

EFFECTO DE LA COPULA EN LOS NIVELES DE AROMATASA Y RECEPTORES PARA ANDROGENOS EN EL APM DE RATAS MACHO SEXUALMENTE EXPERTOS

Sandoval Payán, G. A.⁽¹⁾; Antonio Cabrera, E.⁽²⁾; Paredes Guerrero, R.G.⁽²⁾

⁽¹⁾Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro

⁽²⁾Instituto de Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

En ratas macho, el despliegue de la conducta sexual depende de testosterona y de su aromatización a estradiol por la enzima aromatasa en el área preóptica medial (APM). En esta región cerebral de ratas macho existen células inmunorreactivas a la proteína receptora para andrógenos (RA) y de la aromatasa. En el APM de ratas macho, la testosterona, modula la expresión de la proteína RA y la actividad aromatasa. En el presente trabajo se evaluó si en el APM de machos sexualmente expertos, la cópula modifica los niveles de expresión de la enzima aromatasa y de la proteína RA. Para ello, machos sexualmente expertos copularon hasta una eyaculación y fueron sacrificados a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados obtenidos muestran que la cópula no modifica los niveles de expresión de la proteína del RA, pero si los niveles de expresión de la proteína aromatasa.

INTRODUCCION

En todas las especies de mamíferos estudiados hasta el momento, la conducta sexual masculina depende de hormonas testiculares (Meisel y Sachs, 1994). Esto es, las ratas macho castradas presentan una inhibición de la conducta sexual. Esta inhibición conductual se revirtió con la administración de testosterona o estradiol (Davidson, 1969). En la rata, la testosterona es el principal andrógeno circulante y su conversión a estradiol por la enzima aromatasa es importante para el despliegue de la conducta sexual masculina (Larsson, 1979). La actividad de la enzima aromatasa se ha localizado en diferentes regiones cerebrales que modulan la conducta sexual masculina entre las que se puede mencionar: al área preóptica medial (APM), el hipotálamo ventromedial (HVM) y la amígdala medial (AMG) (Roselli y cols., 1998). La participación del APM, HVM y AMG se demostró por estudios de lesiones mostrando que la lesión en el APM elimina de manera permanente la expresión de la conducta sexual masculina (Hull y cols., 2005). Otros estudios informaron que la administración de estradiol en el APM, pero no en el hipotálamo posterior en ratas machos castrados revierte la inhibición sexual producida por la castración (Christensen y Clemens, 1974). En cambio, la administración de inhibidores de aromatasa en el APM elimina la conducta sexual (Vagell y McGinnis, 1997). Con estas y otras evidencias se puede mostrar que la actividad de la aromatasa en el APM es esencial para el despliegue de la conducta sexual masculina. Por otro lado, los cambios en la actividad de aromatasa cerebral (AA) son dependientes de esteroides (Balthazart y Ball, 1998). Se ha mostrado que en el APM de ratas macho castradas la actividad de la aromatasa disminuye una semana después de la castración (Roselli Cols., 1984). Las ratas macho sexualmente expertos (SE) eyaculan después de 10 a 15 intromisiones en un intervalo de 10 a 15 min de copula con una hembra sexualmente receptiva (Larsson, 1956). Varios estudios en ratas macho han demostrado que la conducta sexual aumenta la concentración plasmática de testosterona (Kamel y Frankel, 1978). En ratas, el incremento de T se ha observado solamente en machos sexualmente expertos pero no en machos sin experiencia sexual. Con base en las consideraciones anteriores se planteó determinar si la conducta copulatoria modifica la expresión de la proteína aromatasa y la proteína del receptor para andrógenos en el APM de ratas macho sexualmente expertos por Western Blot.

