



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ACTIVIDAD SEXUAL Y BIODISPONIBILIDAD DE TIRONINAS EN
EL CÁNCER PROSTÁTICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
SILVIA ANGULO BARBOSA

TUTORA PRINCIPAL
Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano. Instituto de Neurobiología.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. María Magdalena Giordano Noyola. Instituto de Neurobiología.
Dra. Wendy Portillo Martínez. Instituto de Neurobiología

MÉXICO SEPTIEMBRE 2014



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.

Esta tesis se realizó en el Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 127368, 176911) y por la UNAM (PAPIIT-DGAPA, IN202513, IN200813). Silvia Angulo recibió beca CONACYT (277741).

DEDICATORIA

A aquellas personas que se encuentran librando la batalla más importante y devastadora de su vida y a los seres que los acompañan en ese duro camino, pues nadie sabe lo fuerte que es, hasta que ser fuerte es la única opción.

Especialmente a Lupis, te guardaré siempre en mi corazón pues aún nos faltaron miles de terapias de abrazos que culminar.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Aceves Velasco por brindarme su amistad y confianza, por todos los atinados comentarios a mi trabajo, pero sobre todo, por enseñarme a ser crítica y no chillar en las presentaciones.

A la Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano pues gracias a ella, aprendí que si se desea ser extraordinario, hay que hacer cosas extraordinarias y comenzar los proyectos con valor y entusiasmo, continuar cada día con perseverancia, hasta terminarlos, dando siempre todo de sí.

A la Dra. Magdalena Giordano y la Dra. Wendy Portillo por formar parte de mi comité tutor y seguir pacientemente mis pasos durante este escalón en un trayecto aún largo por caminar, por su interés genuino, apoyo continuo, por las acertadas aportaciones y principalmente por su claridad en la orientación y visión de mi proyecto.

A Q.F.B. Guadalupe Delgado[†], por su incondicional apoyo además de técnico, humano brindado a este, mi proyecto de vida. A Juanita y a mis compañeros del laboratorio de metabolismo energético (D-02) Alex, Aura, Eva, Laura, Xóchitl y Yas; quienes me han acompañado en este trayecto y se han convertido en parte de mi familia.

A M.V.Z. Martín García y Alejandra Castilla (Biotério), Ing. Ramón Martínez Olvera (Cómputo), Dr. Francisco J. Valles Valenzuela (Biblioteca), Ma. de Lourdes Palma Tirado (Unidad de Microscopia), a M. en C. Leonor Casanova Rico (Unidad de Enseñanza), y al Dr. Alfredo Varela Echeverría (Coord. Maestría), por todo su apoyo brindado.

A mis compañeros de la maestría (Doc., Gaby, Gil, Gina, James, Jonathan, José Luis, Juan Pablo, Mel, Mitzi, Ren, Rodrigo y Steph), a mis amigos del Instituto (estudiantes y doctores), por su calidad académica y humana, por sus consejos y apoyo durante mi formación profesional.

A mi familia que jamás me abandona (Leo, Rose, JC, Ferni, Santi, Maggie, Dil, Clau, Briss, Aliss y Samy), a mis hermanos elegidos (Gaby, Ro, Rubis, George, Richi, Shanti, Cletus, Mari, Cuauh, Jaque, Kiki y Rox) y al compañero de mi vida, cómplice e inductor de mis sueños, Mario ♥

A mi jurado

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	vii
Resumen	viii
Introducción	1
Antecedentes	2
1.- Próstata	2
2.- Cáncer de próstata	2
2.1.- Actividad sexual	5
3.- Hormonas tiroideas	6
3.1.- Hormonas tiroideas y fisiopatología prostática	7
3.2.- Genes tironino-dependientes relacionados con proliferación y diferenciación celular	8
3.2.1.- ARA70 α	11
3.2.2.- Ciclina D1	11
4.- Modelos de estudio del cáncer prostático	12
4.1.- <i>In vitro</i>	12
4.2.- <i>In vivo</i>	12
Planteamiento del problema	15
Hipótesis	16
Objetivo general	16

Objetivos particulares	16
Material y métodos	16
Modelo ratón TRAMP	17
Inducción y criterios de evaluación de la actividad sexual	
Diseño experimental	17
Análisis histopatológico	18
Criterios histopatológicos	19
Extracción y cuantificación de T3 por ELISA	20
Expresión génica	21
Extracción y cuantificación de proteínas	
Actividad de desyodasa 1	22
Análisis estadístico	23
Resultados	24
Evaluación de los patrones motores en los ratones WT y TRAMP sexualmente activos.	24
Efectos de la actividad sexual en el peso corporal y prostático.	25
Efecto de la actividad sexual sobre el epitelio normal y el desarrollo del cáncer prostático.	26-29
Niveles circulantes y prostáticos de T3	30
Efecto de la actividad sexual en la biodisponibilidad de T3	31
Efecto de la actividad sexual en la expresión de genes tironino-dependientes asociados con proliferación y diferenciación del epitelio prostático.	32
Discusión	32
Conclusiones	38

Perspectivas	38
Referencias	40
Anexo I Conducta sexual	47
Anexo II Tablas de resultados estadísticos	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Anatomía prostática	2
2. Desyodación de las hormonas tiroideas	7
3. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas	9
4. Imagen representativa de un acino prostático correspondiente al lóbulo dorso-lateral de un ratón silvestre (10X), criterios de medición histológica.	19
5. Evaluación de los parámetros motores que acompañan a la conducta sexual de ratones WT y TRAMP	24
6. Efecto de la actividad sexual en la ganancia de peso corporal de los ratones WT y TRAMP	25
7. Efecto de la actividad sexual en el peso prostático de los ratones WT y TRAMP.	26
8. Efectos de la actividad sexual en la histopatología del lóbulo dorso-lateral en ratones WT y TRAMP.	27
9. Efectos de la actividad sexual en la histología del lóbulo dorso-lateral de los ratones WT y TRAMP.	28
10. Efecto de la actividad sexual en la incidencia de lesiones prostáticas.	29
11. Efecto de la actividad sexual en los niveles circulantes y prostáticos de T3 en ratones WT y TRAMP	30
12. Efecto de la actividad sexual en la expresión de genes o actividad D1, asociada a la biodisponibilidad de T3 en ratones WT y TRAMP.	31
13. Efecto de la actividad sexual en la expresión de genes tironino-dependientes.	32
14. Modelo propuesto del mecanismo protector de la actividad sexual en la progresión del CaP	37
15. Patrones conductuales de la fase ejecutora durante la actividad sexual, evaluados en machos.	47

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1. Genes implicados en la carcinogénesis prostática.	3
2. Genes tironino-dependientes relacionados con proliferación y diferenciación celular.	10
3. Modelos de estudio del cáncer de próstata.	13
4. Distribución de grupos usando una matriz 2x2.	17
5. Análisis histológico basado en los criterios propuestos por Suttie (2003).	20
6. Características de los oligonucleótidos usados en la PCR	22
7. Dosis empleada para la inducción de receptividad en las hembras ovariectomizadas	46

RESUMEN

Estudios en humanos sugieren que la actividad sexual (AS), reduce el riesgo de desarrollar cáncer de próstata y que la activación/liberación de mensajeros endócrinos podría estar asociada con esta protección. La AS, previene que los niveles prostáticos de triyodotironina (T3) disminuyan con la edad y se ha sugerido que la T3 podría contribuir a mantener el epitelio prostático funcional y diferenciado. El objetivo de esta tesis fue analizar el efecto de la AS en la biodisponibilidad de T3 y en el desarrollo del cáncer prostático en un modelo murino. El ratón TRAMP es un modelo transgénico que expresa selectivamente el oncogen-SV40 y desarrolla cáncer de próstata a partir de la pubertad. Se evaluó el efecto de la actividad sexual en el desarrollo de cáncer prostático. Se formaron los siguientes grupos: silvestre (WT) y TRAMP, sexualmente inactivos y/o activos. Se analizó la conducta sexual, en 3 sesiones de 1h durante 2 meses. Nuestros datos indicaron que no existen diferencias conductuales entre el grupo WT y TRAMP, con esto validamos el uso del TRAMP para evaluar el efecto de la AS sobre el desarrollo de cáncer. Por otro lado y de manera interesante, encontramos efectos inversos en la respuesta histopatológica de la próstata a la AS, del grupo WT con respecto al TRAMP. En el grupo WT se induce un fenotipo secretor, explicado por un mayor número y tamaño celular, sin que se modifique el peso prostático, en contraste en el TRAMP, se observa una reducción en el tamaño celular (altura epitelial) y el cociente del área epitelio/luminal, lo cual correlaciona con menor peso prostático. Los criterios para evaluar la progresión tumoral mostraron que el grupo TRAMP sexualmente activo presentó un menor grado de lesiones PIN así como cancerosas, con respecto al TRAMP sexualmente inactivo. Evaluando el mecanismo implicado en esta posible protección, encontramos que la AS no modifica los niveles circulantes de T3, pero sí los niveles prostáticos en ambos grupos (WT y TRAMP) y este incremento se acompaña de mayor expresión de ARA70 α (gen diferenciador tironino-dependiente). Sin embargo el mecanismo de respuesta a la AS parece ser distinto entre los grupos. Mientras que en el grupo WT la AS no generó cambios en la expresión o actividad de D1 ni de la ciclina D1 pero incrementó la expresión de su transportador MCT-8, en el grupo TRAMP, la AS no modificó la expresión de su transportador, pero incrementó la expresión y actividad de D1. En conjunto, nuestros datos demuestran que la AS incrementa los niveles de T3 tanto en la próstata normal (WT) como en la tumoral (TRAMP) y ambas son capaces de responder a este incremento, lo cual sugiere que la T3 prostática, podría evitar la progresión tumoral manteniendo el tejido diferenciado.

INTRODUCCIÓN

La próstata es una glándula accesoria del tracto reproductor masculino, está presente en todos los mamíferos, pero únicamente los humanos, los cánidos y los felinos, desarrollan cáncer de próstata (CaP) (Morrison et al., 2002). En el mundo este tipo de cáncer representa una de las neoplasias más frecuentes y es la segunda causa de muerte en varones mayores de 50 años (American Cancer Society, 2014). Esta patología es de origen multifactorial y se han identificado algunos factores que reducen o aumentan el riesgo de desarrollarla (Wilson et al 2012). Aunque durante mucho tiempo ha existido controversia en relación al efecto de la actividad sexual en el CaP, estudios recientes sugieren que existe una asociación entre mayor frecuencia de actividad sexual y menor riesgo (Ahmadi et al 2011). Se desconocen los mecanismos implicados en esta protección, pero una posible explicación es que la activación del sistema neuroendócrino que ocurre durante la actividad sexual, contribuye a mantener la integridad del epitelio prostático. Hay evidencia de que la actividad sexual aumenta la generación local de andrógenos (dihidrotestosterona, DHT) y de hormonas tiroideas (triyodotironina, T3) en la próstata (Purvis et al., 1986; López-Juárez et al., 2009). En relación a la T3, estudios de nuestro grupo en modelos animales han mostrado que los tumores prostáticos presentan niveles prácticamente indetectables de esta hormona, que se acompañan de una baja expresión (mRNA) de la desyodasa 1 (D1, enzima que cataliza la formación de T3) y de una elevada expresión (mRNA) de desyodasa 3 (D3, enzima que cataliza la inactivación de T3). Por otro lado, en un modelo in vitro de CaP humano (línea celular LnCaP) se mostró que la suplementación con T3 induce la expresión de genes de diferenciación epitelial; y reduce la invasividad celular estimulada por la estimulación β -adrenérgica. Estas evidencias indican que aunque el proceso tumorigénico de la próstata se acompaña de una reducción en la generación local de T3, las células cancerosas no pierden la capacidad de responder a esta hormona. El propósito de este trabajo fue comprender el efecto de la actividad sexual en el desarrollo del CaP y analizar la participación de la T3 en este proceso.

ANTECEDENTES

1 – Próstata

La próstata es una glándula de secreción mixta túbulo-alveolar, presente en todos los mamíferos, y junto con las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales forma parte de las glándulas accesorias del tracto reproductor masculino. La próstata se localiza debajo de la vejiga urinaria. Su morfología varía dependiendo de la especie, pero en los humanos está formada por un solo lóbulo el cual se divide en 4 zonas: estromal, de transición, periférica y central. En contraste, la próstata de los roedores es multilobulada y presenta 4 pares denominados: anteriores, ventrales, dorsales y laterales (figura 1). La principal función de la próstata es producir y secretar componentes al líquido seminal, los cuales contribuyen a mantener la viabilidad y movilidad espermática. Dentro de los principales productos de secreción se encuentran enzimas como las fosfatasa, el antígeno específico prostático, la proteína de unión prostática; así como la fructosa, el ácido cítrico, la espermina y el zinc (Knobil & Neill, 1994; Burden et al., 2005).

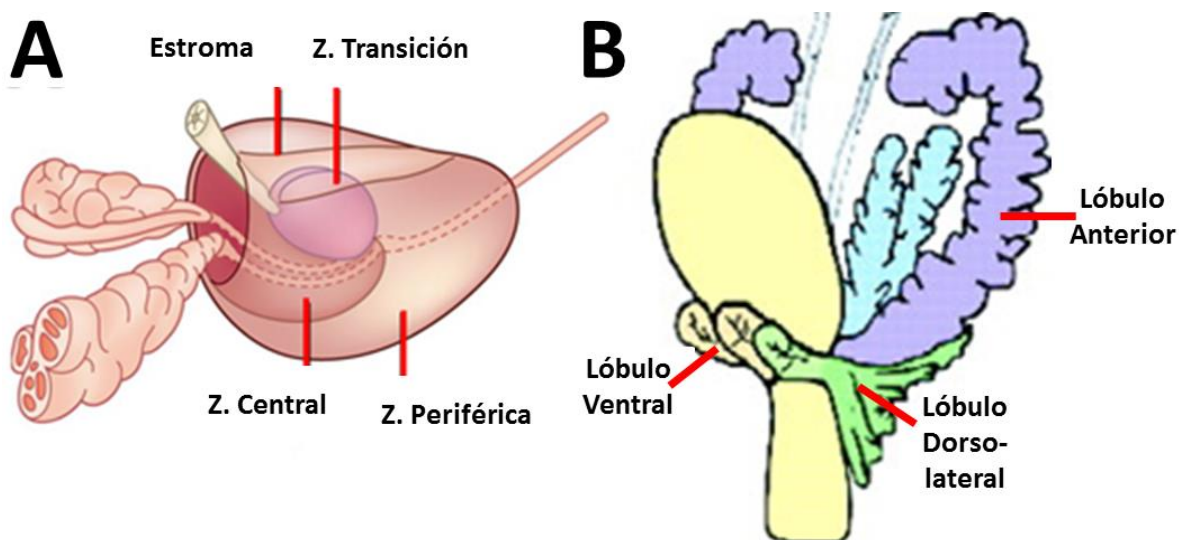


Figura 1. Anatomía prostática. A, Próstata humana. Se muestran las principales zonas de la glándula: estroma, transición, central y periférica. B, Próstata Murina. Se muestran los lóbulos anteriores, dorso-laterales y ventrales

2 - Cáncer de Próstata (CaP)

El CaP ocupa tanto en nuestro país como a nivel mundial, el segundo lugar de incidencia (57 nuevos casos/100.000 habitantes/año) y mortalidad (15 muertes/100.000 habitantes/año) por neoplasias (Organización Mundial de la Salud, OMS 2014 & American Cancer Society, ACS 2014). Es una enfermedad de origen multifactorial; cuyo proceso carcinogénico no está bien comprendido. Hasta la fecha se han identificado algunos factores de riesgo asociados con el desarrollo de esta enfermedad, como son la edad (>50 años), raza y/o grupo étnico (afroamericanos) y antecedentes genéticos heredables (mutaciones de los genes HPC1 [del inglés, *human prostatic cancer 1*], BRCA1 [del inglés, *Breast Cancer 1*] y GSTP1 [del inglés, *glutathion s transferasa type 1*]). Otros factores asociados a un mayor riesgo incluyen agentes infecciosos, factores ambientales (exposición a cancerígenos) y el estilo de vida (estrés, sedentarismo, obesidad, etc). También se han identificado algunos factores protectores asociados al estilo de vida como son; la actividad física, la dieta (aporte de antioxidantes, bajo consumo en grasas) y la actividad sexual (Lara et al., 2004; Ferris-i-Tortajada et al., 2011; Wilson et al., 2012; Mandair et al., 2014). En el cuadro 1 se resume la expresión de algunos genes involucrados en los procesos de iniciación, promoción (aumento de la tasa proliferativa) y progresión del CaP.

Cuadro1. Genes implicados en la carcinogénesis prostática

ETAPAS	GEN	PRODUCTO CODIFICADO	FUNCIÓN	FENÓMENO NEOPLÁSICO
INICIACIÓN	NKX3.1	Factor de transcripción homodominio oncofetal	Regula ciclo celular (PKB/AKT/mTOR)	↑ PIA
	PTEN	Fosfatasa lípida	Regula ciclo celular (PTEN/IP3K/AKT/mTOR)	Mutado o perdido en PIN
	Myc	Factor de transcripción	Regula ciclo celular (↑ ciclinas, ↓p21 ↓bcl2)	Mutado y sobreexpresado en PIN

ÓN	MXI1	Proteína de interacción con MAX	Represor transcripcional de MYC	↑ PIN
	NCOA4 ARA70α ARA24	Proteínas coactivadores del receptor nuclear de andrógenos	Coregulador transcripcional	↓NCOA4 ↑ARA24 En CaP localizado
P R O M O C I O N Y P R O G R E S I Ó N	Rb	Retinoblastoma Proteína supresora de tumor	Inhibe progresión del ciclo celular y repara daño al DNA	Pérdida de función en CaP localizado
	CDKN1B (P27)	Proteína 27 de la familia Cip/Kip, inhibe cdk 2 y 4	Detiene el ciclo celular, evitando entre a fase G1.	Inactivado en CaP localizado
	CDKN2A (P16)	Proteína de la familia Cip/Kip, inhibe cdk 4 y 6 Inhibe fosforilación de Rb.	Promueve la progresión de la fase G1 a la fase S.	Pérdida de función en CaP localizado
	CCND1	Ciclina D1 Activa cdk4 y cdk6.	Promueve la progresión del ciclo celular en la fase G1/S.	Sobreexpresado en CaP localizado
	Telomerasa	Ribonucleoproteína	Actividad terminal transferasa	↑CaP localizado
	E-Cadherina	Glicoproteína epitelial	Adhesión célula-célula dependiente de calcio	↓ CaP
	c-CAM	Molécula de adhesión celular	Adhesión celular	↓ CaP
	Integrinas	Receptores transmembrana	Interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular	↓ Reduce su expresión en CaP. Correlaciona con invasión celular
	c-Met	Receptor de tirosin-cinasa	Activador de Ras/PI3k/STAT3	Sobre-expresado en CaP
	Receptor de andrógenos	Receptor nuclear de andrógenos	Factor de transcripción	Frecuentemente mutado

p53	Fosfoproteína 53	Gen supresor de tumores	Mutado y sobre-expresado
Bcl2	Familia de oncogenes (linfoma de células B tipo 2)	Inhibe apoptosis, promueve supervivencia	Se sobre-expresa en CaP
IGFβ1	Factor de crecimiento tipo insulina β tipo1	Promueve crecimiento celular y favorece proliferación	↑ en CaP
TGF α y β1	Factor de crecimiento transformante α y β tipo 1	Favorece proliferación e invasión	↑ en CaP
EGF	Factor de crecimiento epidermal	Favorece proliferación	↑ en CaP metastático
CD82 (KAI1)	Proteína integral de membrana	Supresor de metástasis	↓ en CaP metastático

PIA: atrofia inflamatoria proliferativa, PIN, neoplasia intraepitelial prostática, CaP: cáncer de próstata, ↑: incrementa, ↓: disminuye. (Modificado de Abate-Shen & Shen 2000).

