

114
24



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

ACTIVACION DE LA TIROSINA AMINOTRANSFERASA
CON DEXAMETASONA E INHIBICION CON
ANTAGONISTAS SINTETICOS EN CULTIVO PRIMARIO
DE HEPATOCITOS DE RATA

Tesis Profesional

Q u e p r e s e n t a :

VILMA MALDONADO LAGUNAS

para obtener el título de:

B I O L O G O

1990

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

ACTIVACION DE LA TIROSINA AMINOTRANSFERASA CON DEXAMETASONA E
INHIBICION CON ANTAGONISTAS SINTETICOS EN CULTIVO PRIMARIO DE
HEPATOCITOS DE RATA.

CONTENIDO

RESUMEN.

I. INTRODUCCION.

paginas

1. HORMONAS GLUCOCORTICOIDES.....	1
1.1 GENERALIDADES.....	2
1.2 BIOSINTESIS, TRANSPORTE Y DEGRADACION.....	4
1.3 REGULACION DE LA SECRECION.....	10
1.4 ANALOGOS.....	12
1.4.1 AGONISTAS SINTETICOS.....	13
1.4.2 ANTAGONISTAS SINTETICOS.....	13
1.5 MECANISMO DE ACCION.....	16
1.5.1 ENTRADA.....	16
1.5.2 ACTIVACION.....	16
1.5.3 TRANSLOCACION.....	21
1.5.4 REGULACION DE LA EXPRESION GENOMICA.....	22
1.6 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDE.....	26
1.6.1 ESTRUCTURA.....	26
1.6.2 LOCALIZACION.....	33
1.6.3 POBLACION HETEROLOGA DEL RECEPTOR.....	34
1.7 EFECTOS POSTRANSCRIPCIONALES.....	34
2.1 FISIOLOGIA DEL HIGADO.....	34
2.2 HEPATOCITOS EN CULTIVO COMO MATERIAL DE ESTUDIO.....	41
3. DOS ENZIMAS HEPATICAS INDUCIBLES CON GLUCOCORTICOIDES (TAT Y TDO).....	41
3.1 TIROSINA AMINOTRANSFERASA (TAT).....	41
3.2 TRIPTOFANO DIOXIGENASA (TDO).....	42
II. OBJETIVOS.....	44
III. METODO.....	45
IV. RESULTADOS.....	50
4.1 CULTIVO DE HEPATOCITOS.....	50
4.1.1 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.....	50
4.1.2 CARACTERISTICAS METABOLICAS.....	50
4.2 INDUCCION DE LA TAT POR DEXAMETASONA.....	56
4.2.1 CINETICA DE INDUCCION.....	56
4.2.2 CURVA DOSIS-RESPUESTA.....	56

4.3 INHIBICION DE LA INDUCCION DE LA TAT.....°.....	61
V. DISCUSION.....	66
VI. CONCLUSIONES.....	70
VII. BIBLIOGRAFIA.....	71
VIII. APENDICES.	

RESUMEN

Este trabajo forma parte de un proyecto, que tiene como finalidad el estudio del mecanismo de acción de los glucocorticoides.

Se pretende realizar la caracterización del comportamiento de varias enzimas hepáticas inducibles con glucocorticoides como la tirosina aminotransferasa, la tritofano dioxigenasa y la glutamina sintetasa, por medio de cinética de inducción, curvas dosis respuesta y su inhibición con antagonistas sintéticos.

Una vez teniendo la caracterización del comportamiento de las enzimas, los tiempos y las concentraciones óptimos de glucocorticoides para su inducción, hacer un análisis con cromatografía de intercambio iónico del receptor despues de diferentes tratamientos con antagonistas y agonistas sintéticos y relacionarlo con la caracterización de las diferentes enzimas hepáticas.

El proyecto tiene como hipótesis general, la existencia de varios tipos de receptores citoplásmaticos de hormonas glucocorticoides como una de las causas de la variabilidad en la respuesta a glucocorticoides de diferentes enzimas.

El estudio esta diseñado para llevarse a cabo en cultivo de hepatocitos en monocapa por las ventajas que este ofrece.

En este trabajo se presenta el establecimiento del cultivo de hepatocitos de rata en monocapa y la caracterización del comportamiento de una de las enzimas: la tirosina aminotransferasa; con su cinética de inducción y curva dosis respuesta, con dexametasona (un glucocorticoide sintético) así como la inhibición de ésta inducción con los antagonistas sintéticos RU38486 y RU5020. Por ser el inicio de un proyecto creimos pertinente incluir una revisión bibliográfica acerca de los glucocorticoides.

I. INTRODUCCION.

1. HORMONAS GLUCOCORTICOIDES.

1.1 GENERALIDADES.

Los glucocorticoides son un tipo de hormonas esteroides sintetizadas y secretadas por las zonas fascicular y reticular de la corteza suprarrenal.

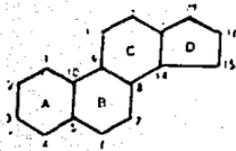
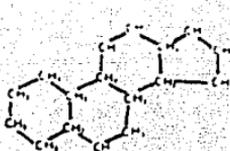
Químicamente los esteroides se caracterizan por estar constituidos sobre el esqueleto carbónico del ciclopentanoperhidrofenantreno y los glucocorticoides específicamente de un derivado de este, el pregnano que consta de 21 átomos de carbono (Pasqualine, 1973).

Existen requerimientos estructurales definidos para que una molécula posea actividad glucocorticoide. Entre ellos se mencionaran: la doble ligadura entre los carbonos 4 y 5, así como la cetona en el carbono 3; el hidroxilo en el carbono 11 y la cadena lateral en el carbono 17, con cetona en el carbono 20 y un alcohol primario en el 21. La presencia de un hidroxilo en el carbono 17 aumenta la actividad pero no es indispensable (figura 1).

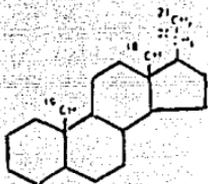
En el humano, mono, perro y cobayo el principal glucocorticoide es el cortisol, mientras que en la rata, ratón y los batracios, lo es la corticosterona (Calandra *et al*, 1985). Las hormonas glucocorticoides, difieren de otros esteroides en la gran variedad de órganos que afectan y en la diversidad de respuestas fisiológicas que desencadenan. Lo mismo que otras hormonas, los glucocorticoides solamente intervienen como modificadores de mecanismos preexistentes en los organismos, por estimulación ó inhibición de los mismos y en ciertos casos por mecanismos permisivos que posibilitan la acción de otros factores.

Estas hormonas ejercen acciones periféricas: anabólicas y catabólicas y además modulan ciertas funciones del sistema nervioso (figura 2).

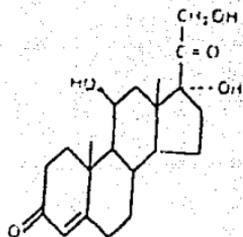
La acción anabólica se ejerce principalmente en el hígado, el riñón y el pulmón. En el hígado estas hormonas estimulan la gluconeogénesis a partir de precursores no hidrocarbonados, principalmente aminoácidos. Promueven: la captación hepática de aminoácidos circulantes; la activación de enzimas transaminasas, que convierten a estos aminoácidos en α -cetoácidos precursores de la glucosa; la síntesis de enzimas claves de la gluconeogénesis (piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, glucosa-6-fosfatasa); la síntesis de glucógeno y de proteínas plasmáticas.



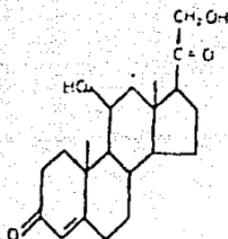
Ciclopentanoperhidrofenantreno.



Pregnano



Cortisol



Corticosterona.

Figura 1. Estructura química de los glucocorticoides (cortisol y corticosterona) (Calandra et al., 1985).

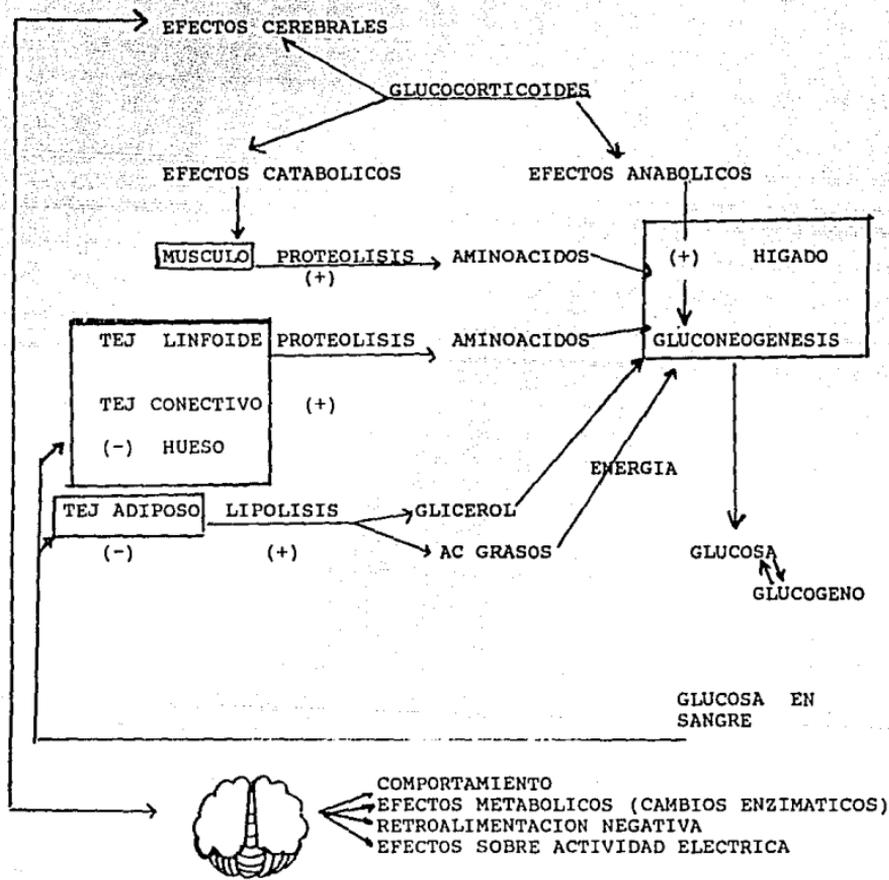


Figura 2. Efectos anabólicos, catabólicos y sobre el sistema nervioso de los glucocorticoides. Los símbolos (+) y (-) indican estimulación e inhibición, respectivamente. (Calandra *et al*, 1985).

En el riñón los glucocorticoides también son gluconeogénicos, además de activar la filtración glomerular. En el pulmón la acción anabólica se manifiesta por la aceleración de la maduración del pulmón fetal y de la biosíntesis de fosfolípidos.

En células adiposas, linfoides, conectivas, epiteliales, musculares y óseas, los glucocorticoides aumentan la destrucción de biomoléculas proteicas y ó grasas las que liberan sus constituyentes (aminoácidos, glicerol y ácidos grasos) en la sangre (Guyton, 1987; Calandra *et al*, 1985).

Algunas acciones estimulantes e inhibitorias de los glucocorticoides se muestran en la tabla 1 y 2.

Los glucocorticoides tienen aplicación en la farmacología clínica y la terapéutica por su acción inhibitoria de la respuesta inmune, inflamatoria y alérgica.

Las funciones de los glucocorticoides en el cerebro son varias, entre ellas el control de enzimas como la glicerol-fosfato-deshidrogenasa y la glutamina sintetasa. También ejercen efectos importantes sobre el comportamiento como alteraciones en el carácter, el reconocimiento de estímulos sensoriales, en el sueño y la actividad eléctrica de las neuronas. Son ya clásicos los trastornos del carácter experimentados por pacientes con Síndrome de Cushing ó en la enfermedad de Addison.

Como se mencionó anteriormente, los glucocorticoides tienen una acción permisiva, esto significa que la presencia de concentraciones fisiológicas de estas hormonas son necesarias para que ocurran algunos efectos metabólicos, mediados por otras hormonas, por ejemplo se ha encontrado que hay una estimulación incompleta de la gluconeogénesis por glucagón ó epinefrina en hígado de rata adrenalectomizadas, la cual es corregida por administración de glucocorticoides; la movilización de la grasa por la adrenalina, requiere la presencia de pequeñas cantidades de cortisol, este también estimula el tono arteriolar indirectamente por acción permisiva para la noradrenalina (Thompson y Lippman, 1974; Saez y Bertrand, 1977).

Los glucocorticoides son esenciales para el buen funcionamiento del organismo en su respuesta al "stress", ya que actúan sobre el metabolismo de los carbohidratos, y conducen a un aumento de sustratos energéticos circulantes, acosta de energía almacenada y de procesos anabólicos de mantenimiento.

Si bien la falta de glucocorticoides conduce a síntomas de debilidad, mialgia y en algunos casos es letal, un aumento en ellos por procesos anormales, imponen un alto costo anabólico al organismo. Este puede manifestarse bajo formas de miopatía, diabetes por esteroides, hipertensión, inmunosupresión e inhibición del crecimiento (Munk *et al*, 1984).

1.2 BIOSÍNTESIS, TRANSPORTE Y DEGRADACION.

Para iniciar la síntesis de glucocorticoides, las células pueden tomar el colesterol de la circulación a partir de las lipoproteínas, de la reserva que tienen de colesterol esterificado ó bien sintetizarlo (Ochoa y Suckling, 1987;

Acción.	Referencia.
En músculo esquelético bajan la síntesis de proteínas y aumentan su degradación.	Max <u>et al.</u> , 1987. Max y Silbergeld, 1987; Sharma y Timiras, 1987.
Aumentan la síntesis de la glutamina sintetasa en adipocitos en cultivo.	Bhandari y Miller, 1987.
Aumentan el ARNm de la albúmina y bajan el de colágeno, en hígado.	Davis y Smith, 1987.
Regulan el metabolismo proteico en fibroblastos humanos.	Weiner <u>et al.</u> , 1987.
Son importantes en la lactogénesis y la lactación en humanos.	Alexandrová, 1986.
Aumentan el nivel de receptores β -adrenérgicos que activan la adenil ciclasa en músculo liso de hamster.	Collins <u>et al.</u> , 1988.
Aumentan en fibroblastos durante el proceso inflamatorio en humanos.	Rabur <u>et al.</u> , 1985.
Tienen un efecto antiinflamatorio, inhibiendo desde los macrófagos la liberación de un factor que induce la migración de neutrófilos.	Cunha y Ferreira, 1986.
Tienen efecto inmune, bloquea la producción de linfocinas y monocinas inmunes.	Besedovsky <u>et al.</u> , 1986.
Inducen la tirosina aminotransferasa en hígado y hepatomas.	Simons <u>et al.</u> , 1988.
Intervienen en el proceso inflamatorio en fibroblastos.	Damon <u>et al.</u> , 1985; Guyre <u>et al.</u> , 1988.
En el sistema nervioso central se han encontrado receptores de glucocorticoides.	Leloux, <u>et al.</u> , 1983.
Inducen la Triptofano dioxigenasa y Tirosina aminotransferasa en hígado de rata.	Voigt y Sekeris, 1978.

Tabla 1. Algunos efectos específicos de los glucocorticoides.

Regulan el gen de metalotioneina I en ratón.	Mayo y Palmiter, 1982 Mayo <u>et al.</u> , 1982.
Inhiben el activador del plasminógeno en células de hepatoma de rata.	Seifert y Gelehrter, 1978.
Estimulan el transporte de a-aminoisobutirico en hepatocitos de rata.	Yamada <u>et al.</u> , 1980.
Inhiben la formación de prostaglandinas por la formación de una proteína inhibitoria de la fosfolipasa A ₂ en neutrófilos, macrófagos peritoneales y células Kupffer.	Dieter <u>et al.</u> , 1986.
Inhibe el crecimiento celular linfoide.	Distelhorst <u>et al.</u> , 1984.
Aumentan los receptores de insulina en células IM-9.	Fantus <u>et al.</u> , 1982.
Tienen efectos en parámetros de crecimiento celular.	Darbe y King, 1987.
Reducen la producción de T ₃ y la activación de la 5-deiodinasa <u>in vivo</u> en hígado y riñón de rata.	Bianco <u>et al.</u> , 1987.
Bajan la transcripción general en timo de rata y causan su involución.	Stepanek <u>et al.</u> , 1983.
Afectan una variedad de acontecimiento metabólicos y fisiológicos de la placenta, por ejemplo bajan la síntesis de progesterona y afectan la síntesis de gonadotropina coriónica.	Heller <u>et al.</u> , 1986.
Tienen actividad adipogénica en fibroblastos 3 TE-LI, al aumentar la acumulación de lípidos y la actividad de la glicerol-deshidrogenasa.	Schiwek y Loofler, 1987.
Tienen efecto en la producción y acción de citocinas inmunes.	Guyre <u>et al.</u> , 1988.
Regulan la transcripción de su receptor.	Rosewicz <u>et al.</u> , 1988.

Tabla 1. Continuación.

Efectos estimulantes:

Depósito de glucógeno en hígado.
Gluconeogénesis a partir de los aminoácidos en el hígado.
Captación hepática de los aminoácidos circulantes.
Transaminasas hepáticas.
Biosíntesis de proteínas en hígado.
Lipólisis en el tejido adiposo.
Formación de cuerpos cetónicos.
Filtración glomerular.
Eritropoyesis y leucopoyesis.
Secreción gástrica (ácido clorhídrico y pepsina).
Elevación de la presión arterial.
Propiedades cardiotónicas.
Resistencia al "stress".
Crecimiento y maduración del pulmón fetal.
Movilización de lípidos.
Involución del timo.
Formación de angiotensinógeno.
Síntesis de ARN.
Formación de Urea.
Liberación de ácidos grasos libres.

Efectos inhibitorios.

Captación de glucosa por las células periféricas .
Metabolismo proteico en músculo, hueso, tejido linfóideo.
Lipogénesis en el tejido adiposo.
Reabsorción tubular renal de agua.
Número de eosinófilos, basófilos y linfocitos de la sangre.
Crecimiento del tejido linfático normal (timo, ganglios, bazo) y de algunos patológicos (linfomas).
Síntesis de matriz ósea (resultado: osteoporosis).
Respuesta inmunitaria (disminución de anticuerpos).
Respuesta antiinflamatoria y antialérgica.
Secreción de ACTH y CRF.
Secreción de hormona melanocito-estimulante.
Funciones tiroideas.
Funciones adreocorticales.
Secreción de somatotrofina.
Coagulación sanguínea.
Cicatrización.

Tabla 2. Efectos generales, estimulantes e inhibitorios de los glucocorticoide. Calandra et al, 1985; Pasqualine, 1973).

y Ochoa, 1986).

La biosíntesis de estas hormonas implica docenas de transformaciones químicas reguladas enzimáticamente. La secuencia de reacciones para la síntesis de cortisol y corticosterona se muestra en la figura 3A y la localización intracelular de varios pasos en esta síntesis se ilustra en la figura 3B.

La reacción inicial que convierte al colesterol en 5 -pregnenolona, es catalizada por un complejo enzimático p-450 intramitocondrial conocido, como desmolasa.

La 5 -pregnenolona es convertida en 11-deoxicortisol por pasos sucesivos dentro del retículo endoplásmico. Este último es hidroxilado en la posición 11 después de haber sido transferido a la mitocondria. El producto final, el cortisol, rápidamente difunde fuera del orgánulo de la célula (Berne *et al*, 1983).

El orden de las hidroxilaciones desde la 5 -pregnenolona al 11-deoxicortisol es variable, a veces la reacción de la 3- β -ol dehidrogenasa y de la $^4,^5$ isomerasa, pueden ocurrir después de todas las hidroxilaciones.

Para la corticosterona la ruta es casi idéntica, excepto por el hecho de que la progesterona escapa a la 17- α -hidroxilación y se somete directamente a la reacción de la 21-hidroxilasa, para sufrir finalmente una 11 β -hidroxilación (Berne *et al*, 1983; Williams, 1981).

Una vez sintetizados y volcados a la sangre, en su mayor proporción, los glucocorticoides se unen a una proteína llamada Transcortina ó proteína CBG ("Corticosteroid Binding Globulin"). La albúmina plasmática también fija glucocorticoides pero su afinidad es 1,000 veces menor que la de la Transcortina. El 5% de glucocorticoides permanece libre, al parecer estos son los que penetran en las células blanco (Thompson y Lippman, 1974).

La Transcortina es una glucoproteína del suero, un sólo glucocorticoides naturales y está ampliamente distribuida por el mundo animal. Su peso molecular es aproximadamente de 52,000 Da tiene un pI de 5.0 y un coeficiente de sedimentación igual a 3.7 S, contiene altos niveles de ácido aspártico glutámico y leucina, la composición de los aminoácidos es distinta a la de otras proteínas que unen a esteroides, por ejemplo de la albúmina (Barden *et al*, 1977).