EXPERIMENTAL

Pruebas conductuales

Ratas macho Wistar (350-380g) fueron sometidos a cinco sesiones de entrenamiento sexual, a intervalos de 1 día entre sesión, con hembras sexualmente receptivas. La receptividad de las hembras fue inducida con la administración subcutánea y secuencial de 25 µg/rata de benzoato de estradiol (EB) 52 a 56 h antes y 1 mg/rata de progesterona (P) 4-6 h antes de la prueba de cópula. Las pruebas de conducta sexual fueron efectuadas en cajas de apareamiento (40 × 60 × 40 cm). Los sujetos fueron sometidos a la prueba durante la fase oscura del ciclo luz/oscuridad con iluminación tenue por 30 min. Los machos que eyaculan entre 10 y 15 min fueron usados en el presente estudio.

Análisis semi-cuantitativo de los niveles de aromatasa cerebral por Western Blot

Una semana después de la última sesión de cópula de entrenamiento, los machos sexualmente expertos fueron divididos en los siguientes grupos: machos sexualmente expertos que no eyaculan (Control) sacrificados una semana después de su última semana de entrenamiento sexual; machos sexualmente expertos sacrificados inmediatamente después de la eyacuación (SE-0h) o 24 horas (SE-24) o 72 horas (SE-72) después de una eyacuación. Se incluyó un grupo de machos sexualmente expertos castrados (SE-Cas) una semana después de la última sesión de cópula. Se sacrificaron los animales por decapitación extrayendo el cerebro y diseccionando cada área cerebral de interés: APM, HVM y AMG. Cada área cerebral fue homogeneizada en 100 µL de solución de lisis. Se realizó determinación de proteínas totales por el método de Lowry. Una vez obtenida la concentración de muestra se llevo a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% a 95V por 2.20 h de 40 y 60 µg de proteínas para RA y AroP40, respectivamente. (El peso molecular predicho de la aromatasa es de 55.0 KD, receptores para andrógenos de 110.0 KD y el peso molecular predicho de la proteína β-actina es de 49.0 KD.) Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 23V por 0.5 h. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario contra la proteína aromatasa (anti-CYP19. Conc. 1:200) o contra la proteína β-actina (Conc. 1:500) toda la noche a 4° C. Se continuó con una incubación con anticuerpo secundario acoplado a una fosfatasa alcalina a una concentración de 1:5000 por 2 h a 4° C. Se reveló por el método de fosfatasa alcalina. Y finalmente se llevó a cabo la determinación semi-cuantitativa de los niveles de la proteína aromatasa y del receptor para andrógenos midiendo la densidad óptica de las bandas correspondientes de dichas proteínas.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

La figura 1(A) muestra los niveles de expresión de la proteína del receptor para andrógenos en el APM de machos SE, SE-0h, SE-24h y SE-72h. Los resultados obtenidos muestran que en el APM de ratas macho SE, la cópula hasta una eyacuación no modificó significativamente los niveles de expresión de la proteína receptora para andrógenos. Es decir, en el APM de los machos sexualmente expertos sacrificados 0h o 24h o 72h después de una eyaculacion, los niveles de expresión de la proteína receptora para andrógenos no fue diferente al grupo de machos sexualmente expertos. Estudios anteriores muestran que en el APM de ratas macho, 24h despues de la cópula hasta una eyacuación, la densidad de células inmunorreactivas a la proteína receptora para andrógenos disminuye significativamente con respecto al grupo control (Fernández-Guasti y cols., 2003). Los resultados del presente estudio sugieren que en el APM de ratas macho, la conducta sexual masculina no modifica los niveles de síntesis del RA. La figura 2 (A) muestra los niveles de expresión de la proteína aromatasa en el APM de machos SE, SE-Cas. SE-0h, SE-24h y SE-72h. Los resultados obtenidos muestran que en el APM de ratas macho, la cópula hasta una eyacuación modifica significativamente los niveles de expresión de la proteína aromatasa. Es decir, en el APM de