2.1 - Actividad sexual

La actividad sexual es el estímulo primordial que controla y mantiene la función de la próstata. En los últimos 10 años, se ha generado información relacionada con conducta sexual y el riesgo de CaP. La evidencia muestra que una vida sexual activa en etapas tempranas (20 años), disminuye el riesgo a desarrollar cáncer en etapas tardías (+ 50 años) (Giles., et al., 2003; Leitzmann., et al., 2004; Fernández., et al., 2004; Ahmadi et al., 2010). Sin embargo, esta protección no se observa en sujetos sexualmente activos que presentan prostatitis o un historial de enfermedades de transmisión sexual como sífilis y/o gonorrea

(Rosenblatt., et al., 2001; Hayes., et al., 2004; Sarma., et al., 2006; Cheng., et al., 2010).

En humanos y en modelos animales se ha descrito que la conducta sexual estimula la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada así como otros sistemas endócrinos. La conducta sexual aumenta de manera transitoria los niveles circulantes de hormonas adrenales (catecolaminas y glucocorticoides) y de la reproducción (testosterona, estrógenos, prolactina, oxitocina). Este aumento ocurre después de una o varias cópulas y retorna a niveles basales en un período entre 2 a 14 horas (Bonilla- Jaime, et al., 2005; Hernández, et al., 2006). En el modelo de la rata se ha reportado que la actividad sexual por largo plazo (5 meses) se acompaña de un aumento en el peso prostático. Este crecimiento además presenta respuesta hipertrófica e hiperplásica de la glándula, pero conserva la citoarquitectura epitelial, lo cual se denomina fenotipo secretor (Huang, et al., 1989). En términos neuroendócrinos se ha propuesto que el crecimiento prostático podría estar asociado con la activación de las vías de señalización de andrógenos (generación de DHT y translocación de receptor al núcleo) y de prolactina (vía Stat-1/ Stat- 3) (Hernández, et al., 2007; Rojas et al., 2011).

Las hormonas tiroideas forman parte de un grupo de mensajeros endócrinos presentes en el sistema reproductor masculino (gónadas y glándulas accesorias), y en el fluido seminal (Brzezińska-Ślebodzińska E. et al., 2000; Anguiano et al., 2006; Anguiano et al 2008). Estudios recientes indican que exceso de hormona tiroidea (hipertiroidismo franco) se acompaña de problemas de disfunción eréctil (Corona et al., 2011; Corona et al., 2012); pero poco se conoce de las implicaciones de la actividad sexual sobre la función tiroidea. Como se revisará más adelante, estudios de nuestro grupo han sugerido que la actividad sexual regula el efecto de las hormonas tiroideas de manera órgano-específica.

3 - Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas se sintetizan en la glándula tiroides y se secretan al torrente sanguíneo en forma de tetrayodotironina (T4) y triyodotironina (T3). A la T4 se le considera una prohormona ya que, a partir de un proceso enzimático de

desyodación, puede ser biotransformada a una forma activa (T3) o inactiva (rT3, isómero de la T3). Se considera que la T3 es la hormona activa, porque presenta una afinidad 10 veces mayor que la T4 por los receptores nucleares de TH (Sawin et al., 2000). La desyodación es un proceso que opera de manera órgano-específica y es regulada por una familia de enzimas denominadas desyodasas. La desyodasa tipo 1 (D1) es capaz de desyodar tanto el anillo externo (vía de activación, generación de T3) como el interno (vía de inactivación, inactivación de T3) de la T4, mientras que las desyodasas tipo 2 y tipo 3, desyodan selectivamente el anillo externo e interno, respectivamente (Figura 2). Está bien establecido que el control de estas enzimas es muy importante para regular el efecto biológico de las tironinas en los diferentes órganos blanco. A continuación se revisa el efecto de estas hormonas en el desarrollo normal y patológico de la próstata.

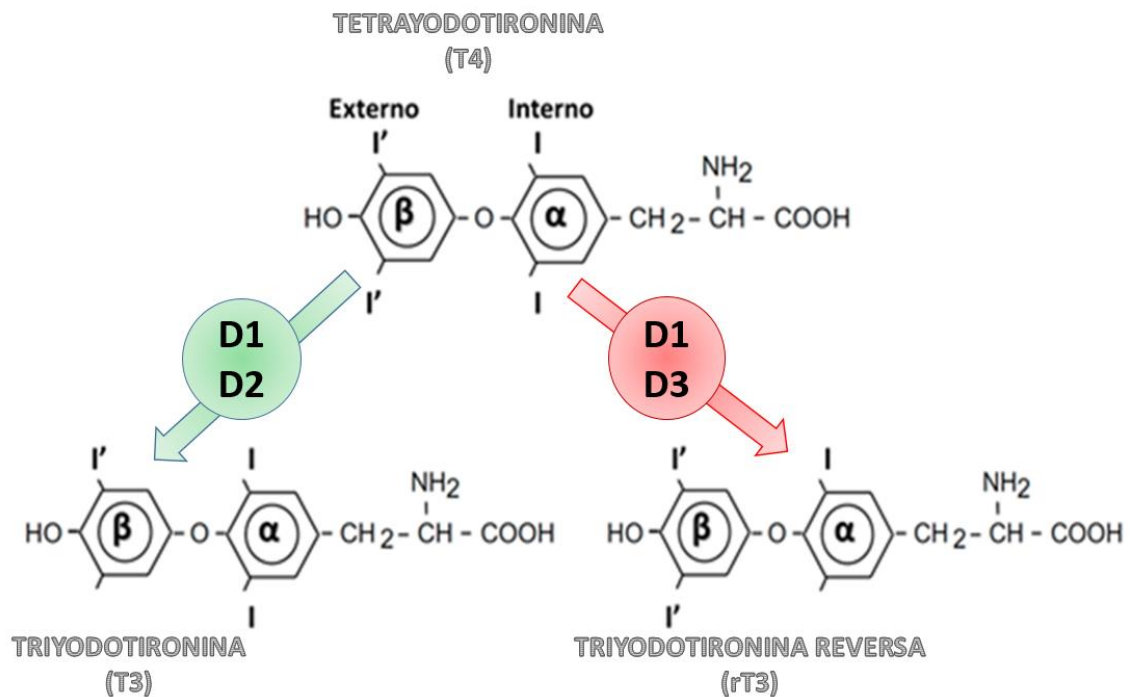


Figura 2. Desyodación de las hormonas tiroideas. La D1 puede desyodar ambos anillos de la T4 y dar lugar a la formación de T3 o rT3. La D2 desyoda el anillo externo (β) mientras que la D3 únicamente el anillo interno (α). En verde se muestra la vía de activación a través de la cual se genera T3 y en rojo la vía de inactivación.

3.1 - Hormonas Tiroideas y Fisiopatología Prostática

Hay evidencia de que las hormonas tiroideas participan en el crecimiento y función de la próstata a través de mecanismos directos e indirectos. En la

pubertad, un aporte suficiente de T3 promueve el crecimiento y diferenciación de esta glándula a través de la modulación de la actividad del eje hipotálamo–hipófisis–gónadas. Además, la T3 regula de manera directa la actividad de enzimas metabólicas en la próstata. Esto correlaciona con el hecho de que el epitelio prostático expresa receptores de T3 (Maran., et al., 1998; Sidharthan et al., 1993; Esquenet et al., 1995).

En relación a la disponibilidad de T3, se ha demostrado que la próstata de rata expresa niveles elevados de D1 durante la pubertad, pero dicha expresión declina con la edad (Anguiano B., et al., 2006) Un estudio realizado en ratas sexualmente activas (sementales para reproducción), mostró que la actividad sexual constante evita que la actividad de D1 disminuya con la edad (López-Juárez et al., 2009). La inervación simpática regula positivamente la respuesta de la actividad D1 prostática a la conducta sexual (Delgado-González et al., 2011). Sin embargo, el control neuroendócrino de esta enzima es mucho más complejo, pues estudios en ratas sexualmente inactivas muestran que la T3, la prolactina y el estradiol estimulan la actividad D1, mientras que los andrógenos la inhiben (Anguiano et al., 2006). En comparación con su contraparte normal, estudios en tumores prostáticos han mostrado una reducida expresión de D1 y una elevada expresión de D3. Esta relación inversa en la expresión de las desyodasas correlaciona con niveles prácticamente indetectables de T3 en la próstata tumoral (Angulo-Barbosa et al 2012; Anguiano et al 2012). Sin embargo las células de cáncer prostático tienen la capacidad de responder a T3, pues la administración de esta hormona promueve la proliferación celular y potencia el efecto proliferativo de los andrógenos sobre la línea celular de cáncer diferenciado LNCaP (Esquenet et al 1995). Además se ha observado que una dosis moderada de T3 (hipertiroidismo subclínico) en ratones inmunosuprimidos inoculados con células LNCaP, previene la adquisición de un fenotipo tumoral más agresivo (neuroendócrino) (datos no publicados, comunicación personal, Delgado-González E.). Lo anterior ha llevado a proponer que un aporte adecuado de T3 es fundamental para el desarrollo e integridad del epitelio prostático. Estudios en otros tipos de cáncer (mamario, tiroideo, renal, colon), muestran que una reducida actividad de D1 y D2 y/o elevada expresión D3 facilita la progresión tumoral (Valverde C. et al., 2014). La ausencia de T3 en

cáncer mamario y hepático está relacionada con procesos de invasión y metástasis, lo cual se refleja en mayor expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), de metaloproteasas y la adquisición del fenotipo mesenquimal (disminución de caderina-E, queratina 8/18 y aumento en vimentina) (Dentice et al., 2006; Boelen et al., 2008; Martínez-Iglesias et al., 2009).

3.2 - Genes tiroideo-dependientes relacionados con proliferación y diferenciación celular.

Los genes tiroideo dependientes presentan elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) en su región promotora. Se trata de dos hexámeros con la secuencia consenso “AGGTCA” que generalmente pueden tener el arreglo DR4 (repetición directa espaciada por 4 nucleótidos) o IP6 (palindrómico inverso espaciado por 6 nucleótidos) y que funcionan como medios sitios a los cuales se une el receptor de hormonas tiroideas (TR) y el receptor X de retinoides (RXR) formando heterodímeros (figura 3). Así, el TR actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando y de manera muy general, el mecanismo de activación de un gen dependiente de hormonas tiroideas es el siguiente: al unirse la T3, ésta induce un cambio conformacional en el TR que promueve la liberación del complejo correpresor y permite el reclutamiento del complejo coactivador, regulando así la transcripción génica (Brent et al., 2011, Mullur et al., 2014).

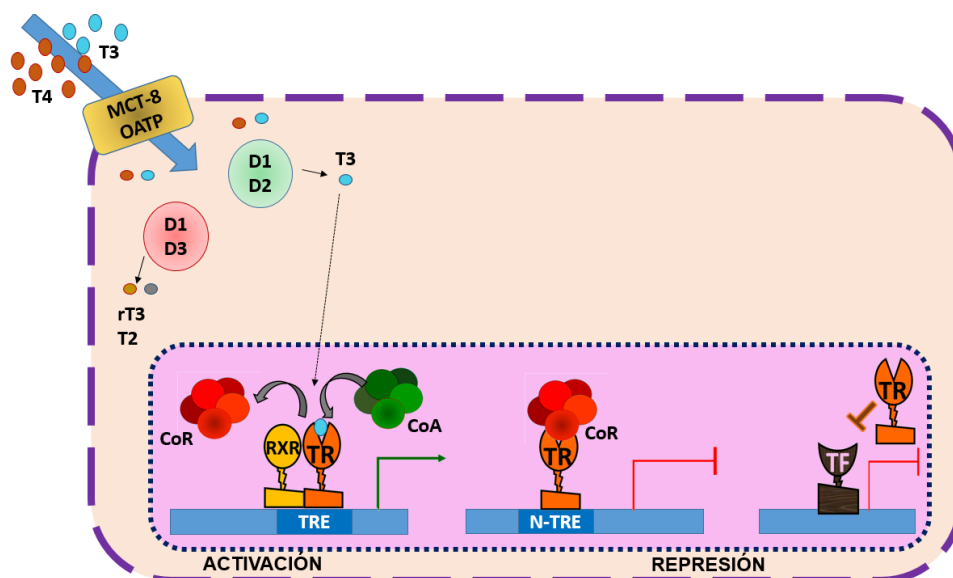


Figura 3. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas. La T4 y T3 entran a la célula blanco través de proteínas transportadoras como MCT8 u OATPs. Dentro de la célula, la D1 y/o la D3 produce rT3 y T2 (isoformas inactivas), mientras que la D1 y/o la D2 convierten la T4 en T3, la cual es capaz de unirse a sus receptores nucleares y regular la transcripción de genes blanco. T4: tiroxina, T3: triyodotironina, D1, 2 y 3: desyodasas 1,2 y 3, TR: receptor nuclear de hormonas tiroideas, RXR: receptor X de retinoides, CoR: correpresor, CoA: coactivador, TRE: elemento de respuesta a hormonas tiroideas, N-TRE: elemento de respuesta a hormonas tiroideas negativo, TF: factor de transcripción.

Actualmente se conocen alrededor de 150 genes regulados por T3, 75 % se regulan positivamente y 25 % de manera negativa. También existen genes que sin presentar un TRE en su región promotora, son regulados de manera indirecta por T3 (SHGB, BMP-4, SULT2A1) (Chang & Privalsky. 2009). En el cuadro 2 se muestran algunos de los genes que son regulados por T3, el tipo de regulación transcripcional, así como los efectos biológicos en que participa.

Cuadro 2.- Genes tironino-dependientes relacionados con proliferación y diferenciación celular.

GEN	PRODUCTO CODIFICADO	ELEMENTO REGULADOR	TRATAMIENTO CON T3	PROCESO BIOLÓGICO EN QUE PARTICIPA
ARA70	Proteína coactivadora del Receptor de andrógenos	TRE-TR	↑Múltiples tejidos	Diferenciación
MyoD Miogenina	Proteína de músculo esquelético	TRE-TR	↑Múltiples tejidos	Diferenciación
Notch1 BMP7	Morfógenos	Indirecto Desconocido	↑Múltiples tejidos	Diferenciación
c-Fos	Factor de transcripción	AP1-SRE	↓Múltiples tejidos	Diferenciación y Proliferación
E2F1	Arresto mitótico homólogo deficiente - tipo 1	N-TRE-TR	↓Múltiples tejidos	Proliferación

EGF y EGFR	Factor de crecimiento endotelial y su receptor	Desconocido	↑Múltiples tejidos	Proliferación
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β	Desconocido	↑Múltiples tejidos	Proliferación
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico	TRE-TR	↑Múltiples tejidos	Proliferación
PAK	Cinasa activada por p21/cdc42/ract1	TRE-TR	↑Múltiples tejidos	Apoptosis
ITGβ7	Integrinaβ7	TRE-TR	↑Múltiples tejidos	Adhesión celular
CCND1	Ciclina D1	Transrrepresión CREB O ATF-2	↓Neuroblastoma ↑Hipófisis	Proliferación
CCNA2	Ciclina A2	Descononido	↓Múltiples tejidos	Proliferación
MDM2	Inhibidor de P53	TRE-TR	↑Múltiples tejidos	Revierte arresto celular
Cip/Kip	Inhibidor de cdk2, y de complejos cycD/cdk4y6	Desconocido No tiene TRE	↑P21 ^{cip} ↑P27 ^{kip} ↑P57 ^{kip}	Arresto celular
P53	Fosfoproteína 53 Supresora de tumor	Forma complejos con TRβ	↑Múltiples tejidos	Reparación de DNA
Mdm2	Inhibidor de P53 Estimula ciclina A	2TRE-TR	↑Múltiples tejidos	Proliferación

TRE: elemento de respuesta a hormona tiroidea, N-TRE: elemento de respuesta negativo a hormona tiroidea, TR: receptor nuclear de hormonas tiroideas, SER: elemento de respuesta a esteroides, ↓: Regulado a la baja, ↑: Regulado al alta. (Modificado de: Puzianowska-Kuznicka M., 2006; Kress E., 2009).

A continuación se describen dos genes cuya regulación depende de hormonas tiroideas y que son relevantes para el cáncer de próstata.

3.2.1.- ARA70

ARA 70 es una proteína que forma parte del complejo coactivador del receptor de andrógenos, cuyo gen es regulado positivamente por T3. Se han identificado dos TRE funcionales en los sitios -234/-190 y +56/+119 de su región promotora. A nivel de la proteína, existen dos variantes de ARA 70 (α y β), las cuales se generan mediante un corte y empalme alternativo en el mRNA. ARA 70- α actúa como un gen supresor de tumores, induciendo la expresión de p27^{kip} y evitando la progresión de la fase G1/S del ciclo celular. Por otro lado, la variante β funciona como un oncogen, promoviendo la proliferación e invasión celular mediante la disminución de p27 y e-cadherina y aumentando la expresión de ciclina A, B1 y skp2 (Alen et al., 1999; Peng et al., 2008; Ligr et al., 2010; Wu et al., 2011; Kollara et al., 2012).

3.2.2.- Ciclina D1

La ciclina D1 es una proteína que participa en el ciclo celular, regulando las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4 y CDK6). El complejo ciclina/cinasa fosforila e inactiva a la proteína del retinoblastoma (Rb- proteína supresora de tumores que frena el ciclo celular) y de esa manera promueve la transición de la fase G1/S del ciclo celular, es decir promueve la proliferación. El promotor del gen de la ciclina D1 no tiene TRE, pero al parecer la T3 podría inhibir la transcripción de éste gen a través de un efecto indirecto mediado por CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPc) (García-Aranda et al., 2004). En el cáncer prostático, la expresión de ciclina D1 está aumentada en comparación con el tejido normal. Se ha reportado que además de su bien conocido efecto proliferativo, es esencial en la adhesión y migración celular (Fleishman et al., 2011; Comstock et al., 2007; Aroto-Ohshima T y Sawa H., 1999; Zhiping et al., 2006; Puzianowska-Kuznicka et al., 2006).

4 - Modelos de estudio del CaP

En el cuadro 3 se muestran los principales modelos *in vitro* e *in vivo* de CaP utilizados para comprender los mecanismos asociados a la iniciación, promoción y progresión de esta patología.

4.1 - *In vitro*

Los modelos *in vitro* incluyen el uso de líneas celulares cancerosas inmortalizadas, de diverso origen (humano o murino), estado de diferenciación (responsivas o no-responsivas a andrógenos) y capacidad invasiva. En el cuadro 3, se muestran las principales líneas humanas utilizadas en investigación.

4.2 - *In vivo*

Debido a que el CaP no puede inducirse con cancerígenos químicos, en los últimos años se han desarrollado ratones transgénicos, los cuales a través de distintas construcciones desarrollan cáncer. El ratón TRAMP [del inglés: *transgenic adenocarcinoma mouse prostate*] es un modelo ampliamente utilizado en investigación, porque desarrolla el CaP de manera gradual (neoplasia intraepitelial, cáncer diferenciado, cáncer indiferenciado y metástasis), tal y como ocurre en el cáncer humano. Sin embargo no se ha evaluado en ninguno de estos modelos el efecto de la actividad sexual sobre la progresión del cáncer prostático.