Su papel fisiológico es la regulación de niveles de cortisol libre en la sangre, han sido propuestas otras funciones que incluyen el transporte intracelular, ya que se ha visto que la CBG puede unirse a las membranas plasmáticas de las células blanco, también ha sido detectada dentro de las células. Se ha especulado que podría funcionar como acarreador (Kunh *et al*, 1988).

Los glucocorticoides son inactivados principalmente en el hígado, los productos resultantes del catabolismo son siempre esteroides, el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno se conserva (figura 3 C). La etapa más importante, es la reducción enzimática de la doble ligadura 4-5 en el anillo A, para formar un derivado dehidroesteroideal, que se transforma en un derivado tetrahidratado por reducción enzimática del carbonilo 3. Después por un proceso de reducción la hidroxilación del carbonilo del carbono 20 origina cortoles. El tetrahidrocortisol y los cortoles

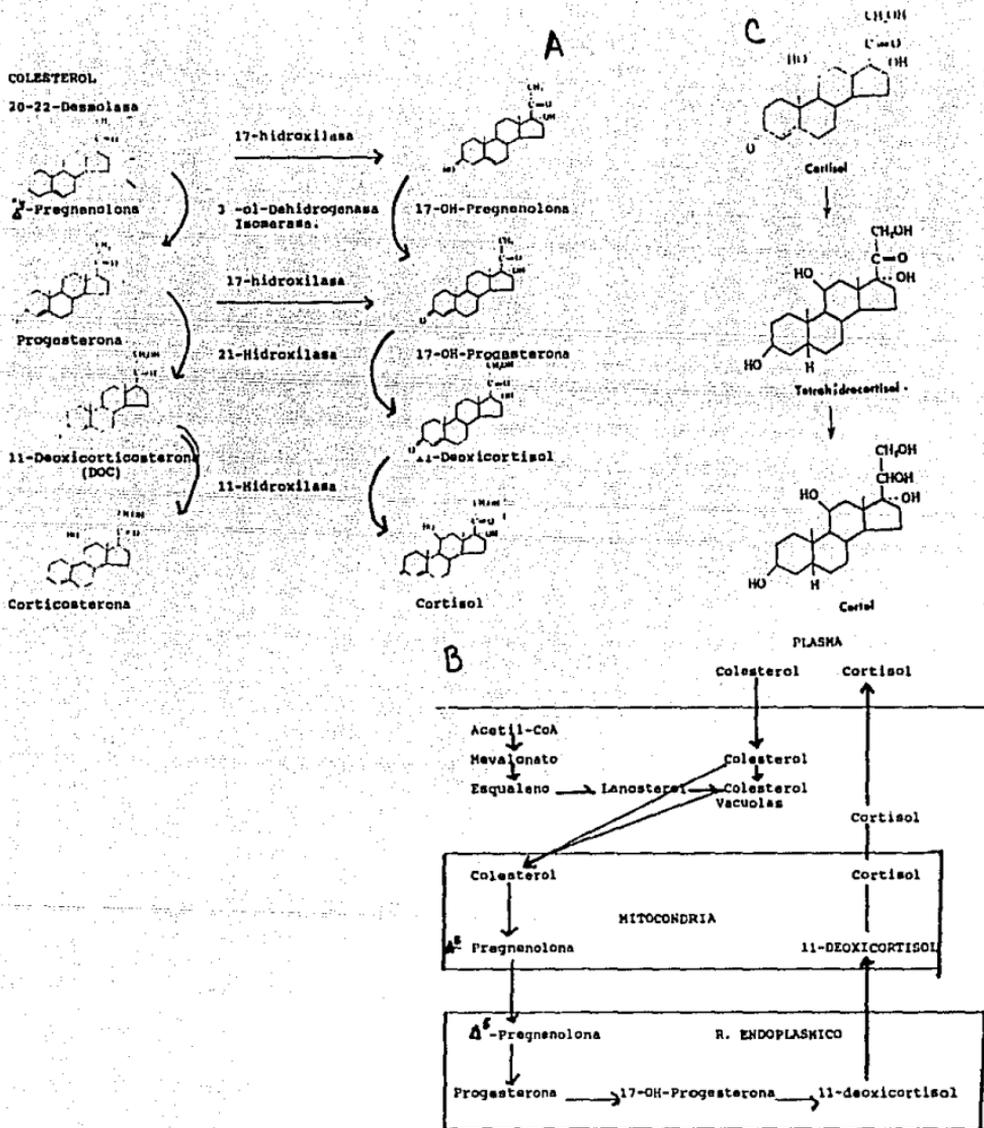


Figura 3. A. Pasos en la síntesis de los glucocorticoides. B. Localización intracelular de las reacciones involucradas en la biosíntesis del cortisol. C. Pasos principales en la degradación de glucocorticoides. (Berne, *et al*, 1983).

son conjugados con el ácido glucorónico y forman glucoronidos, que son solubles en agua y son excretados por los riñones (Pasqualine, 1973).

El hígado también es capaz de añadir un grupo 6- β -hidroxilo al cortisol y aumenta así su solubilidad y permite su excreción. Otra posibilidad es la separación de la cadena lateral 20, 21, obteniéndose un compuesto de 19 átomos de carbono con un grupo carbono 17 (un 17-cetosteroides), también soluble en agua, que se elimina fácilmente (Duncan et al, 1978).

1.3 REGULACION DE LA SECRECION.

El mantenimiento de la estructura, el crecimiento, así como de la actividad secretora de la corteza suprarrenal, depende de su interacción con el hipotálamo y la pituitaria, y forman así el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, que funciona según un mecanismo de retroalimentación negativa (figura 4).

El primer paso es la liberación de los péptidos hipotalámicos; el factor liberador de corticotropina (CRF), la vasopresina arginina (VASO) y el péptido colestocinina (CCK), que descienden desde las neuronas que los producen, ubicadas en el hipotálamo posterior, por las venas portales que atraviesan la eminencia media y el tallo hipofisiario, hasta llegar a las células corticotrofas de la pituitaria, en las que estimulan la síntesis e inducen la descarga de la hormona adrenocorticotropina (ACTH).

La liberación de ACTH también es estimulada por las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina secretadas de la médula, adrenal.

La descarga de la ACTH, pasa a la circulación general para ejercer su función sobre la corteza adrenal. La ACTH estimula la captación del colesterol por las células adrenales a induce la síntesis y secreción de los glucocorticoides.

El sistema inmune también está involucrado en la regulación de la liberación de ACTH y glucocorticoides. Se ha encontrado que la interleucina 1 y sustancias producidas por monocitos, estimulan la liberación de ACTH de células de la pituitaria (Resine et al, 1986). Besedovsky et al, 1986, reportaron que una pequeña cantidad de interleucina 1 es suficiente para aumentar los niveles de ACTH y glucocorticoides en la rata.

Los glucocorticoides circulantes son detectados por receptores hipotalámicos, que una vez estimulados causan la inhibición de la secreción de los péptidos hipotalámicos (Adler et al, 1988), también actúan sobre la pituitaria anterior al inhibir la liberación y síntesis de ACTH (Allem et al, 1988). Los glucocorticoides también previenen la producción de citocinas inmune como interleucina 1, 2 y 3, interferón t y el factor de necrosis tumoral (Guyre et al, 1988; Cunha y Ferreira, 1986), y forman así un sistema cerrado (Resine, et al, 1986).

El hipocampo también interviene en el mecanismo de retroalimentación negativa, así cuando hay disminución en el número de receptores para glucocorticoides por situaciones patológicas ó por hipocampectomía hay pérdida de sensibilidad en el eje (Magariños et al, 1987).

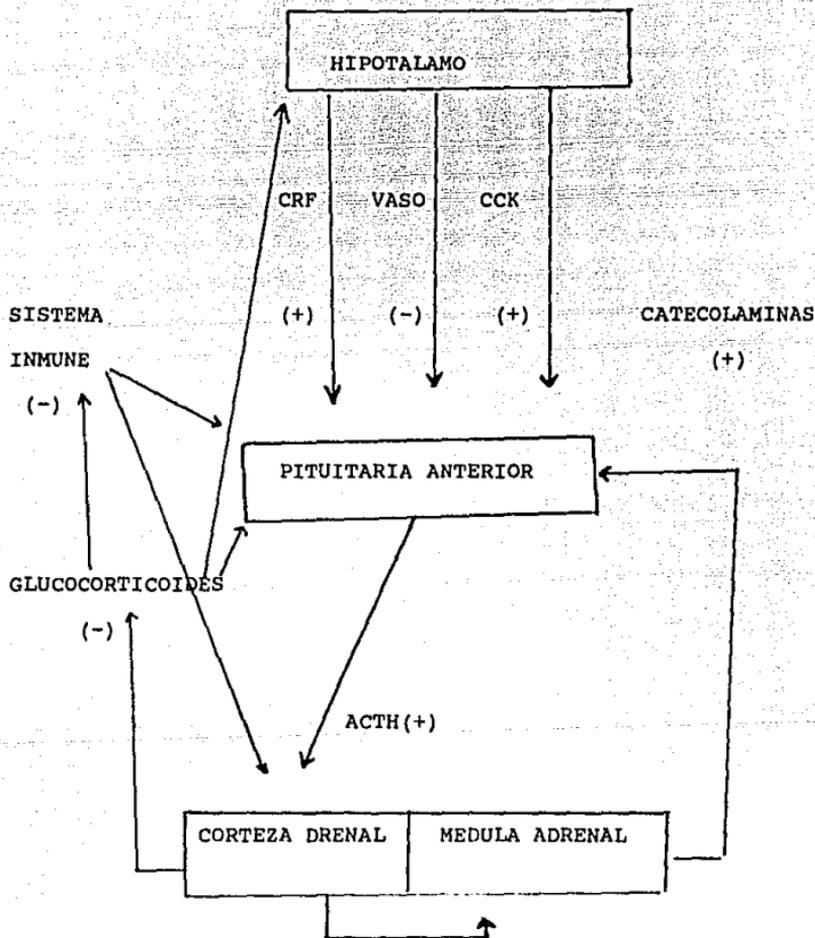


Figura 4. Regulación de la secreción de glucocorticoides que funciona según un mecanismo de retroalimentación negativa (Resine, *et al*, 1986).

Durante condiciones de "stress", existe un mecanismo que asegura el mantenimiento de una producción elevada de glucocorticoides no obstante los niveles existentes. Pero esto es necesario que la producción de ACTH escape a su factor inhibitorio, se ha propuesto que existe una pérdida de sensibilidad de las neuronas hipotalámicas, frente a los corticoides ó que reciben estímulos secretorios más potentes que superan la inhibición, lo cual parece ser lo más probable. Estos estímulos se originan en el sistema nervioso central, bajo los efectos de diversas formas de "stress" y por vía nerviosa alcanzan el hipotálamo y provocan la descarga de los liberadores de ACTH.

Recientemente Sapolky *et al*, (1986), propusieron que durante situaciones prolongadas de "stress", depresión ó senilidad, se rompe el equilibrio entre la respuesta endócrina al agente "estresante" y el fin de esta respuesta. Este rompimiento puede ser transitorio ó definitivo y se atribuye a una disminución de receptores citoplasmáticos en el hipotálamo.

En estudios con ratas seniles, se encontró que existe un trastorno irreversible en el fin de la respuesta a "stress", que se debe a la pérdida de las células con receptores a glucocorticoides en el hipotálamo, por un efecto tóxico de las hormonas (Salposky, *et al*, 1986). En estados patofisiológicos concomitantes al envejecimiento en humanos se han encontrado situaciones análogas, por ejemplo se ha visto que una variedad de subtipos de depresión, donde existe resistencia a dexametasona, vienen a ser más comunes en personas de edad más avanzada.

Todos estos estudios sugieren un papel muy importante de los glucocorticoides en procesos de envejecimiento prematuro por "stress", sensibilidad a trastornos neurológicos y depresiones. Aunado a ésto los glucocorticoides como otras hormonas esteroides son promotores del crecimiento de ciertos tumores (Lippman, 1976; Rhim, 1983; Schlechte y Schmidt, 1987).

De aquí que en tiempos recientes se haya concentrado mucha atención en el desarrollo de antagonistas de hormonas glucocorticoides.

1.4 ANALOGOS.

En el año de 1929 se obtuvieron los primeros extractos potentes de corteza suprarrenal que de inmediato se aplicaron en el tratamiento de la enfermedad de Addison y del shock, pero su potencia incierta y alto costo impidieron la expansión de su uso en la medida en que la terapéutica lo reclamaba. Cuando en 1937 se obtuvo la desoxicorticosterona por síntesis, su aplicación clínica se extendió con gran rapidez, pero exclusivamente se aplicó en la enfermedad de Addison.

En 1948 se logró producir cortisona y se utilizó en el tratamiento de reumatismo y a un extenso grupo de enfermedades. Poco después el cortisol fue extraído y utilizado del tejido suprarrenal de diversos mamíferos domésticos pero su alto costo hace impracticable su extracción. Se encontró la forma de producir la semisíntesis a partir de productos de configuración

molecular emparentada con el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno como el ácido desoxicólico y principalmente las sarmentogeninas de origen vegetal. También se pueden obtener por síntesis total pero su costo es mucho más elevado.

Simultáneamente se descubrió la posibilidad de intensificar los efectos farmacológicos de estos esteroides útiles a los fines terapéuticos y de suprimir las reacciones colaterales indeseables (como la retención de sodio y agua), por modificación de la molécula original del cortisol (Pasqualine, 1973).

1.4.1 ANAGONISTAS SINTETICOS.

Los antagonistas sintéticos son compuestos que poseen actividad glucocorticoide, en ocasiones la actividad de estas moléculas está aumentada por introducción de nuevas funciones químicas, por ejemplo, la presencia de una doble ligadura entre los carbonos 1 y 2 del cortisol (prednisolona), la presencia de un átomo de flúor en el carbono 9 y la metilación en el carbono 16 (dexametasona), la presencia de un hidroxilo en el carbono 16 y el flúor en el 9 (triamcinolona), la dexametasona y la triamcinolona también poseen la doble ligadura entre los carbonos 1 y 2 (figura 5).

Su mayor actividad biológica se debe a varias propiedades: 1) son unidos débilmente por las proteínas plasmáticas y circulan como hormonas libres (activas); 2) son más estables, la vida media del cortisol se ha estimado de 90 minutos y de 200 para la prednisolona, metilprednisolona, dexametasona y betametaxona y algo más para la triamcinolona y fluorocortisona; 3) tienen mayor afinidad por los receptores citoplasmáticos.

Las potencias relativas de algunos agonistas son: cortisol 1, cortisona 0.7, corticosterona 0.2, fluorocortisona 10, prednisolona 4, prednisona 4, triamcinolona 3, 6-a-metilprednisolona 5 y dexametasona 30 (Calandra et al., 1985).

Estos glucocorticoides sintéticos son útiles como agentes terapéuticos en una amplia diversidad de enfermedades, por ejemplo son eficientes para elevar el nivel de glucosa en la sangre en pacientes hipoglucémicos, para suprimir la secreción de ACTH, en el control de ciertos tipos de leucemias y como agentes antiinflamatorios ó de inmunosupresión.

1.4.2 ANTAGONISTAS SINTETICOS.

Desde el descubrimiento de las propiedades antiglucocorticoide de la progesterona en 1966, muchos compuestos esteroidales han sido reportados como antagonistas de la actividad glucocorticoide (Chrousos et al., 1983).

La mayoría de los antiglucocorticoides han sido descritos como efectivos in vitro pero débilmente activos in vivo, debido a su metabolismo in vivo por enzimas adrenales como la 11- β -hidroxilasa (Naylor y Rosen, 1982).

El RU38486 descubierto en 1980 en los laboratorios Russel-

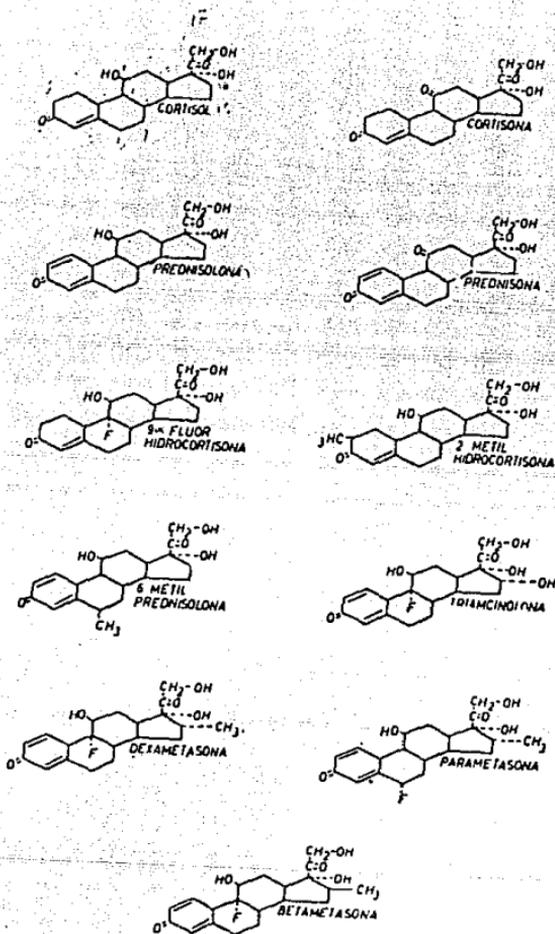


Figura 5. Análogos sintéticos a glucocorticoides (Calandra *et al*, 1985).

Uclaf es el primer esteroide capaz de antagonizar totalmente el efecto agudo y crónico de la dexametasona (dxm) in vitro así como in vivo, sin exhibir actividad agonista a altas dosis (Moguliewsky y Philibert, 1984). Por ejemplo bloquea la atrofia inducida por dxm del músculo esquelético de rata (Konaqaya et al, 1986); antagoniza el efecto inhibitorio de la dxm en el crecimiento de fibroblastos L-29 (Jung-Testas y Baileu, 1983); antagoniza la incorporación de uridina en timocitos de rata; también suprime la inhibición de la secreción de ACTH inducida por corticoesteroides en cultivo de células de pituitaria de rata (Gaillard et al, 1984); antagoniza in vivo el efecto de corticosteroides en el hígado sobre el glucógeno, la triptofano dioxigenasa e inhibe la secreción de ACTH inducida por dxm (Gaillard et al, 1984).

El efecto antagonista potente del RU38486 se debe a su fuerte unión al receptor citoplasmático de glucocorticoides (Bourgeois et al, 1984; Jung-Testas y Baulieu, 1983). Su afinidad por el receptor es cerca de tres veces más alta que la de la dxm (Moguliewsky y Philibert, 1984). Si bien se ha visto in vitro que una vez unido al receptor su translocación es reducida y que su unión a secuencias específicas e inespecíficas al ADN esta alterada (Bourgeois et al, 1984; Moguliewsky y Philibert, 1984; Naylor y Rosen, 1982).

Rajpert et al, (1987), al trabajar in vivo con células linfoblásticas humanas IM-9, encontraron que el complejo RU38486-receptor no regulaba el número ni la vida media del mismo receptor como ocurre con los agonistas. La regulación negativa del número y la disminución de la vida media del receptor, es una propiedad del complejo receptor-glucocorticoide transformado.

Ellos concluyeron que la unión del RU38486 al receptor no es seguida por la activación del complejo in vivo y que la activación que es observada in vitro puede ser producida artificialmente, en el manipuleo experimental. Moguliewsky y Philibert observaron que al activarse el complejo receptor-RU38486 se forma un complejo menos estable.

Este antagonista podría ser útil en el tratamiento de ciertos tumores dependientes de hormonas por ejemplo en tumores cerebrales, en tratamientos de enfermedades debido a hipercorticoides como; hipertensión, glaucoma, depresión, diabetes (Naylor y Rosen, 1982).

Se usa en pacientes afectados con Síndrome de Cushing con buenos resultados (Kawai et al, 1987; Nieman et al, 1985).

Otros antiglucocorticoides son: 6- β -bromoprogesterona, cortisol 21 mesilate (Simons et al, 1980), 1,9(11)-11 deoxicortisol RU5020. Todos ellos tienen un efecto antagonista menor que el RU38486 in vitro e in vivo, algunos son activos sólo en altas dosis y generalmente muestran un efecto agonista débil.

Los diversos antiglucocorticoides actúan a diferente nivel, así por ejemplo la cortesolona una vez unido al receptor de glucocorticoide, se transloca al núcleo pero no se une al ADN y la progesterona se une al receptor pero no es translocado.

Los análogos (agonistas y antagonistas) sintéticos de los glucocorticoides tienen importancia por su aplicación clínica y

para la elucidación del mecanismo de acción de los glucocorticoides. A su vez el estudio del mecanismo del mecanismo de acción de estas hormonas provee uno de los medios más adecuados para delinear la organización y la expresión del genoma complejo de los mamíferos (Agarwal et al, 1985).

