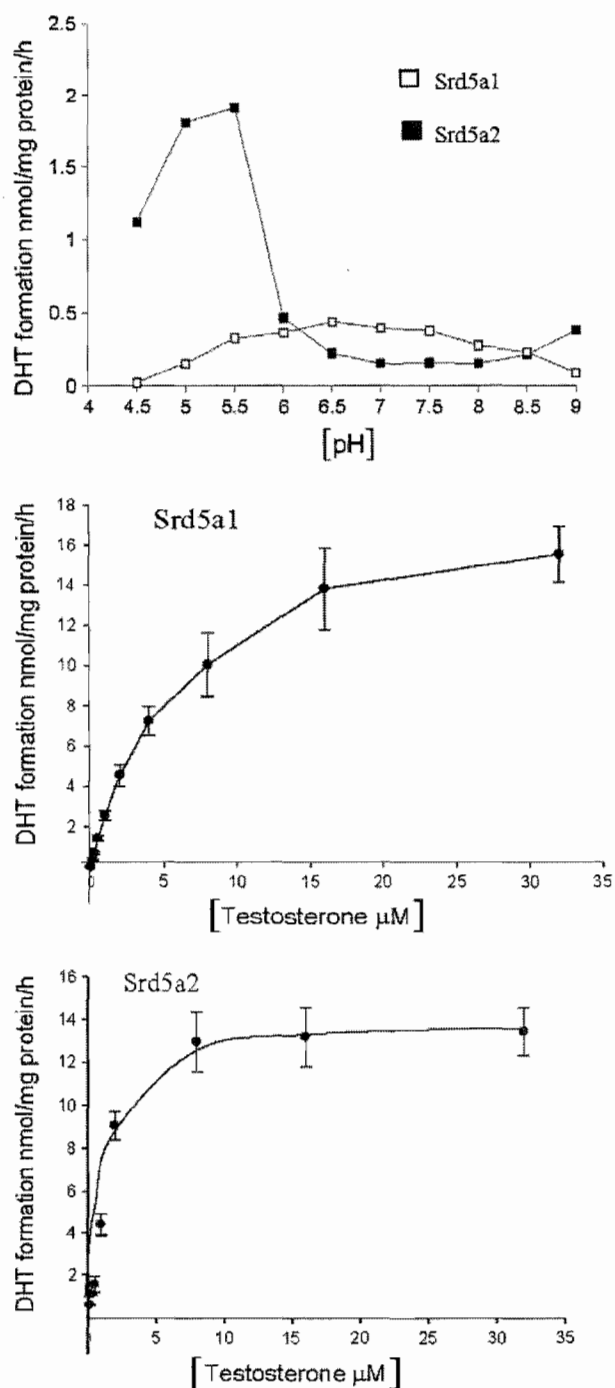


Fig. 4. Optimal pH and saturation curves of the cloned  $5\alpha$ -reductases. Cellular homogenates prepared from HEK-293 cells transfected with pcDNA3.1/hSrd5a1 or pcDNA3.1/hSrd5a2 were incubated with [ $^3$ H]testosterone and NADPH as a cofactor over the indicated pH range (upper panel). Alternatively, the enzymes were assayed at pH 7.5 (middle panel) or pH 5.5 (lower panel) in the presence of varying concentrations of [ $^3$ H]testosterone for 10 min at 37 °C (for details see Section 2).

glands (Berman et al., 1995), whereas it is also expressed in the liver, the epididymis and the pituitary in adult tissues (Thigpen et al., 1993). On the other hand,  $5\alpha$ -reductase 1 is expressed mainly in peripheral tissues, including the liver, cerebellum, adrenals and skin. In rats, the hepatic tissue exhibits a unique sexual dimorphism in  $5\alpha$ -reductase expression; females exhibit 10–20 times more type 1 isozyme activity and mRNA than do the males (Russell

and Wilson, 1994). Likewise, androgens seem to stimulate expression of the type 2 isozyme but not the type 1 isozyme. In the adult prostate, DHT regulates its own biosynthesis through a feed-forward mechanism; this kind of autoregulation appears to operate in adults, but not in fetal tissues (George et al., 1991; Berman et al., 1995; Killian et al., 2003).