Cuadro 3. Modelos de estudio del cáncer de próstata

IN VITRO			
LÍNEA CELULAR	ORIGEN	PRESENCIA Y RESPUESTA AL RA	CAPACIDAD INVASIVA
<i>PTA-3568</i>	Humano	SI	NO
<i>PTA-3569</i>	Humano	SI	NO
<i>LnCaP</i>	Metástasis de un nodo linfático humano	RA MUTADO / SI	NO
<i>MDA-PCa</i>	Metástasis a hueso humano	SI	NO
<i>PC3</i>	Metástasis lumbar humano	NO	SI
<i>VCaP</i>	Humano	NO	SI

<i>DU145</i>	Metastasis de SNC humano	NO	SI	
<i>P25.48</i>	Humano	NO	SI	
IN VIVO				
MODELO DE RATÓN	EFEECTO	SITIO METASTÁSICO	RESISTENCIA A CASTRACIÓN	MAYOR GRADO DE NEOPLASIA
<i>RARγ (KO)</i>	Pérdida de función	Vesículas seminales	No determinado	Metaplasia escamosa
<i>p27 (KO)</i>	Pérdida de función	Hiperplasia en varios órganos y sobrepeso	No determinado	Hiperplasia estromal
<i>Pten (KO)</i>	Pérdida de función	Gónadas, células linfoides, intestino, tiroides	No determinado	PIN
<i>Nkx3.1 (KO)</i>	Pérdida de función		No determinado	Displasia e hiperplasia
<i>C3(1)-Tag</i>	Sobre-expresión oncogénica	Pulmón poco frecuente	No determinado	Adenoma
<i>PB-T/tag (TRAMP)</i>	Sobre-expresión oncogénica	Nodo linfático, pulmón y hueso	Si	Cáncer poco diferenciado, Metastásico
<i>FG-Tag</i>	Sobre-expresión oncogénica	Nodo linfático, adrenal y pulmón	Si	H – PIN
<i>LPB-Tag (LADY)</i>	Sobre-expresión oncogénica	Nodo linfático, hígado y pulmón	No	H – PIN
<i>PSACreNkx3.1 f lox</i>	KO condicional	No desarrolla	No determinado	PIN
<i>PSACrePtenf lox</i>	KO condicional	No desarrolla	No	Cáncer poco diferenciado
<i>PBCre4Cantnb Lox</i>	KO condicional	Glándula bulbouretral, prepusial y testículos	Putativa	Adenocarcinoma
<i>PBCre4p53f loxRbf lox</i>	KO condicional	No desarrolla	No determinado	Cáncer

RA: receptor nuclear de andrógenos, KO: ausencia, PIN: neoplasia intraepitelial prostática, H-PIN: neoplasia intraepitelial prostática de alto grado. (Modificado de Russell P., & Kingsley E., 2003; Valkenburg K., & Williams B., 2011 y Parisotto M., & Metzger D., 2013).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las hormonas tiroideas o tironinas presentan un amplio espectro de efectos biológicos, incluyendo el equilibrio entre proliferación y diferenciación celular, y es a través del control de las desyodasas que se regula el efecto de estas hormonas de manera órgano-específica. Estudios del laboratorio han mostrado que la próstata de rata expresa la enzima D1 capaz de generar T3 de manera local. Esta enzima se expresa selectivamente a partir de la pubertad y declina con la edad. En ratas macho sexualmente activos se ha mostrado que la actividad sexual constante previene dicho descenso, sugiriendo que la generación local de T3 (vía D1), podría estar asociada al gasto metabólico que implica mantener la actividad secretora de la glándula (López-Juárez et al 2009). Se desconoce la relevancia de las desyodasas en el proceso canceroso, pero estudios en tumores prostáticos han mostrado baja expresión de la enzima D1 y elevada expresión de la D3 que se traduce en niveles prácticamente indetectables de T3 en los tumores (Angulo-Barbosa et al., 2012; Anguiano et al 2012). No obstante que el proceso tumorigénico se acompaña de la disminución de la capacidad de generar T3, hay evidencia de que las células de cáncer prostático LNCaP expresan receptores a HT y responden a la administración exógena de la hormona. En efecto, la administración de T3 promueve la proliferación celular, así como la expresión de proteínas de diferenciación de epitelio prostático (Esquenet et al., 1995). Más aún, el tratamiento con una dosis moderada de T3 equivalente a hipertiroidismo subclínico, previene en los tumores prostáticos la adquisición de un fenotipo neuroendócrino altamente invasivo, inducido por la estimulación β -adrenérgica (datos no publicados, comunicación personal de Delgado-González E.). En conjunto estos datos sugieren que un aporte exógeno y local de T3 podría ser fundamental para mantener la integridad del epitelio prostático. En este estudio se propuso analizar si la actividad sexual prevenía o retrasaba la promoción del cáncer, y si esto pudiera estar relacionado con cambios en la expresión de las desyodasas y en los niveles locales de T3.

HIPÓTESIS

La actividad sexual continua aumenta los niveles prostáticos de T3 y mantiene la integridad del epitelio prostático.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la actividad sexual en la biodisponibilidad de T3 y en el desarrollo del cáncer prostático.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar en el modelo del ratón TRAMP, los parámetros motores asociados con la conducta sexual.
2. Analizar los efectos de la actividad sexual sobre el peso y la histopatología prostática en ratones silvestres y TRAMP.
3. Analizar en ambos grupos, los efectos de la actividad sexual sobre los niveles circulantes y prostáticos de T3.
4. Analizar el efecto de la actividad sexual en la expresión de genes asociados con captura, generación/inactivación de T3 y con proliferación y diferenciación de epitelio prostático.

MATERIAL Y METODOS

Modelo Ratón TRAMP.

Se trabajó con una cepa de ratones transgénicos denominados TRAMP, los cuales desarrollan neoplasia intraepitelial (del inglés *prostate intraepithelial neoplasia, PIN*) y cáncer. Estos ratones expresan el oncogen viral de retinoblastoma de simio SV40, el cual codifica para el antígeno tumoral transformante corto y largo (Tag). Este oncogen está ligado a la región promotora de una proteína específica de próstata, la probasina (PB-Tag), cuya expresión depende de andrógenos. A partir de las 10 semanas de edad la próstata presenta un fenotipo PIN y alrededor de las 20 semanas, cáncer bien diferenciado (Greenberg et al., 1994). Los ratones TRAMP provienen de un

fondo genético de la cepa C57BL6, cuyo pie de cría fue obtenido de los laboratorios Jackson (Sacramento, California). La tipificación se realizó mediante PCR, a partir de DNA extraído de la cola (Gingrich et al., 1999). Los ratones recibieron alimento y agua “*ad libitum*” y se mantuvieron con temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) y fotoperiodo controlado (12:12). El sacrificio se realizó por decapitación bajo previa administración de una mezcla de ketamina/xilacina (30 y 6 mg/kg de peso corporal). Este protocolo fue aprobado por el comité de Biética del INB (UNAM), con base a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Inducción y criterios de evaluación de la actividad sexual.

Ratones machos de 2 meses de edad se distribuyeron de manera aleatoria y se colocaron de manera individual en cajas copulatorias con una hembra receptiva. La receptividad sexual se indujo en hembras ovariectomizadas, mediante la administración subcutánea antes de la cópula de 25 μg de estradiol (48 h antes) y 1 mg de progesterona (4h antes). En los ratones silvestres (WT, del inglés *wild type*) y TRAMP se evaluaron los patrones motores (frecuencia y latencia de montas, intromisiones y eyaculaciones, así como el índice de eficiencia copulatoria, IEC) que se despliegan como parte de la conducta sexual (ver anexo I).

Diseño Experimental

Se contó con un grupo de ratones WT y TRAMP, los cuales a las 8 semanas de edad, fueron divididos en dos subgrupos, un grupo sexualmente activo y uno inactivo (cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución de los grupos usando una matriz 2 X 2. Se contó con una n = 5 - 17 ratones/ grupo.

Grupos	Condición Sexual	
Silvestre	Inactivos	Activos
TRAMP	Inactivos	Activos

El grupo sexualmente activo permaneció durante dos meses en compañía de hembras receptoras. La evaluación de la conducta sexual se realizó en sesiones de una hora, al inicio, a la mitad (primer mes) y al término del estudio (segundo mes). Las parejas macho-hembra se formaron de manera aleatoria y se intercambiaron a lo largo del experimento. Al final del experimento, los ratones fueron sacrificados por decapitación y se registró el peso prostático, el cual fue normalizado respecto al peso corporal. El tejido prostático normal y/o tumoral se almacenó en formalina (10%) para su posterior procesamiento histológico (inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina), o se congeló a -70°C para su análisis molecular. La cuantificación circulante y prostática de T3 se realizó por medio de un ensayo de ELISA; la expresión de genes se analizó por qRT-PCR y la actividad de desyodasa tipo 1, se realizó mediante la técnica de liberación de radioyodo.

Análisis histopatológico

El efecto de la actividad sexual sobre el desarrollo del cáncer prostático se analizó en cortes en parafina (5 micras) teñidos con hematoxilina-eosina. Se analizó una laminilla por ratón, de un total de 5 ratones por grupo.

Indicadores de actividad sexual. En cada laminilla se identificó el lóbulo dorso-lateral y se evaluó la altura del epitelio, el número de invaginaciones, el área epitelial y área luminal como indicadores de hipertrofia o hiperplasia prostática. Las mediciones se realizaron mediante el uso del programa Leica Application Suite (versión 2.8.1) y las observaciones se hicieron en un microscopio Leica. En todos los casos, la selección de acinos se realizó al azar a una magnificación 5X y se analizaron un total de 4-6 acinos por laminilla. Esto representa aproximadamente el 50 % del total de acinos por laminilla por lóbulo. La altura del epitelio (μm) se analizó a una magnificación 20X (silvestres) o 60X (TRAMP). Como se muestra en la figura 4, en cada acino se superpusieron dos líneas perpendiculares y la medición de la altura epitelial se llevó a cabo en los cuatro puntos cardinales. La altura se promedió entre cuatro y se obtuvo la altura por acino/lóbulo/ratón. El número de invaginaciones se analizó a 10X a partir de 6 acinos seleccionados al azar. Se promedió el número de

invaginaciones/acino/lóbulo/ratón. El área epitelial y luminal (μm^2) se analizó a una magnificación 20 X. Se promedió área por acino/lóbulo/ratón.

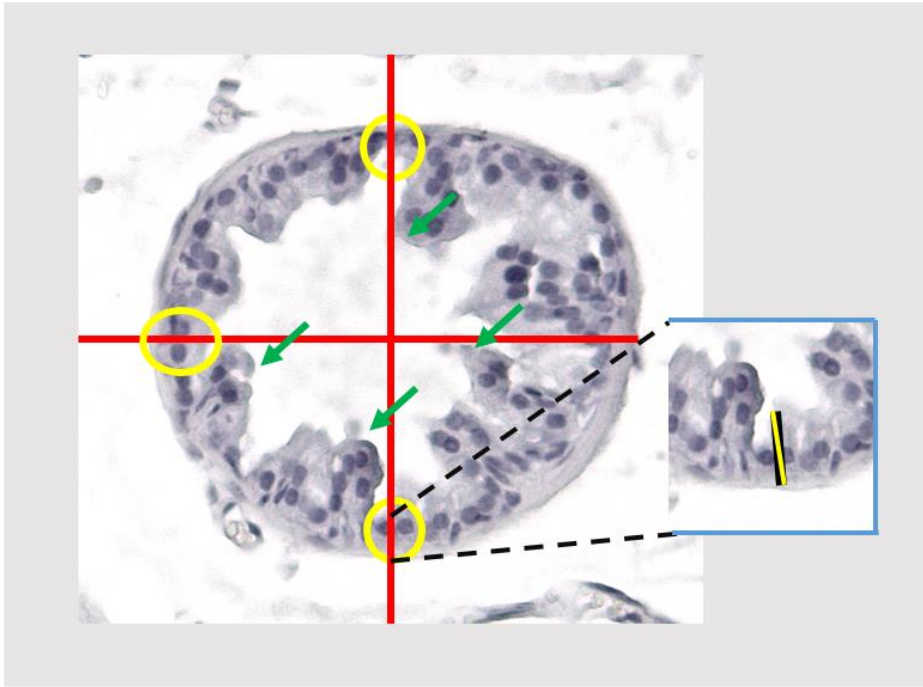


Figura 4. Imagen representativa de un acino prostático correspondiente al lóbulo dorso-lateral de un ratón silvestre (10X). La altura epitelial se analizó a partir de la sobreposición de dos líneas perpendiculares (rojo). Las marcas amarillas señalan cuales fueron las células que se midieron y la altura del epitelio comprende la distancia que existe de la membrana basal a la apical (recuadro de acercamiento). Las flechas verdes indican las invaginaciones.

Criterios histopatológicos. El análisis patológico se realizó en la próstata completa (laminilla completa), utilizando los criterios descritos por Kaplan - Lefko (2003) y Suttie (2003). Los primeros diferencian la presencia de lesiones precancerosas (PIN) y cancerosas. La neoplasia PIN se caracteriza por presentar pseudoestratificación nuclear, células en penacho (núcleo polarizado y una alta proporción citoplasma/núcleo) y figuras apoptóticas; mientras que el cáncer bien diferenciado, además de lo anterior, presenta estructuras cribiformes (espacios circulares bien delimitados con ausencia de células), así como una respuesta desmoplásica (fibrosis) con infiltración de células estromales al epitelio y lumen. La clasificación de Suttie considera algunos de los criterios de Kaplan-Lefko (cuadro 5), pero la clasificación que hace del PIN es más precisa y lo diferencia como de bajo y alto grado. El grado de lesión se obtiene a partir de un sistema de puntuación, que se calcula considerando tanto el tipo de lesión, como el porcentaje de distribución. El grado 1 representa una atrofia proliferativa

inflamatoria, PIA (se caracteriza por presencia de pseudoestratificación nuclear), los grados 2 y 3 indican una neoplasia intraepitelial de bajo y alto grado consecutivamente L-PIN y H-PIN. Los grados 4 y 5 corresponden a un adenoma confinado e invasivo, respectivamente y el grado 6 a un adenocarcinoma metastásico. La distribución se estimó como focal (1-2 lesiones aisladas), multifocal (hasta el 30 % del acino, ocupado por el tipo de lesión), o difusa (más de un 50%).

Cuadro 5. Análisis histológico basado en los criterios propuestos por Suttie (2003)

GRADO	TIPO DE LESIÓN	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
1	Atrofia proliferativa inflamatoria (PIA)	Atrofia y pseudoestratificación.
2	Neoplasia intraepitelial de bajo grado (L-PIN)	Además de lo anterior, aparecen estructuras cribiformes en áreas focales del acino (<30%).
3	Neoplasia intraepitelial de alto grado (H-PIN)	Más del 50 % del acino presenta estructuras cribiformes y aparece una respuesta desmoplásica (proliferación estromal).
4	Adenoma confinado	Invasión epitelial a lumen.
5	Adenoma invasivo	Invasión a lumen y ruptura de la cápsula.
6	Adenocarcinoma con potencial metastásico	Invasión fuera de la cápsula y presentan metástasis locales y a distancia. Tejido epitelial poco diferenciado.

Extracción y Cuantificación de T3 por ELISA

La próstata normal o tumoral se pesó y se homogenizó en una proporción 1:4 (peso/volumen) en una solución de metanol + 1 mM PTU (6-n-propil-2-thiouracilo). El homogenado se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante se evaporó a 65°C y se resuspendió en suero hipotiroideo (libre de hormonas) de humano. La cuantificación de T3 se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA, para humano, Diagnóstica Internacional, California), utilizando una curva estándar de 0.75 a 10 ng/ml de T3. La reacción se incubó durante 1 hora con el primer anticuerpo (anti-T3 en ratón) y el conjugado unido y libre se separó con un segundo anticuerpo (IgG anti-ratón de cabra). El complejo unido se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm, en el lector de microplacas (BioRad, Model680, California).

La obtención de las muestras de sangre para la determinación de los niveles séricos de T3 se realizó durante la decapitación al final del experimento y se colectó en tubos eppendorf de 1.5 ml, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 7 minutos para recabar el suero. La cuantificación de T3 circulante, se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA, para ratón, NOVATEINBIO, Massachusetts), utilizando una curva estándar de 0.5 a 10 ng/ml de T3. La reacción se incubó durante 1 hora con el primer anticuerpo (anti-T3 multiclonal) y el conjugado unido y libre se separó con un segundo anticuerpo (IgG anti-T3). El complejo unido se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm, en el lector de microplacas (BioRad, Model680, California).

Expresión génica

La expresión de los genes de interés se analizó mediante un ensayo de qRT-PCR. La extracción de RNA total se llevó a cabo con el reactivo de Trizol. La pureza del RNA se determinó mediante el cociente de absorbancia 260/280 nm. La integridad se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa (1%). La transcripción reversa (RT) del cDNA se realizó con la retrotranscriptasa reversa (PROMEGA) a partir de 2 µg de RNA y 50 µM de oligo dT. La reacción de PCR se realizó utilizando 1 µl de cDNA y se utilizó SYBR Green como fluoróforo del producto amplificado, donde la fluorescencia emitida por el compuesto intercalante es directamente proporcional al número de copias generadas en cada ciclo de la PCR. La especificidad del producto se corroboró a través del análisis de la curva de disociación y verificando el tamaño del

fragmento amplificado por medio de un gel de agarosa. En el cuadro 6 se muestran las características de los oligonucleótidos que se utilizaron en cada ensayo. Los resultados se expresan como número de copias del gen de interés/ número de copias de β -actina.

CUADRO 6. Características de los oligonucleótidos utilizados en la PCR.

Gen	Secuencia	Temperatura alineación	Producto (pb)	GenBank ID
β -Actina	s: CCATCATGAAGTGTGACGTTG as: ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	55°C	173	NM_007393
Dio1	s:ATTTGACCAGTTCAAGAGACTCGTAG as: CCACGTTGTTCTTAAAAGCCCA	60°C	112	NM_007860
Dio2	s:GGTGGTCAACTTTGGTTCAGCC as:AAGTCAGCCACCGAGGAGAACT	65°C	95	NM_010050.2
Dio3	s: TTCATGGCGCGGATGAG as: GATGATAAGGAAGTCAACGTCGC	60°C	72	NM_172119
Ciclina D1 Ccnd1	s: GTGCAGAGGGAGATTGTGCC as: GTGCAGAGGGAGATTGTGCC	64°C	315	NM_007631
ARA70 α Ncoa4	s: TGCCATTGGTCTTCAGGCTCCTas: CAGGCATCGCTGAAGAAACTGC	67°C	115	NM_019744
MCT-2 SLC16A 7	s:TCTGACAACAGCCAAGAGAAACA as:TCTACATCAGCTGTGCATCGGAGGT CA	65°C	138	NM_011391.1
MCT-8 SLC16A 2	s: GCGCTACTTCACCTACGGGAas: CAGACACCACACCATTGGC	56.5°C	121	NM_09927.2

Extracción y cuantificación de proteínas

La próstata normal o tumoral se pesó y se homogenizó en una proporción 1:5 (peso/volumen), en una solución buffer compuesto de: HEPES 10mM, EDTA 1 mM y DTT 13 mM (pH= 7.5). La proteína se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad), utilizando una curva estándar de concentración de 1 a 8 μ g de albumina sérica bovina (BSA). Este método es muy sensible (desde 1-15 μ g) y se basa en la unión del colorante azul de Coomassie (G-250) a las proteínas, formando un complejo proteína-colorante, el cual se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm, en el lector de microplacas.

Actividad de desyodasa 1

La actividad de desyodasa fue determinada por el método de liberación de radioyodo. El ensayo estándar requiere un volumen final de 100 μ l, donde 50 μ l corresponden al homogenado protéico y los otros 50 μ l a la mezcla radiomarcada. Las condiciones óptimas para evaluar la actividad desyodativa prostática fueron: 150 μ g de proteína, 2nM 125 I-rT3, 0.5 μ M de rT3 no marcada y 5 mM del cofactor DTT, en incubación durante 3 horas a 37°C. Posteriormente se frenó la reacción mediante la adición de 100 μ l de una solución que incluye suero bovino al 50%, BSA 3% y 1mM PTU; y 300 μ l de ácido tricloroacético al 10% (TCA). El radioyodo libre fue aislado con un lavado con 2 ml de ácido acético al 10%, mediante cromatografía sobre columnas Dowex AG-50W-X2 (Bio-Rad, California). Los resultados se expresaron como picomolas de yodo / mg de proteína / hora.