1.5 MECANISMO DE ACCION.

1.5.1 ENTRADA.

El primer paso del proceso que lleva finalmente a la hormona glucocorticoide a expresar su acción fisiológica, es su entrada a la célula blanco (figura 6). Anteriormente se había propuesto que los esteroides en virtud a su pequeño tamaño y su naturaleza lipofílica, entraban a la células por difusión pasiva. Sin embargo algunos estudios apoyan la hipótesis de la existencia de transportador membranal saturable de varias hormonas esteroides en ciertos tipos celulares. Los estudios realizados por Allera y Rao (1986) mostraron, al trabajar con vesículas de membrana plasmática de hígado de rata y con una técnica que permite la medición de la cinética de transporte a tiempos muy cortos, que la toma de corticosterona es saturable, reversible, dependiente del tiempo y la temperatura, que disminuye al bajar el volumen vesicular y que es más eficiente a concentraciones fisiológicas de la hormona. Todo esto apoya la hipótesis de la existencia de un transportador de membrana para glucocorticoides.

Gamatchu (1987), presenta evidencias inmunológicas de que algunas proteínas antigénicamente parecidas al receptor citoplasmático de glucocorticoides están localizados en la membrana de células de linfoma S-49, detectó las proteínas en la membrana plasmática por mediciones de marcaje inmunofluorescente con un anticuerpo para el receptor citoplasmático de glucocorticoides. El análisis de estas proteínas reveló bandas de 85 y 155 KDa. También se observó que hay una relación entre el número de estos receptores y la lisis celular.

1.5.2 ACTIVACION.

Una vez en el interior de la célula, el glucocorticoide se une a una proteína receptora específica y forma el complejo glucocorticoide-receptor (CRG).

Tienrungrøj et al, (1987), concluyeron de sus estudios con receptores de glucocorticoides en hígado de rata, que los grupos sulfhidrilo del receptor son absolutamente requeridos para la unión del glucocorticoide, ya que el tratamiento de receptores desocupados con agentes modificadores de sulfhidrilo, como el metanotiosulfanato, impiden su unión. Anteriormente ya se habían demostrado que los reactivos reductores de grupos sulfhidrilo como el ditiotreitól aumentaban la unión del receptor al glucocorticoide. Wosu y Shyamala (1987), al trabajar in vitro con receptores citoplasmáticos de hígado de rata, encontraron que el

NADPH y los extractos citoplasmáticos que contenían tioredoxina y tioredoxina reductasa, aumentaban la unión del receptor y su ligando. Proponen que in vitro el sistema de intercambio tiol-disulfuro mediado por tioredoxina y dependiente de NADPH mantiene en estado reducido el receptor, y permite así su unión con el glucocorticoide.

Después de la unión hormona-receptor, el complejo sufre cambios fisicoquímicos y es transformado a un estado que es afín al ADN, a este proceso se le da el nombre de Activación.

Se puede unir la hormona y el receptor, in vitro sin que exista una activación, in vivo se cree que esta unión es el primer evento que dispara todo el proceso de acción de la hormona (Moudgil et al, 1986).

Existen varios modelos para explicar por qué mecanismos se lleva a cabo la activación.

1) Se ha propuesto una disociación de subunidades del complejo. Ya que la activación es acompañada de una reducción del tamaño del complejo, la cual es reflejada en un cambio en su valor de sedimentación en gradientes de sacarosa y en su radio de Stokes (9.1 S y 8.2 nm para el complejo inactivado y 4 S y 6 nm para el complejo activado) y también se presenta una reducción en su peso molecular de 319 KDa a 96 KDa, se ha propuesto como mecanismo de la activación una disociación de subunidades (Denis et al, 1988; LaPointe et al 1986; Mougil et al, 1985; Vedeckis, 1983).

Inicialmente se propuso que los receptores inactivados se unían y formaban una molécula homotetrámera u homodímera y que al activarse se disociaban (Vedeckis, 1983), si bien, Howard y Distelhartz (1988), encontraron que una proteína de 90 KDa, inhibía la unión del receptor a columnas de ADN-celulosa y Sanchez et al, 1987, usando técnicas inmunológicas han identificado que el receptor de glucocorticoides sin activar, está asociado con una fosfoproteína de 90 KDa, proteína que se activa con shock de calor (Pelham, 1988), denominada hsp 90. Al activarse el complejo, la proteína hsp 90 se disocia de receptor (Rexin et al, 1988). La disociación de esta proteína es un evento dependiente de la temperatura y de la presencia de la hormona. Se ha comprobado la asociación de la hsp 90 en células intactas de linfoma de ratón S 49 y que la dexametasona promueve la disociación de la hsp 90 in vivo (Howard y Distelhartz, 1988). Se ha sugerido que la interacción física de la hsp 90 con el receptor podría estabilizar una conformación activa que une a la hormona, ya que la disociación por calor de la hsp 90, causa una incapacidad del receptor para unir a la hormona (Bresnick, et al, 1988).

Denis et al (1988), hicieron un estudio de las propiedades hídricas del CRG en sus dos formas, activado e inactivado, sus resultados sugieren que el CGR inactivo consta de una proteína receptora y un dímero de la hsp 90.

Tai et al (1986), encontraron una proteína de 59 KDa como componente común del complejo receptor en varios tejidos (hígado, estómago, útero, riñón) de conejo, que responden a esteroides y que es diferente de la proteína hsp 90.

La activación del complejo ocasiona un decremento en su afinidad a resinas DEAE (Moudgil et al, 1985), se cree pueda ser

un reflejo de la exposición de residuos positivos después de la disociación y/o puede deberse a la remoción de partes cargadas negativamente del complejo (Smith y Harmon, 1987). Sanchez et al (1987), sugieren que la proteína hsp 90, puede contribuir significativamente a la carga negativa neta presente en el CRG sin activar, ya que la carga de la hsp 90 y la del complejo inactivo son cromatográficamente muy similares. Así la disociación de esta produce un complejo con menos carga negativa neta y ocasiona un decremento en la afinidad a resinas DEAE.

Tienrungroj et al (1987), encontraron que el peróxido de hidrógeno previene la disociación de la hsp 90 de una manera reversible con ditiotreitol, esto sugiere que un grupo sulfhidrilo debe permanecer reducida para que la disociación se lleve a cabo. Rexine, et al (1988), apoya esta hipótesis con sus resultados en células de linfoma de ratón.

También se ha descubierto la asociación de ARN con el CRG. Webb et al (1986), encontraron un material capaz de incorporar in vivo uridina C^{14} y ortofosfato P^{32} , en el último paso de la purificación del complejo inactivo de hígado de rata por columnas de DEAE-celulosa, después de la elución del complejo. Este material se teñía con bromuro de etidio y su presencia era dependiente de la presencia del complejo. Colectivamente estos datos sugieren que algunas moléculas de ARN están ligadas con el complejo inactivo.

Sin embargo Kovacic-Millivojevic y Vedeckis (1986), trabajando con CRGs aislados de tumor de pituitaria (ArT-20), no detectaron ARN en el complejo inactivo, si bien encontraron un complejo activo asociado con ARN de características intermedias al complejo activo a inactivo, es decir de peso molecular de 132 KDa y 6 nm de radio de Stockes y 5.2 S. Comprobaron que el complejo inactivo pasa directamente del complejo de 9 S al de 4 S sin formar el complejo 5.2 S. Proponen que el complejo después de disociarse y formar el complejo de 4 S se une al ARN dando un complejo de 5.2 S. Esto lo han comprobado in vitro al convertir el monómero de 4 S a la forma 5.2 S por adición de ARN exógeno.

Ali y Vedeckis (1987), identificaron y purificaron las moléculas de ARN asociadas al complejo de 5.2 S y encontraron que son moléculas pequeñas con un coeficiente de sedimentación de 4 S, un tamaño de aproximadamente 76 nucleótidos, y que pueden ser aminoacilados y se une principalmente con aminoácidos básicos. Por lo tanto concluyen que posiblemente se trata de un ARN de transferencia.

Como el complejo CRG puede interactuar con ARN de transferencia una vez aminoacilado se sugiere que esta es una forma en la cual los glucocorticoides pudieran tener efectos extragenómicos al modular la biosíntesis de proteínas y/o podrían participar en la vía ubiquitina (ruta de degradación proteica no lisosomal que requiere ARN de transferencia básicos) (Ferber y Ciechanover, 1986).

2) Otro mecanismo por el cual se puede explicar la reducción en el tamaño y peso del complejo activo, es por proteólisis parcial del mismo.

Algunos resultados muestran la estabilización del receptor inactivo con leupeptina (un inhibidor de proteasa). Aunque Hsieh, et al, (1987), han encontrado que el efecto inhibitorio de la

leupeptina se debe a que impide la unión de la hormona al receptor ya que tiene un sitio de unión común en el receptor y compete por él.

Otros inhibidores de proteasas incluyendo la tirosil-fenilalanina clorometil cetona, tosilisina clorometil cetona y trans-epoxisuccinilleucilarginina han sido reportadas como inhibidores de la unión del esteroide en el receptor.

3) Defosforilación del receptor. Las observaciones de que los inhibidores de fosfatasa semejantes a molibdato, tungstato y vanadato, estabilizan el receptor de glucocorticoides y bloquean la activación, sugieren que esos compuestos pueden actuar indirectamente y bloquean la acción de las fosfatasa. También se ha reportado que la activación del CRG es estimulado por incubación con fosfatasa alcalina intestinal de ternera y ya que el receptor es una fosfoproteína, se ha propuesto por lo tanto que la activación del complejo podría involucrar una defosforilación del receptor.

Los estudios que han realizado Moudgil *et al*, (1984) sugieren que los efectos del molibdato y compuestos relacionados son debidos a su interacción directa con el receptor. Encontraron que el molibdato es capaz de inhibir la unión del CRG activado al núcleo y a columnas de ADN-celulosa, y que el complejo puede ser extraído de estos aceptores por molibdato de una manera dependiente de la concentración; también cuando usan columnas de molibdato sefarosa pueden retener al CRG.

Además otros inhibidores de fosfatasa como el levamisole, fluoruro y arsenato, no previenen la activación.

El grupo de Moudgil argumenta que sólo con altas concentraciones de fosfatasa alcalina se logra aumentar la activación y además varios compuestos fosforilados incluyendo ATP aumentan la activación del CRG, por lo tanto descartan la posibilidad que una defosforilación intervenga en la activación del CRG.

Smith *et al*, (1986), examinaron el CRG por electroforesis de dos dimensiones, encontraron que en estado inactivo hay dos isoformas ($pI= 5.7$ y $6.0-6.5$) de 92 KDa. Después de la activación el pI de ninguna de las dos isoformas fue alterado, indicando que no hay una modificación de uniones covalentes.

Tampoco detectaron cambio cuando trataron el CRG con fosfatasa alcalina. Si bien encontraron que sólo la forma más básica de las dos isoformas se unía a columnas de ADN-celulosa, por lo tanto concluyeron de sus estudios que la heterogeneidad de la carga de la molécula puede ser importante en la regulación de la habilidad del receptor para unirse al ADN.

Smith y Harmon (1987), detectaron las dos isoformas en un fragmento de 26,5 KDa, del receptor producido por digestión con tripsina y que es el dominio al que se une la hormona, esto indica que la heterogeneidad del receptor es el resultado de una modificación en este dominio.

También Mendel *et al*, (1987), al trabajar con células de timo de ratón WEHI-7 y análisis por electroforesis en gel de poli-acrilamida, encontraron que el complejo CRG contiene cinco moles de fosfato por cada mol de hormona. La mitad está asociada a la proteína hsp 90 y la otra mitad al receptor. Las asociadas al receptor no cambian durante la activación.

El CRG puede ser activado in vitro por incubación a 25 °C con ATP, diálisis ó por cromatografía en gel. Es inhibido por rifamicina AF/013, o-penantrolina, fosfato de piridoxal (PLP) y ácido aurintricarboxílico, todos ellos inhibidores de enzimas del metabolismo de nucleótidos.

Algunos estudios proponen el PLP como un modulador del proceso de activación in vivo (DiSorbo et al, 1980; DiSorbo y Litwack, 1981; Compton y Cidlwski, 1986). Se ha mostrado que el PLP tienen un doble efecto sobre el complejo: mientras que promueve algunos de los cambios estructurales propios de la activación, inhibe la asociación del complejo a columnas de ADN-celulosa ó a núcleos aislados (Sekula et al, 1981 y 1982). DiSorbo et al, 1980 han reportado que una deficiencia de piridoxal aumenta la proporción del complejo capaz de activarse por calor. Además, la incubación de células de hepatoma (FAZA) en un medio sin piridoxina disminuye el nivel intracelular de PLP con un aumento concomitante en la inducción de la enzima Tirosina aminotransferasa.

Katunuma, et al, (1974 y 1977), encontraron dos moduladores de la activación de Proteus mirabilis del intestino de rata, estos dos moduladores aumentan la inducción de enzimas hepáticas por glucocorticoides. El primero denominado factor I se identificó como un derivado del nucleótido de uridina, de peso molecular menor de 1,000 que induce enzimas y la citotoxicidad de glucocorticoides en limfoblastos in vitro, y el segundo (el factor II) cuya estructura fue de guanosina 3'2'-o-difosfato cíclico, su actividad amplificadora se demostró en hígado perfundido y en cultivo de células de hepatoma, donde aumentó cinco veces la acumulación de glucógeno (Katunuma y Kido , 1978; Mukai, 1979).

Barnett et al, (1983), encontraron en citosol de hepatocitos de rata un inhibidor de la activación, de alto peso molecular (10,000 a 14,000). No se conoce su mecanismo de acción, pero posiblemente sea un polipéptido por su tamaño y su sensibilidad al calor. Y Bodine y Litmack (1988), encontraron un inhibidor de la activación de bajo peso molecular, termoestable en el citosol de hepatocitos, que por sus características químicas y físicas parece ser un éter aminofosfoglicérido .

1.5.3 TRANSLOCACION.

Después de la activación sigue una relocalización del complejo hormona-receptor hacia el núcleo vía un proceso llamado Translocación.

La Translocación es inhibida por el fosfato de piridoxal y por un inhibidor macromolecular de la translocación (MMT). También es influida por ATP, pirofosfato y otros factores de bajo peso molecular.

Yamamoto et al, (1986), han purificado parcialmente un promotor de la translocación estimulado por ATP (ASTP) del citosol de hepatocitos de ratas adrenalectomizadas.

El ASTP es una proteína de 93,000 de peso molecular. En ratas adrenalectomizadas la actividad del ASTP en el citosol aumenta y

cuando se les administra dexametasona, su actividad en el citosol disminuye, aumenta al mismo tiempo en el núcleo. Así proponen que esta proteína puede ser translocada al núcleo, después recicla, como el receptor de glucocorticoides y además es sintetizado de ovo ya que su reparación en el citosol es parcialmente inhibida por la actinomicina D.

Kido et al., (1987), encontraron que algunos activadores de la proteína Cinasa C, como el glicerol 1, 2 racémico dioctanil y el 12-o-tetradecanoilforbol-23-acetato, amplifican la inducción de la tirosina aminotransferasa y la ornitina descarboxilasa por glucocorticoides in vivo e in vitro, y que en ausencia de los glucocorticoides estos no afectan la actividad de ninguna de las dos enzimas.

Ellos mismos, al trabajar con hepatocitos en cultivo primario encontraron que el H-7 un inhibidor de la proteína Cinasa C, inhibe la translocación del complejo receptor-hormona al núcleo y consecuentemente inhibe la inducción de TAT por glucocorticoides, pero no inhibe la incorporación de glucocorticoides a la célula ó la unión de la hormona al receptor.

Estos hallazgos indican que la proteína Cinasa C, podría jugar un papel esencial en la translocación del CRG al núcleo.

1.5.4 REGULACION DE LA EXPRESION GENOMICA.

Smith y Vonn Holt (1981), encontraron que la envoltura nuclear de los hepatocitos de rata, presentan sitios de alta afinidad y saturables para el CRG. Lefebvre et al., (1986), concluyeron de sus trabajos con envoltura nuclear de hepatocitos de rata, que este sitio de unión está localizado específicamente en la membrana nuclear y no en el complejo de poro ó en la lámina fibrosa.

Se sabe también que el CRG se asocia con la matriz nuclear, por medio de puentes disulfuro (Kaufmann et al., 1986). Lo que sugiere la posibilidad de control por agentes que modifiquen esta interacción (Grippe et al., 1986).

Perlmann y Wrange (1988) demostraron que un nucleosoma reconstituido, con histonas de hígado de rata y un fragmento del virus de tumor mamario de ratón, fue capaz de unir específicamente CRG, además al dirigir con ADNasa I encontraron que el CRG induce alteraciones locales en este ADN organizado en nucleosomas.

Los glucocorticoides regulan la transcripción de varios genes, por una interacción directa del complejo hormona-receptor con sitios específicos y de alta afinidad en el ADN.

La unión del complejo receptor-hormona a un loci genómico específico, fue primero demostrado en Drosophila donde se encontró que el anticuerpo anti-ecdisona se unía a porciones específicas del ADN en las cuales la transcripción era estimulada por la ecdisona (Parcker, 1986).

Los estudios posteriores con fusión de genes y delección de segmentos específicos del ADN, aunado con análisis de la expresión de estos recombinantes dependientes de glucocorticoides, han podido identificar secuencias que median el

control transcripcional de diversos genes como el de la tirosina aminotransferasa (TAT) (Jantzen et al, 1987 (a)), el del virus mamario de ratón (Buetti y Kühnel, 1986; Kühnel et al, 1986; Sheldreit y Beato, 1984), el de metallothionein 11A (Jantzen, et al, 1987(b)), el de la triptofano dioxigenasa (Danesh, et al, 1987), etc.

Los análisis de la interacción de proteína-ADN y con técnicas de secuenciación genómica, han mostrado que estas regiones son protegidas contra la digestión de la ADNasa I y que su reactividad al dimethylsulfato cambia después de la administración de la hormona, esto sugiere que el complejo hormona-receptor se une a esos sitios específicos a los cuales se les da el nombre de elementos que responden a glucocorticoides (ERG).

Al comparar las secuencias ERGs de varios genes (figura 7), se encontró que existe homología entre ellas. Así es identificada una secuencia consenso, que consiste en un palindroma imperfecto de 15 nucleótidos (GGTACA NNN TGTCT) que son conservadas en los diferentes genes con una frecuencia de 60% ó más (Jantzen et al, 1987(a)).

Los ERG se encuentran antes del promotor a diferentes distancias, por ejemplo en el gen de la tirosina aminotransferasa uno de sus ERG esta a 2.5 Kb antes del sitio de iniciación de la transcripción, en cambio en el virus mamario de ratón está a 0.1 Kb.

Cada gen puede poseer más de un ERG, así en el virus de tumor mamario de ratón (MMTV) se han encontrado cuatro (Douglas y Cidowski, 1987; Kühnel et al, 1986) y en el gen de TAT tres (Jantzen et al, 1987(a)).

Una nueva propiedad que se ha descubierto entre dos ERG del gen de TAT es su habilidad para activar la transcripción de una manera cooperativa, donde uno de ellos es incapaz de inducir por sí sólo la transcripción, pero aumenta considerablemente la inducibilidad del otro. También encontraron que hay un aumento de su inducibilidad cuando los dos elementos son translocados a un lugar más cercano del promotor (Jantzen et al, 1987 (a)).

Los experimentos de transferencia de genes, demostraron que los recombinantes preparados de fragmentos que contienen ERG pueden conferir expresión a genes heterólogos regulados por glucocorticoides (Douglas y Cidowski, 1987), así cuando el ERG del gen de la tirosina aminotransferasa ó del virus de tumor mamario de ratón, son puestos antes del gen del virus del herpes simple (HSV) ó del de timidina cinasa (TK), resultan ser funcionales (Slater et al, 1986; Jantzen et al, 1987 (a)).

Aunque los ERG tienen parecido a las secuencias "enhancer" o amplificadoras, identificadas primero en virus y subsecuentemente en genes celulares, Slater et al, (1986), mencionan tres diferencias fundamentales entre ambos tipos de secuencias: la acción de los ERG requieren el complejo receptor-glucocorticoide; los ERG no tienen efectos tan grandes como los amplificadores y por último la ARN polimerasa se une a los amplificadores y entonces viaja hacia el promotor, en vez de ello, se piensa que en los ERG se une el complejo hormona-receptor perturbando la estructura de la cromatina y se crea así accesibilidad a la entrada bidireccional de la ARN polimerasa, existiendo así una

TAT -2515 CTCTGC T G T A C A GGA T G T T C T AGCTAC -2489
 TAT -2420 TACGCA G G A C T T GTT T G T T C T AGTCTT -2446
 TDO -1174 TGCTCC C T T T C A TGC T G T C C T GGCCCA -1200
 TDO -439 CTCATA T G C A C A GCG A G T T C T AGTGAG -413
 hMT -268 GCACCC G G T A C A CTG T G T C C T CCCGCT -242
 MSV -245 TTCAGC T G T T C C ATC T G T T C T TGGCCC -271
 MSV -171 CATCTG G G G A C C ATC T G T T C T TGGCCC -191
 hGH + 87 CCTTTG G G C A C A ATG T G T C C T GAGGGG +113
 MMTV -187 TTTATG G T T A C A AAC T G T T C T TAAAAC -161
 MMTV -134 TGGMTT G G T A T C AAA T G T T C T GATCTG -108

G 121123 6 8 1 - - - 323 - 10- - - - 363313

A -213-2 - - 1 7 - 6 523 1 - - - - 331131

T 543451 3 2 6 2 2 1 151 9 -10 7 -10 3-3122

G 425234 1 - 2 1 8 3 113 - - - 3 10- 113544

SECUENCIA

CONSENSO

G G T A C A N N T G T T C T

Figura 7. Secuencias de ERG que han sido identificadas de diversos genes. TAT (tirosina aminotransferasa); TDO (triptofano dioxigenasa); hMT (metalotioneina; MSV (virus sarcoma murino); hGH (hormona de crecimiento); MMTV (virus de tumor mamario de ratón) (Jantzen et al., 1987).

diferencia fundamental en su mecanismo de acción (Slater et al, 1986).