los machos sexualmente expertos sacrificados 0h o 72h después de una eyaculación, los niveles de expresión de la proteína aromatasa son significativamente diferentes al grupo de machos sexualmente expertos control o castrados. Los niveles de expresión de la proteína aromatasa del grupo SE-24h con respecto al grupo SE-0h disminuyeron significativa pero no con respecto al grupo control. Posteriormente se registra un aumento significativo en los niveles de expresión del grupo SE-72h con respecto al SE-24h alcanzando niveles similares al grupo SE-0h. Estos resultados sugieren que la copula ejerce un efecto en los niveles de expresión de la proteína aromatasa que se observa inmediatamente después de la cópula y que permanece hasta las 72h. 24h después de la cópula se observa una disminución significativa sobre la expresión de la proteína aromatasa con respecto a las 0h después de la cópula. Esto pudiera estar relacionado con un periodo de adaptación o regulación de expresión asociada quizá, a un proceso de plasticidad para alcanzar un nivel basal nuevo. Estudios previos han mostrado que existen cambios inmediatos de la cópula en los niveles de estrógeno cerebral (Taziaux y col, 2007) que pudieran correlacionarse con cambios en los niveles de la expresión de la aromatasa observados en el presente trabajo.

En resumen, estos resultados muestran que en el APM de ratas macho, la cópula hasta una eyaculación, modifica la expresión de la proteína aromatasa pero no la expresión de los receptores para andrógenos.

Figura 1. (A) Nivel de expresión de la proteína receptora para andrógenos en el APM de machos sexualmente expertos (SE), Machos sexualmente expertos castrados 7 días antes del sacrificio (SE-Cas), Machos sexualmente expertos sacrificados inmediatamente (SE-0h) o 24h (SE-24h) o 72h (SE-72h) después de una eyaculación

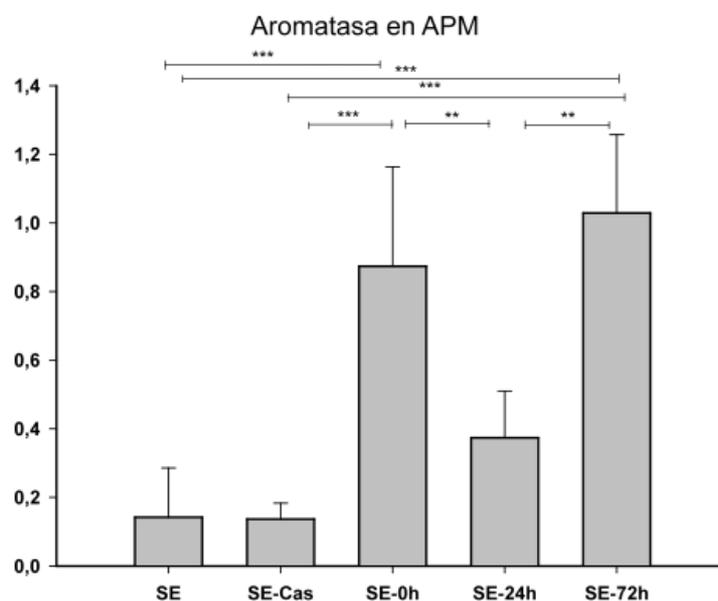
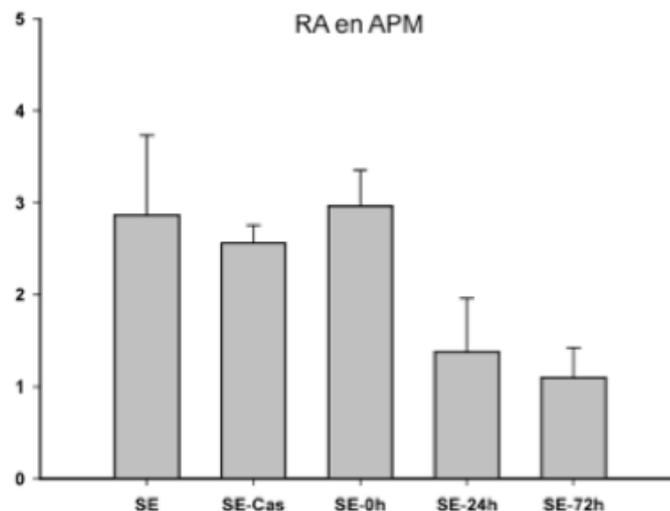
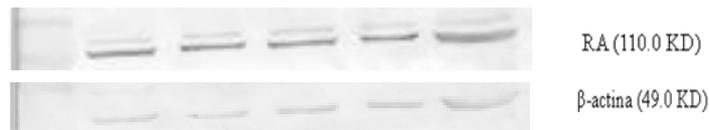
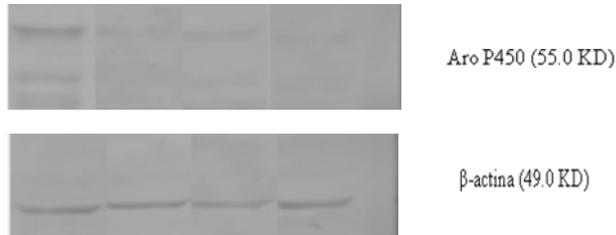