Análisis Estadístico

Los parámetros de la conducta sexual se analizaron mediante una prueba no paramétrica (Wilcoxon). El efecto de la actividad sexual sobre la histopatología prostática (altura de epitelio, número de invaginaciones y área epitelio / luminal) se analizó mediante una prueba T-student. El resto de los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías (grupo x actividad sexual). Los valores de F significativos se indican en la sección de resultados, mientras que los no significativos se muestran únicamente en el ANEXO II. Las diferencias entre grupos se determinaron con la prueba de comparación múltiple Bonferroni. En todos los casos se consideraron cambios significativos a una $p < 0.05$. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico Graph PadPrism 6.

RESULTADOS

Evaluación de los patrones motores en los ratones WT y TRAMP sexualmente activos.

En la figura 5 se muestra la incidencia (% de ratones), frecuencia (número) y latencia (minutos), de montas, intromisiones y eyaculaciones. Los resultados muestran que al inicio del estudio más del 75 % de los ratones de ambos grupos presentó montas e intromisiones, pero ninguno eyaculó en el transcurso de 1 hora. Al mes de actividad sexual se observó que el 100 % de los ratones de ambos grupos ejecutó montas e intromisiones y entre un 25 a un 50 % de los ratones eyaculó. Al final del estudio todos los ratones eyacularon. En ambos grupos disminuyó significativamente la frecuencia y latencia de las montas [F(2,24)=0.96 p=0.001 y F(2,24)=5.80 p=0.01], así como la frecuencia de intromisión [F(2,246)=10.786 p=0.0005]. Los resultados muestran que desde el inicio del experimento, los ratones de ambos grupos presentaron un índice de eficiencia copulatoria (IEC) mayor a 0.5

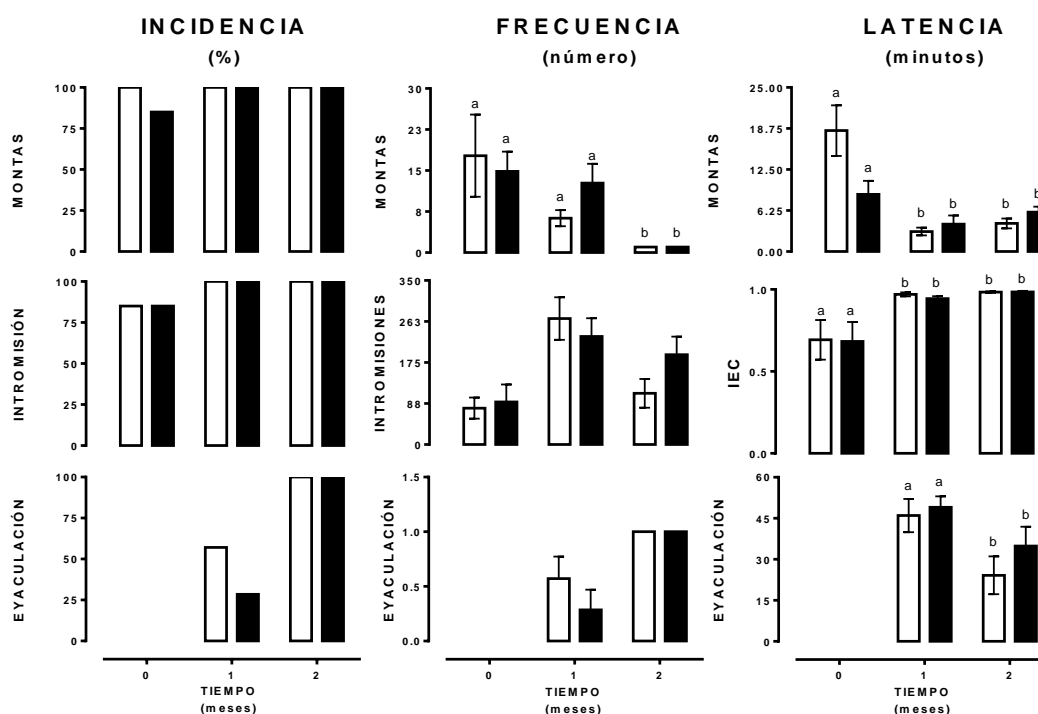


Figura 5. Evaluación de los parámetros motores que acompañan a la conducta sexual en ratones WT y TRAMP. La barra blanca representa el grupo WT y la negra el grupo TRAMP. IEC, índice de eficiencia copulatoria. La incidencia se analizó mediante el

análisis no paramétrico Wilcoxon. La frecuencia y la latencia se analizaron con un ANDEVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple (Bonferroni). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). $n = 17$ ratones/ grupo.

Efectos de la actividad sexual en el peso corporal y prostático.

En la figura 6 se muestra el efecto de la actividad sexual (8 semanas) sobre el peso corporal absoluto y relativo al peso inicial. En ambas representaciones se observó aumento significativo del peso de los ratones sexualmente inactivos (WT o TRAMP) a partir de la cuarta semana del estudio. Este aumento no se observó en los ratones sexualmente activos, de uno u otro grupo. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías (WT por TRAMP o bien WT y TRAMP por sesión) y la prueba post-hoc Bonferroni. Con el peso absoluto se observaron diferencias significativas en función del factor tiempo [$F(3,24) = 98.97$, $p < 0.0001$], factor grupo [$F(3,24) = 15.35$, $p < 0.0001$] y en la interacción de ambos factores [$F(33,24) = 16.9$, $p < 0.0001$]. Con el peso relativo también se observaron diferencias en función del tiempo [$F(3,24) = 45.14$, $p < 0.0001$], grupo [$F(3,24) = 117.1$, $p < 0.0001$] y en la interacción de ambos factores [$F(3,24) = 7.15$, $p < 0.0001$].

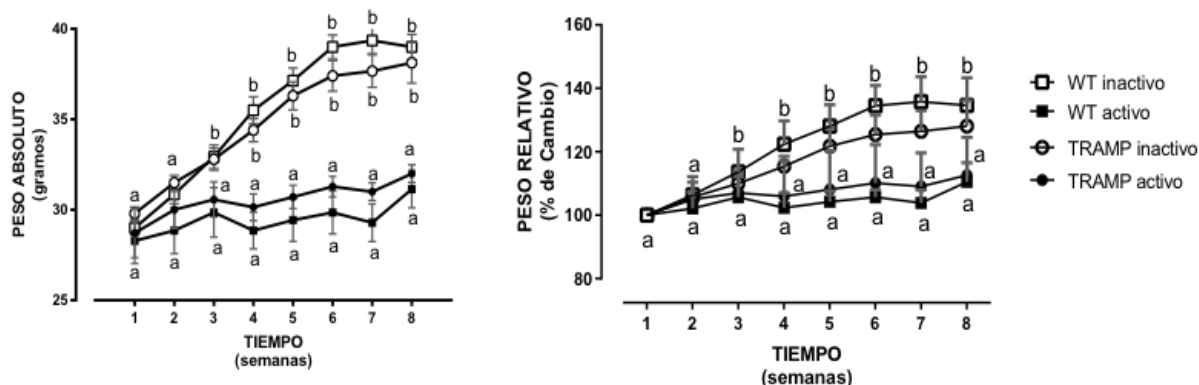


Figura 6. Efecto de la actividad sexual en la ganancia de peso corporal de los ratones WT y TRAMP. Se muestra el peso absoluto (A) y relativo (B). Este último fue normalizado como porcentaje de cambio respecto al peso inicial. Los datos se analizaron con un ANDEVA de 2 vías y una prueba de comparación múltiple (Bonferroni). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). $n = 17$ ratones/ grupo.

Los resultados de la figura 7 muestran que los ratones TRAMP del grupo inactivo; presentan mayor peso prostático (absoluto y relativo al peso corporal), en comparación con los ratones WT. En contraste este incremento no se observó en los ratones TRAMP sexualmente activos. El peso prostático absoluto y corregido, arrojó diferencias significativas en el factor actividad sexual

[F(,31)=11.77, $p < 0.001$ y $F(1,31)=4.59$, $p < 0.05$], así como en la interacción de ambos factores (grupo y actividad) [$F(1,31)=14.79$, $p < 0.005$ y $F(1,31)=12.51$, $p < 0.001$).

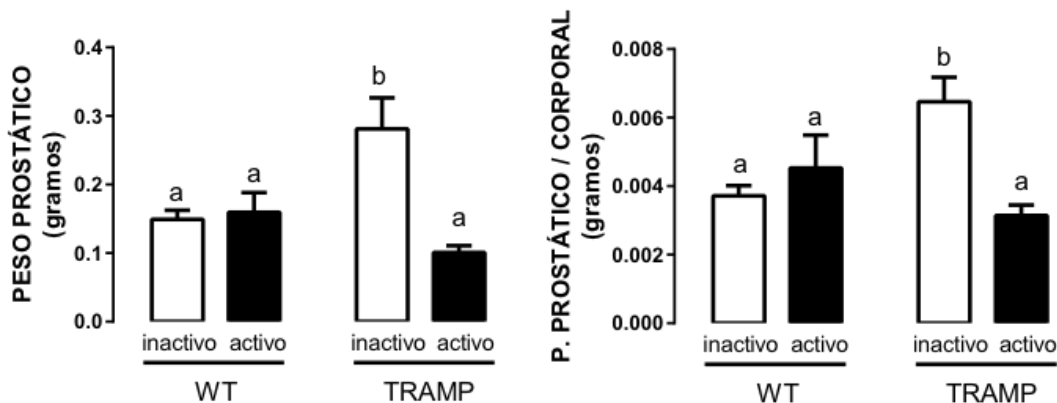


Figura 7. Efecto de la actividad sexual en el peso prostático de los ratones WT y TRAMP. El peso relativo fue normalizado respecto al peso corporal. Los datos se analizaron con una prueba de ANDEVA (2 vías) y de comparación múltiple (Bonferroni). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) $n=7$ ratones /grupo.

Efecto de la actividad sexual sobre el epitelio normal y el desarrollo del cáncer prostático.

En la figura 8 se observan fotomicrografías panorámicas (5X) del lóbulo dorso-lateral de los ratones WT y TRAMP. En las imágenes (20X) se muestra la organización de los acinos y se observa que los ratones WT exhiben un fenotipo epitelial normal (monocapa de epitelio columnar, moderadas invaginaciones, lumen con secreción eosinófila), mientras que los ratones TRAMP presentan un fenotipo canceroso (pseudoestratificación epitelial, estructuras cribiformes, respuesta desmoplásica; núcleos hipercromáticos).

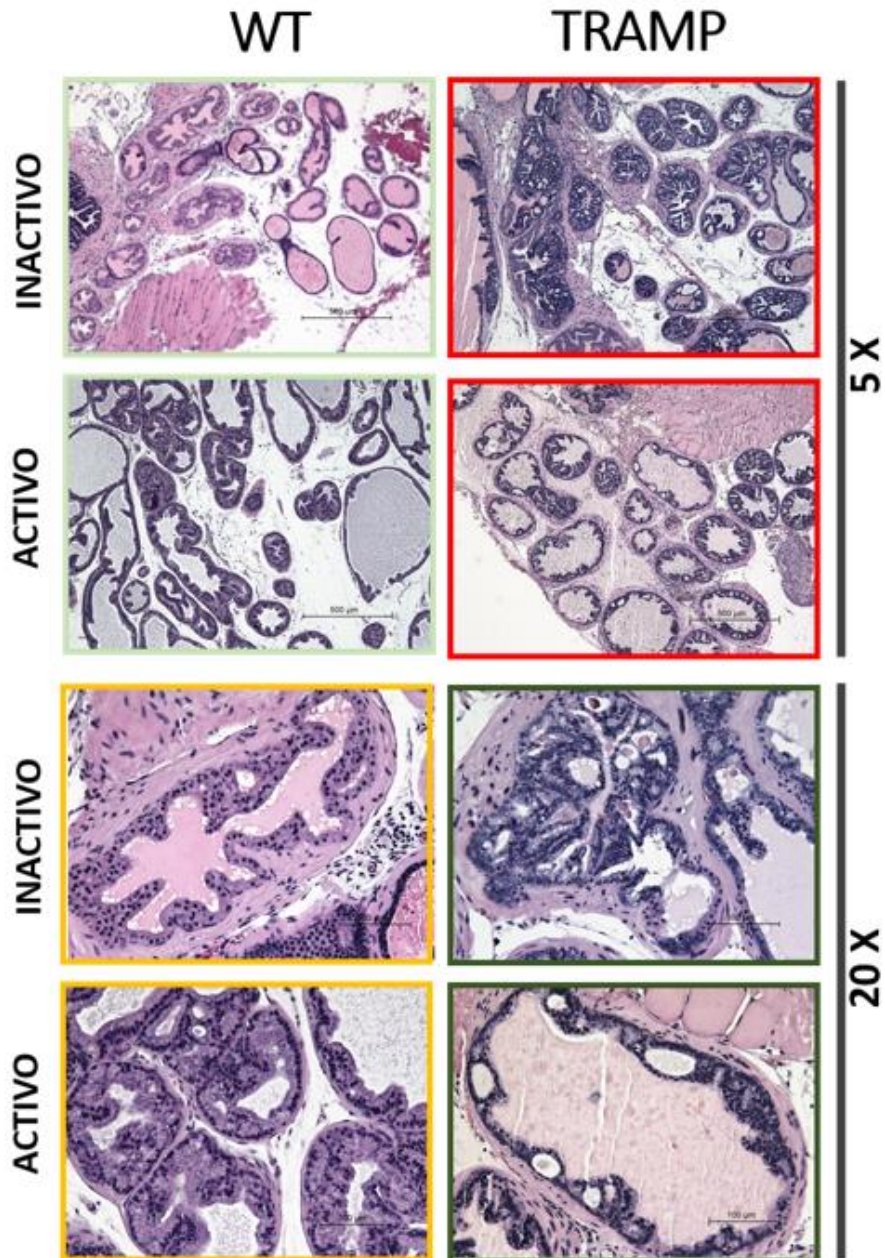


Figura 8. Efectos de la actividad sexual en la histopatología del lóbulo dorso-lateral en ratones WT y TRAMP. Fotomicrografías tomadas a partir de cortes histológicos en parafina (5 μ m) teñidos con hematoxilina-eosina. Magnificación 5X y 20X.

Los resultados de la figura 9 muestran los efectos de la actividad sexual en la morfología de los acinos de los ratones WT y TRAMP. En los ratones WT la actividad sexual no modificó el tamaño del acino, tampoco el área epitelial, ni luminal; pero aumentó la altura epitelial y número de invaginaciones [$t=2.27$ $df=8$, $p=0.02$ y $t=3.73$ $df=8$, $p<0.05$]. En los ratones TRAMP la actividad sexual no modificó el tamaño del acino; pero aumentó el área luminal, y redujo

significativamente la altura y área epitelial, así como la proporción epitelio/lumen. ($t=1.98$ $df=7$, $p<0.05$ y $t=5.78$ $df=8$, $p<0.001$).

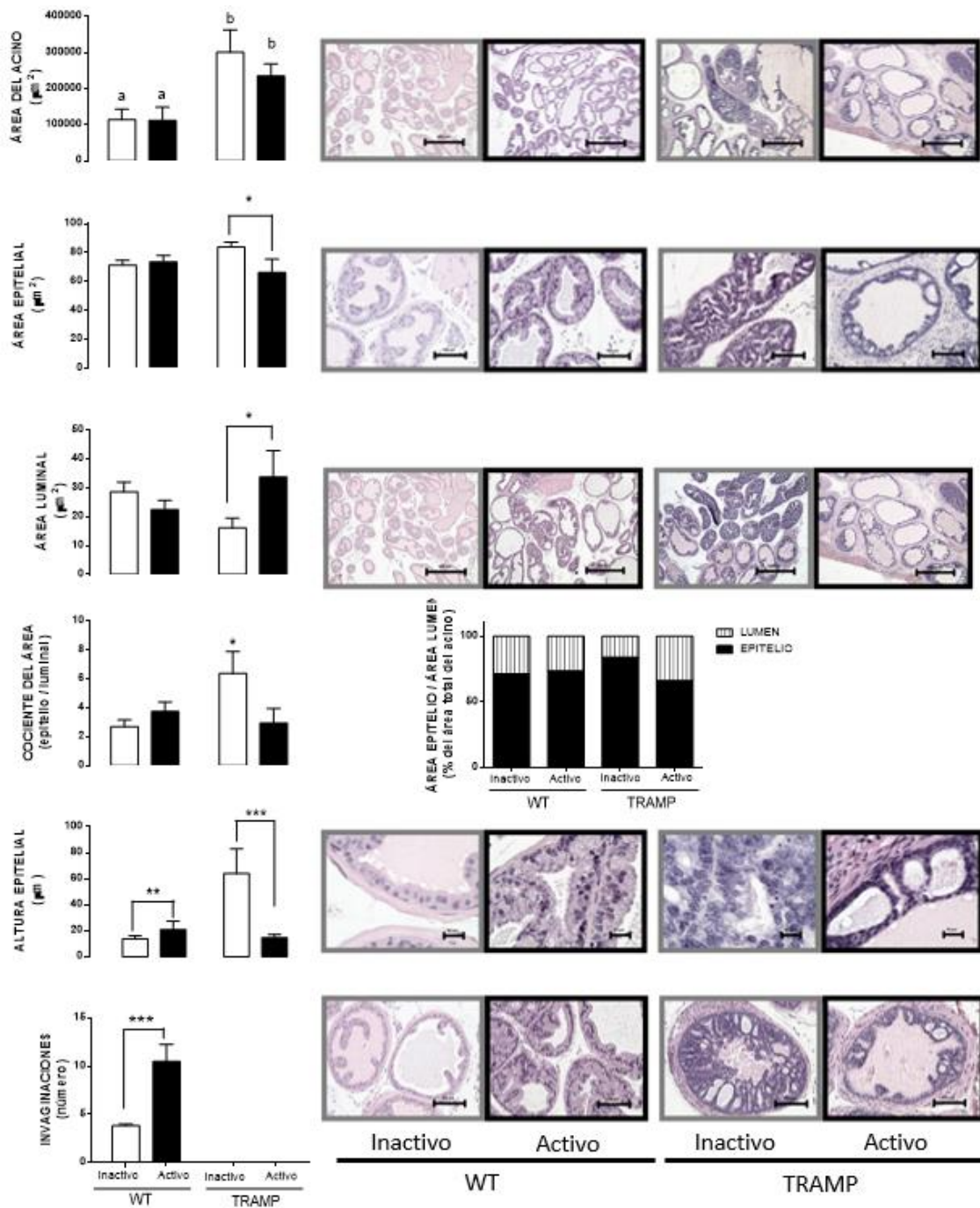


Figura 9. Efectos de la actividad sexual en la histología del lóbulo dorso-lateral de los ratones WT y TRAMP. A la derecha de las gráficas se muestran imágenes representativas del análisis cuantitativo. Los datos se analizaron de manera independiente (WT o TRAMP) con una T de student. En el grupo TRAMP no fue posible cuantificar el número de invaginaciones. Asteriscos y letras denotan diferencias significativas respecto al grupo sexualmente inactivo. * $p<0.05$; **, $p<0.01$; *** $p<0.001$. $n=5$ ratones/ grupo. Se analizaron 4 acinos por lóbulo y 4 células por acino.