Los ERG frecuentemente se presentan acompañados de otras secuencias que unen factores de transcripción. Así por ejemplo el análisis de la inducción del gen de triptofano dioxigenasa, reveló la presencia de secuencias adicionales al sitio de unión del receptor de glucocorticoides, una secuencia de once nucleótidos idénticos a la secuencia CACCC del promotor de β -globina, posiblemente por una interacción proteína-proteína entre el receptor de glucocorticoide y la proteína que se une a la secuencia CACCC, ya que se encontró que es indispensable un alineamiento estereoespecífico de las dos secuencias y además la secuencia CACCC por sí misma no afecta la unión del receptor de glucocorticoide al ADN (Schule et al, 1988).

También el sitio de unión de alta afinidad del factor nuclear I (FNI(TGGCA NNN TGCCCA)), se encuentra próximo al ERG del virus de tumor mamario de ratón. Miksicek et al, (1987), al introducir mutaciones en esta secuencia, que abolían la capacidad de unir al FNI, encontraron que decrecía la inducción de la transcripción con glucocorticoides, probando así la importancia de esta proteína nuclear en la actividad del glucocorticoide.

Strähle et al (1988), demostraron, que al poner un ERG cerca de la secuencia TATA (a 15 pb) del promotor de la timina Cinasa, este ERG confería inducibilidad con glucocorticoides, esto sugiere que el receptor de glucocorticoide en conjunción con proteínas que se unen a la secuencia TATA es capaz de formar un complejo activo de transcripción. Cuando el ERG era insertado a 351 pb arriba del sitio de transcripción del gen de la tirosina aminotransferasa no fue inducido a menos que se insertara otro ERG ó la secuencia CCAAT. Las mutaciones en esta última secuencia abolieron la inducibilidad con glucocorticoides, esto indica una acción sinérgica del receptor con los factores que reconocen la secuencia CCAAT. Y no sólo esta secuencia (CCAAT) fue eficiente sino también la secuencia CACCC, sitios que unen FNI y a al factor de transcripción SPI. Así son varios los factores de transcripción que actúan sinérgicamente con el receptor de glucocorticoides. La actividad de esos elementos fue dependiente de la línea celular en la cual los transcritos fueron analizados, posiblemente por la presencia y/o la abundancia del factor particular en la línea celular probada.

En estudios con el gen MMTV, se ha visto que la hormona induce la aparición de sitios hipersensibles a la nucleasa S1 cerca de la unión del complejo ADN y también induce un aumento en la sensibilidad a la ADNasa I. Se sabe también que los glucocorticoides inducen rápidamente y de una manera reversible, un aumento ó decremento en la capacidad de la cromatina a unir ARN polimerasa bacterial (Slater et al, 1986).

El mecanismo por el cual los glucocorticoides inhiben la transcripción de ciertos genes ha sido menos estudiado. Akerblom et al, 1988, al realizar estudios sobre la regulación negativa de la expresión del gen de la subunidad α de la hormona glucoproteica humana (gonadotropina) por glucocorticoides, in vitro, encontraron que tal regulación negativa ocurre por interferencia con la unión ó función de la(s) proteína(s) que se unen a los elementos que responden al AMPc, ya que se superponen

las secuencias del ADN que unen el receptor de glucocorticoide y las secuencias que responden a AMPc, así al unirse el complejo receptor-glucocorticoide de causa interferencia con la unión ó acción de otras proteínas cruciales para la expresión de este gen.

Algunos modelos sobre la interacción del complejo receptor-esteroide con el ADN se han formulado con base en la estructura química tridimensional de las moléculas (Sluyer, 1983; Bransome et al, 1985; Hendry et al, 1980). Por la analogía estructural entre los esteroides y el par de bases timina-adenina en el ADN se ha sugerido la posibilidad de que la hormona podría insertarse en el ADN y formar uniones de hidrógeno con éste después que el complejo receptor-hormona se ha unido al ADN. Estos estudios se realizaron con modelos y programas de computación.

1.6 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDE.

1.6.1 ESTRUCTURA.

La proteína receptora, es un polipéptido de 777 aminoácidos (Picard y Yamamoto, 1987), con un peso molecular de 94,000 Daltones determinando, por electroforésis en gel SDS, un radio de Stockes de 6.0 nm, determinado por filtración en gel en Sephadex 6-200, su punto isoelectrico es de 5.8 (Carlstedt-Duke et al, 1984). Es codificada por un ARN de 4.8 Kb (Hollenberg, et al, 1985).

Está compuesto de tres dominios (figura 8) que fueron separados por digestión parcial con proteasa, (tripsina, a-quitripsina y papaína) (Carlstedt-Duke et al, 1984). El dominio inmunogénico, lo conforman aproximadamente los primeros 403 aminoácidos del extremo amino de la molécula, con un peso molecular aproximado de 45,000 Da y un radio de Stockes de 2.6 nm (Carlstedt-Duke et al, 1984). Con estudio in vitro y usando receptores mutados con deleciones en esta región (Stanley et al, 1987), se ha encontrado que si bien este dominio no es indispensable para la activación de la transcripción, su ausencia total ó parcial reduce la habilidad del receptor a inducir la activación. Godowski et al, (1987(a)), al trabajar con genes fusionados, se encontró que la región entre los aminoácidos 106 a 318, es indispensable para un buen funcionamiento del receptor.

Los anticuerpos que existen para el receptor se unen a este dominio (Okret et al, 1984); Gustafsson et al, 1984; Westphal et al, 1981).

Su función precisa no se conoce, posiblemente sirva de sitio de unión para otras moléculas ó tenga un papel estructural no específico. Gran parte de esta región probablemente se encuentra en la superficie de la molécula.

Un segundo dominio es aquel al cual se une la hormona. Se encuentra en el extremo carboxilo de la molécula receptora, consta de aproximadamente 245 aminoácidos (del residuo 532 al 777), con un radio de Stockes de 1.9 nm y un peso molecular de 27,000 Daltones (Carlstedt-Duke y Gustafsson, 1986). Stanley et

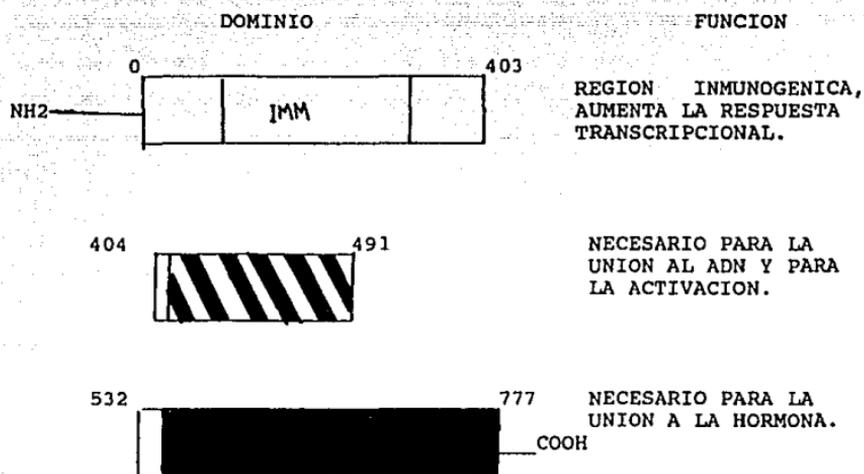


Figura 8. Dominios funcionales del receptor de glucocorticoides que han sido separados con digestión parcial con proteasa. (Stanley *et al*, 1987).

al (1987), con una combinación de ensayo de expresión transitoria y mutagénesis in vitro, encontraron que la delección de este dominio en el receptor de glucocorticoide humano, producía un receptor activo constitutivo, que induce la transcripción del gene fusionado MMTV-CAT, en presencia ó ausencia de dexametasona, revela así que este dominio normalmente tiene una función moduladora de la activación de la transcripción. Godowski et al, (1987(b)), también obtuvieron receptores constitutivos activos, cuando realizaron mutaciones en este dominio.

Pratt et al, (1988), al trabajar con receptores de glucocorticoides en humano con mutaciones en diferentes puntos, encontraron que este dominio y específicamente del aminoácido 532 al 697 tiene, las características estructurales necesarias para la formación del complejo 9 S, además esta región presenta alta homología entre los receptores de esteroides, proponen que pueda estar involucrada en la unión de la(s) proteína(s) 90 hsp, ya que las mutaciones en esta región impiden la formación del complejo 9S y presenta cinco cisteínas que posiblemente intervengan en la unión con otros componentes.

Se ha sugerido que los receptores truncados ó modificados en este dominio podrían tener un papel importante en la existencia de tumores (Green y Chambon, 1986; Sap, et al., 1986), así por ejemplo la proteína viral de la eritroblastosis (v-erb-A) que presenta una gran similitud con el receptor de esteroides y posiblemente funcione a nivel transcripcional por el mismo mecanismo de acción, amplifica el potencial de varios oncogenes primarios como el del v-erb-B, inhiben la maduración de los eritoblastos e inducen su propagación. Esta proteína no une su ligando, si bien es capaz de unirse al ADN, así podría ser un receptor alterado con potencia oncogénica (Weinberger et al, 1986; Green y Chambon, 1986).

El tercer dominio se puede identificar en la región central de la molécula receptora, consta de unos 88 aminoácidos (del residuo 404 al 491), de los cuales la mayoría son básicos. Esta región es rica en cisteínas (9 residuos) que se encuentran en una posición altamente conservada entre los receptores de esteroides.

En el factor de transcripción TFIIIA de Xenopus 5 S y en otras proteínas reguladoras que se unen a los ácidos nucleicos, se ha encontrado que presentan unas estructuras en forma de horquilla ("fingers") en sus moléculas, indispensables para su unión al ADN, estas estructuras se forman con zinc como cofactor y por coordinación tetraivalente de éste con las cisteínas e histidinas que contiene la molécula (Hollenberg et al, 1987; Nagai et al, 1988). Para el receptor de glucocorticoides específicamente se han encontrado evidencias que permiten suponer que en este dominio se formen estructuras análogas a estas (figura 9). Así Freedman et al, 1988 con uso de la espectroscopia con rayos X encontró que cada molécula de receptor contiene aproximadamente dos átomos de zinc, sus observaciones indican que cada átomo de zinc establece uniones con cuatro átomos de azufre de las cisteínas y forman un arreglo tetrahédrico.

La capacidad de unión del receptor de estrógeno a columnas de ADN-celulosa se pierde cuando se expone a quelantes del metal y se restaura con adición de zinc (Evans y Hollenberg, 1988). También los cambios en la posición de los residuos de cisteínas

RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDE

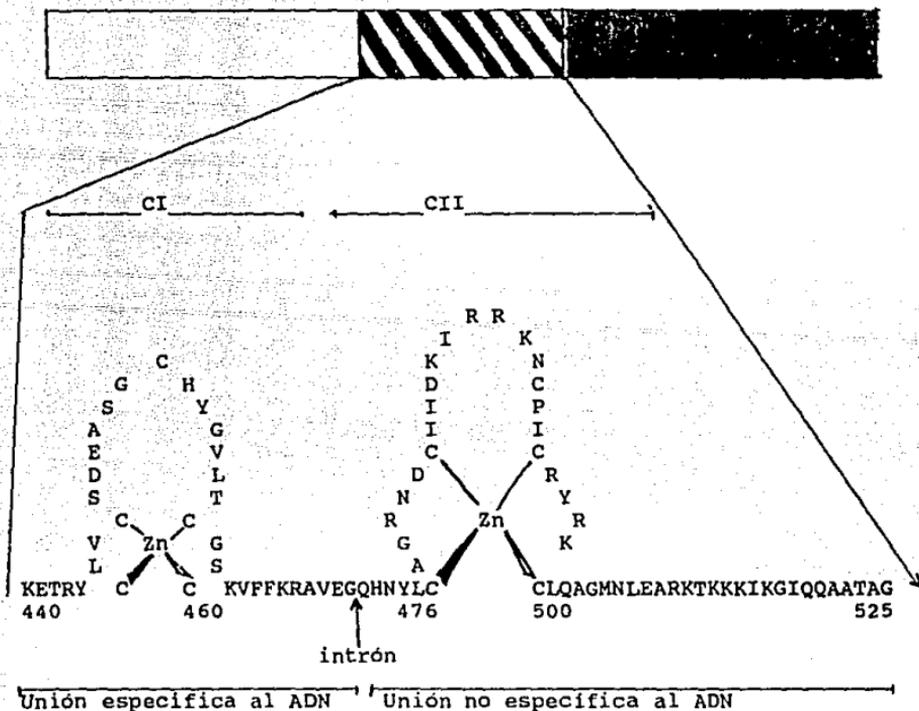


Figura 9. Coordinación propuesta para los átomos de zinc en el dominio que une el ADN del receptor de glucocorticoide. Se muestran las dos subregiones CI y CII, cada una contiene cuatro cisteínas altamente conservadas las cuales podrían coordinar tetrahédricamente el zinc para formar las estructuras en horquilla. Las regiones CI y CII están separadas por un intrón (Freedman *et al* 1988; Green *et al*, 1988).

por mutaciones en el receptor de glucocorticoide, causa una pérdida de la capacidad de unión al ADN, así como de la regulación transcripcional (Freedman et al, 1988).

Esta región puede subdividirse en dos subregiones: CI (C-X₂-C-X₁₃-C-X₂-C) y CII (C-X₅-C-X₉-C-X₂-C-X₀-C) donde cada subregión podría formar una estructura en horquilla. Aparentemente las dos subregiones son codificadas por dos exones separados que presentan un intrón intermedio (Green et al, 1988), al igual que el factor de transcripción TFIIIA donde sus 9 estructuras son codificadas en exones separados, esto sugiere que la estructura representa un sólo dominio que se une al ADN, el cual ha sufrido duplicación a través de la evolución.

Con receptores quiméricos donde la subregión CI ó CII del receptor de estrógeno era remplazado con la correspondiente región del receptor de glucocorticoide, se mostró que la primera región es la que juega el papel principal en la determinación de la especificidad al unirse al ADN. Se sugiere que esta región determina la especificidad de unión por contactos específicos con algunas ó todas las bases del ERG y que esta unión es estabilizada por contactos no específicos realizados por la estructura de la subregión CII (Green et al, 1988).

Si las nueve regiones en horquilla de TFIIIA se unen a 50 pares de bases, entonces cada estructura puede unirse a aproximadamente 5 pares de bases, ahora, si los ERG son palindromas de 5 a 6 pares de cada lado, separadas por 3 pares de bases intermedias, se puede suponer que el receptor pudiera unirse como dímero ó monómero y que cada estructura en horquilla reconoce una mitad del ERG (Green et al, 1988).

Este dominio posee una afinidad intrínseca por el ADN para formar un complejo ADN-proteína y tiene capacidad para activar la transcripción. Cualquier alteración en esta zona ocasiona la pérdida de las dos funciones. La presencia en un solo segmento de las dos funciones, hace la diferencia entre el receptor de glucocorticoide y otras proteínas reguladoras de la transcripción (por ejemplo: la proteína GCN 4 de levadura ó la proteína GAL4) donde estas funciones se encuentran en segmentos físicamente separados (Stanley et al, 1987).

El tamaño pequeño del dominio reduce la posibilidad que tenga una función enzimática modificadora de la molécula del ADN (como topoisomerasa girasa ó nucleasa), así la función de la activación de la transcripción parece ser una consecuencia de su unión al DNA (McDonnel et al, 1988). Godowski et al (1987(b)), cambiaron el dominio del receptor de glucocorticoide que une ADN por el de E. coli (Lx87) y encontraron que el receptor se unía a ADN y que si faltaba el dominio que une al ligando no había amplificación, tal vez por que impedía su unión con otras proteínas ó factores.

Las comparaciones entre la secuencia de aminoácidos del receptor de glucocorticoide, de estrógeno, de la vitamina D₃ (McDonnel et al, 1987; Becker, 1986) y la proteína viral v-erb-A (y su contraparte celular c-erb-A, receptor de las hormonas tiroideas), han revelado que estas proteínas tienen una gran similitud (figura 10 y 11). Así en la región que corresponde al dominio que se une al ADN conservan la posición de nueve cisteínas, entre el receptor de esteroides y el receptor de hormonas tiroideas, existe una similitud de 45 a 55%, entre el

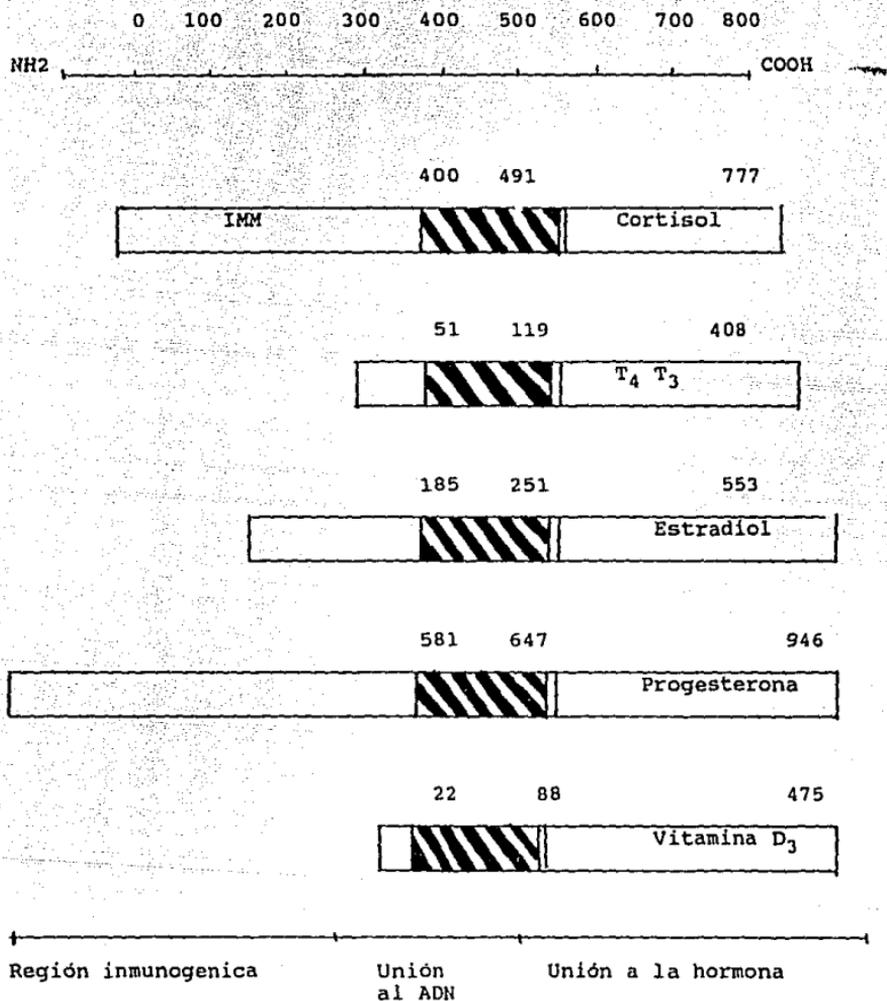


Figura 10. La comparación de receptores hormonales ha revelado que estas proteínas tienen una gran similitud. (Weinberg *et al.*, 1986; McDonnell *et al.*, 1988; Green y Chambon, 1986).

de progesterona un 62% y entre el receptor de glucocorticoide y el de progesterona se puede encontrar un 91% de similitud (Green y Chambon, 1986). En el dominio que une al ligando de los receptores de esteroides tienen idéntica hidrofobicidad y los receptores de la vitamina D y de hormonas tiroideas son más polares en este dominio, entre el receptor de esteroides y hormonas tiroideas hay una similitud del 20%. Entre el receptor de estrógeno y el de glucocorticoide un 55%. En el dominio inmunogénico el receptor de la vitamina D y el receptor de hormonas tiroideas son muy similares, en general estas dos proteínas están más relacionadas entre sí que con los receptores de esteroides (McDonnell et al, 1988). Se ha sugerido que formen una superfamilia de genes, cuyos productos sean proteínas reguladoras de la transcripción y algunas potencialmente oncogénicas (Green y Chambon, 1986; Weinberger et al, 1986). Por su similitud puede ser que tuvieran un origen común y tomando en cuenta que el receptor de la vitamina D y el de hormonas tiroideas son más simples y más semejantes podrían ser las más primitivas, así el receptor de hormonas tiroideas pudo surgir de la duplicación del gen del receptor de la vitamina D (o viceversa) y después otras duplicaciones pudieron dar origen al receptor de los esteroides (McDonnell et al, 1988).