In this study, the  $5\alpha$ -reductase isoenzymes from HGs exhibited certain differences in their specific expression patterns. Using real-time qPCR, the levels of mRNA were found to be higher for Srd5a1 than for Srd5a2, but no sexual dimorphism was shown. The amounts of mRNA of both isoenzymes slightly increased after castration and were maintained at a low level in testosterone-treated castrated males; although such differences were not statistically significant, the data suggests that androgens act on the mRNA levels of both reductases. In line with this observation, it has been reported that while the female gland contains a single class of alveolar cells (type I) and elevated  $5\alpha$ -reductase activity, the male HG contains two types of alveolar cells (types I and II) and low enzyme activity; however, four weeks after castration, the male gland is composed of mainly type I cells, which parallels an elevation in  $5\alpha$ -reductase activity (Vilchis et al., 1994).

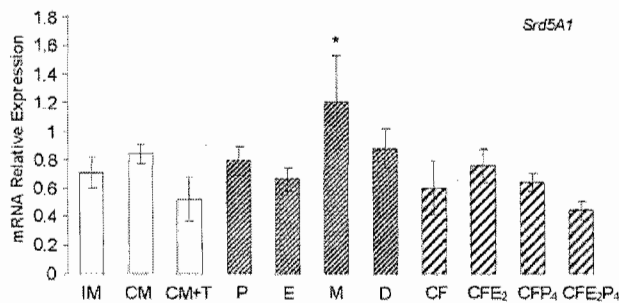
In females, the intraglandular mRNA levels for both isoenzymes showed variations during the estrous cycle. Srd5a1 mRNA was more abundant at metestrus than at other phases of the cycle and was modestly affected by  $17\beta$ -estradiol. Unlike Srd5a1, Srd5a2 was expressed at a higher level at proestrus than at diestrus, and its expression levels increased significantly in spayed females treated with estrogens. Similar variations in somatostatin (Puig-Domingo et al., 1988) and porphyrin (Payne, 1994) levels during the estrous cycle have been described previously in hamsters; these results agree with a direct role of estrogens on the HG. The cyclic changes in the expression pattern of both isoenzymes are likely due to circulating ovarian steroids, since this organ is a target for sex hormones; in this context we have reported the presence of intracellular estrogen receptors in the HGs of different vertebrate species (Vilchis et al., 1992b; Chavez et al., 2009).

As mentioned above, androgens are implicated in the regulation of a wide array of physiological processes in the HG (Vilchis & Perez-Palacios, 1989; Vilchis et al., 1992b, 2006; Payne, 1994), and although testosterone is the main circulating androgen, evidence exists that DHT is the bioactive androgen at the Harderian level. In the Syrian hamster, for instance, DHT has been reported to decrease both ALA-S1 mRNA levels (Dominguez et al., 1994) and the activity of thyroxine 5'-deiodinase in HGs (Rubio et al., 1996). The exogenous administration of DHT also leads to a rapid increase of *N*-acetyltransferase activity levels and reduces melatonin content in the glands of spayed females (Marrufo et al., 1989; Menendez-Pelaez et al., 1990). Additionally, DHT appears to be involved in the synthesis of large amounts of intraglandular hemeproteins in both males and females (Vilchis et al., 1996). Together, these observations have underlined the importance of the steroid  $5\alpha$ -reductase(s) in determining androgen action in the HG.

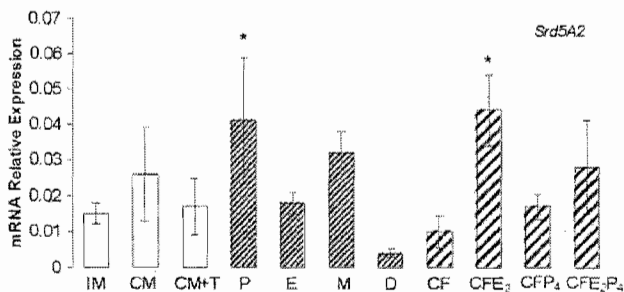
In conclusion, we isolated full-length cDNAs for two distinct steroid  $5\alpha$ -reductases. The cloned isoenzymes are closely related in nucleotide sequence and peptide domain homology to mouse, rat and human  $5\alpha$ -reductases, whereas the expression of their cDNAs in cultured cells confirms that the proteins encoded by these transcripts represent the authentic hamster type 1 and 2  $5\alpha$ -reductases. Data from the present study suggest that both reductases may be physiologically important in the androgen signaling pathway of HG by regulating the local synthesis of DHT. These results further underscore that not only androgens but also estrogens, may regulate expression of steroid  $5\alpha$ -reductase genes.