En la figura 10 se muestra el efecto de la actividad sexual en la incidencia de lesiones prostáticas en el ratón TRAMP. La incidencia representa el porcentaje de acinos con lesión tipo PIN o cáncer de toda la laminilla. Los ratones sexualmente activos presentaron una mayor incidencia de lesiones tipo PIN [F(1,16)=4.546, p<0.05]; pero menor incidencia de lesiones tipo cáncer, en comparación con los ratones inactivos. Al analizar la distribución del patrón cribiforme dentro del área del acino, se encontró que los ratones sexualmente activos presentan menos estructuras cribiformes (10 %), en comparación con los ratones inactivos (45 %) [t=5.512 df=8, p=0.0006]. Como se observa en la tabla de la figura 12, esta distribución es indicativa de un PIN de bajo y alto grado, respectivamente.

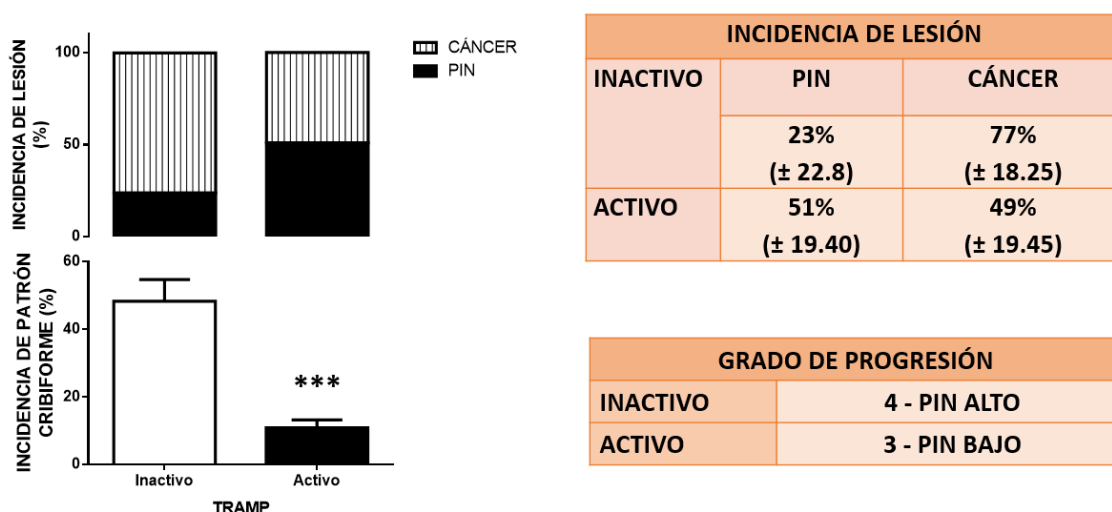


Figura 10. Efecto de la actividad sexual en la incidencia de lesiones prostáticas. La incidencia representa el porcentaje (%) de lesiones tipo PIN o cáncer dentro de un acino. La incidencia se analizó en toda la laminilla. El patrón cribiforme se determinó con base al área que estas estructuras ocupan dentro del acino. Se analizó un total de 4 acinos por lóbulo. Los datos se analizaron con una prueba de ANDEVA (2 vías) y de comparación múltiple (Bonferroni) o una T student. *** denotan diferencias significativas (p<0.05) n=6 ratones /grupo.

Efecto de la actividad sexual en la biodisponibilidad de T3

En la figura 11 se observan los niveles circulantes y prostáticos de T3 en ratones WT y TRAMP. Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas en los niveles circulantes de T3 entre ratones silvestres y TRAMP, ni por efecto de la actividad sexual. En relación a los niveles prostáticos de T3 se observó que

la actividad sexual se acompañó de un aumento significativo en la concentración de esta hormona [$F(1,14)=23.26$, $p=0.001$].

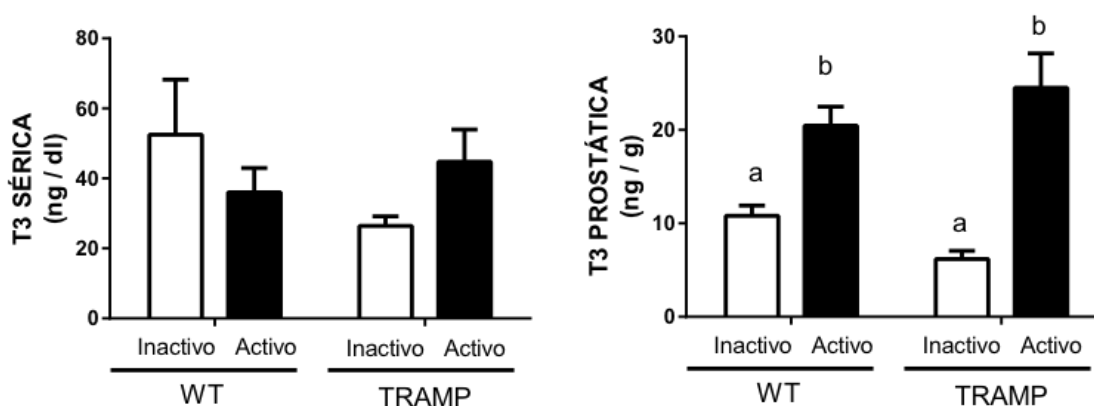


Figura 11. Efecto de la actividad sexual en los niveles circulantes y prostáticos de T3 en ratones WT y TRAMP. Los datos se analizaron con una prueba de ANDEVA (2 vías) y de comparación múltiple (Bonferroni). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p<0.05$) $n= 9-12$ ratones por grupo.

En la figura 12 se muestra el efecto de la actividad sexual en la expresión de genes relacionados con captura (transportador MCT-8), generación (desyodasa tipo 1) e inactivación (desyodasa tipo 3) de T3. En los ratones WT la actividad sexual aumentó la expresión del transportador MCT-8 [$F(1,20)=8.6$, $p<0.01$]; pero contrario a lo esperado, no modificó la expresión de la D1, ni tampoco la expresión de D3. En contraste, en los ratones TRAMP la actividad sexual no modificó la expresión del MCT-8; ni de la D3, pero aumentó la expresión y actividad de la D1 [$F(1,20)=12.79$, $p<0.005$].

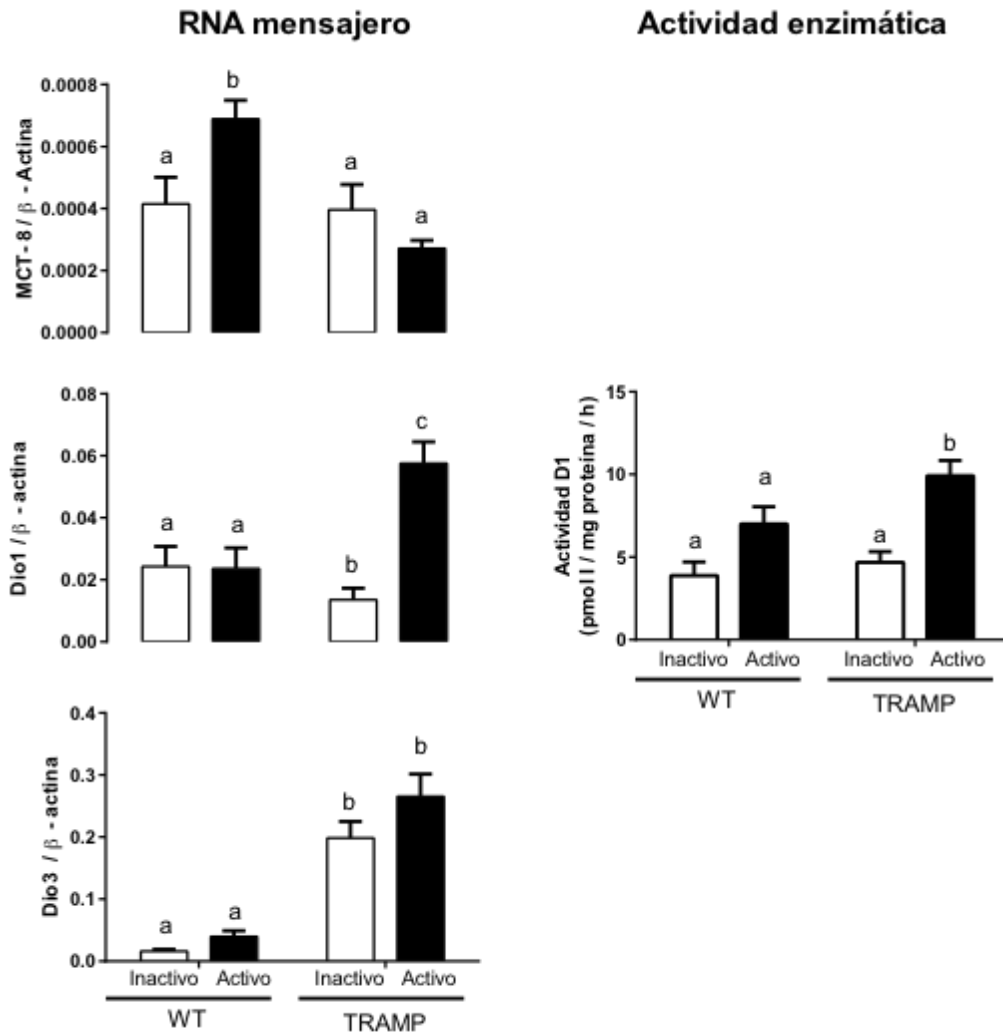


Figura 12. Efecto de la actividad sexual en en la expresión de genes relacionados con captura (transportador MCT-8), generación (desyodasa tipo 1) e inactivación (desyodasa tipo 3) de T3 en ratones WT y TRAMP con y sin actividad sexual. Los datos se analizaron con una prueba de ANDEVA (2 vías) y de comparación múltiple (Bonferroni). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) $n = 6 - 10$ ratones por grupo.

Efecto de la actividad sexual en la expresión de genes tironino-dependientes asociados con proliferación y diferenciación del epitelio prostático.

La figura 13 muestra que la actividad sexual no modificó la expresión de ciclina D1, pero aumento la expresión de ARA70 α en ambos grupos [$F(1,20)=19.90$, $p < 0.0005$].

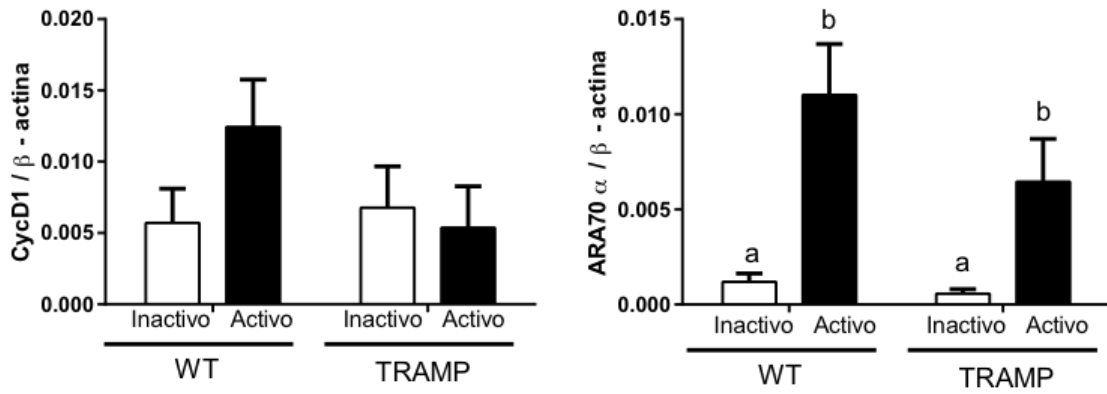


Figura 13. Efecto de la actividad sexual en la expresión de genes tironino-dependientes. Los datos se analizaron con una prueba de ANDEVA (2 vías) y de comparación múltiple (Bonferroni). Letras distintas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) $n = 6$ ratones por grupo.

DISCUSIÓN

La conducta sexual del ratón TRAMP

En este trabajo se analizó por primera vez el efecto de la actividad sexual en la disponibilidad de hormonas tiroideas y en el desarrollo del CaP. El ratón TRAMP es un modelo transgénico ampliamente utilizado en estudios de quimio-prevención y se conoce que la presencia del transgen (*Tag*), no repercute significativamente en la fertilidad de esta cepa (Gingrich et al., 1999). Sin embargo, en este estudio se validó si efectivamente el ratón TRAMP, representa un buen modelo para evaluar los efectos de la actividad sexual. Se analizaron los patrones motores que acompañan a la ejecución de la conducta sexual (incidencia y frecuencia de montas, intromisiones y eyaculaciones) y se encontró que en ninguna de estas variables hubo diferencias significativas entre los ratones silvestres y TRAMP, por lo que el uso de este modelo es apropiado para evaluar el impacto de la actividad sexual sobre el desarrollo del CaP.

Impacto de la actividad sexual en el desarrollo del CaP y generación de T3

Se encontró que los ratones silvestres y TRAMP presentan ganancia de peso corporal en función de la tasa de crecimiento; sin embargo esta ganancia no fue observada en los ratones sexualmente activos de ninguno de los grupos. Este dato contrasta con estudios previos, los cuales han mostrado que la cohabitación de ratas macho con hembras (periodo de 1 a 5 meses); o bien la abstinencia sexual en ratones (1 mes), no modifican la ganancia de peso corporal (Braun & Krieg 1983; López-Juárez et al., 2009; Gärtner K., 1992). Esta discrepancia podría ser explicada por el esquema de inducción y frecuencia de las cópulas. En los estudios anteriormente citados, el ciclo estral de las hembras no fue manipulado, a diferencia del presente estudio, en dónde los machos siempre estuvieron presentes con hembras receptivas. En este sentido, un estudio previo había observado una evidente reducción de la ganancia de peso corporal, en ratas macho expuestas a hembras receptivas (2 a 3 veces por semana, por 2 a 3 meses) (Weizembaum 1981). Vale la pena mencionar que esta reducción del peso corporal no se acompaña de hipofagia; pero sí de una reducción del índice de adiposidad y se ha sugerido que niveles altos de testosterona podrían estar

involucrados en la reducción del peso corporal (Siegel et al 1981; Weizembaum et al 1981). El aumento en los niveles de testosterona, también ha permitido explicar la hipertrofia prostática que ocurre en respuesta a la actividad sexual (Herz Z., et al 1969). En roedores, este efecto trófico se presenta primordialmente en el lóbulo ventral y se relaciona con el hecho de que este lóbulo es más sensible al efecto de los andrógenos (Aumuller et al 1985). En el presente estudio no se observó el aumento del peso de la próstata debido probablemente a que el peso de la glándula no se analizó por lóbulos. Sin embargo, se observó que efectivamente la actividad sexual induce un efecto hipertrófico (aumenta la altura del epitelio) e hiperplásico (aumenta el número de invaginaciones) sobre el epitelio secretor de la próstata de ratón, lo cual concuerda con trabajos previos en ratas (Aumuller et al 1985; López-Juárez 2009). Sin embargo, en la próstata tumoral (ratón TRAMP) se encontró que la actividad sexual redujo el crecimiento prostático que se acompañó la reducción en la altura y área epitelial, y del aumento del área luminal. Más aún, en la próstata de los ratones TRAMP sexualmente activos, se observó una menor proporción (25 a 30 %) de lesiones precancerosas (PIN alto grado) y cancerosas, en comparación con el grupo TRAMP inactivo. Este hallazgo es de potencial relevancia clínica, dado que hay evidencia de que el PIN de alto grado, evoluciona rápidamente a cáncer (ACS, 2014).

Aunque se desconocen los mecanismos neuroendócrinos asociados con esta protección, con base en los resultados de este estudio proponemos que la T3 podría estar mediando esta respuesta, al menos en parte. Encontramos que la actividad sexual no modifica los niveles circulantes de T3 en los ratones silvestres, ni en los TRAMP, pero aumenta las concentraciones de esta hormona en la próstata de ambos grupos. En el grupo silvestre, este aumento se correlacionó con un aumento en la expresión del transportador de T3 (MCT-8), pero no con cambios en la expresión y actividad de la enzima D1, o expresión de D3. En contraste, el aumento de la T3 prostática en los ratones TRAMP sexualmente activos, correlacionó con el aumento en la expresión y actividad de D1, en la expresión del RNAm de D3, pero no con la expresión del RNAm de MCT-8. Estos hallazgos sugieren que entre ratones silvestres y TRAMP, la disponibilidad de T3 se regula de manera diferente.

El aumento prostático de T3 en respuesta a la actividad sexual, se había mostrado previamente en el modelo de rata y se explicó por el aumento en la expresión y actividad de D1 (Delgado-González 2011). En este modelo (ratón) resulta difícil explicar dicho aumento; dado que la actividad sexual en el grupo silvestre no aumentó la expresión de la enzima D1 (mRNA o actividad), pero sí en el TRAMP, y no redujo la expresión de la enzima D3 involucrada en la inactivación de T3. Además, nuestro estudio descarta la participación de la otra enzima involucrada en la generación local de T3 (D2), dado que su expresión no fue detectada. El aumento en la expresión del MCT-8, difícilmente explica el aumento prostático de T3, dado que los niveles séricos de esta hormona no aumentaron en los ratones sexualmente activos. En este estudio no se analizaron los niveles circulantes de T4; pero una posibilidad es que la actividad sexual estimule la secreción de T4, y que la alta expresión de MCT-8 favorezca su internalización y desyodación a T3. Sin embargo esta hipótesis tiene que ser explorada.

Se conoce que la estimulación simpática (noradrenérgica) y los niveles elevados de prolactina, estimulan la actividad D1 prostática, mientras que los andrógenos la inhiben (Anguiano et al., 2006; Delgado González 2011), y que todos estos factores se activan o liberan en respuesta a la cópula (Thomas & Keenan., 1976; Keenan, 1981; Anguiano et al., 2006). Como era de esperarse, correlacionando con antecedentes de nuestro laboratorio, la expresión de RNAm de D3 (inactivación de T3) en la próstata tumoral fué elevada, pero la actividad sexual no modificó su expresión en ninguno de los grupos, sugiriendo que la actividad sexual no incide sobre esta enzima. Se conoce que la falta de T3, por la activación de D3, promueve procesos asociados con proliferación e invasión tumoral (Hernández, et al., 2007; Kester et al., 2011 & Gereben et al., 2008). Nuestros datos no permiten discernir, la diferente sensibilidad de uno y otro grupo y se requiere analizar la participación de estos factores en la respuesta sexual y en la regulación de las desyodasas en el modelo del ratón.

Posible efecto protector de la T3 en el cáncer prostático

Con el propósito de analizar la posible contribución de T3 en el desarrollo del CaP, se analizó la expresión de genes tironino-dependientes, asociados con

proliferación celular (ciclina D1) y diferenciación de epitelio prostático (ARA70 α). Ciclina D1 es un gen que se regula negativamente por T3; sin embargo y contrario a lo esperado, nuestros datos no mostraron diferencias en sus niveles de expresión ni por efecto de la actividad sexual, ni entre ratones silvestres y TRAMP. Es decir, no hubo una asociación directa de ciclina D1 con el peso prostático, ni una asociación indirecta con los niveles de T3. Esto puede deberse a que en la próstata, ciclina D1 no se relaciona directamente con el tamaño glandular, pero sí con la progresión tumoral (Fleishman et al., 2011; Comstock et al., 2007; Aroto-Ohshima T y Sawa H., 1999; Zhiping et al., 2006). El hecho de que no se haya observado una relación inversa entre T3 y la expresión de ciclina D1 puede deberse a que el promotor de este gen no contiene un sitio TRE, por lo que la inhibición de la transcripción involucra un mecanismo indirecto, el cual no opera en todos los tejidos, ni condiciones fisiológicas y/o patológicas (González-Sancho et al., 2002; Wang et al., 2014).