6.2 LOCALIZACION.

Con la técnica de "footprinting" dimetilsulfato in vivo, el grupo de Becker (1986) demostró que el ERG del gen de TAT une más fuertemente al receptor cuando está presente la hormona, y protege los residuos de guanina del ERG, que no se logra cuando la hormona está ausente ó en presencia del antagonista RU38486.

En contraste Willman y Beato (1986), al trabajar in vitro con receptores de hígado de rata, encontraron que la hormona ó su antagonista no tenían efecto en las propiedades de unión del receptor al ERG del virus de tumor mamario de ratón, si bien era necesario precalentar a 25 C durante 30 minutos la preparación citosólica que contenía al receptor.

Tal parece que la hormona no es necesaria para que el receptor se una al ADN in vitro, mientras que in vivo sí. Green y Chambon (1986), proponen que in vitro el receptor está asociado con otras moléculas que inhiben su unión al núcleo y la unión de la hormona al receptor induce la disociación de tales moléculas y permite al receptor unirse al ERG.

La purificación extensiva del receptor in vitro ó el paso de calentamiento a 25°C podría sustituir la acción de la hormona e inducir artificialmente una conformación del receptor que es requerida para reconocer la secuencia específica del ADN y unirse a ella.

Wikstrom et al (1987), al trabajar con un anticuerpo contra el receptor en un estudio inmunocitoquímico encontraron que el receptor del glucocorticoide se localiza en el citoplasma y en el núcleo y que hay un aumento de éste en el núcleo cuando se agrega dexametasona, a diferencia del receptor de estrógeno y progesterona, que su localización es exclusivamente nuclear.

1.6.3 POBLACION HETEROLOGA DEL RECEPTOR.

A pesar de que el mecanismo de los glucocorticoides ha sido muy estudiado y que el receptor ha sido purificado y caracterizado, existen evidencias que indican que el proceso es más complejo y que más de un receptor está involucrado.

En el hipotálamo de rata han sido descritos al menos dos receptores diferentes para glucocorticoides (Sapolsky *et al.*, 1986). También se han encontrado receptores adicionales en núcleos de hígado de ratas hembras (Bechet y Perry, 1986).

Otro receptor diferente fue descrito por Hirota *et al.* (1987). Esta proteína parece mediar la inducción de la actividad de la triptofano dioxigenasa en hígado de rata, y difiere del receptor clásico en sus propiedades inmunológicas y fisicoquímicas, aunque el peso molecular de ambos receptores es similar.

1.7 EFECTOS POSTRANSCRIPCIONALES DE LOS GLUCOCORTICOIDES.

Se han reportado efectos postranscripcionales de los glucocorticoides.

También han sido reportados las acciones directas sobre el metabolismo (Nevis, 1983) y la estabilización de una serie de mensajeros en diferentes tipos celulares, (Guertin *et al.*, 1983; Guyette *et al.*, 1979). En células HTC infectadas con virus mamario de ratón, los glucocorticoides afectan la maduración y la compartimentalización de dos proteínas virales, por un mecanismo independiente de la respuesta transcripcional del virus (Firestone *et al.*, 1982). Este mecanismo requiere del funcionamiento normal del receptor y de la síntesis de ovo de ARN y proteínas.

En diferentes tipos de músculo (Kelly y Goldspink, 1982) y en músculo esquelético aislado (Mc Grath y Goldspink, 1982), se ha observado que la respuesta a los glucocorticoides es diferencial y que involucra alteraciones tanto en la síntesis como en la degradación de proteínas. Evidencia más directa de los efectos postranscripcionales de los glucocorticoides fue proporcionada por Snoek *et al.* (1981), que describieron un efecto de la dexametasona, insensible a la actinomicina D y que depende de un pretratamiento con AMP cíclico para que funcione.

Keller y col. (1982), mostraron, en células L de ratón, que la piridoxina bloqua la inducción de la glutamina sintetasa por dexametasona, pero no el contenido polisomal modificado ni la fosforilación de la proteína S-ribosomal.

2.1 FISILOGIA DEL HIGADO

Una vez que se absorben los nutrientes del tracto intestinal la mayor parte llegan directamente al hígado, que es el principal

centro de distribución de éstos en el metabolismo de los mamíferos. Tal vez el hígado sea el órgano que muestra una mayor flexibilidad metabólica, puesto que es el primero en recibir los nutrientes desde el intestino y tiene que ajustar sus actividades metabólicas a la composición variable de la mezcla de nutrientes y a la entrada discontinua o intermitente de ellos. El hígado funciona en el tratamiento y distribución de los nutrientes recibidos, así como en mantenimiento de su concentración constante en la sangre sistémica (Lehninger, 1982).

En el metabolismo de los hidratos de carbono el hígado efectúa las siguientes funciones específicas: almacena glucógeno; convierte la galactosa y la levulosa en glucosa; la gluconeogénesis y la formación de muchos compuestos químicos importantes partiendo de los productos intermedios del metabolismo glucídico. La mayor parte de estas funciones del hígado en el metabolismo de los hidratos de carbono son particularmente importantes, para mantener normal la concentración de glucosa en la sangre, funciona como un glucostato (Guyton, 1980).

En el metabolismo de los lípidos algunas de sus funciones específicas son: la beta oxidación de ácidos grasos y la formación de ácido acetoacético, de lipoproteínas, de colesterol y fosfolípidos y la conversión de grandes cantidades de hidratos de carbono y proteínas, en grasa.

El hígado almacena las vitaminas A, D y B₁₂. Forma gran parte de las sustancias de la sangre que intervienen en el proceso de coagulación (fibrinógeno, protombina, globulina aceleradora, proconvertina y otras). Y almacena la mayor parte del hierro en forma de ferritina.

Es el responsable de la formación de bilis para el proceso digestivo incluyendo la síntesis de compuestos mayores como los ácidos biliares. Es el órgano primordial de defensa bioquímica, elimina compuestos xenobióticos del organismo como los conservadores de alimentos, drogas, colorantes, partículas del medioambiente y sustancias adictivas como el etanol y la nicotina, por varios procesos de biotransformación. También regula los niveles periféricos de hormonas por medio de su degradación durante su paso por él (Jungermann, K. 1986 (a) y (b)).

Las funciones más importantes del hígado en el metabolismo proteico son: la deasaminación de aminoácidos; la formación de urea para suprimir el amoniaco de los líquidos corporales y opera a la vez así también como un regulador de pH y mantiene el balance ácido-base adecuado; la formación y degradación de proteínas plasmáticas (albúmina, transferrina, etc.); y en la interconversión entre los diferentes aminoácidos y otros compuestos importantes para los procesos metabólicos. Entre las funciones más importantes del hígado se halla su capacidad de sintetizar algunos aminoácidos y otros compuestos a partir de los aminoácidos. Por ejemplo los denominados aminoácidos no esenciales que pueden ser sintetizados por el hígado. Para ello se empieza por sintetizar un cetoácido que tiene la misma composición química que el aminoácido que debe formarse (excepto por el radical ceto). Luego se transfiere un radical amino a través de varias etapas de transaminación desde un aminoácido disponible al cetoácido para ocupar el lugar del oxígeno

cetónico.

En condiciones normales el hígado cataboliza más de la mitad de los aminoácidos exógenos, procedentes de la hidrólisis de las proteínas y de los peptidos alimentarios y los transforma en urea. Otra fracción de aminoácidos exógenos es utilizada por el hígado para sintetizar proteínas que emplea para su propia estructura y función y el resto pasa a la circulación general para difundir rápidamente en el espacio extracelular y facilitar su captación por los diferentes tejidos. En general funciona como un regulador de los niveles de aminoácidos en la sangre.

A grandes rasgos podemos decir que principalmente cinco factores regulan las funciones del hígado: la concentración de sustratos sanguíneos, los niveles hormonales, la inervación autonómica del órgano, la heterogeneidad zonal de los hepatocitos y las células no parenquimáticas.

El hígado consta de células del parenquima y por lo menos cuatro tipos de células no parenquimatosas (Kupffer, endoteliales, células Pit e Ito).

Histológicamente la células de parenquima tienen una apariencia uniforme la cual contrasta fuertemente con las funciones principales del órgano.

Histoquímicamente hay diferencias, estas pueden relacionarse con la unidad funcional y estructural del hígado. Siguiendo el recorrido de la sangre, pueden distinguirse por lo menos dos diferentes zonas, la zona perivenosa y periportal (centribular o eferente y pericentral o aferente respectivamente) las cuales están irrigadas con sangre rica o pobre en oxígeno, sustratos y hormonas.

Las células parenquimatosas de las dos zonas difieren en su equipamiento enzimático y estructuras subcelulares. En el modelo de la zonación metabólica, han sido propuestas diferentes funciones para cada zona.

El metabolismo de energía oxidativa, la oxidación β y el catabolismo de los aminoácidos, la ureagénesis la gluconeogénesis, la excreción de ácido biliar y la protección oxidativa están localizadas principalmente en la zona periportal.

Las enzimas glucogénicas: fosfoenol-piruvato carboxilcinasa, fructosa bifosfatasa, y glucosa-6-phosphatasa así como las enzimas ureagénicas carboxil-fosfato sintetasa predominan en esta zona.

La glucólisis, lipogénesis, la formación y biotransformación de glutamina están situadas principalmente en la zona perivenosa.

Las enzimas glicolíticas: glucocinasa y piruvato cinasa tipo-1 así como las enzimas glutaminogénicas: glutamina sintetasa predominan en la esta zona.

Esta heterogeneidad parece ser un prerrequisito para el funcionamiento normal del hígado. La heterogeneidad no es una propiedad inherente del parenquima hepático per se, esta se desarrolla gradualmente después del nacimiento y es dinámico ya que se altera bajo diferentes condiciones fisiológicas como por ejemplo cuando se realiza una hepatectomía, en estado de ayunas, y en presencia de diabetes (Jungermann, K. 1986 (a) y (b))

2.2 HEPATOCITOS EN CULTIVO COMO MATERIAL DE ESTUDIO.

Para el estudio de las diversas funciones del hígado, se requiere un buen sistema que reproduzca la actividad del hígado in vivo. Varios sistemas in vitro han sido probados. Desde los cortes de hígado que se usaron hasta los años cincuenta, pero el periodo experimental era limitado a pocas horas y las células presentaban alteraciones metabólicas, debido al daño causado al realizar los cortes y se perdía una gran proporción de la capacidad para la gluconeogénesis a partir del lactato ó aminoácidos y la oxidación de ácidos grasos a cuerpos cetónicos; los resultados obtenidos por este método eran poco confiables.

También se ha utilizado hígado perfundido que es un buen sistema pues las células conservan la mayoría de las funciones, pero el periodo experimental es también muy limitado y sólo pueden realizarse uno ó dos experimentos.

Cabe mencionar que ambos métodos tienen la desventaja que la actividad de las diferentes poblaciones de células hepáticas no pueden distinguirse (Ichiara, 1982).

En 1960 se cultivaron por primera vez células de hígado. Fueron células de hígado perinatal aisladas por tripsinización, que se establecían por períodos largos como líneas celulares. Como consecuencia estas células retenían pocas funciones propias de los hepatocitos. No se sabe si estas líneas celulares perdían sus características durante el cultivo ó si las líneas eran establecidas de células inmaduras ó no parenquimatosas. Algunas líneas eran transformadas y mostraban desviación en el número cromosómico. Las células de hepatoma cultivadas retienen varias funciones de los hepatocitos, como la inducción de la tirosina aminotransferasa por glucocorticoides, pero el número de estas funciones es limitado (Ichiara, 1982).

En 1969 Howard y Persh (Citado por Ichiara, 1982), aislaron células parenquimatosas de cortes de hígados aislados por digestión con colagenasa y hialuronidasa, obtuvieron una producción baja de células y como el tejido era incubado por 70 minutos, las células se dañaban.

El uso de esas enzimas para el aislamiento de células data desde 1957, cuando Lafargues las empleó en epitelio de glándula mamaria para ser usado en cultivo de tejido. En 1964 fueron muy usadas para el aislamiento de adipocitos.

En el año de 1969, Berry y Friends aislaron células por perfusión de hígado, permitiendo así que cada célula quedara expuesta a la acción de las enzimas. Obtuvieron diez veces más producción de células que las obtenidas por cortes de hígado.

Desde 1970 los reportes de estudios bioquímicos en esas células aisladas en fresco han aumentado rápidamente. Estas células si bien retienen funciones como urogenénesis y gluconeogénesis tienen fallas en otras funciones por ejemplo: el balance de nitrógeno es negativo ya que su catabolismo proteico está aumentado y la síntesis de proteínas del suero es baja (Seglen, 1977; Schwarze, 1980), presentan baja sensibilidad a varias hormonas probablemente debido a la pérdida de receptores membranales como los de insulina, glucagon etc (O'Connor-McCourt

et al., 1985).

La razón de estas fallas es el daño sufrido en las membranas celulares durante la digestión con la colagenasa. Así también las concentraciones de un número de metabolitos en las células preparadas en fresco son sustancialmente más bajas que en el hígado intacto, especialmente los aminoácidos; glutamina, glutamato, aspartato y alanina y la enzima glucosa-6-fosfato. Esta pérdida ocurre durante la preparación de las células ya que en la centrifugación, en particular, existe un suplemento inadecuado de oxígeno que causa la pérdida de algunos constituyentes celulares de bajo peso molecular (Ichihara, 1982).

Estos daños son reparados si las células aisladas son cultivadas de 6 a 24 horas antes de cada experimento, tiempo en el cual se recuperan las funciones propias de los hepatocitos. (Yamada et al. 1980).

El recambio proteico es anabólico después de dos horas de cultivo (Seglen, 1977), los hepatocitos en cultivo sintetizan proteínas del suero como: albúmina, fibrinogeno, transferrina, fibronectina, transcobalamin II, plasminógeno y hemopexina, entre otras.

Aún cuando los hepatocitos recién aislados conservan su región peribiliar intracelular rica en lisosomas y pobre en mitocondrias (Groothuis, 1981), durante el aislamiento pierden la especialización de la membrana plasmática. En cambio los hepatocitos en cultivo desarrollan características de diferenciación membranar por ejemplo la reconstitución de canalículo biliar y presencia de desmosomas que han sido observados en el microscopio electrónico (Yamada et al., 1980). La actividad específica de enzimas como la fosfatasa alcalina, la 5 nucleotidasa, y ATaasa son bajos en células recién aisladas, se reestablecen durante el cultivo, tanto en su nivel de actividad como en su localización específica alrededor del canalículo biliar (Jung et al., 1982).

Las glucoproteínas del glucocalix perdidas durante el procedimiento de aislamiento son recuperadas después de pocas horas en cultivo (Jaurengui et al., 1986). Aparecen los receptores de transferrina y la habilidad de unir Insulina y glucagon se recupera (Kishimoto y Tavassoli 1986; O'Connor-McCourt et al., 1985). A las cuatro horas de cultivo las células responden al factor de crecimiento epidérmico (Auberger et al., 1983) y a las dos horas de cultivo adquieren receptores β -adrenérgicos (Nakamura et al., 1984 (a y b)).

Los hepatocitos en cultivo retienen muchas enzimas específicas del hígado, como la triptofano dioxigenasa, tirosina aminotransferasa, serina dehidratasa, las cuales pueden ser reguladas por hormonas. Las enzimas del ciclo de la urea pueden ser inducidas por glucagon (Ichihara, 1982).

Gurr y Potter (1980) (Citado por Ichihara, 1982), notaron que las células frescas siguen mostrando las mismas influencias que in vivo, todavía por un tiempo después de la dispersión. Así al cultivarse unas horas antes del experimento se eliminan complicaciones de estas influencias, esto es muy importante cuando se trabaja con inducciones de enzimas con hormonas ya que es indispensable disminuir las influencias de hormonas endógenas. Por esto uno de los principales usos del cultivo de hepatocitos

es el estudio de los efectos hormonales. Además que permite trabajar por periodos lo suficientemente largos como para poder detectar sus efectos.

Una ventaja más del uso de hepatocitos cultivados en monocapa, es la posibilidad de poder cambiar facilmente el medio tanto cualitativamente como cuantitativamente.

Si bien el suero ha sido generalmente usado para promover y mantener la viabilidad de las células así como para inducir la adhesión celular al recipiente de cultivo y la dispersión de las células, poco se sabe acerca del efecto del suero por sí mismo en las actividades metabólicas de los hepatocitos. Un suero comercial fetal estéril para cultivo, contiene concentraciones anormales de ciertos metabolitos: por ejemplo tiene 5.02 mM de fructosa, 18 mM de lactato, 12.3 mM de bicarbonato y 4.93 mM de glucosa. Además contiene factores que todavía se desconocen (Horiuti *et al.*, 1982).

Se sabe que hay un factor del suero que conserva la viabilidad de las células. Se ha extraído de la glándula pituitaria bovina un compuesto con la misma función y se ha identificado como un inhibidor de tripsina, así es muy probable que la actividad de sobrevivencia del suero sea debida a la presencia de inhibidores de proteasa (como el inhibidor de a-2-plasmina ó leupeptina), que actúen sobre alguna(s) proteasa(s) de la membrana plasmática que participe en la degradación de proteínas que son importantes para mantener la integridad celular, ya que se ha visto que los inhibidores de proteasas que son efectivos para promover la sobrevivencia celular inhiben el 80% de la actividad de proteasa membranal de hepatocitos (Asami *et al.*, 1984; Nakamura *et al.*, 1984 (a); Katunuma *et al.*, 1984).

Yamada *et al.* (1981), encontraron que los hepatocitos cultivados en un medio sin suero (HI/W05/BA200) que es un medio rico en aminoácidos y por lo tanto inhibe la proteólisis presentan ventajas en algunas características morfológicas en comparación con aquellas células cultivadas en un medio con suero, como menor cantidad de gránulos intracelulares y una mayor viabilidad reflejada en una mayor exclusión por azul de tripan de las células, así como más eficacia en la adhesión y dispersión de las células en las cajas de cultivo. El medio sin suero es también más favorable para mantener la función de la membrana por largos períodos de tiempo ya que la toma de ácido a-aminoisobutírico y el porcentaje de síntesis de albumina fue mayor que en células cultivadas con suero.

Es posible mantener hepatocitos en cultivo en monocapa en buenas condiciones por una semana, después pueden presentar características de células no diferenciadas, como aumento de fetoproteínas y pérdida del citocromo P-450, si bien esto se ha logrado resolver de diferentes maneras, por ejemplo, poner al medio hormonas como insulina, dexametasona, ó biomatriz extracelular hepática (Kreamer *et al.*, 1986; Jauregui *et al.*, 1986; Enat *et al.*, 1984). Con levamisole se ha logrado elevar el citocromo P-450 (D'Engelman y Richardson, 1986). Jauregui *et al.* (1986), con medio de Chee han logrado mantener hepatocitos por largos períodos de tiempo en óptimas condiciones. Yeoh *et al.* (1986) al agregar Ultrosor G al cultivo en vez de suero, logran mantenerlos durante tres semanas en buen estado.

A veces en períodos largos de cultivo pueden presentarse las llamadas células claras, las cuales son diferentes morfológicamente a las células maduras y no retienen funciones del hígado. Su origen no es claro podría tratarse de células derivadas de células no parenquimatosas, células maduras dediferenciadas ó células parenquimatosas inmaduras.

Los hepatocitos de adultos en cultivo primario no muestran alguna señal de crecimiento celular, como aumento de síntesis de ADN ó número celular como los hepatocitos fetales ó neonatales. Si bien es posible que los hepatocitos de adultos se reproduzcan bajo condiciones apropiadas de cultivo. Si se agrega insulina, dexametasona, factor de crecimiento epidermal y prolactina, por ejemplo, la síntesis de ADN aumenta marcadamente y muestran un crecimiento celular, siempre y cuando se siembren a baja densidad, ya que se ha encontrado que existe un modulador superficial que controla la proliferación de hepatocitos de manera dependiente de la densidad celular, así cuando existe contacto célula-célula este modulador mantiene a los hepatocitos en un estado de fase G_0 en la cual las funciones del hígado específicas son expresadas al máximo y la proliferación celular es inhibida fuertemente. Cuando este contacto intercelular se rompe por algún daño como con la hepatitis viral, hepatectomía parcial, etc, la inhibición del crecimiento por el modulador cesa y los hepatocitos pasan de la fase G_0 a la G_1 en la cual las células pueden responder a factores de crecimiento y proliferar hasta que el contacto celular se reestablece (Enat et al, 1984: Nakamura et al, 1986).