**Table 2**  
Characteristics of hamster 5 $\alpha$ -reductases expressed in transfected HEK-293 cells.

Isozyme	pH	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (pmol/mg protein/min)	Cell line	Reference
<i>Srd5a1</i>					
Hamster	6–7.5	7.14 $\pm$ 0.47	314 $\pm$ 0.47	HEK-293	This study
Rat	5.5–7–5	1–2.5	1300	HEK-293	Normington and Russell (1992)
Human	6–8	3.5–5.2	220	COS	Andersson and Russell (1990)
Monkey	6.5–8	2	245	CHO	Levy et al. (1995)
<i>Srd5a2</i>					
Hamster	5.5	1.964 $\pm$ 0.64	248 $\pm$ 1.3	HEK-293	This study
Rat	5	0.075	300	HEK-293	Normington and Russell (1992)
Human	5.5	0.7	88	HEK-293	Andersson et al. (1991)
Monkey	5	0.2	86	CHO	Levy et al. (1995)



**Fig. 5.** Real-time RT-qPCR analysis of 5 $\alpha$ -reductase-1 mRNA transcripts. Harderian gland cDNA samples from intact males (IM); castrated males (CM); castrated males treated with testosterone (CM+T); intact females at proestrus (P), estrus (E), metestrus (M) and diestrus (D); castrated females (CF); and castrated females treated with estradiol (CFE<sub>2</sub>), progesterone (CFP<sub>4</sub>) or estradiol plus progesterone (CFE<sub>2</sub>P<sub>4</sub>) were used to amplify specific transcripts of *Srd5a1* by quantitative RT-PCR. Data represent mean values  $\pm$  S.D. ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  compared with IM.



**Fig. 6.** Real-time RT-qPCR analysis of 5 $\alpha$ -reductase-2 mRNA transcripts. Harderian gland cDNA samples from intact males (IM); castrated males (CM); castrated males treated with testosterone (CM+T); intact females at proestrus (P), estrus (E), metestrus (M) and diestrus (D); castrated females (CF); and castrated females treated with estradiol (CFE<sub>2</sub>), progesterone (CFP<sub>4</sub>) or estradiol plus progesterone (CFE<sub>2</sub>P<sub>4</sub>) were used to amplify specific transcripts of *Srd5a2* by quantitative RT-PCR. Data represent mean values  $\pm$  S.D. ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  compared with IM.

## Acknowledgments

This study was supported by a Research Project Grant (No. 44975) and a Postgraduate Studentship to L.R. (Reg. No. 167215) from CONACYT (México). We thank Mat. Margarita Chávez (Facultad de Ciencias, UNAM) for her invaluable assistance with the statistical analysis, and to Dr. Ivonne Heuze for providing the hamsters for this study.

## References

Andersson, S., Russell, D.W., 1990. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 $\alpha$ -reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3640–3644.