Por otra parte se evaluó la expresión prostática de ARA70- α y se encontró que no hubo diferencias en la expresión basal de este gen entre ratones silvestres y TRAMP, pero la actividad sexual aumentó significativamente su expresión. Este gen es regulado directamente por T3 (TRE) y codifica para una proteína coactivadora del receptor de andrógenos (Tai et al., 2007). Se desconoce la relevancia funcional del efecto de T3 en la próstata, pero hay evidencia de que la proteína ARA70- α actúa como un supresor de tumores, porque mantiene la diferenciación epitelial y reduce la capacidad invasiva de las células (Alen et al., 1999; Peng et al., 2008; Ligr et al., 2010; Wu et al., 2011; Kollara et al., 2012). En un estudio encontró que ARA70- α se expresa en el epitelio prostático normal y que disminuye su expresión durante el proceso tumorigénico (Li P., et al 2002); sin embargo, nuestros datos muestran que la actividad sexual no sólo previene dicho descenso, sino que aumenta su expresión. En relación a esto, estudios recientes de nuestro grupo muestran que la administración de T3 previene la adquisición de un fenotipo neuroendócrino (maligno) mediado por la estimulación β -adrenérgica (Delgado-González et al 2013). Nuestros datos, no descartan la participación de otros factores neuroendócrinos relacionados con esta protección y sustentan la noción de que

la actividad sexual reduce el riesgo de desarrollar cáncer prostático (Ahmadi H., et al 2010; James W., 1994).

En resumen, nuestros datos indican que en el modelo del ratón TRAMP, la actividad sexual redujo el crecimiento prostático y aunque no previno el desarrollo de cáncer, disminuyó significativamente el número de lesiones precancerosas y cancerosas. Es probable que el aumento de la T3 tumoral (vía D1) asociado a la actividad sexual, participe en esta protección, a través de mantener la diferenciación del epitelio prostático. A continuación se muestra un modelo propuesto.

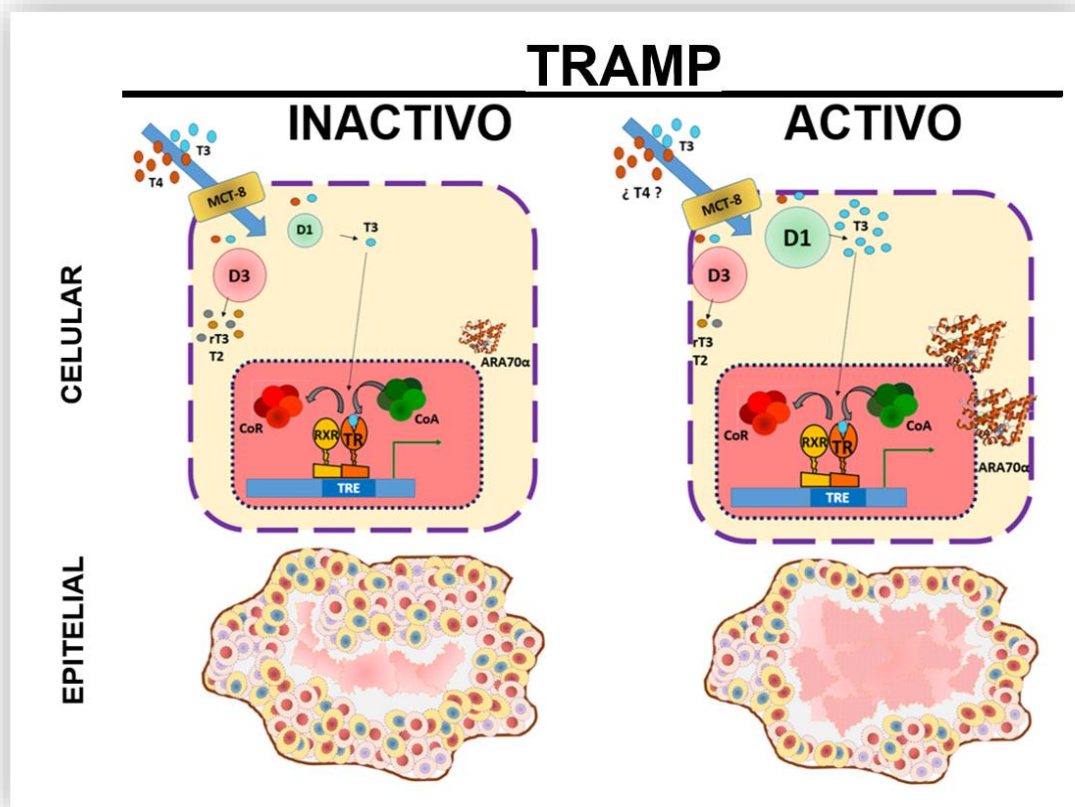


Figura 14. Modelo propuesto de la participación de la T3 en el mecanismo protector de la actividad sexual, en la progresión del CaP. La próstata del ratón TRAMP (tumoral), presenta menores niveles de D1 así como de T3 con respecto a un ratón silvestre (WT, próstata no tumoral). Durante la activación neuroendócrina que ocurre en respuesta a la actividad sexual (AS), entre otros, incrementa la actividad de D1 prostática y su consecuente producción de T3. La próstata del TRAMP es capaz de responder al incremento en los niveles de T3, ya que esto se acompaña del incremento en la expresión de ARA70α, un gen tironino-dependiente que participa en la diferenciación prostática.

En consecuencia de estos cambios moleculares, observamos que contrario a lo que ocurre en la próstata normal, en el TRAMP, la AS no genera un efecto trófico sobre el epitelio, y además exhibe características de una menor progresión tumoral, explicado

por un cociente epitelio/lumen más bajo, y una menor incidencia de estructuras cribiformes. Es posible que el incremento en la T3 en respuesta a la AS, se asocie al elevado gasto energético que implica mantener la actividad secretora, y que la posterior inducción de genes diferenciadores como ARA70 α participe disminuyendo la progresión tumoral. Sin embargo se requiere explorar la participación de los múltiples factores se activan en respuesta a la AS.

CONCLUSIONES

No existen diferencias en la ejecución de los patrones motores asociados a la conducta sexual entre ratones silvestres y TRAMP.

La actividad sexual redujo la ganancia de peso corporal y previno el crecimiento del tumor, así como el número de lesiones precancerosas y cancerosas.

La actividad sexual no tuvo efecto en los niveles circulantes de T3, pero promovió la generación local de T3 en la próstata normal y tumoral que se asoció con el aumento en D1 en los ratones TRAMP y un aumento en el RNAm del transportador MCT8 en los ratones silvestre.

El aumento prostático de T3 se acompañó del aumento en la expresión de un gen de diferenciación (ARA70- α) en los ratones sexualmente activos tanto silvestres como TRAMP.

Proponemos que es probable que la T3 participe como parte de la respuesta protectora asociada a la actividad sexual.

PERSPECTIVAS

Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio, fue el hecho de que la actividad sexual reduce la incidencia de lesiones tipo PIN de alto grado y de cáncer. Se desconocen los mecanismos involucrados, pero es probable que el aumento local de T3 participe en esta protección. Resultaría de interés analizar el efecto que la actividad sexual y/o T3, ejercen en la expresión de genes “maestros” involucrados en la transición de PIN de bajo grado, a uno de alto grado y consecuentemente a cáncer. Además de conocer si estos efectos preventivos se mantienen a largo plazo.

Otra posibilidad que también resulta de interés, es analizar la interacción metabolismo-estrés oxidativo. Existen evidencias de que la transición de PIN a cáncer se acompaña de la reducción en la expresión/actividad de enzimas antioxidantes (Bostwick et al 2000). En la próstata, se desconoce el efecto de la actividad sexual y/o T3 en el estrés oxidativo; pero hay evidencia de que la

cópula reduce la peroxidación de lípidos asociada a la edad en tejidos como hígado y riñón (Oxenkrug & Requintina 2003).

Para discernir la contribución de T3 en estos procesos, se puede recurrir a la estimulación o abatimiento de la función tiroidea, o administración o remoción de esta hormona en modelos in vivo e in vitro.

REFERENCIAS

- Abate-Shen C., & Shen MM., (2000). "Molecular genetics of prostate cancer" *GENES & DEVELOPMENT* 14(19):2410-34
- Ahmadi, Allameh, Baradaran, Mounstaser-Kouhsari, Bazargan-Hejazi, Sepher, Mehraei, Gholamreza., (2010). "Circulating Sex Hormones Play No Role in the association between sexual activity and the risk of prostate" cancer *JOURNAL OF SEXUAL MEDICINE* 3: 905 – 913
- Alen P., Claessens F., Schorenmarkers E., Swinnen J., Verhoeven G., Rombauts W., Peeters B., (1999). "Interaction of the putative androgen receptor-specific coactivator ARA70/ELE1 alpha with multiples steroid receptors and identification of internally deleted ELE1 betha isoform" *MOLECULAR ENDOCRINOLOGY* 1: 117-128
- American Cancer Society, (2014). "Cancer Facts and Figures" Atlanta: *AMERICAN CANCER SOCIETY*
- Anguiano B., Aranda N., Delgado G, Aceves C., (2008). "Epididymis expresses the highest 5'deiodinase activity in the male reproductive system: kinetic characterization, distribution, and hormonal regulation. *ENDOCRINOLOGY* 149(8):4209-4217
- Anguiano B., Delgado – González E., Angulo – Barbosa S., Aceves C., (2012). "The effects of thyroid hormones on prostate physiopathology. Thyroid hormone action Saturday poster basic". Poster 270 Thyroid Sup 1.
- Anguiano B., López-Juárez A., Delgado G., Romero C., Aceves C., (2006). "Deiodinase type 1 activity is expressed in the prostate rats and is modulated by thyroid hormones, prolactin and sex hormones". *THE JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* 190: 363-371
- Angulo – Barbosa S., (2012). "Participación de las desyodasas en la iniciación y progresión del cáncer de próstata. Asociación con marcadores de proliferación y diferenciación celular". Tesis de licenciatura. FES – Iztacala –UNAM
- Aroto-Ohshima T y Sawa H., (1999). "Over-expression of cyclin D1 induces glioma invasión by increasing matrix metalloproteinase activity and cell motility" *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER* 83: 387-392
- Aroto-Ohshima T y Sawa H., 1999. "Over-expression of cyclin D1 induces glioma invasion by increasing matrix metalloproteinase activity and cell motility" *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER* 83: 387-392
- Aumuller G., Braun B., Seitz J., Muller W., Heyns W., Krieg M., (1985). "Effects of sexual resto or sexual activity on the structure and function of ventral prostate of the rat". *THE ANATOMICAL RECORD* 212(4):345-52.

- Boelen A., Borrsma J., Kwalkkel J., Weiland C., Renkens R., Visser T., Fliers E., Wiersinga W., (2008). "Type 3 deiodinase is highly expressed in infiltrating neutrophilic granulocytes in response to acute bacterial infection" *THYROID* 18: 1095-103
- Bonilla – Jaime H., Vázquez – Palacios G., Arteaga – Silva M., Retana – Márquez S., (2005). "Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats" *HORMONES AND BEHAVIOR* 49: 376 – 382
- Braun & Krieg (1983). "Sexual activity influences organ weight and androgen metabolism of rat prostate, bulbocavernosus/levator ani muscle and kidney" *JOURNAL STEROID BIOCHEMISTRY* 19(6):1763-1768
- Brent GA. (2012). "Mechanisms of thyroid hormone action" *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 122(9):3035-3043
- Brzezińska-Ślebodzińska ., Ślebodziński A., Kowalska K., (2000). "Evidence for the presence 5' deiodinase in mammalian seminal plasma and for the increase in the enzyme activity in the prepubertal testis." *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANDROLOGY* 23:218
- Burden H., Holmes C., Persad R., Whittington K., (2005). "Proteasomes – Their effects on human male reproduction and fertility". *HUMAN REPRODUCTION Update* 12: 283 – 292
- Buxhofer-Ausch V., Secky L., Wlcek K., Svoboda M., Kounnis V., Briasoulis E., Tzakos A., Jaeger W. & Thalhammer T., (2013). "Tumor specific expression of organic anion-transporting". *JOURNAL OF DRUG DELIVERY*. 2013;2013:863539
- Chang H., & Privalsky M., (2009). "Isoform-specific transcriptional activity of overlapping target genes that respond to thyroid hormones receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$ ". *MOLECULAR ENDOCRINOLOGY* 23: 1758 – 1775
- Chen F., & Zhao X., (2013). "Ubiquitin-proteasome pathway and prostate cancer". *ONKOLOGIE* 36(10):592-596
- Cheng I., Witte J., Jacobsen J., Haque R., Quinn V., Quesenberry C., Caan B., Van Den Eeden S., (2010). "Prostatitis, Sexually Transmitted Diseases, and Prostate Cancer: The California Men's Health Study" *PLOS ONE* 5: 1 – 9
- Comstock C., Revelo M., Buncher C., Knudsen K., (2007). "Impact of differential cyclin D1 expression and localization in prostate cancer" *BREAST JOURNAL OF CANCER* 96: 970-979
- Corona G., Jannini E., Lotti F., Boddi V., De Vita G., Forti G., Lenzi A., Mannucci E., Maggi M., (2011). "Premature and delayed ejaculation: two ends of a single continuum influenced by hormonal milieu". *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANDROLOGY*. 34(1): 41 - 48
- Corona G., Jannini E., Lotti F., Boddi V., De Vita G., Forti G., Lenzi A., Mannucci E., Maggi M., (2011). "Premature and delayed ejaculation: two ends of a single continuum influenced by hormonal milieu". *ORIGINAL ARTICLE INTERNATIONAL JOURNAL OF ANDROLOGY*. 34(1): 41 - 48

- Corona G., Jannini E., Vignozzi L., Rastelli G., Maggi M., (2012). "The hormonal control of ejaculation Nature Reviews". *UROLOGY* 9(9): 508 - 519
- Delgado-González E., Aceves C., Anguiano B., (2011). "Post-Ejaculatory Increase of prostatic triiodothyronine (T3) depends on sympathetic innervation in the rat". *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 84: 118-123
- Dentice M., Luongo C., Huang S., Ambrosio R., Elefante A., Mirebeau-Prunier D., Zavacki A., Fenzi G., Grachtchouk M., Hutchin M., Dlugosz A., Bianco A., Missero C., Larsen R., Salvatore D., (2006). "Sonic-hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocyte" *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES* 104: 14466-14471
- Drori D., & Folman Y., (1969). "The effect of mating on the longevity of male rats" *EXPERIMENTAL GERONTOLOGY* 4(4): 263-266
- Esquenet M., Swinnen J., Heyns W., Verhoeven G., (1995). "Triiodothyronine modulates growth, secretory function and androgen receptor concentration in the prostatic carcinoma cell line LNCaP" *MOLECULAR CELLULAR ENDOCRINOLOGY* 1: 105-111
- Fernández L., Galán Y., Jiménez R., Gutierrez A., Guerra M., Pereda C., Alonso C., Riboli E., Agudo A., González C., (2004). "Sexual behaviour, history of sexually transmitted diseases, and the risk of prostate cancer: a case-control study in Cuba" *INTERNATIONAL JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY* 34: 193 – 197
- Ferris-i-Torrejada García-i-Castelli, Berbel-Tornero., Ortega-Garcís., (2011). "Constitutional risk factors for prostate cancer" *ACTAS UROLÓGICAS ESPAÑOLAS* 5: 282 – 288
- Fleishman A., Rocha C., Saxer-Sekulic N., Zlobec I., Sauter G., (2011). "High-level cytoplasmic cyclin D1 expression in lymph node metastases from prostate cancer independently predicts early biochemical failure and death in surgically treated patients" *HISTOLOGY* 58: 781-789
- Gärtner K., (1992). "Life expectancy, its relation to sexual activity and body weight in male inbred mice" *JOURNAL EXPERIMENTAL ANIMAL SCIENCE* 35(3):125-135
- Giles G., Severi G., English D., McCredie M., Borland R., Boyle P., Hopper J., (2003). "Sexual factors and prostate cancer" *BJU INTERNATIONAL* 92: 211 – 216
- Gingrich, Barrios, Foster, Greenberg, (1999). "Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model" *PROSTATE CANCER AND PROSTATIC DISSEASIS* 2: 70 - 75
- Gladkova A. (1999). "The regulation of male sexual behavior by the sex hormones". *USPERKHI FIZIOLOGICHESKIKH NAUK* 30(1):97-105

- González-Sancho JM., (2002). "Inhibition of proliferation and expression of T1 and cyclin D1 genes by thyroid hormone in mammary epithelial cells". *MOLECULAR CARCINOGENESIS* 1: 25-34
- González-Sancho JM., 2002 "Inhibition of proliferation and expression of T1 and cyclin D1 genes by thyroid hormone in mammary epithelial cells". *MOLECULAR CARCINOGENESIS* 1: 25-34
- Greenberg, De Mayo, Sheppard, Barrios, Leboritz, Finegold, Angelopoulou, (1994). "The rat probascine gene promoter directs hormonally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice" *MOLECULAR ENDOCRINOLOGY* 8: 230 - 239
- Greenberg, De Mayo, Sheppard, Barrios, Leboritz, Finegold, Angelopoulou, (1994). "The rat probascine gene promoter directs hormonally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice" *MOLECULAR ENDOCRINOLOGY* 8: 230 - 239
- Guevara M., Amezcua C., Hernández M., Sanz A., (2007). "SexyMater: programa computacional para el registro y análisis de conductas sexuales y maternas en roedores". *NEUROBIOLOGÍA ISSN 2007-3054*
- Hayes R., Pottern L., Strickler H., Rabkin C., Pope V., Swanson G., Greenberg R., Schoenberg J., Liff J., Hoover R., Fraumeni J., (2004). "Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer" *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 82: 718 – 725
- Hernández A., García B., Obregón M., 2007. "Gene expression from the imprinted Dio3 locus is associated with cell proliferation of cultured brown adipocytes" *ENDOCRINOLOGY* 148: 3968-3976
- Hernández M., Soto-Cid A., Rojas F., Pascual L., Aranda-Abreu G., Díaz R., Rojas F., García L., Toledo J., Manzo J., (2007). "A study of the prostate, androgens and sexual activity of male rats" *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY* 16: 5 – 11
- Herz Z, Folman Y, Drori D. (1969). "The testosterone content of the testes of mated and unmated rats" *JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* 44(1):127-128
- Huang J., Chang L., Ho D., Ho L., (1989). "The effect of sexual activity on androgen metabolism, androgen receptor translocation, and glandular weight of ventral prostate rats" *ACTA ENDOCRINOLOGICAL* 120 : 505-510
- Irshad s., & Abate-Shen C., (2013). "Modeling prostate cancer in mice: something old, something new, something premalignant, something metastatic" *CANCER METASTASIS REVIEW* 32: 109-122
- James W., (1994). "Prostatic cancer, coital rates, vasectomy and testosterone" *JOURNAL OF BIOSOCIAL SCIENCES* 26(2):269-272