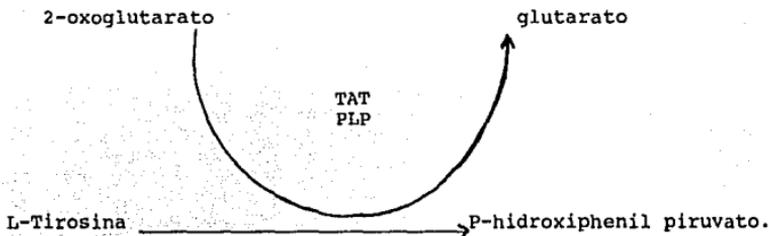
Schwarz et al, 1985, aislaron un factor de proliferación de hepatocitos del citosol del hígado en regeneración, Nakamura et al (1986), encontraron en las plaquetas de rata otro factor de crecimiento que estimula la síntesis del ADN en hepatocitos de rata adulta en cultivo.

3. DOS ENZIMAS HEPATICAS INDUCIBLES CON GLUCOCORTICOIDES (TAT Y TDO)

3.1 TIROSINA AMINOTRANSFERASA (TAT).

La tirosina aminotransferasa (L-tyrosina: 2-oxoglutarato aminotrasferasa E.C.2.6.1.5) es una enzima clave en el catabolismo de la tirosina, cataliza la reacción en la cual el grupo amino de la tirosina es transferido al átomo de carbono de su α -oxoácido, primera reacción en la vía en la cual la tirosina puede finalmente ser degradada a fumarato y acetato.

Probablemente prevee la acumulación de niveles tóxicos de tirosina en las células y también provee sustratos gluconeogénicos y cetónicos (Groenewald *et al*, 1984).



La TAT también cataliza la transaminación de varios aminoácidos aromáticos como fenilalanina y triptofano, pero en menor grado.

El α -cetoglutarato es el principal cetoácido aceptor del grupo amino de la tirosina. El 5'fosfato de piridoxal (PLP) y la peridoxamina son sus cofactores.

La TAT es un dímero de 50,000 Daltones cada subunidad, tiene un coeficiente de sedimentación de 5.9 S y un pI de 5.6.

La TAT existe solamente en el hígado, en estudios anteriores se reportó en riñón y cerebro pero parece ser la aspartato aminotransferasa que puede catalizar la misma reacción (Granner y Hargrove, 1983).

La TAT es regulada por varias hormonas, por ejemplo es inhibida por la hormona de crecimiento e inducida por glucagón, AMPc y glucocorticoides (Yoshida *et al*, 1986).

Su inducción por glucocorticoides, reportado inicialmente por Lin y Knox en 1957 (Citado por Groenewald *et al*, 1984) fue uno de los primeros ejemplos de control hormonal de enzimas en mamíferos.

Los glucocorticoides regulan la síntesis de TAT a nivel

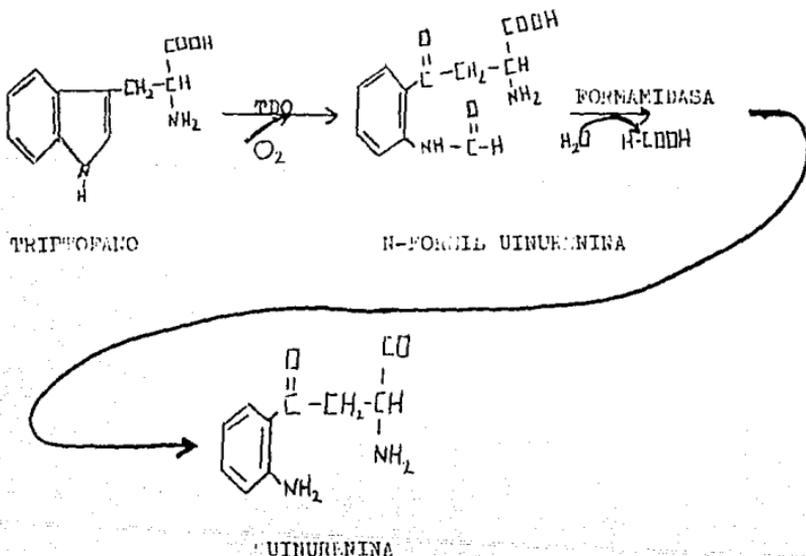
transcripcional ya que los inhibidores de la síntesis de proteínas inhiben su inducción, además la hormona causa un rápido aumento en la cantidad y actividad del ARN mensajero de la TAT, este aumento es paralelo al incremento de la actividad de la enzima (Granner y Hargrove, 1983).

En rata la actividad de la TAT aumenta justo después del nacimiento de una manera dependiente de la presencia de hormona adrenal. La actividad durante la vida fetal es muy baja, representa el 10 ó 20% del nivel encontrado en el hígado de ratas adultas. Doce horas después del nacimiento la actividad llega al doble, gradualmente baja hasta llegar al nivel normal.

3.2. TRIPTOFANO 2,3-DIOXIGENASA (TDO) (ó TRIPTOFANO PIRROLASA).

La triptofano 2,3-dioxigenasa (Tryptófano pirrolasa L-triptofano: oxígeno 2,3-oxidoreductasa, E.C.1.13.11.11) es una enzima que interviene en el catabolismo del triptofano.

La primera reacción en la degradación del triptofano es la oxidación de esta a la N-formilquinurenina, reacción catalizada por la TDO, emplea como oxidante, oxígeno molecular.



La TDO posee un grupo prostético ferroprotoporfirina IX, está constituida por cuatro subunidades, su peso molecular es de 103,000 Da.

Es una enzima inducible cuyos niveles en los tejidos de mamífero se elevan al administrarse triptofano ó glucocorticoides.

La inducción por glucocorticoides es el resultado de la estimulación de la síntesis del ARN mensajero específico que codifica para la TDO. Por el contrario, los niveles elevados que siguen de la administración de triptofano, se debe a una disminución en la velocidad de degradación de la enzima e incremento de la saturación de la enzima por el sustrato (White et al, 1983).

La TDO no está presente en el hígado de rata hasta el décimo día después del nacimiento, pero puede inducirse prematuramente por hormonas esteroides de la corteza adrenal.

En el metabolismo del triptofano se originan una gran variedad de sustancias entre las que se encuentran: la serotonina (un vasoconstrictor), la vitamina niacina que se requiere en la síntesis de NAD⁺ y NADP⁺ (Mahler, 1971).

OBJETIVOS

A) UNO DE LOS OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO ES EL REALIZAR LA CARACTERIZACION DEL COMPORTAMIENTO DE LA ENZIMA HEPATICA TIROSINA AMINOTRANSFERASA POR MEDIO DE:

i) LA OBTENCION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA INDUCCION DE LA TIROSINA AMINOTRANSFERASA POR DEXAMETASONA, UN AGONISTA SINTETICO DE LA ACTIVIDAD GLUCOCORTICOIDE.

ii) LA OBTENCION DE LA CINETICA DE INDUCCION DE LA TIROSINA AMINOTRANSFERASA POR DEXAMETASONA.

iii) DEL ESTUDIO DE LA INHIBICION DE LA INDUCCION DE LA TIROSINA AMINOTRANSFERASA POR LOS ANTAGONISTAS SINTETICOS RU38486 Y RU5020.

B) OTRO OBJETIVO ES EL ESTABLECER EL CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATA EN MONOCAPA POR LAS VENTAJAS QUE OFRECE EN ESTE TIPO DE ESTUDIOS, YA QUE LAS CELULAS EN ESTE SISTEMA RETIENEN VARIAS FUNCIONES PROPIAS DE LOS HEPATOCITOS. SE PUEDE CAMBIAR EL MEDIO DE CULTIVO TANTO CUALITATIVA COMO CUANTITATIVAMENTE Y TRABAJAR POR PERIODOS DE TIEMPO LO SUFICIENTEMENTE LARGOS PARA MEDIR RESPUESTAS HORMONALES.

C) OTRO OBJETIVO ES EL REALIZAR UNA REVISION BIBLIOGRAFICA DE LOS GLUCOCORTICOIDES LO MAS COMPLETA POSIBLE.

III. METODO.

1) OBTENCION DE COLAGENA DE RATA.

Para aislar las fibra de colágena, a 10 colas de rata se les hizo una incisión en la piel (alrededor) cerca del extremo de la punta con una navaja, manualmente se rompieron las colas en ese punto. Se jaló hacia los lados hasta que las dos partes quedaron distantes, unidas solamente por las fibras de colagena descubiertas. Con ayuda de unas tijeras se cortaron y se recolectaron.

Para cada 4 g de fibras se realizó el siguiente procedimiento: se agitaron las fibras en 200 ml de agua destilada durante 1 hora y se desechó el agua. Se agregaron 300 ml de ácido acético 0.5 M y se dejó agitar una noche a 4 C, para disolver la colágena.

Se centrifugó una hora a 20,000 g. El sobrenadante se filtró con vacío, a través de un filtro Whatman #1. Se dializó por 24 horas a 4 C con tres cambios de agua destilada. Finalmente se diluyó 2 o 3 veces con agua destilada y se guardó a -5 C, hasta usarse.

2) RECUBRIMIENTO DE CAJAS DE PETRI CON COLAGENA DE RATA.

Para cubrir 40 cajas Petri (50 mm de diámetro), se prepararon 25 ml de la siguiente mezcla: a 10 ml de colágena se agregaron 10 ml de agua destilada y se disolvieron 0.35 g de medio Waymouths MB 752'1. Por separado se disolvieron 0,56 g de bicarbonato de sodio en 5 ml de agua.

Se juntaron las dos soluciones justo antes de empezar el recubrimiento de las cajas y se mantuvieron en hielo con agitación continua.

A cada caja Petri se le añadieron 500 ul de la mezcla y se expandieron por toda la base de la caja con agitación manual vigorosa, se recogieron entonces 400 ul (se formó así una capa delgada) sin dejar burbujas, ya tapadas se expusieron a luz ultravioleta de 15 a 30 minutos para esterilizarlas y se mantuvieron a 4 C, hasta usarse (nunca más de 24hrs).

3) AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATA.

Las células de hígado fueron aisladas en condiciones asépticas. El material utilizado fue esterilizado con autoclave por 15 minutos a una presión de 10 a 15 libras ó con gas (óxido de etileno) por 5 horas. Las soluciones empleadas fueron pasadas por un filtro millipore de 0.45 um de diámetro.

El area de trabajo y el instrumental quirúrgico se limpió con una mezcla de benzal/alchoho/agua (1/1/1) para desinfectarlo.

Se anesteciaron ratas macho Winstar de 200 g con pentobarbital de sodio ("anestésal") a una dosis de 200 ul, por vía intraperitoneal.

El hígado fue perfundido in situ, por la vena cava (entrada de flujo) y por la aorta (salida de flujo) se mantuvo la velocidad de flujo a 25 ml/minuto. Primero se hicieron pasar 100 ml de buffer Krebs (NaCl 120 mM; KCl 5 mM; KHP₄ 1.2 mM; MgSO₄ (-7H₂O) 1.2 mM; 2.5 ml de NaHCO₃ 1M y 1 gota de rojo de fenol cada 100 ml de buffer), más 50 mg de EDTA, oxigenado con CO₂ 5% y O₂ 95% a 37 C, con este volumen se eliminó la sangre. Después se perfundió con 100 ml de medio de perfusión (1.4 g de medio Waymouth MB/752/1; 8 mg de estreptomycinina 2 mg de penicilina; 0.22 g de bicarbonato de sodio, por cada 100 ml de medio de perfusión) equilibro también con CO₂ 5% y O₂ 95% a 37 C. Cuando quedaban 50 ml de medio se pusieron a recircular y se les agregaron 25 mg de colagenasa tipo IV. La perfusión se continuó por 25 a 30 minutos más.

El hígado fue entonces transferido a un vaso de precipitado con 50 ml de medio de lavado (0.7 g de medio Waymouth MB 752/1; 4 mg de estreptomycinina; 1 mg de penicilina y 1 ml de solución Hepes 1 M pH=7.6) con ayuda de dos cucharas de plástico las células fueron suavemente dispersadas, se filtró por una tela nylon. El filtrado se centrifugó 2 minutos a 600 rpm. El sobrenadante que contenía las células Kupffer y células muertas fue removido por aspiración. El botón con las células parenquimatosas fue resuspendido en 50 ml de medio de lavado y se repitió el procedimiento de centrifugación otras dos veces. Finalmente el botón celular se resuspendió en 50 ml de medio de siembra (0.7 g de medio Waymouth MB 752/1; 4 mg de estreptomycinina; 1 mg de penicilina; 0.11 g de bicarbonato; 10% de suero fetal de ternera, por cada 50 ml de medio de siembra). Se sembraron 200 ul en las cajas Petri cubiertas con colágena y se llevó el volumen a 1 ml con medio de siembra. Las cajitas se colocaron en un envase cerrado a prueba de gas con un ambiente húmedo, esto último se logró al pasar el flujo de CO₂ 5% y O₂ 95% por un matraz con agua caliente antes de llegar al envase donde estaban las cajas Petri con los hepatocitos.

A las dos horas el medio de siembra fue aspirado y sustituido con medio de mantenimiento (1.4 g de medio Waymoth MB 752/1; 8 mg de estreptomycinina; 2 mg de penicilina y 3.3 ml de una solución albúmina/oleato (6%/15%) por cada 100 ml de medio de mantenimiento. Después de 18 horas este medio fue sustituido por medio de mantenimiento nuevo y se realizaron las inducciones hormonales.

Cuando se midió la actividad de TDO todos los medios contenían 2.5 mM de triptofano.

4) INDUCCIONES.

Cada determinación se realizó por triplicado y cada experimento se repitió un mínimo de 3 veces.

Experimento 1. Se agregó a cada cajita dexametasona (10⁻⁶ M) y se recolectaron las células cada dos horas durante 14 horas y posteriormente a las 24 horas. Como controles se colectaron células al inicio del

experimento y a las 12 horas, sin adición de dexametasona.

Experimento 2. Se agregó a cada cajita dexametasona a las siguientes concentraciones Molares: 0, 5×10^{-10} , 10^{-9} , 5×10^{-9} , 10^{-8} , 5×10^{-8} , 10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} . Fueron recolectadas doce horas después.

Experimento 3. Se agregó a cada cajita simultaneamente dexametasona (5×10^{-7}) y las siguientes concentraciones molares del antagonista sintético RU5020: 0, 10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} . Se recolectaron 12 horas después.

Experimento 4. Fue igual al anterior pero utilizando el antagonista RU38486 en vez de RU5020.

5) RECOLECCION DE CELULAS.

Se aspiró el medio de cultivo de las cajitas y se lavaron las células 2 veces con buffer PKB/salina (Buffer KH_2PO_4 50 mM pH=7.6; α -cetoglutarato 1 mM; 5'fosfato de piridoxal 0.1 mM; NaCl 0.9%) a 4 C. Finalmente se agregaron 500 ul de buffer PKB/salina y con ayuda de un émbolo de jeringa de plástico se recolectaron las células, raspando el fondo de las cajas de cultivo y se recolectaron con una micropipeta. Se llevó a un volumen final de 600 ul y se pusieron en tubos Eppendorf. Se guardaron a -80 C hasta su análisis.

Para la medición de la enzima TDO se utilizó el buffer TDO (fosfato de potasio 20 mM pH=7.0 con 2.5 mM de triptofano, 1.36 mg/10ml de methemoglobina y 0.9% de NaCl) para el lavado y la resuspensión de las células.

6) OBTENCION DEL CITOSOL.

Las células se lisaron por tres ciclos de congelamiento-descongelamiento y se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 rpm, el sobrenadante se usó para medir la actividad de las enzimas y proteínas. Hasta que se realizaron las mediciones el citosol fue mantenido a -80 C.

7) INDUCCION DE TDO IN VIVO

Se preparó una suspensión de triptofano (40 mg/ml) en 0.9% (m/v) de cloruro de sodio con Tween 80 al 0.1%. Se calentó la mezcla a 100 C con agitación y se dejó la solución enfriar lentamente, se mantuvo con movimiento, así el triptofano puede ser separado como una suspensión microcristalina. Se inyectó a

una dosis de 750 mg/Kg de peso corporal, intraperitonealmente con una ahuja hipodérmica del número 16.

La dexametasona se administró a una dosis de 100 mg/Kg de peso corporal, también intraperitonealmente.

A las 17 horas se anesteciaron 4 ratas (machos) de 200 g con éter. A una se le inyectó solo triptofano a otra sólo dexametasona, a la tercera se le inyectó triptofano más dexametasona, y la última se mantuvo sin inducción (control). Se repitieron las inducciones a las 8 horas del siguiente día y se sacrificaron las ratas tres horas después.

Se perfundieron los hígados con solución salina 0.9%, se transfirieron cada uno a un vaso de precipitado y se cortaron con tijeras en piezas pequeñas y después se homogenizaron en cuatro volúmenes de buffer de TDO (buffer de potasio 20 mM, pH=7.0; 2.5 mM de triptofano; 1.36 mg de methemoglobina por cada 10 ml de buffer) en un homogenizador con pistón de teflón. Se llevaron las muestras a una concentración de proteínas de 0.3 a 1.5 mg/ml para poder medir la actividad de TDO.

8) INDUCCION DE TAT IN VIVO

A las 17 horas se anestesiaron 2 ratas macho de 200 g con éter. A una se le inyectó intraperitonealmente dexametasona a una dosis de 100 mg/Kg de peso corporal y la otra se mantuvo sin inducción (control). Se repitió la operación a las 20 horas del siguiente día y se sacrificaron las ratas tres horas después.

Se perfundieron los hígados con solución salina 0.9%, se transfirieron cada uno a un vaso de precipitado y se cortaron en piezas pequeñas con tijeras, después se homogenizaron en cuatro volúmenes de buffer TAT (buffer fosfato 50 mM, α -cetogluturato 2 mM, 0.2 mM de fosfato de piridoxal; EDTA 1 mM, pH= 7.0) en un homogenizador con pistón de teflón. Se llevaron las muestras a una concentración de proteínas de 0.3 a 1.5 mg/ml para medir la actividad de TAT.

9) ENSAYO PARA LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE TDO (Metzler et al, 1982).

Este ensayo se basa en la formación de un compuesto, derivado aza de la kinurenina, que desarrolla un color lila que puede ser fácilmente medido en el espectrofotómetro.

Se incubaron 500 ul de cada muestra en baño María a 37°C con agitación. Después de 40 y 80 minutos fueron transferidos a tubos Eppendoeft que contenían 300 ul de la mezcla de etanol/ ácido perclórico 70%/ agua destilada (1/1/1) para completar la reacción de la TDO y para la hidrólisis de N-formilkinurenina a kinurenina. Se mantuvieron estos tubos 15 minutos más a 37°C. Después fueron transferidos a -12°C (agua/sal/hielo) por 5 minutos, se les agregaron 50 ul de una solución fría de nitrato de sodio al 5%, fueron incubados 15 minutos a -12°C. Subsecuentemente se agregaron 100 ul de sulfato de amonio al 10%

y se incubaron por otros 15 minutos a -12°C . Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 2 minutos y alícuotas de 550 μl del sobrenadante fueron entonces mezclados con 100 μl de una solución de dicloro de N-naftilenediamonio al 1.7%. Se mantuvieron a temperatura ambiente por dos horas o una noche a 4°C en la obscuridad. El derivado azo de la kinurena fue medido a 560 nm.

10) ENSAYOS PARA LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE TAT (Diamondstone et al, 1986).

Este ensayo se basa en la conversión de parahidroxifenilpiruvato en parahidroxibenzaldehído en presencia de KOH.

Se llevaron todas las muestras a un volumen de 200 μl con amortiguador TAT (buffer de fosfato 50 mM pH=7.6; EDTA 1 mM; albúmina 0.5 %).

Se preparó en el momento la siguiente mezcla: (para 20 tubos) 10 ml de la solución de tirosina (1.25 g/500ml pH= 7.6) más 5 ml de KH_2PO_4 (pH= 4.5 125 mM), 300 μl de α -cetoglutarato (0.5 M en buffer de fosfatos 50 mM pH= 7.6) y 30 μl de 5-fosfato de piridoxal (0.05 M de buffer de fosfatos 50 mM pH= 7.6).

Se incubaron las muestras y la mezcla a 37°C en baño María. Se agregaron a tiempo preciso 700 μl de la mezcla a cada uno. Se terminó la reacción a los 15 minutos con 100 μl de KOH 10 N.

Se incubaron 30 minutos a 37°C . Finalmente se leyeron a 331 nm y se compararon con el blanco (200 μl de amortiguador TAT).

11) CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY (Lowry et al 1951).

En el método de Lowry, la muestra es tratada con un reactivo alcalino con iones cúprico, fosfotungstato y iones fosfomolibdato. Se basa en la reacción de los péptidos con el cobre alcalino y la reacción del reactivo fosfomolibdato-fosfotungstato por la proteína tratada con cobre. La absorción luminosa resultante es proporcional aproximadamente al contenido de péptidos en la muestra.

Se preparó la siguiente mezcla en el orden mostrado. Un volumen de tartrato de sodio (2% v/v en agua) más un volumen de $\text{CuSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1%) y 100 volúmenes de carbonato de sodio anhidro (2% en NaOH 0.1N).