- Andersson, S., Berman, D.M., Jenkins, E.P., Russell, D.W., 1991. Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354, 159–161.
- Berman, D.M., Tian, H., Russell, D.W., 1995. Expression and regulation of steroid 5 $\alpha$ -reductases in the urogenital tract of the fetal rat. *Mol. Endocrinol.* 9, 1561–1570.
- Bhattacharyya, A.K., Collins, D.C., 2001. Site-directed mutagenesis studies of rat 5 $\alpha$ -reductase (isozyme 1); mutation of residues in the cofactor binding and C-terminal regions. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 77, 177–182.
- Buzzell, G.R., Blank, J.L., Vaughan, M.K., Reiter, R.J., 1995. Control of secretory lipid droplets in the Harderian gland by testosterone and the photoperiod: comparison of two species of hamsters. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 230–238.
- Chavez, B., Ramos, L., Merchant-Larios, H., Vilchis, F., 2009. Cloning and expression of the estrogen receptor- $\alpha$  (Esr1) from the Harderian gland of the sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 203–209.
- Dominguez, P., Antolin, I., Boga, J.A., Uria, H., Menendez-Pelaez, A., 1994. Androgen regulation of gene expression in the Syrian hamster Harderian gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 106, 81–89.
- Dunnett, C.W., 1964. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482–491.
- George, F.W., Russell, D.W., Wilson, J.D., 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, 8044–8047.
- Hoffman, R.A., 1971. Influence of some endocrine glands, hormones and binding on the histology and porphyrins of the Harderian glands of golden hamsters. *Am. J. Anat.* 132, 463–478.
- Hoffman, R.A., Johnson, L.B., Reiter, R.J., 1985. Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *J. Pineal Res.* 2, 161–168.
- Killian, J., Pratis, K., Clifton, R.J., Stanton, P.G., Robertson, D.M., 2003. 5 $\alpha$ -Reductase isoenzymes 1 and 2 in the rat testis during postnatal development. *Biol. Reprod.* 68, 1711–1718.
- Kumar, P., Brodie, S.G., Vaughan, M.K., Menendez-Pelaez, A., Reiter, R.J., Chambers, J.P., 1992. Testosterone sensitive dihydropyridine binding in the Harderian gland of the male hamster. *Cell Calcium* 13, 565–570.
- Levy, M.A., Brandt, M., Sheedy, K.M., Holt, D.A., Heaslip, J.L., Trill, J.J., Ryan, P.J., Morris, R.A., Garrison, L.M., Bergsma, D.J., 1995. Cloning, expression and functional characterization of type 1 and type 2 steroid 5 $\alpha$ -reductases from *Cynomolgus* monkey: comparison with human and rat isoenzymes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 52, 307–319.
- López, J.M., Toivia, J., Alvarez-Uría, M., 1992. Postnatal development of the Harderian gland in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a light and electron microscopic study. *Anat. Rec.* 233, 597–616.
- Marrufó, B., Menendez-Pelaez, A., Buzzell, G.R., Gonzalez-Brito, A., Reiter, R.J., 1989. 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone administration converts indolamine metabolism and porphyrin content of the female Syrian hamster Harderian gland to the male type. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 192, 192–195.
- Menendez-Pelaez, A., Reiter, R.J., Guerrero, J.M., Puig-Domingo, M., Howes, K.A., 1988. Sexual dimorphism in *N*-acetyltransferase activity, hydroxyindole-*O*-methyltransferase activity and melatonin content in Harderian gland of Syrian hamsters: changes following gonadectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187, 287–291.
- Menendez-Pelaez, A., Buzzell, G.R., Gonzalez-Brito, A., Reiter, R.J., 1990. Androgenic control of *N*-acetyltransferase in the Harderian glands of the Syrian hamster is mediated by 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone. *J. Cell. Biochem.* 42, 95–100.
- Normington, K., Russell, D.W., 1992. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes. *J. Biol. Chem.* 267, 19548–19554.
- Payne, A.P., 1994. The Harderian gland: a tercentennial review. *J. Anat.* 185, 1–49.
- Puig-Domingo, M., Guerrero, J.M., Reiter, R.J., Peinado, M.A., Menendez-Pelaez, A., Santana, C., Webb, S.M., 1988. Androgenic control of immunoreactive somatostatin in the Harderian gland of the Syrian hamster. *J. Reprod. Fert.* 82, 753–759.
- Rubio, A., Menendez-Pelaez, A., Buzzell, G.R., Vaughan, M.K., Vaughan, G.M., Reiter, R.J., 1996. Sexual differences in 5 $\alpha$ -deiodinase activity in the Harderian gland of Syrian hamsters and the effect of pinealectomy: regulation by androgens. *J. Cell. Biochem.* 62, 397–404.
- Russell, D.W., Berman, D.M., Bryant, J.T., Cala, K.M., Davis, D.L., Landrum, C.P., Prihoda, J.S., Silver, R.I., Thigpen, A.E., Wigley, W.C., 1994. The molecular genetics of steroid 5 $\alpha$ -reductases. *Rec. Prog. Horm. Res.* 49, 275–284.