- Kaplan-Lefko P., Chen T., Ittmann M., Barrios R., Ayala G., Huss W., Maddison L., Foster B., Greenberg N., (2003). "Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model" *PROSTATE* 55(3):219-237
- Keenan E., Klase P., Thomas J., (1981). "Effects of prolactin on DNA synthesis and growth of the accessory sex organs in male mice" *ENDOCRINOLOGY* 109(1):170-175
- Keenan E., Klase P., Thomas J., (1981). "Interaction between prolactin and androgens in the accessory sex organs in male mice" *JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* 90(3):323-330
- Keenan E., Ramsey E., Kemp E., (1981). "The role of prolactin in the growth of the prostate gland" *PROGRESS IN CLINICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH* 75B:9-18
- Knobil E., & Neill K., (1994). "The physiology of reproduction". USA: *RAVEN PRESS*.
- Kollara A y Brown T., (2012). "Expression and function of nuclear receptor co-activator 4: evidence of a potential role independent of co-activator activity" *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES* 69(23): 3895–3909
- Kress E., Samarut J., Plateroti M., (2009). "Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: Paradox or duality? Molecular and Cellular Endocrinology 313; 36–49
- Krüger T., Haake P., Chereath D., Knapp W., Janssen O., Exton M., Schedlowski M., Hartmann U., (2003). "Sexual activity produces transient sympathoadrenal activation & a pronounced long-lasting increase in prolactin in men and women (automatic blood collection) pre, during and post orgasm". *JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* 177, 57-64
- Kumar a., Shekhar S., Dhole B., (2014). "Thyroid male reproduction" *INDIAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM*. 18(1): 23-31.
- Lara P., Deníz F., Ruíz A., Pinar B., Sáez-Bravo M., (2004). "Cancer de Próstata" *BIOCANCER* 1 24: 136-178
- Leitzmann M., Platz E., Stampfer M., Willett W., Giovannucci E., (2004). "Ejaculation Frequency and Subsequent Risk of Prostate" *CANCER JOURNAL OF AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION* 291: 1578 – 1586
- Leonard., (2000). Intracellular pathways of iodothyronine metabolism en: *The Thyroid* Werner & Ingbar's 8^o. Capítulo: 3 pp 36-163
- Li P., Yu X., Melamed J., Roeder R., Wang Z., (2002). "Heterogeneous expression and function of androgen receptor co-factors in primary prostate cancer" *AMERICAN JOURNAL PATHOLOGY* 161(4):1467-1474
- Ligr M., Li Y., Daniels G., Melamed J., Peng Y., Wang W., Wang J., Ostrer H., Pagano M., Wang Z., Garabedian M., Lee P., 2010. "Tumor suppressor

fuction of androgen receptor coactivator ARA70 α in prostate cancer” *TUMOROGENESIS AND NEOPLASTIC PROGRESSION . THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 176: 1981-1900

- López-Juárez A., Delgado G., Aceves C., Anguiano B., (2009). “Type 1 deiodinase activity and generation of triiodothyronine (T3) in prostate of sexually active rats”. *PROSTATE* 69: 1651-1659
- Mandair D., Rossi RE., Pericleous M., Whyand T., Caplin ME (2014). “Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review” *NUTRITIONAL METABOLISM* 16;11:30
- Maofu F., Wan C., Li Z., Sakamaki T., Pestell R., (2004). “Mini review: Cyclin D1: Normal and abnormal functions” *ENDOCRINOLOGY* 145: 5439-5447
- Maran R., Arhuldas M., Udhayacumar R., Subramanian S., Rajendiran G., Anthony F., Arunakaran J., Govindarajulu P., (1998). “Impact of altered thyroid hormone status on prostatic glycosidases” *INTYERNATIONAL JOURNAL OS ANDROLOGY* 21: 121-128
- Martínez-Iglesias O., García-Silva S., Regadera J., Aranda A., (2009). “Hypothyroidism enhances tumor invasiveness and metastasis development” *PLOS ONE* 4: 10.1371
- Morrison W., (2002). “Cancer in dogs and cats: Medical and surgical management” 2° Edition Chapter 30 Cancer of the reproductive tract. *CLINICALÑ SINGS DIAGNOSIS AND TREATMENT OF SPECIFIC CANCER IN DOG AND CATS*. Pp 560-564
- Mullur R., Lui YY., Bgrent GA., (2014). “Thyroid hormone regulation of metabolism” *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* 94(2):355-82
- NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio NORMA OFICIAL MEXICANA.
- Parisotto M., & Metzger D., (2013). “Genetically engineered mouse models of prostate cáncer” *MOLECULAR ONCOLOGY* 7(2):190-205
- Peng Y., Li C., Chen F., Wang Z., Ligr M., Melamed J., Wei J., Gerald W., Pagano M., Garabedian M., Lee P., 2008. “Stimulation of prostate cancer cellular proliferation and invasion by the androgen receptor co-activator ARA70”. *AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 1: 225-235
- Pérez-Juste G., García-Silva S., Aranda A., (2002). “Cell cycle control by the thyroid hormone in neuroblastoma cells” *TOXICOLOGY* 182: 179-182
- Purvis., Haug., Thomassen., Mevåg., Rui (1986). “Short-termn effects of mating on the accessory sex gland of the male rat. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY* 2: 373- 380
- Puzianowska-Kuznicka M., Pietrzak M., Turowska O., Nauman A., (2006). “Thyroid hormones and their receptors in the regulation of the cell proliferation” *ACTA BIOCLÍNICA POLACA*. 53: 641-650

- Rajender S., Monica M., Walter L., Agarwal A., (2011). "Thyroid, spermatogenesis and male fertility" *FRONTEIRS IN BIOSCIENCE* (Elite edition). 1;3:843 -855
- Rojas F., Manzo J., Soto-Cid A., Aranda-Abreu E., Juárez E., Coria-Ávila G., Toledo R., Locia J., Hernández M., (2011). "The androgen receptor in the prostate physiopathology" *NEUROBIOLOGÍA* 2: 120- 125
- Rosenblatt K., Wicklund K., Stanford J., (2001). "Sexual factors and the risk of prostate cancer" *AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY* 153: 1152 – 1158
- Russell P., & Kingsley E., (2003) "Human Prostate Cancer Cell Lines" *PROSTATE* 57(3):205-225
- Sarma A., McLaughlin J., Wallner L., Dunn R., Cooney K., Schottenfeld D., Montie J., Wei J., (2006). "Sexual Behavior, Sexually Transmitted Diseases and Prostatitis: The Risk of Prostate Cancer in Black Men". *THE JOURNAL OF UROLOGY* 176: 1108 – 1113
- Sawin Intrinsic and extrinsic variables of thyroid hormone actions. iodothyronine metabolism en: The Thyroid Werner & Ingbar's 8°. Capítulo: 13; 278 – 301
- Sidharthan V., Rose P., Rajalingam R., Udhayakumar R., Arhuldas M., Govindarajulu P., (1993). "Dorsolateral prostatic phosphomonoesterases and adenosine triphosphatases in hypo- hyperthyroid rats". *INDIAN JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY* 32: 616-618
- Siegel L., Nunez A., Wade G., (1981). " Copulation affects body weight but not food intake or dietary self-selection in male rats" *PHYSIOLOGY & BEHAVIOR* 27(5):943-946
- Suttie A., Nyska A., Haseman J., Moser G., Hackett T., Goldsworthy T., (2003). "A Grading Scheme for the Assessment of Proliferative Lesions of the Mouse Prostate in the TRAMP Model". *SOCIETY OF TOXICOLOGIC PATHOLOGY* 31(1): 31 -38
- Tai P., Huang Y., Shin C., Chen R., Chen C., Chen W., Wang C., Lin K., (2007). "Direct regulation of androgen receptor-associated protein 70 by thyroid hormone and its receptors. *ENDOCRINOLOGY* 148(7):3485-3495
- Thomas J., & Keenan E., (1976) "Prolactin influences upon androgen action in male accesory sex organs" *ADVANCES IN SEX HORMONES RESEARCHS* 2:425-70.
- Valkenburg K., & Williamns B., (2011). " Mouse models of prostate cancer" *PROSTATE CANCER* doi: 10.1155/2011/895238.
- Valverde C., Orozco A., Solís J., Robles-Osorio L., (2014). "Iodothyronine deiodinases: Emerging clinical crossroads". *CELLULAR ENDOCRINOLOGY IN HEALTH AND DISEASE*. Chapter 22; 365-377

- Visser W., Friesema E., Jansen J., Visser T., (2007). "Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters". *BEST PRACTICE AND RESEARCH*. 21 (2):223-36
- Wang Y., Zhou D., Chen S., (2014). "SGK3 is an androgen-inducible kinase promoting prostate cancer cell proliferation through activation of p70S6 kinase and up-regulation of cyclinD1" *MOLECULAR ENDOCRINOLOGY* 28(6):935-948
- Weizembaum F., Matthews M., Whitehouse J., Adler N., (1981). "Depressant effects of sexual rest on reproductive behavior and physiology in male rats" *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 25(4): 744-751
- Wilson KM., Giovannucci EL., Mucci LA., (2012). " Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer" *ASIAN JOURNAL ANDROLOGY* 14(3):365-74
- Wu X., Chen F., Sahin A., Albarracin C., Pei Z., Zou X., Singh B., Xu R., Daniels G., Li Y., Blake M., Scheider R., Cowin P., Lee P., 2011. "Distinct functions of androgen receptor coactivator ARA70 α y β in mammary gland development, and in breast cancer" *BREAST CANCER RESEARCH TREATMENT* 2: 391-400
- Wu X., Gong S., Roy-Burman P., Lee P., Culing Z., (2013). "Current mouse and cell models in prostate cancer research" *ENDOCRINE – RELATED CANCER* 20(4): 10
- Yadav N. & Heeners HV. (2012). "Androgen action in the prostate gland". *THE ITALIAN JOURNAL OF UROLOGY AND NEFROLOGY* 1: 35 – 49
- Ya-Hui H., Ming-Ming T., Kwang-Huei L., (2008). "Thyroid Hormone Dependent Regulation of Target Genes and Their Physiological Significance" *Chang Gung MEDICAL JOURNAL* 31: 325 – 34
- Zarei F., Yousofvand N., Khazaei M., Ghanbari A., (2013). "Effect of exogenous testosterone, finasteride, and castration on serum level of thyroxin". *IRAN BIOMEDICAL JOURNAL* 17(4): 221-224
- Zhiping L., Wang C., Prendergast G., Pestell R., (2006). "Cyclin D1 funtions in cell migrations" *CELL CYCLE* 5: 2440-2442

ANEXO I

Registro de parámetros y patrones de conducta sexual ó copulatoria.

Se trabajó con un grupo de 15 hembras ovariectomizadas (OVX) ($x= 32$ gramos) de la cepa C57, donadas por la Dra. Wendy Portillo, más 35 más provenientes de nuestra colonia, a las cuales se les realizó la OVX a las 6 semanas de edad ($x=19.5$ gramos), se les permitió su recuperación durante 2 semanas; y posterior a ello se les indujo el estro mediante la administración por vía sc, de $20\mu\text{g}$ de estradiol y $600\mu\text{g}$ de progesterona (cuadro 7), 48 y 4 horas respectivamente; antes de someterlas a la copula.

Cuadro 7. Dosis empleada para la inducción de la receptividad en las hembras ovariectomizadas.

Estradiol	Progesterona
Solución concentrada: $10\mu\text{g} / 50\mu\text{l}$ Dosis 6mg en 30ml	Solución concentrada: $300\mu\text{g} / 50\mu\text{l}$ Dosis 180mg en 30ml

Al grupo de los machos sexualmente activos se les realizaron 3 registros de una hora, con intervalos de un mes entre cada uno (1° sesión de registro, en el primer contacto, 2° y 3° sesión a 1 y 2 meses de actividad respectivamente), donde fueron analizados los siguientes patrones conductuales: porcentaje de montas, intromisiones y eyaculaciones; número de montas y eyaculaciones así como las latencias de montas y eyaculaciones (figura 15). Finalmente se realizaron los índices de eficiencias copulatorias con el siguiente cociente: número de intromisiones / número de montas .

Monta : En presencia de una hembra en proestro, el macho intenta varias montas; el pene esta en erección parcial y se protruye fuera del prepucio. Estas montas por lo general no son exitosas. Durante esta actividad el macho excreta “gotitas” de líquido accesorio derivado de la glándula de

Cowper (bulbouretrales) y que difiere del plasma seminal emitido por las glándulas vesiculares durante la eyaculación. Si la hembra es receptiva seguirá con la copulación.

Intromisión: Se refiere a la realización de monta continuando con el proceso de búsqueda de la vagina por el pene, lo cual es secundado por movimientos de los miembros posteriores, seguida de la intromisión peneana dentro de la vagina acompañándose de movimientos pélvicos, finalmente termina con un desmonte brusco y aseo del área genital.

Eyaculación: El macho realiza una serie de movimientos pélvicos seguido de una larga intromisión donde impulsos nerviosos (vías simpáticas toraco-lumbares) inervan al músculo liso y al epitelio secretor del aparato reproductos masculino, desde el dorso de la porción libre del pene induce donde el macho vierte líquido seminal y espermatozoides; permanece estático unos segundos y continua finalmente con una lenta desmonta y nuevamente aseo del área genital.

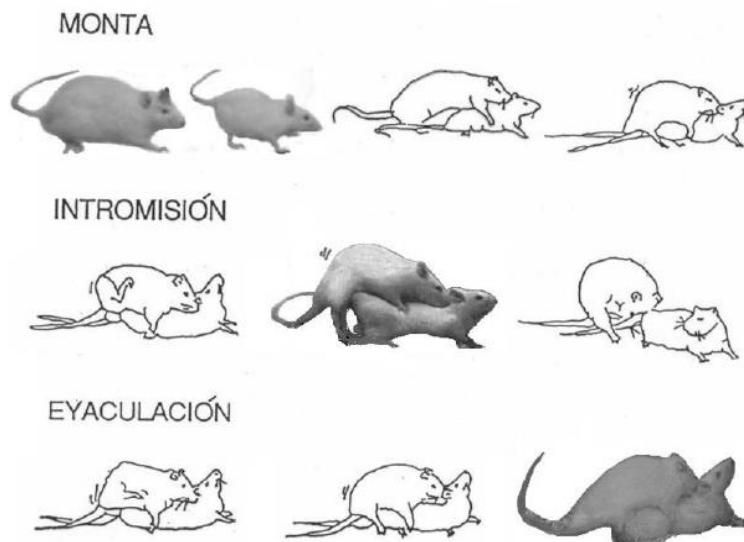


Figura. 15 Patrones conductuales de la fase ejecutora durante la actividad sexual, evaluados en machos roedores (Tomado de Guevara M., et al 2007).

Anexo II

Tablas de resultados estadísticos

Patrones motores que acompañan a la conducta sexual de ratones WT y TRAMP.

Table Analyzed	INCIDENCIA DE MONTAS
Column B	TRAMP
vs.	vs.
Column A	WT
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	> 0.9999
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	0.0 , -1.000
Sum of signed ranks (W)	-1.000
Median of differences	
Median	0.0
Table Analyzed	INCIDENCIA DE INTROMISIONES
Column B	TRAMP
vs.	vs.
Column A	WT
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	> 0.9999
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	0.0 , -1.000
Sum of signed ranks (W)	-1.000
Median of differences	
Median	0.0
Table Analyzed	INCIDENCIA DE EYACULACIÓN
Column B	TRAMP
vs.	vs.
Column A	WT
Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	> 0.9999
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	0.0 , -1.000
Sum of signed ranks (W)	-1.000
Median of differences	
Median	0.0
Table Analyzed	FRECUENCIA DE INTROMISIÓN
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked
Alpha	0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	4.612	0.2612	ns	No	
Time	35.01	0.0005	***	Yes	
Column Factor	0.6974	0.5370	ns	No	
Subjects (matching)	20.72	0.4293	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	
Interaction	25572	2	12786	F (2, 24) = 1.421	P = 0.2612
Time	194107	2	97054	F (2, 24) = 10.78	P = 0.0005
Column Factor	3867	1	3867	F (1, 12) = 0.4039	P = 0.5370
Subjects (matching)	114890	12	9574	F (12, 24) = 1.064	P = 0.4293
Residual	216022	24	9001		
Number of missing values	0				
Table Analyzed		FRECUENCIA DE MONTAS			
Two-way RM ANOVA		Matching: Stacked			
Alpha		0.05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	2.960	0.3961	ns	No	
Time	30.71	0.0007	***	Yes	
Column Factor	0.2782	0.7410	ns	No	
Subjects (matching)	29.16	0.1639	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	
Interaction	158.3	2	79.17	F (2, 24) = 0.9629	P = 0.3961
Time	1642	2	821.2	F (2, 24) = 9.988	P = 0.0007
Column Factor	14.88	1	14.88	F (1, 12) = 0.1145	P = 0.7410
Subjects (matching)	1560	12	130.0	F (12, 24) = 1.581	P = 0.1639
Residual	1973	24	82.22		
Number of missing values	0				
Table Analyzed		LATENCIA DE MONTAS			
Two-way RM ANOVA		Matching: Stacked			
Alpha		0.05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	13.85	0.0088	**	Yes	
Time	38.48	< 0.0001	****	Yes	
Column Factor	2.637	0.1902	ns	No	
Subjects (matching)	16.41	0.3716	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	
Interaction	289.8	2	144.9	F (2, 24) = 5.806	P = 0.0088
Time	805.1	2	402.6	F (2, 24) = 16.13	P < 0.0001
Column Factor	55.18	1	55.18	F (1, 12) = 1.928	P = 0.1902
Subjects (matching)	343.4	12	28.62	F (12, 24) = 1.147	P = 0.3716

Residual	599.0	24	24.96
Number of missing values	0		
Table Analyzed	LAT_EYAC_a_2MES ES		
Column B	TRAMP		
vs.	vs.		
Column A	WT		
Unpaired t test			
P value	0.2996		
P value summary	ns		
Significantly different? (P < 0.05)	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
t, df	t=1.084 df=12		
How big is the difference?			
Mean ± SEM of column A	24.14 ± 6.919 N=7		
Mean ± SEM of column B	34.86 ± 7.056 N=7		
Difference between means	10.71 ± 9.882		
95% confidence interval	-10.82 to 32.25		
R square	0.08922		
F test to compare variances			
F,DFn, Dfd	1.040, 6, 6		
P value	0.9634		
P value summary	ns		
Significantly different? (P < 0.05)	No		
Table Analyzed	LAT_EYAC_WT1me s/WT2meses		
Column B	WT-2meses		
vs.	vs.		
Column A	WT-1mes		
Unpaired t test			
P value	0.3073		
P value summary	ns		
Significantly different? (P < 0.05)	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
t, df	t=1.115 df=6		
How big is the difference?			
Mean ± SEM of column A	46.00 ± 6.069 N=4		
Mean ± SEM of column B	33.50 ± 9.421 N=4		
Difference between means	-12.50 ± 11.21		
95% confidence interval	-39.92 to 14.92		
R square	0.1718		
F test to compare variances			
F,DFn, Dfd	2.410, 3, 3		
P value	0.4890		
P value summary	ns		
Significantly different? (P < 0.05)	No		
Table Analyzed	LAT_EYAC_TRAMP 1mes/TRAMP2mese s		
Column B	TRAMP-2meses		
vs.	vs.		
Column A	TRAMP-1mes		
Unpaired t test			
P value	0.4963		
P value summary	ns		
Significantly different? (P < 0.05)	No		
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
t, df	t=0.8246 df=2		
How big is the difference?			
Mean ± SEM of column A	49.00 ± 4.000 N=2		
Mean ± SEM of column B	40.50 ± 9.500 N=2		
Difference between means	-8.500 ± 10.31		
95% confidence interval	-52.85 to 35.85		
R square	0.2537		

F test to compare variances
 F,DFn, Dfd
 P value
 P value summary
 Significantly different? (P < 0.05)

Table Analyzed	Lat_eyac_ WT1mes/TRAMP1m es/WT2meses/TRAM P2meses			
ANOVA summary				
F			0.7001	
P value			0.5779	
P value summary			ns	
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)			No	
R square			0.2079	
Brown-Forsythe test				
F (DFn, DFd)			0.8248 (3, 8)	
P value			0.5162	
P value summary			ns	
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)			No	
Bartlett's test				
Bartlett's statistic (corrected)				
P value				
P value summary				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)				
ANOVA table	SS	DF	MS	P value
Treatment (between columns)	451.4	3	150.5	P = 0.5779
Residual (within columns)	1720	8	214.9	
Total	2171	11		
Data summary				
Number of treatments (columns)	4			
Number of values (total)	12			

Table Analyzed	IEC					
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked					
Alpha	0.05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	0.06453	0.9824	ns	No		
Time	38.09	0.0005	***	Yes		
Column Factor	0.07060	0.8331	ns	No		
Subjects (matching)	18.27	0.6118	ns	No		
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interaction	0.001274	2	0.0006372	F (2, 24) = 0.01780	P = 0.9824	
Time	0.7523	2	0.3762	F (2, 24) = 10.51	P = 0.0005	

Column Factor	0.001394	1	0.001394	F (1, 12) = 0.04637	P = 0.8331
Subjects (matching)	0.3608	12	0.03007	F (12, 24) = 0.8400	P = 0.6118
Residual	0.8591	24	0.03580		

Number of missing values 0

Table Analyzed **INCIDENCIA DE MONTAS**

Column B TRAMP

vs. vs.