Se llevaron las muestras a 200 μl con agua destilada. Se añadió 1 μl de la mezcla de reactivo de follin y se esperaron 10 minutos. Se agregaron a cada muestra 100 μl de Follin diluido (50% en agua). Se esperaron 30 minutos y se leyeron a 700 nm contra el blanco. Se construyó una curva con albúmina sérica bovina de 0 a 50 mg. Con mínimos cuadrados se obtuvo la concentración de proteína de las muestras a partir de la D.O. y la curva patrón de albúmina.

IV RESULTADOS.

4.1 CULTIVO DE HEPATOCITOS.

4.1.1 Características morfológicas.

Las células fueron observadas al microscopio óptico durante todo el experimento. La integridad de la membrana celular fue analizada mediante la prueba de exclusión con azul de tripan.

Durante el cultivo las células perdieron su apariencia redonda como de recién aisladas (figura I.1 A), y adquirieron la morfología propia de los hepatocitos. Las membranas se expandieron, en la figura I.1 B pueden observarse que las células se unieron y formaron una monocapa.

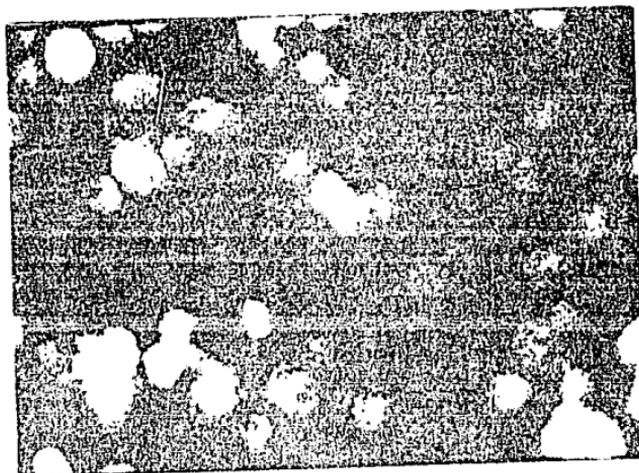
Pudimos constatar mediante la prueba de exclusión con azul de tripan que cualquier deterioro celular inicial se amplificaba grandemente durante el cultivo. Únicamente se formó la monocapa cuando la exclusión de la tinción fue superior al 95%, en cuyo caso, la viabilidad celular se mantuvo constante todo el tiempo que duraron los experimentos.

4.1.2. Características metabólicas.

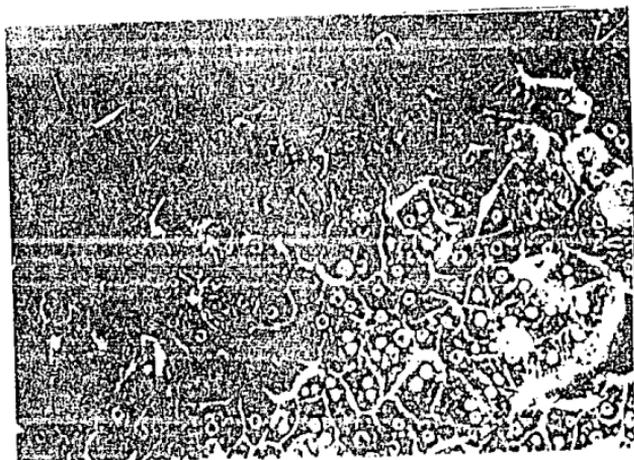
Para comprobar que las actividades enzimáticas en los hepatocitos en cultivo representan a las mediciones in vivo, se compararon las actividades de las enzimas tirosina aminotransferasa y triptofano dioxigenasa bajo diferentes condiciones experimentales.

En la tabla y figura I.2 puede observarse que en el hígado del animal in vivo la triptofano dioxigenasa es inducida tanto por triptofano como por dexametasona, fueron aditivos los efectos de ambos agentes. En células en cultivo los efectos de los inductores fueron muy similares en la actividad enzimática. Cabe mencionar sin embargo, que en las células en cultivo no fue posible medir la actividad enzimática en ausencia de triptófano. Esto ha sido reportado previamente.

La tabla y figura I.3 muestran los resultados comparativos de la actividad de la TAT in vivo e in vitro. Como puede observarse tanto en hígado del animal in vivo como en cultivo de hepatocitos la tirosina aminotransferasa es inducida por dexametasona.



A



B

Figura 1.1 Hepatocitos de rata, obtenidos por perfusión in situ con colagenasa y cultivados (A: por 2 horas y B: por 20 horas) como se describe en la sección de método. Vistas al microscopio óptico 100 X.

	Actividad TDO (mU/ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad Especifica TDO. (mU/mg)
A. In vivo:			
Control	0.12 ± 0.04	3.96 ± 0.06	0.03 ± 0.008
Trp	0.23 ± 0.01	3.86 ± 0.29	0.06 ± 0.008
DXM	0.47 ± 0.07	3.67 ± 0.08	0.13 ± 0.02
Trp + DXM	0.75 ± 0.06	3.59 ± 0.11	0.21 ± 0.02
B. En cultivo:			
Trp	0.13 ± 0.02	2.30 ± 0.04	0.057 ± 0.01
Trp+DXM(a)	0.35 ± 0.03	1.67 ± 0.06	0.21 ± 0.01
Trp+DXM(b)	0.50 ± 0.04	2.13 ± 0.19	0.26 ± 0.02

Tabla I.2 Actividad especifica de la enzima TDO en higado de rata in vivo ó en cultivo de hepatocitos, bajo diferentes condiciones experimentales.

In vivo: control ; Trp (con 750 mg de triptofano/Kg de peso) ; DXM (con 10mg de dexametasona/Kg de peso); Trp + DXM (con ambos a las concentraciones antes señaladas). Se administraron por via intraperitoneal en dos dosis (17 horas y a las 8 horas del día siguiente) tres horas despues de la segunda dosis las ratas fueron sacrificadas y el higado fue homogenizado y analizado. Se midieron la actividad de TDO y las proteínas. Cada determinación se realizo por triplicado , se presenta el promedio y la desviación estandar.

En cultivo de hepatocitos: Trp (con 2.5 mM de triptofano); Trp + DXM (con 2.5 mM de triptofano y 10^{-6} M (a) ó 10^{-5} M (b) de dexametasona. Las células se recolectaron 12 horas despues de la inducción, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midieron la actividad de TDO y las proteínas. Cada determinación se realizo por triplicado, se presenta el promedio y su desviación estandar.

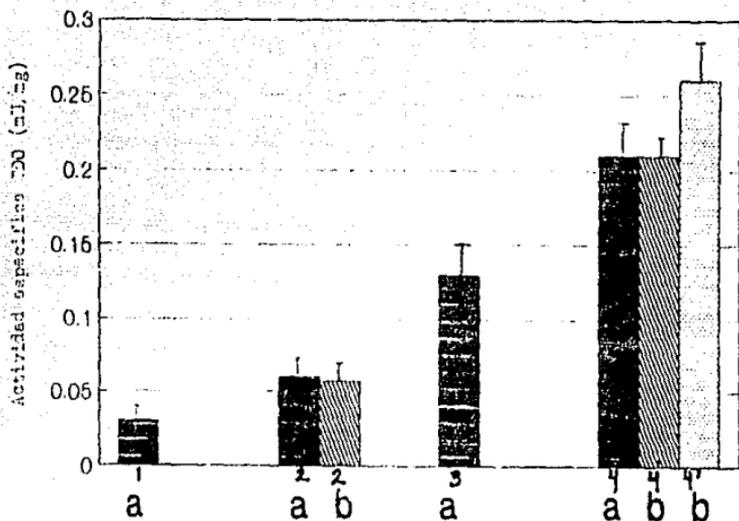


Figura I.2 Actividad específica de la enzima TDO en hígado de rata *in vivo* ó en cultivo de hepatocitos, bajo diferentes condiciones experimentales.

In vivo (a): (1) (sin inducción); (2) (con 750 mg de triptofano/Kg de peso); 3 (con 10mg de dexametasona/Kg de peso); 4 (con ambos a las concentraciones antes señaladas). Se administraron por vía intraperitoneal en dos dosis (17 horas y a las 8 horas del día siguiente) tres horas después de la segunda dosis las ratas fueron sacrificadas y el hígado fue homogenizado y analizado. Se midieron la actividad de TDO y las proteínas.

En cultivo de hepatocitos (b): (2) (con 2.5 mM de triptofano); (4) (con 2.5 mM de triptofano y 10^{-6} M (4) ó 10^{-5} M (4')) de dexametasona. Las células se recolectaron 12 horas después de la inducción, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midieron la actividad de TDO y las proteínas.

	Actividad TAT (mU/ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad específica TAT (mU/mg)
A. In vivo:			
Control	0.78 ± 0.07	3.27 ± 0.20	0.23 ± 0.05
DXM	1.96 ± 0.10	2.30 ± 0.26	0.85 ± 0.04
B. En cultivo:			
Control	0.23 ± 0.05	2.28 ± 0.12	0.10 ± 0.02
DXM	1.98 ± 0.09	2.04 ± 0.10	0.98 ± 0.01

Tabla I.3 Inducción de la TAT por dexametasona en hígado de rata ó en cultivo de hepatocitos.

In vivo(A): Control y DXM (con 10 mg de dexametasona/Kg de peso), se administraron intraperitonealmente dos dosis (a las 17 y 8 horas del día siguiente), las ratas fueron sacrificadas tres horas después de la segunda dosis, el hígado fue homogenizado. Se midieron la actividad de TAT y las proteínas. Se presenta el promedio de tres determinaciones y la desviación estándar.

En cultivo(B): Control y DXM (con 10^{-6} M de dexametasona), las células fueron recolectadas 12 horas después de la inducción, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midieron la actividad de TAT y las proteínas. Se presenta el promedio de tres determinaciones y su desviación estándar.

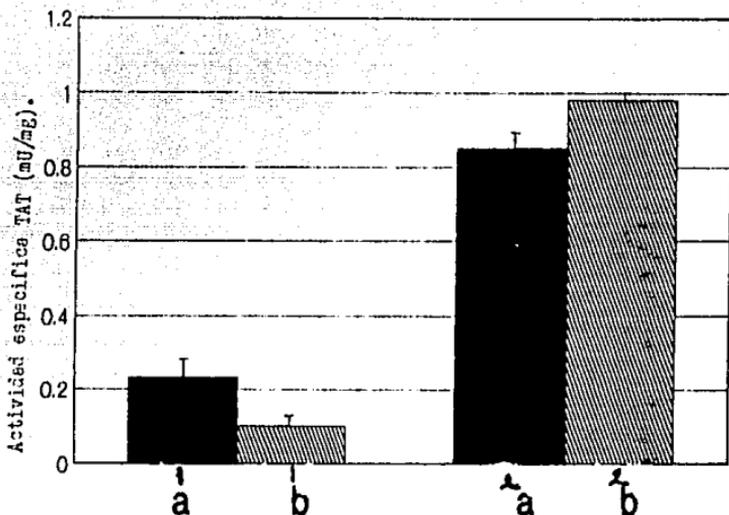


Figura I.3 Inducción de la TAT por dexametasona en hígado de rata in vivo o en cultivo de hepatocitos.

In vivo (a): (1) Control y (2) DXM (con 10 mg de dexametasona/Kg de peso), se administraron intraperitonealmente dos dosis (a las 17 y 8 horas del día siguiente), las ratas fueron sacrificadas tres horas después de la segunda dosis, el hígado fue homogenizado. Se midieron la actividad de TAT y las proteínas.

En cultivo (B): (1) Control y (2) DXM (con 10^{-6} M de dexametasona), las células fueron recolectadas 12 horas después de la inducción, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midieron la actividad de TAT y las proteínas. Se representa la desviación estándar y el promedio. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.2 INDUCCION DE LA TAT POR DEXAMETASONA.

4.2.1 Cinética de inducción.

La tabla y figura II.1 muestran la cinética de inducción de la TAT por el efecto a la dexametasona. Como puede observarse el nivel basal se mantuvo constante lo que indica el buen estado metabólico de las células. En cuanto a la inducción de la actividad enzimática, esta siguió un comportamiento sigmoideal, como se esperaría. El período latente fue de dos horas y la actividad máxima fue a las 12 horas y se mantuvo constante hasta 24 horas.

4.2.2 Curva-dosis respuesta.

La tabla y figura II.2 muestran que la actividad de la enzima alcanzó su máximo de inducción a una concentración de 1 μM de dexametasona.

Para los estudios de antiinducción se tomó la concentración de 0.1 μM de dexametasona dado que con esta concentración se alcanzó un 70% de inducción de la enzima y el efecto competitivo de los análogos pudo observarse más claramente.

Tiempo	Actividad TAT ($\mu\text{U/ml}$)	Proteínas (mg/ml)	Actividad específica TAT ($\mu\text{U/mg}$)
0	0.18 ± 0.04	2.15 ± 0.19	0.08 ± 0.02
2	0.20 ± 0.02	2.10 ± 0.04	0.10 ± 0.01
4	0.78 ± 0.15	2.20 ± 0.02	0.35 ± 0.07
6	1.24 ± 0.12	2.22 ± 0.16	0.56 ± 0.01
8	1.02 ± 0.10	1.55 ± 0.22	0.66 ± 0.04
10	1.45 ± 0.04	1.93 ± 0.05	0.75 ± 0.02
12	1.78 ± 0.03	1.80 ± 0.07	0.99 ± 0.03
14	1.89 ± 0.06	1.93 ± 0.16	0.99 ± 0.07
24	1.36 ± 0.06	1.67 ± 0.02	0.82 ± 0.03
12 N	0.18 ± 0.04	2.03 ± 0.05	0.09 ± 0.02
24 N	0.13 ± 0.02	1.67 ± 0.36	0.08 ± 0.01

Tabla II.1 Inducción de TAT con dexametasona, en cultivo de hepatocitos de rata. Después de 20 horas de incubación se agregó al medio de cultivo dexametasona a una concentración de 10^{-6} M y se recolectaron las células en los tiempos indicados, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midieron la actividad de TA y las proteínas. Se mantuvieron muestras sin inducción a las 12 y 24 horas (12 N y 24 N). Se presenta el promedio y desviación estandar. Cada determinación se realizó por triplicado.

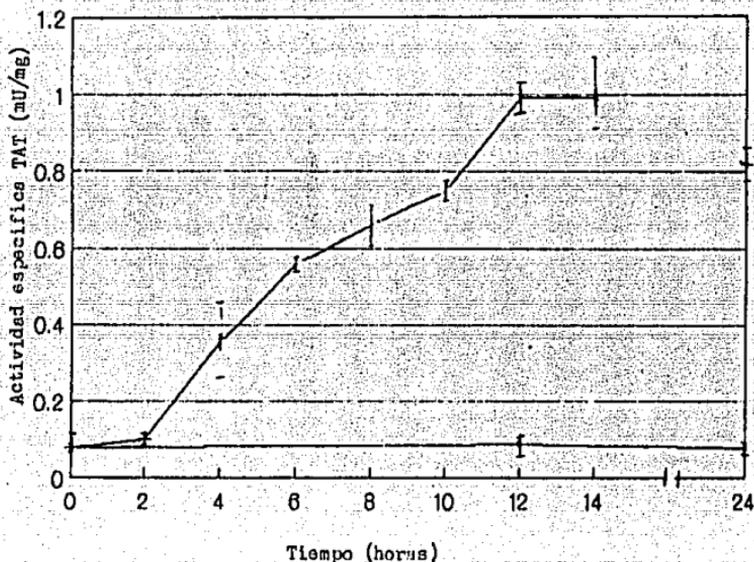


Figura II.1 Cinética de Inducción de la TAT por efecto de la dexametasona, en cultivo de hepatocitos de rata. Después de 20 horas de incubación se agregó al medio de cultivo dexametasona a una concentración de 10^{-8} M y se recolectaron las células en los tiempos indicados, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midió la actividad específica de TAT. Se mantuvieron muestras sin inducción a las 12 horas y 24 horas. Se presenta el promedio de tres determinaciones y su desviación estándar.

Dexametasona (M)	Actividad TAT (mU/ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad específica (mU/mg)
0	0.23 ± 0.01	2.40 ± 0.12	0.09 ± 0.006
5 x 10 ⁻¹⁰	0.30 ± 0.01	2.24 ± 0.12	0.14 ± 0.01
1 x 10 ⁻⁹	0.29 ± 0.00	2.26 ± 0.07	0.13 ± 0.006
5 x 10 ⁻⁹	0.34 ± 0.03	2.24 ± 0.06	0.15 ± 0.01
1 x 10 ⁻⁸	0.44 ± 0.02	2.26 ± 0.09	0.20 ± 0.01
5 x 10 ⁻⁸	1.14 ± 0.02	2.36 ± 0.00	0.48 ± 0.01
1 x 10 ⁻⁷	1.52 ± 0.14	2.12 ± 0.03	0.71 ± 0.06
5 x 10 ⁻⁷	1.71 ± 0.10	2.14 ± 0.11	0.80 ± 0.08
1 x 10 ⁻⁶	2.07 ± 0.10	2.14 ± 0.09	0.97 ± 0.08
5 x 10 ⁻⁶	2.07 ± 0.10	2.05 ± 0.06	1.01 ± 0.07
1 x 10 ⁻⁵	2.07 ± 0.10	2.19 ± 0.03	0.95 ± 0.07

Tabla II.2 inducción de TAT con dexametasona a diferentes concentraciones en cultivo de hepatocitos de rata. Después de 20 horas de incubación se agregó al medio de cultivo la dexametasona a diferentes concentraciones y se recolectaron las células 12 horas después. se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midieron la actividad de TAT y las proteínas. Se presenta el promedio de tres determinaciones y su desviación estándar.

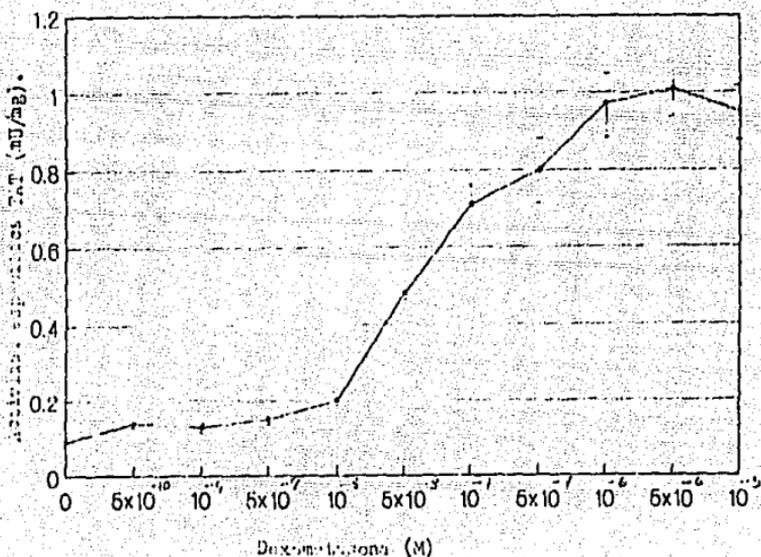


Figura II.2 Curva dosis-respuesta de la TAT por efecto de la dexametasona en cultivo de hepatocitos de rata. Después de 20 horas de incubación se agregó al medio de cultivo la dexametasona a diferentes concentraciones y se recolectaron las células 12 horas después. Se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midió la actividad específica de TAT. Cada determinación se hizo por triplicado, se presenta el promedio y su desviación estándar.

4.3 INHIBICION DE LA INDUCCION DE LA TAT.

Se estudio el efecto de dos antagonistas sintetizados por los laboratorios Rousel-Uclaf (RU38486 y RU5020). El RU5020 o promegestona es un análogo de la progesterona que compite por los sitios del receptor citoplasmático de glucocorticoides e inhibe su acción. En nuestro sistema de estudio el RU5020 inició su inhibición a la inducción de la TAT con dexametasona en una concentración de 100 μ M. El RU38486 fue más potente a razón de 10 veces (figura y tabla III.1).

RU5020 (M)	Actividad TAT (mU/ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad específica TAT (mU/mg)
0	1.7 ± 0.30	1.90 ± 0.46	0.90 ± 0.05
1 X 10 ⁻⁷	2.07 ± 0.86	2.40 ± 0.69	0.89 ± 0.08
5 X 10 ⁻⁷	1.59 ± 0.01	1.88 ± 0.06	0.85 ± 0.02
1 X 10 ⁻⁶	1.47 ± 0.42	1.75 ± 0.31	0.84 ± 0.05
5 X 10 ⁻⁶	1.91 ± 0.06	2.23 ± 0.04	0.86 ± 0.01
1 X 10 ⁻⁵	2.53 ± 0.47	3.50 ± 0.43	0.72 ± 0.04
5 x 10 ⁻⁵	0.65 ± 0.17	2.01 ± 0.60	0.31 ± 0.06
1 X 10 ⁻⁴	0.37 ± 0.06	1.65 ± 0.47	0.23 ± 0.04

Tabla III.1 Inhibición por RU5020 de la inducción de la TAT con dexametasona. Después de 20 horas de incubación se agregaron al medio de cultivo, dexametasona (5×10^{-7} M) y el antiinductor RU5020 a diferentes concentraciones. Las células se recolectaron 12 horas después, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midieron la actividad de la enzima y las proteínas. Cada determinación se realizó por triplicado, se presenta el promedio y su desviación estándar.