- Russell, D.W., Wilson, J.D., 1994. Steroid 5 $\alpha$ -reductase: two genes/two enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 25–61.
- Santillo, A., Monteforte, R., De Lange, P., Lanni, A., Farina, P., Chieffi-Baccari, G., 2008. Dimorphic expression of uncoupling protein-3 in golden hamster Harderian gland: effects of castration and testosterone administration. *J. Cell. Physiol.* 215, 481–487.
- Thigpen, A.E., Silver, R.L., Guileyardo, J.M., Cassey, M.L., McConnell, J.D., Russell, D.W., 1993. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.* 92, 903–910.
- Thompson, G.G., Hordovatz, X., Moore, M.R., McGadey, J., Payne, A.P., 1984. Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. *Int. J. Biochem.* 16, 849–852.
- Vilchis, F., Pérez-Palacios, G., 1989. Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. *J. Endocrinol.* 121, 149–156.
- Vilchis, F., Langley, E., Cerbón, M.A., Chavez, B., Solis, J., Perez-Palacios, G., 1992a. Nuclear receptors for 3,5,5' triiodothyronine in the Harderian gland of male and female golden hamsters. *Life Sci. Adv. Exp. Clin. Endocr.* 11, 133–137.
- Vilchis, F., Chavez, B., Cerbón, M.A., Pérez-Palacios, G., 1992b. The Harderian gland as a target for steroid hormone action: role and characteristics of intracellular receptors. In: Webb, S.M., Hoffman, R.A., Puig-Domingo, M.L., Reiter, R.J. (Eds.), *Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 297–316.
- Vilchis, F., Enriquez, J., Queipo, G., Pérez-Palacios, G., Chavez, B., 1994. Steroid 5 $\alpha$ -reductase activity in the Harderian glands of male and female Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 298–308.
- Vilchis, F., Damsky, R., Heuze, Y., Enriquez, J., Chávez, B., 1996. Identification and androgen regulation of a 156-kDa hemeprotein in the Harderian gland of the Syrian hamster. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101, 297–303.
- Vilchis, F., Ramos, L., Timossi, C., Chavez, B., 2006. The influence of sex steroid hormones on ferrochelatase gene expression in Harderian gland of hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Endocrinol.* 189, 103–112.
- Zivin, J.A., Waud, D.R., 1982. How to analyse binding, enzyme and uptake data: the simplest case, a single phase. *Life Sci.* 30, 1407–1422.

Thompson GG, Hordovatz X, Moore MR, McGadey J & Payne AP (1984) Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. **Int J Biochem** 16: 849-852.

Truss M & Beato M (1993) Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. **Endocr Rev** 14: 459-79.

Uemura M, Tamura K, Chung S, Honma S, Okuyama A, Nakamura Y & Nakagawa H (2008) Novel 5 $\alpha$ -steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Sci** 99: 81-86.

Ungefroren H, Ivell R, Ergun S (1997) Region-specific expression of the androgen receptor in the human epididymis. **Mol Hum Reprod.** 1997 3:933-40.

Urbatzka R, Lutz I & Kloas W (2007) Aromatase, steroid-5-alpha-reductase type 1 and type 2 mRNA expression in gonads and brain of *Xenopus laevis* during ontogeny. **Gen Comp Endocrinol** 153: 280-288.

Van Rooijen JH, van Assen S, van der Kwast TH, de Rooij DG, Boersma WJA, Vreeburg JTM & Weber RFA (1995) Androgen receptor immunoeexpression in the testes of subfertile men. **J Androl** 16: 510-516.

Viger RS & Robaire B (1996) The mRNAs for the steroid 5 alpha-reductase isozymes, types 1 and 2, are differentially regulated in the rat epididymis. **J Androl** 17: 27-34.

Vilchis F, Chávez B, Cerbón MA & Pérez-Palacios G (1992) The Harderian gland as a target for steroid hormone action: Role and characteristics of intracellular receptors. **In: Harderian Glands: Porphyrin metabolism, behavioural and endocrine effects (Webb S.M., Hoffman R.A., Reiter R.J., Editors Springer Verlag, Berlin pp 297-313.**

Vilchis F, Enríquez G, Queipo G, Pérez-Palacios G & Chávez B (1994) Steroid 5 $\alpha$ -reductase activity in the Harderian glands of male and female Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Gen Comp Endocrinol** 96: 298-308.