Column A WT

Wilcoxon matched-pairs signed rank test

P value > 0.9999

Exact or approximate P value? Exact

P value summary ns

Significantly different? (P < 0.05) No

One- or two-tailed P value? Two-tailed

Sum of positive, negative ranks 0.0 , -1.000

Sum of signed ranks (W) -1.000

Median of differences

Median 0.0

How effective was the pairing?

rs (Spearman)

P value (one tailed)

P value summary

Significant correlation? (P > 0.05)

Table Analyzed **INCIDENCIA DE EYACULACIÓN**

Column B TRAMP

vs. vs.

Column A WT

Wilcoxon matched-pairs signed rank test

P value > 0.9999

Exact or approximate P value? Exact

P value summary ns

Significantly different? (P < 0.05) No

One- or two-tailed P value? Two-tailed

Sum of positive, negative ranks 0.0 , -1.000

Sum of signed ranks (W) -1.000

Median of differences

Median 0.0

How effective was the pairing?

rs (Spearman)	1.000
P value (one tailed)	0.1667
P value summary	ns
Significant correlation? (P > 0.05)	Yes

Efectos de la actividad sexual en el peso corporal y prostático.

Table Analyzed **Pesos1°semana**

ANOVA summary	
F	0.6025
P value	0.6197
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.07003

Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	2.042 (3, 24)
P value	0.1348
P value summary	ns
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	No

Table Analyzed **Pesos2°semana**

ANOVA summary	
F	1.954
P value	0.1478
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.1963

Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	0.8407 (3, 24)
P value	0.4849
P value summary	ns
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	No

Table Analyzed **Pesos3°semana**

ANOVA summary	
F	2.760
P value	0.0642
P value summary	ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	No
R square	0.2565

Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	0.5325 (3, 24)
P value	0.6644
P value summary	ns
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	No

Table Analyzed **Pesos4°semana**

ANOVA summary	
F	19.31
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.7070
Number of families	1
Number of comparisons per family	6
Alpha	0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT-inactivo vs. WT-activo	7.857	4.533 to 11.18	Yes	****
WT-inactivo vs. TRAMP inactivo	1.857	-1.467 to 5.182	No	ns
WT-inactivo vs. TRAMP-activo	6.571	3.247 to 9.896	Yes	****
WT-activo vs. TRAMP inactivo	-6.000	-9.325 to -2.675	Yes	***
WT-activo vs. TRAMP-activo	-1.286	-4.610 to 2.039	No	ns
TRAMP inactivo vs. TRAMP-activo	4.714	1.390 to 8.039	Yes	**

Table Analyzed

Pesos5°semana

ANOVA summary

F 23.43

P value < 0.0001

P value summary ****

Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) Yes

R square 0.7454

Number of families 1

Number of comparisons per family 6

Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT-inactivo vs. WT-activo	8.714	5.178 to 12.25	Yes	****
WT-inactivo vs. TRAMP inactivo	1.143	-2.393 to 4.679	No	ns
WT-inactivo vs. TRAMP-activo	7.429	3.893 to 10.96	Yes	****
WT-activo vs. TRAMP inactivo	-7.571	-11.11 to -4.036	Yes	****
WT-activo vs. TRAMP-activo	-1.286	-4.822 to 2.250	No	ns
TRAMP inactivo vs. TRAMP-activo	6.286	2.750 to 9.822	Yes	***

Table Analyzed

Pesos6°semana

ANOVA summary

F 26.61

P value < 0.0001

P value summary ****

Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) Yes

R square 0.7689

Number of families 1

Number of comparisons per family 6

Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT-inactivo vs. WT-activo	9.857	6.174 to 13.54	Yes	****
WT-inactivo vs. TRAMP inactivo	1.714	-1.969 to 5.397	No	ns
WT-inactivo vs. TRAMP-activo	8.429	4.746 to 12.11	Yes	****
WT-activo vs. TRAMP inactivo	-8.143	-11.83 to -4.460	Yes	****
WT-activo vs. TRAMP-activo	-1.429	-5.111 to 2.254	No	ns
TRAMP inactivo vs. TRAMP-activo	6.714	3.031 to 10.40	Yes	***

Table Analyzed

Pesos7°semana

ANOVA summary

F 38.12

P value < 0.0001

P value summary ****

Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) Yes

R square 0.8265

Number of families 1

Number of comparisons per family 6

Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT-inactivo vs. WT-activo	11.14	7.764 to 14.52	Yes	****
WT-inactivo vs. TRAMP inactivo	2.571	-0.8072 to 5.950	No	ns
WT-inactivo vs. TRAMP-activo	9.429	6.050 to 12.81	Yes	****
WT-activo vs. TRAMP inactivo	-8.571	-11.95 to -5.193	Yes	****
WT-activo vs. TRAMP-activo	-1.714	-5.093 to 1.664	No	ns
TRAMP inactivo vs. TRAMP-activo	6.857	3.479 to 10.24	Yes	****

Table Analyzed

Pesos8°semana

ANOVA summary
 F 19.92
 P value < 0.0001
 P value summary ****
 Are differences among means statistically significant? (P < 0.05) Yes
 R square 0.7135
 Number of families 1
 Number of comparisons per family 6
 Alpha 0.05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
WT-inactivo vs. WT-activo	8.571	4.717 to 12.43	Yes	****
WT-inactivo vs. TRAMP inactivo	1.143	-2.712 to 4.997	No	ns
WT-inactivo vs. TRAMP-activo	7.714	3.860 to 11.57	Yes	****
WT-activo vs. TRAMP inactivo	-7.429	-11.28 to -3.574	Yes	***
WT-activo vs. TRAMP-activo	-0.8571	-4.712 to 2.997	No	ns
TRAMP inactivo vs. TRAMP-activo	6.571	2.717 to 10.43	Yes	***

Table Analyzed **PESO CORPORAL ABSOLUTO**

Two-way ANOVA Ordinary

Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	9.999	< 0.0001	****	Yes	
Tiempo (semanas)	19.47	< 0.0001	****	Yes	
Transgene y AS	32.42	< 0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	580.4	21	27.64	F (21, 269) = 4.522	P < 0.0001
Tiempo (semanas)	1130	7	161.5	F (7, 269) = 26.42	P < 0.0001
Transgene y AS	1882	3	627.2	F (3, 269) = 102.6	P < 0.0001
Residual	1644	269	6.112		

Number of missing values 147

Table Analyzed **PESO CORPORAL RELATIVO**

Two-way ANOVA Ordinary

Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	12.07	< 0.0001	****	Yes	
Tiempo (semanas)	25.39	< 0.0001	****	Yes	
Transgene y AS	28.23	< 0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	6545	21	311.7	F (21, 269) = 7.152	P < 0.0001
Tiempo (semanas)	13770	7	1967	F (7, 269) = 45.14	P < 0.0001
Transgene y AS	15309	3	5103	F (3, 269) = 117.1	P < 0.0001

Residual 11723 269 43.58

Number of missing values 147

Table Analyzed	PESO PROSTÁTICO ABSOLUTO				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	27.42	0.0006	***	Yes	
Actividad sexual	21.82	0.0017	**	Yes	
Transgene	4.013	0.1514	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0.07294	1	0.07294	F (1, 31) = 14.79	P = 0.0006
Actividad sexual	0.05804	1	0.05804	F (1, 31) = 11.77	P = 0.0017
Transgene	0.01067	1	0.01067	F (1, 31) = 2.164	P = 0.1514
Residual	0.1529	31	0.004932		
Number of missing values	17				

Table Analyzed	PESO PROSTÁTICO RELATIVO				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	23.97	0.0012	**	Yes	
Actividad sexual	8.800	0.0395	*	Yes	
Transgene	2.606	0.2518	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	3.641e-005	1	3.641e-005	F (1, 33) = 12.51	P = 0.0012
Actividad sexual	1.337e-005	1	1.337e-005	F (1, 33) = 4.594	P = 0.0395
Transgene	3.960e-006	1	3.960e-006	F (1, 33) = 1.361	P = 0.2518
Residual	9.603e-005	33	2.910e-006		
Number of missing values	19				

Efecto de la actividad sexual sobre el epitelio normal y el desarrollo del cáncer prostático.

Table Analyzed **NÚMERO DE INVAGINACIONES (WT)**
 Column A Inactivo

vs.	vs.
Column B	Activo
Unpaired t test	
P value	0.0029
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=3.731 df=8
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	3.820 ± 0.1934 N=5
Mean ± SEM of column B	10.48 ± 1.776 N=5
Difference between means	-6.664 ± 1.786
95% confidence interval	-10.78 to -2.545
R square	0.6350
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	84.32, 4, 4
P value	0.0008
P value summary	***
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
<hr/>	
Table Analyzed	ALTURA EPITELIAL (WT)
Column A	Inactivo
vs.	vs.
Column B	Activo
Unpaired t test	
P value	0.0264
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=2.271 df=8
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	13.73 ± 0.9820 N=5
Mean ± SEM of column B	20.75 ± 2.932 N=5
Difference between means	-7.023 ± 3.092
95% confidence interval	-14.15 to 0.1076
R square	0.3920
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	8.915, 4, 4
P value	0.0569
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
<hr/>	
Table Analyzed	ALTURA EPITELIAL (TRAMP)

Column B	Activo
vs.	vs.
Column A	Inactivo
Unpaired t test	
P value	0.0004
P value summary	***
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.789 df=8
How big is the difference?	
Mean \pm SEM of column A	64.12 \pm 8.466 N=5
Mean \pm SEM of column B	14.71 \pm 1.086 N=5
Difference between means	-49.41 \pm 8.535
95% confidence interval	-69.09 to -29.73
R square	0.8073
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	60.80, 4, 4
P value	0.0016
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes

Table Analyzed **ÁREA DEL EPITELIO (WT)**

Column A	Inactivo
vs.	vs.
Column B	Activo
Paired t test	
P value	0.3731
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=0.3469 df=4
Number of pairs	5
How big is the difference?	
Mean of differences	-2.190
SD of differences	14.11
SEM of differences	6.312
95% confidence interval	-19.72 to 15.34
R square	0.02920
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0.2060
P value (one tailed)	0.3698

P value summary	ns
Significant correlation? (P > 0.05)	Yes
<hr/>	
Table Analyzed	ÁREA DEL EPITELIO (TRAMP)
Column A	Inactivo
vs.	vs.
Column B	Activo
Mann Whitney test	
P value	0.0476
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	One-tailed
Sum of ranks in column A,B	36.00 , 19.00
Mann-Whitney U	4.000
Difference between medians	
Median of column A	84.72
Median of column B	66.91
Difference: Actual	17.81
Difference: Hodges-Lehmann	17.52
<hr/>	
Table Analyzed	ÁREA DEL LUMEN (WT)
Column A	Inactivo
vs.	vs.
Column B	Activo
Paired t test	
P value	0.2090
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.10)	No
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=0.9369 df=3
Number of pairs	4
How big is the difference?	
Mean of differences	6.045
SD of differences	12.90
SEM of differences	6.452
90% confidence interval	-9.139 to 21.23
R square	0.2264
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0.4528
P value (one tailed)	0.2736
P value summary	ns
Significant correlation? (P > 0.10)	Yes
<hr/>	

Table Analyzed	ÁREA DEL LUMEN (TRAMP)
Column A	Inactivo
vs.	vs.
Column B	Activo
Unpaired t test	
P value	0.0439
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=1.983 df=7
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	12.88 ± 1.776 N=4
Mean ± SEM of column B	33.75 ± 9.178 N=5
Difference between means	-20.87 ± 10.52
95% confidence interval	-45.75 to 4.013
R square	0.3598
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	33.37, 4, 3
P value	0.0161
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes

Table Analyzed	COCIENTE EPITELIO/LUMINALI (WT)
Column A	Inactivo
vs.	vs.
Column B	Activo
Paired t test	
P value	0.2877
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.10)	No
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=0.6089 df=4
Number of pairs	5
How big is the difference?	
Mean of differences	-0.5620
SD of differences	2.064
SEM of differences	0.9230
90% confidence interval	-2.530 to 1.406
R square	0.08483
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0.2380
P value (one tailed)	0.3499

P value summary	ns
Significant correlation? (P > 0.10)	Yes
Table Analyzed	COCIENTE EPITELIO/LUMINAL (TRAMP)
Column A	Inactivo
vs.	vs.
Column B	Activo
Unpaired t test	
P value	0.0469
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=1.901 df=8
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	6.383 ± 1.502 N=5
Mean ± SEM of column B	2.946 ± 1.006 N=5
Difference between means	3.436 ± 1.807
95% confidence interval	-0.7317 to 7.604
R square	0.3112
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.229, 4, 4
P value	0.4566
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No

Table Analyzed	COCIENTE DEL ÁREA EPITELIO/LUMINAL	(WT Y TRAMP)			
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	20.05	0.0462	*	Yes	
Actividad sexual	5.765	0.2622	ns	No	
Transgene	8.394	0.1801	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	23.55	1	23.55	F (1, 15) = 4.721	P = 0.0462
Actividad sexual	6.771	1	6.771	F (1, 15) = 1.358	P = 0.2622
Transgene	9.860	1	9.860	F (1, 15) = 1.977	P = 0.1801
Residual	74.82	15	4.988		

Number of missing values 1

PROPORCIÓN DEL ÁREA EPITELIO/LUMEN (WT Y TRAMP)					
Table Analyzed					
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	5.616	0.0295	*	Yes	
Transgene y AS	7.105e-014	> 0.9999	ns	No	
Epitelio o Lumen	76.76	< 0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	1653	3	551.1	F (3, 32) = 3.399	P = 0.0295
Transgene y AS	2.092e-011	3	6.973e-012	F (3, 32) = 4.300e-014	P > 0.9999
Epitelio o Lumen	22599	1	22599	F (1, 32) = 139.4	P < 0.0001
Residual	5189	32	162.2		

Number of missing values 0

INCIDENCIA (%) DE LA LESIÓN					
Table Analyzed					
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	20.40	0.0356	*	Yes	
Row Factor	0.0004147	0.9919	ns	No	
Column Factor	17.61	0.0488	*	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	3662	1	3662	F (1, 16) = 5.267	P = 0.0356
Row Factor	0.07442	1	0.07442	F (1, 16) = 0.0001070	P = 0.9919
Column Factor	3161	1	3161	F (1, 16) = 4.546	P = 0.0488
Residual	11124	16	695.3		

Number of missing values 0

INCIDENCIA (%) DE PATRÓN CRIBIFORME	
Table Analyzed	
Column B	Activo
vs.	vs.
Column A	Inactivo
Unpaired t test	
P value	0.0006
P value summary	***
Significantly different? (P < 0.05)	Yes

One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.512 df=8
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	48.33 ± 6.391 N=5
Mean ± SEM of column B	10.92 ± 2.281 N=5
Difference between means	-37.41 ± 6.786
95% confidence interval	-53.06 to -21.76
R square	0.7916
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	7.851, 4, 4
P value	0.0708
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No

Niveles circulantes y prostáticos de T3

Table Analyzed	T3 SÉRICA				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	9.460	0.0738	ns	No	
Transgene	2.318	0.3670	ns	No	
Actividad sexual	0.02681	0.9222	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	2717	1	2717	F (1, 32) = 3.417	P = 0.0738
Transgene	665.8	1	665.8	F (1, 32) = 0.8374	P = 0.3670
Actividad sexual	7.699	1	7.699	F (1, 32) = 0.009683	P = 0.9222
Residual	25442	32	795.1		
Number of missing values	4				

Table Analyzed	T3 PROSTÁTICA				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	6.572	0.0280	*	Yes	
Transgene	0.02656	0.8830	ns	No	
Actividad sexual	68.68	< 0.0001	****	Yes	

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	122.8	1	122.8	F (1, 24) = 5.472	P = 0.0280
Transgene	0.4963	1	0.4963	F (1, 24) = 0.02212	P = 0.8830
Actividad sexual	1283	1	1283	F (1, 24) = 57.18	P < 0.0001
Residual	538.6	24	22.44		
Number of missing values	12				

Efecto de la actividad sexual en la biodisponibilidad de T3

Table Analyzed	RNA m MCT-8				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	21.55	0.0080	**	Yes	
Transgene	25.73	0.0043	**	Yes	
Actividad sexual	3.042	0.2815	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	2.385e-007	1	2.385e-007	F (1, 20) = 8.679	P = 0.0080
Transgene	2.847e-007	1	2.847e-007	F (1, 20) = 10.36	P = 0.0043
Actividad sexual	3.367e-008	1	3.367e-008	F (1, 20) = 1.225	P = 0.2815
Residual	5.496e-007	20	2.748e-008		
Number of missing values	0				

Table Analyzed	RNA m DESYODASA TIPO 1				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	27.14	0.0015	**	Yes	
Transgene	7.298	0.0705	ns	No	
Actividad sexual	25.58	0.0019	**	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0.002996	1	0.002996	F (1, 20) = 13.58	P = 0.0015
Transgene	0.0008054	1	0.0008054	F (1, 20) = 3.650	P = 0.0705
Actividad sexual	0.002823	1	0.002823	F (1, 20) = 12.79	P = 0.0019
Residual	0.004413	20	0.0002206		
Number of missing values	0				

RNA m DESYODASA TIPO 3					
Table Analyzed	Ordinary				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	0.8582	0.3542	ns	No	
Transgene	76.31	< 0.0001	****	Yes	
Actividad sexual	3.756	0.0611	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0.002812	1	0.002812	F (1, 20) = 0.8998	P = 0.3542
Transgene	0.2501	1	0.2501	F (1, 20) = 80.01	P < 0.0001
Actividad sexual	0.01231	1	0.01231	F (1, 20) = 3.938	P = 0.0611
Residual	0.06250	20	0.003125		
Number of missing values	0				
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DESYODASA TIPO 1					
Table Analyzed	Ordinary				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	3.280	0.2448	ns	No	
Transgene	10.17	0.0506	ns	No	
Actividad sexual	51.77	0.0003	***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	4.936	1	4.936	F (1, 14) = 1.474	P = 0.2448
Transgene	15.31	1	15.31	F (1, 14) = 4.571	P = 0.0506
Actividad sexual	77.89	1	77.89	F (1, 14) = 23.26	P = 0.0003
Residual	46.89	14	3.349		
Number of missing values	2				

Efecto de la actividad sexual en la expresión de genes tironino-dependientes asociados con proliferación y diferenciación del epitelio prostático.

RNA m CICLINA D1	
Table Analyzed	Ordinary
Two-way ANOVA	Ordinary
Alpha	0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	8.199	0.1771	ns	No	
Transgene	4.491	0.3128	ns	No	
Actividad sexual	3.549	0.3683	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	9.864e-005	1	9.864e-005	F (1, 20) = 1.958	P = 0.1771
Transgene	5.402e-005	1	5.402e-005	F (1, 20) = 1.072	P = 0.3128
Actividad sexual	4.269e-005	1	4.269e-005	F (1, 20) = 0.8474	P = 0.3683
Residual	0.001008	20	5.038e-005		
Number of missing values	0				

Table Analyzed	RNA m ARA70				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	2.886	0.2767	ns	No	
Transgene	5.016	0.1560	ns	No	
Actividad sexual	45.94	0.0002	***	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	2.331e-005	1	2.331e-005	F (1, 20) = 1.250	P = 0.2767
Transgene	4.051e-005	1	4.051e-005	F (1, 20) = 2.173	P = 0.1560
Actividad sexual	0.0003710	1	0.0003710	F (1, 20) = 19.90	P = 0.0002
Residual	0.0003728	20	1.864e-005		
Number of missing values	0				