Figura 2. (A) Nivel de expresión de la proteína aromatasa en el APM de machos sexualmente expertos (SE), machos sexualmente expertos castrados 7 días antes del sacrificio (SE-Cas), machos sexualmente expertos sacrificados inmediatamente (SE-0h) o 24h (SE-24h) o 72h (SE-72h) después de una eyaculación. (ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)



1. (B) Membrana representativa de los grupos experimentales de RA en APM .



2. (B) Membrana representativa de los grupos experimentales de Aromatasa APM.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que la cópula modifica los niveles de expresión de la proteína aromatasa, pero no los niveles de expresión para la proteína receptora para andrógenos en el APM de machos sexualmente expertos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Christensen L. W. and Clemens, L. G. (1974). Intrahypothalamic implants of testosterone or estradiol and resumption of masculine sexual behavior in long-term castrated male rats. *Endocrinology*, 95:984-990.
- Davidson. J. M. (1969). Effects of estrogen on the sexual behavior of male rats. *Endocrinology*, 84:1365-1372.
- Fernández-Guasti, A., Swaab, D, Rodríguez-Manzo G. (2003). Sexual behaviour reduces hypothalamic androgen receptor immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 28:501-512.
- Hull, E. M., Wood R. I. Y McKenna K. E. (2005) Neurobiology of Male Sexual Behavior. In: Balthazart, J, Ball GF (1998) New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci* 21: 243-249.
- Kamel, F., Frankel, A. (1978). Hormone release during mating in the male rat: time course, relation to sexual behavior, and interaction with handling procedures. *Endocrinology* 103, 2172–2179.
- Larson, K, (1979) Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In: Beyer C. (Ed.), *Endocrine Control of Sexual Behavior*, Raven Press, New York, pp. 77-163.
- Larson, K. (1956). Conditioning and Sexual Behavior in Male albino Rat. *Stockholm. Almqvist and Wikesll*.
- Meisel, R.L., Sachs B.D.(1994) The physiology of male sexual behavior, in: E. Knobil J.D. Neills (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed., Raven, New York, pp. 3-105.
- Roselli, C.E., Abdelgadir, S. E., Ronnekleiv, O. K., Klosterman S. A. (1998) Anatomic Distribution and Regulation of Aromatase Gene Expression in the Rat Brain. *Biology of Reproduction*. 82; 79-87.
- Roselli, C. E., Horton, L. E. and Resko, J. A. (1985) Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117 2471-2477.
- Taziaux, M., Keller, M., Bakker, J., Balthazart, J. (2007) Sexual Behavior Activity Tracks Rapid Changes in Brain Estrogen Concentrations. *Neuroscience*, 6567: 6572-6572.
- Vagell, M. E., McGinnis, Y. M. (1997). The Role of Aromatization in the Restoration of Male Rat Reproduction Behavior. pp 415-421.