Vilchis F, Damsky R, Heuze Y, Enríquez J & Chávez B (1996) Identification and androgen regulation of a 156-kDa hemeprotein in the Harderian gland of the Syrian hamster. **Gen Com Endocrinol 101: 297-303.**

Vilchis F, Hernández D, Canto P, Méndez JP & Chávez B (1997a) Codon 89 polymorphism of the human 5 alpha-steroid reductase type 2 gene. **Clin Genet 51: 399-402.**

Vilchis F, Canto P, Chávez B, Ulloa-Aguirre A & Méndez JP (1997b) Molecular analysis of the 5 alpha-steroid reductase type 2 gene in a family with deficiency of the enzyme. **Am J Med Genet 69: 69-72.**

Vilchis F, Méndez JP, Canto P, Lieberman E (2000) Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. **Clin Endocrinol 52: 383-387.**

Vilchis F & Chávez B (2002a) Steroid Reductases. **In: Encyclopedia of molecular medicine. John Wiley & Sons Inc., pp 3008-3011.**

Vilchis F, Chávez B, Larrea F, Timossi C & Montiel F (2002b) The cDNA cloning and tissue expression of the cytochrome P450scc from Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Gen Comp Endocrinol 126: 279-286.**

Vilchis F, Ramos L, Kofman-Alfaro S, Zenteno JC, Méndez JP & Chávez B (2003) Extreme androgen resistance in a kindred with a novel insertion/deletion mutation in exón 5 of the androgen receptor gene. **J Hum Genet 48: 346-351.**

Vilchis F, Valdez E, Ramos L, Garcia R & Chávez B (2008) Novel compound heterozygous mutations in the SRD5A2 gene from 46,XY infants with ambiguous external genitalia. **J Hum Genet 53: 401-406.**

Vornberger W, Prins G, Musto NA & Suarez-Quian CA (1994) Androgen receptor distribution in the rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. **Endocrinology 134: 2307-2316.**

Voutilainen R, Tapanainen J, Chung B-C, Matteson KJ & Miller WL (1986) Hormonal regulation of P450scc (20, 22-desmolase) and P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab** **63**: 202-207.

Wang Z, Tufts R, Haleem R & Cai X (1997) Genes regulated by androgen in the rat ventral prostate. **Proc Natl Acad Sci USA** **94**: 12999-13004.

Wetterberg L, Geller E & Yuwiler A (1970) Harderian gland: An extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats?. **Science** **167**: 884-885.

Weihua Z, Lathe R, Warner M & Gustafsson (2002) An endocrine pathway in the prostate ER $\beta$ , 17 $\beta$ -diol and CYP7B1 regulates prostate growth. **Proc Natl Acad Sci USA** **99**: 13589-13594.

Wetterberg L, Geller E & Yuwiler A (1970) Harderian gland: an extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats?. **Science** **167**: 884-885.

Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA & Haussler MR (1999) Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. **J Cell Biochem Supp** **32/33**: 110-122.

Wigley WC, Prihoda JS, Mowszowicz I, Mendonca BB, New MI, Wilson JD, Russell DW (1994) Natural mutagenesis study of the human steroid 5  $\alpha$ -reductase 2 isozyme. **Biochemistry** **33**: 1265-1270.

Wilson JD, George FW & Griffin JE (1981) The hormonal control of sexual development. **Science** **211**: 1278-1284.

Wilson JD, Griffin JE & Russell DW (1993) Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **Endocr Rev** **14**: 577-592.

Wilson JD (1999) The role of androgens in male gender role behavior. **Endocr Rev** **20**: 726-737.

Wilson JD (2001) The role of 5 $\alpha$ -reduction in steroid hormone physiology. **Reprod Fertil Dev** **13**: 673-678.



Wilson JD, Auchus RJ, Leihy MW, Guryev OL, Estabrook RW, Osborn SM, Shaw G & Renfree MB (2003)  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol is formed in tammar wallaby pouch young testes by a pathway involving  $5\alpha$ -pregnane- $3\alpha,17\alpha$ -diol-20one as a key intermediate. **Endocrinology** **144**: 575-580.

Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB & Rittmaster RS (1999) Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of  $5\alpha$ -reductase. **Endocrinology** **140**: 4509-4515.

Xu LL, Shanmugam N, Segawa T, Sesterhenn IA, McLeod DG, Moul JW & Srivastava (2000) A novel androgen-regulated gene, *PMEPA1*, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate. **Genomics** **66**: 257-263.

Yenugu S, Hamil KG, Radhakrishnan Y, French FS & Hall SH (2004) The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial beta-defensin. **Endocrinology** **145**: 3165-3173.

Zarudnaya MI, Kolomiets IM, Potyahaylo AL & Hovorun DM (2003) Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures. **Nucleic Acids Res** **31**: 1375-1386.