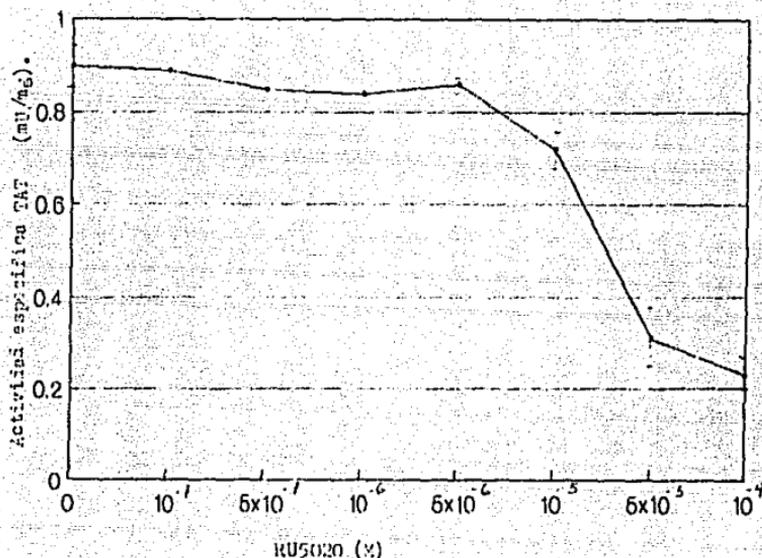


Figura III.1 Inhibición por RU5020 de la inducción de la TAT con dexametasona. Después de 20 horas de incubación se agregaron al medio de cultivo, dexametasona (5×10^{-7} M) y el antiinductor RU5020 a diferentes concentraciones. Las células se recolectaron 12 horas después, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midió la actividad específica de la enzima. Cada determinación se realizó por triplicado, se presenta el promedio y su desviación estándar.

RU38486 (M)	Actividad TAT (mU/ ml)	Pr. (n.)	Actividad especifica TAT (mU/mg)
0	1.70 ± 0.30	1.90 ± 0.45	0.90 ± 0.06
1 x 10 ⁻⁷	0.95 ± 0.04	1.18 ± 0.10	0.81 ± 0.04
5 x 10 ⁻⁷	2.04 ± 0.12	2.45 ± 0.16	0.83 ± 0.05
1 x 10 ⁻⁶	1.76 ± 0.11	2.36 ± 0.13	0.74 ± 0.02
5 x 10 ⁻⁶	1.10 ± 0.20	2.23 ± 0.19	0.50 ± 0.06
1 x 10 ⁻⁵	0.60 ± 0.06	2.09 ± 0.19	0.29 ± 0.04
5 x 10 ⁻⁵	0.23 ± 0.03	1.00 ± 0.19	0.24 ± 0.01
1 x 10 ⁻⁴	0.35 ± 0.05	1.99 ± 0.18	0.17 ± 0.01

Tabla III.2. Inhibición por RU38486 de la inducción de la TAT con dexametasona. Después de 20 horas de incubación se agregaron al medio de cultivo, dexametasona (5×10^{-7} M) y el antiinductor RU38486 a diferentes concentraciones. Las células se recolectaron 12 horas después, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midió la actividad especifica de TAT. Cada determinación se realizó por triplicado, se presenta el promedio y su desviación estándar.

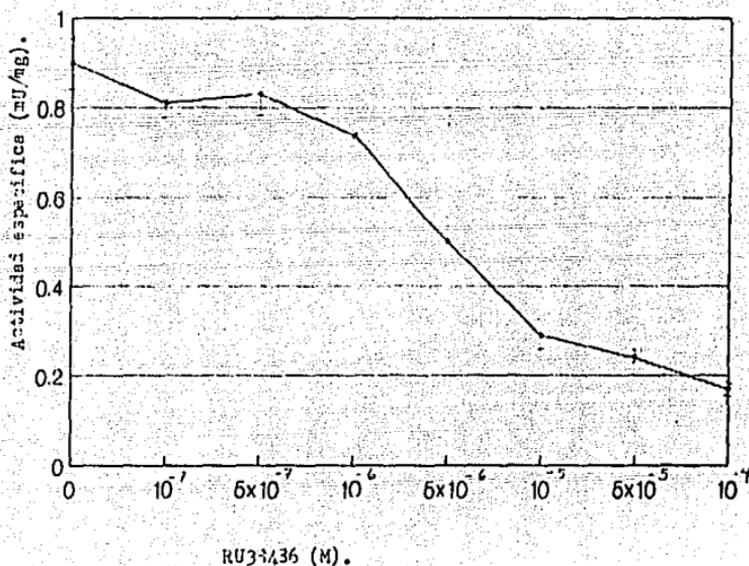


Figura III.2 Inhibición por RU38486 de la inducción de la TAT con dexametasona. Después de 20 horas de incubación se agregaron al medio de cultivo, dexametasona (5×10^{-7} M) y el antiinductor RU38486 a diferentes concentraciones. Las células se recolectaron 12 horas después, se lisaron y se obtuvo el citosol por centrifugación. Se midieron la actividad de la enzima y las proteínas. Cada determinación se realizó por triplicado, se presenta el promedio y su desviación estándar.

DISCUSION.

Durante muchos años, el cultivo de células se dificultó. Las modificaciones hechas en los métodos de cultivo han permitido mantener y hacer crecer muchos tipos celulares especializados en cultivo, y con ello se ha ampliado también la utilidad del cultivo celular como método para observar el comportamiento celular.

El cuerpo humano es un organismo compuesto de partes altamente diferenciadas, cuya actividad e incluso su supervivencia dependen del funcionamiento de distintos órganos, tejidos y células. Muchos de esos órganos han de poder modificar sus funciones y han de ser capaces de compensar alteraciones fisiológicas y las producidas por enfermedad. Por consiguiente no corresponde perfectamente a la realidad el aislar un órgano o célula y hablar de su biología si se quiere estudiar el organismo como un todo.

Si bien la técnica de cultivo de células permite estudiar el comportamiento celular de forma controlada y separar los efectos debidos a las propiedades intrínsecas de las células de los efectos que se producen a causa de las interacciones entre los distintos tipos de células presentes en el organismo. Se puede establecer el entorno de la célula, definir muy bien la célula blanco y examinar los cambios que se producen en la célula después del tratamiento.

El hígado es en esencia una gran fábrica en la que los productos se combustionan, se alteran, se descomponen, se sintetizan o se excretan, desempeñan un papel de modificador de muchos sistemas, es uno de los órganos más versátiles, y las células parenquimatosas hepáticas (hepatocitos) poseen funciones especializadas asociadas a una estructura compleja y ordenada. como es la heterogeneidad zonal.

Así estas células son un sistema deseable como método de estudio, en una forma que permita conservar lo más posible sus características diferenciadas y al mismo tiempo poder mantener el medio externo constante y así poder apreciar los efectos de las variables introducidas. En el cultivo de hepatocitos en monocapa las células no mantienen la heterogeneidad zonal ya que éstas tienen un medio de cultivo óptimo y constante pero hay numerosos estudios donde se comprueba que conservan sus características de células diferenciadas por un buen tiempo y la duración de éste se puede ampliar con la adición de ciertas hormonas en caso de que sea necesario mantenerlos por más de una semana.

En este trabajo se estableció el cultivo de hepatocitos en

monocapa y se comprobó que es un buen sistema de trabajo para el estudio de inducciones hormonales. A diferencia de las células recién aisladas los hepatocitos en cultivo primario se mantienen viables por varios días, lo que nos permite trabajar con tiempos relativamente largos, necesarios para detectar cambios producidos por hormonas. Estas células retienen un gran número de funciones, y presentan la gran ventaja de ser un buen sistema simplificado que permite eliminar el gran número de variables que se tienen in vivo, además de poder manejar muchas repeticiones con un solo animal.

Se obtuvo el cultivo de hepatocitos de rata en buen estado. Cuando las células cultivadas fueron observadas en el microscopio de luz, mostraron características que nos permitieron comprobarlo como: presencia de pocas vacuolas, forma redondeada, se encontraron células mononucleadas y binucleadas, y muy pocas se tiñeron con azul de tripan. Dos horas después de sembrarlas la mayoría se adhirieron al fondo de las cajas petri cubiertas con colágena de rata y formaron una monocapa, esto es gracias a la secreción de proteínas adhesivas tales como la laminina, fibronectina y el colágeno.

Después de aproximadamente diecinueve horas de haber sembrado las células, para que se recuperaran del daño sufrido durante su aislamiento con la digestión con la colagensa, se midió la actividad de las enzimas hepáticas: triptofano dioxigenasa y tirosina aminotransferasa, enzimas que intervienen en el metabolismo del triptofano y la tirosina respectivamente. Estas dos enzimas son inducidas por glucocorticoides a nivel transcripcional. El glucocorticoide después de penetrar a la célula se une a un receptor citoplasmático, sufre un proceso de activación y es translocado al núcleo donde se une al ADN a secuencias específicas (ERG) y provoca un aumento de la transcripción del gen.

Así, se indujeron la TDO y la TAT en el cultivo de hepatocitos con dexametasona (un glucocorticoide sintético) a una concentración de 10^{-6} M y se compararon con las inducciones hechas in vivo con dexametasona a 100 mg/Kg de peso corporal. Se encontró que tanto la TDO como la TAT fueron inducidas por dexametasona in vivo e in vitro (Figura I.2 y I.3). El nivel de TDO en presencia de triptofano a una concentración de 2.5 mM in vitro y 750 mg/Kg de peso corporal in vivo, fue muy parecido. Así como también cuando la dexametasona (10^{-6} M in vitro ó 10 mg/Kg, in vivo) más triptofano estuvieron presentes, donde hubo una inducción aproximada de tres veces en los dos casos. En cultivo no pudo ser medida la actividad de TDO en ausencia de triptofano, in vivo si posiblemente por los niveles endógenos existentes. Por otra parte, cuando se hizo la inducción in vivo se muestra cómo la inducción de la enzima con triptofano y dexametasona es aditiva.

Para la TAT el nivel basal in vivo fue mayor que en cultivo tal vez por influencias in vivo, por ejemplo el "stress" sufrido por el animal al ser sacrificado e in vitro no existen estas

monocapa y se comprobó que es un buen sistema de trabajo para el estudio de inducciones hormonales. A diferencia de las células recién aisladas los hepatocitos en cultivo primario se mantienen viables por varios días, lo que nos permite trabajar con tiempos relativamente largos, necesarios para detectar cambios producidos por hormonas. Estas células retienen un gran número de funciones, y presentan la gran ventaja de ser un buen sistema simplificado que permite eliminar el gran número de variables que se tienen in vivo, además de poder manejar muchas repeticiones con un solo animal.

Se obtuvo el cultivo de hepatocitos de rata en buen estado. Cuando las células cultivadas fueron observadas en el microscopio de luz, mostraron características que nos permitieron comprobarlo como: presencia de pocas vacuolas, forma redondeada, se encontraron células mononucleadas y binucleadas, y muy pocas se tiñeron con azul de tripan. Dos horas después de sembrarlas la mayoría se adhirieron al fondo de las cajas petri cubiertas con colágena de rata y formaron una monocapa, esto es gracias a la secreción de proteínas adhesivas tales como la laminina, fibronectina y el colágeno.

Después de aproximadamente diecinueve horas de haber sembrado las células, para que se recuperaran del daño sufrido durante su aislamiento con la digestión con la colagena, se midió la actividad de las enzimas hepáticas: triptofano dioxigenasa y tirosina aminotransferasa, enzimas que intervienen en el metabolismo del triptofano y la tirosina respectivamente. Estas dos enzimas son inducidas por glucocorticoides a nivel transcripcional. El glucocorticoide después de penetrar a la célula se une a un receptor citoplasmático, sufre un proceso de activación y es trasladado al núcleo donde se une al ADN a secuencias específicas (ERG) y provoca un aumento de la transcripción del gen.

Así, se indujeron la TDO y la TAT en el cultivo de hepatocitos con dexametasona (un glucocorticoide sintético) a una concentración de 10^{-6} M y se compararon con las inducciones hechas in vivo con dexametasona a 100 mg/Kg de peso corporal. Se encontró que tanto la TDO como la TAT fueron inducidas por dexametasona in vivo e in vitro (Figura I.2 y I.3). El nivel de TDO en presencia de triptofano a una concentración de 2.5 mM in vitro y 750 mg/Kg de peso corporal in vivo, fue muy parecido. Así como también cuando la dexametasona (10^{-6} M in vitro ó 10 mg/Kg, in vivo) más triptofano estuvieron presentes, donde hubo una inducción aproximada de tres veces en los dos casos. En cultivo no pudo ser medida la actividad de TDO en ausencia de triptófano. in vivo si posiblemente por los niveles endógenos existentes. Por otra parte, cuando se hizo la inducción in vivo se muestra cómo la inducción de la enzima con triptofano y dexametasona es aditiva.

Para la TAT el nivel basal in vivo fue mayor que en cultivo tal vez por influencias in vivo, por ejemplo el "stress" sufrido por el animal al ser sacrificado e in vitro no existen esta:

influencias.

Si bien la TDO y la TAT son inducidas por dexametasona, lo son en magnitud diferente, in vivo para la TDO aumentó 3 veces y la TAT 3.6 veces. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Voigt y Sekeris (1978), con experimentos in vivo, con ratas machos, que muestran una diferencia en la inducción de la TDO y la TAT con hidrocortisona.

En cultivo para una concentración de 10^{-6} M de dexametasona, la diferencia entre la inducción de las dos enzimas fue mayor, la inducción para la TDO fue de 3 veces aproximadamente y de 11 para la TAT, esto nos indica una clara diferencia en la inducción de las dos enzimas por el glucocorticoide sintético, que se hace más evidente sin las diversas influencias presentes en el organismo in vivo.

El que se indujeran las dos enzimas hepáticas con dexametasona tanto in vivo como in vitro, nos da una prueba de la integridad enzimática de las células en cultivo, después de cierto tiempo de incubación, en el cual se recuperan de los daños sufridos durante su aislamiento y la siembra.

En el cultivo se indujo con dexametasona la TAT a una concentración de 10^{-6} M y se midió la actividad de diferentes tiempos para obtener la cinética de inducción (Figura II.1). Se obtuvo una inducción mayor a las doce horas, aproximadamente 12 veces mayor que la basal. La máxima fue de 0.99 mU y la basal de 0.08 mU; y el tiempo medio de la inducción máxima fue a las cuatro horas con un resultado de 0.45 mU/mg de proteína.

Al probar diferentes dosis de dexametasona a las doce horas (Figura II.2), se encontró que hubo una inducción máxima a una concentración entre 10^{-6} M y 5×10^{-5} M sin haber efecto tóxico a 10^{-5} M, ya que no hubo muerte celular con esa concentración de dexametasona. La concentración media máxima fue aproximadamente de 10^{-6} M con 0.48 mU/mg de proteína.

Con la concentración subóptima de 5×10^{-7} M y tiempo máximo de la inducción de TAT con dexametasona, se probó la inhibición de los antagonistas sintéticos RU38486 y RU5020 (Figura III.1 y III.2). La inhibición con RU38486 fue la más potente, se inhibió aproximadamente 5 veces la actividad de la TAT de 0.90 mU/mg de proteína a 0.17 mU/mg de proteína a una concentración de RU38486 de 10^{-4} M y la inhibición media máxima fue aproximadamente de 0.36 mU/mg de proteína con RU38486 a 10^{-5} M.

Para la RU5020, la inhibición fue cerca de cuatro veces, de 0.90 mU a 0.23 mU/mg de proteína y la inhibición de antigluocorticoides de 5×10^{-5} M.

Esto está en concordancia con la información bibliográfica ya que el RU38486 parece ser el más potente antigluocorticoide conocido hoy día in vitro e in vivo, sin exhibir cualquier afecto

agonista. La actividad del RU38486 ha sido observada en varios sistemas (Jung-Testas y Baulieu, 1983). A sido probada en hígado de rata *in vivo* su actividad antiglucocorticoide en la inducción de TAT por dexametasona (Moguilewsky y Philibert, 1984).

Estos dos antagonistas compiten con la dexametasona por el receptor citoplasmático. El potente efecto atagónista del RU38486 está relacionado con una fuerte interacción con el receptor citosólico del glucocorticoide ya que su relativa afinidad de unión es cerca de 3 veces más alta de la que presenta la dexametasona. además no se une a CBG y su vida media (20 horas) es más larga que la de otros esteroides la cual es de minutos (progesterona) o de 3 a 5 horas para la dexametasona (Kawai y col, 1987). Si bien su constante de disociación es acelerada en condiciones de activación, este intervalo siempre es más lento que el de la dexametasona o corticosterona. Su decremento en la translocación nuclear ha sido observada en la línea celular T-linfoide y en timo. También se ha visto que su afinidad a columnas ADN-celulosa es más baja que la del complejo receptor-agonista, este comportamiento sugiere una diferencia a nivel molecular (Jung-Testas y Baulieu, 1983) posiblemente de una activación incompleta o ausente. Así el RU38486 interactúa fuertemente con el receptor de glucocorticoide, y forma un complejo no activo e impide la unión de los agonistas al receptor. Ahora cuando el complejo es sometido a condiciones de activación se vuelve menos estable y es incapaz de translocarse al núcleo y unirse al ADN, produce así una inhibición de la respuesta glucocorticoidea. Cabe mencionar que existe reversibilidad en el efecto antiglucocorticoide del RU38486.

Si bien otros compuestos (6-b-bromoprogesterona, cortisol 21 mesilate, 1,9-11-deoxicortisol, etc.) muestran actividad antagonista en modelos celulares *in vitro* desafortunadamente la mayoría de ellos son poco efectivos, parcialmente antagonistas o sólo son efectivos en pruebas específicas y/o a muy altas dosis (Philibert, 1984). Una de las causas de esta imperfección es atribuida al metabolismo de los antiglucocorticoides a formas inactivas *in vivo*. Si bien se ha visto que hay compuestos como la cortexolona que antagoniza en hígado de rata, el depósito de glucógeno inducido por dexametasona, pero tienen efecto sobre la inducción de la TAT y sólo una parcial inhibición para la TDO (Naylor y Rosen, 1982) es decir que intervienen posiblemente otros factores.

CONCLUSIONES.

- Se realizó el cultivo de hepatocitos de rata en monocapa con características morfológicas y con la comparación de la actividad de la TDO y la TAT in vivo se confirmó el buen estado del cultivo.
- Se obtuvo la inducción máxima de la TAT a una concentración de 10^{-6} M de deaxmetasona a las 12 horas.
- Los antagonistas sintéticos RU38486 y RU5020 inhibieron esta inducción siendo más potentes el RU38486.
- Por lo tanto concluimos que el cultivo de hepatocitos de rata en monocapa es un sistema adecuado y simple para el estudio de la inducción e inhibición de enzimas.
- Que la TAT es una enzima inducible por glucocorticoides de una manera dependiente de la concentración y el tiempo y que esta inducción puede ser inhibida por los antagonistas sintéticos RU38486 y RU5020.

BIBLIOGRAFIA.

- Adler, G. K., Samas, M. y Majzoub, J.A. (1988). Expression and dexamethasone regulation of the human corticotropin-releasing hormone gene in a mouse anterior pituitary cell line. *J. Mol. Biol.* 252, 1895-1897.
- Agarwal, M. K., Lombardo, G., Eliezer, N y Mougil, V.K. (1985). Activation of rat liver glucocorticoid receptor bound to the antiglucocorticoid RU38486. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 133, 745-752.
- Akerblom, I. E. Slater, P. E., Beato, D. J. y Mellon, P.L. (1988). Negative regulation by glucocorticoid through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science.* 241, 4863-4866.
- Alexandrová, M. (1986). Glucocorticoid receptor of rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Endocr. Exper.* 20, 203-300.
- Ali, M. y Vedeckis, M. V. (1987). The glucocorticoid receptor protein binds to transfer RNA. *Science.* 230, 467-470.
- Allem, B.P., Sutanto, W. y Jones, M.T. (1988). A correlative study of RU38486 biopotency and competition with (H3) dexamethasone for receptors in the rat central nervous systems. *J. Steroid Biochem.* 30, 411-415.
- Allera, A. y Rao, G.S. (1986). Characteristic and specificity of the glucocorticoid "carrier" of rat liver plasma membrane. In "mechanisms and clinical aspects of steroid hormone resistance" *Adv. Exp. Med. Biol.* 196. Eds Chrousos, Louriaux y Lipset. Plenum Press. New York. 53-66.
- Asami, O., Nakamura, T., Mura, T. y Ichihara, A. (1984) Identification of trypsin inhibitor in bovine pituitary extracts as a survival factor for adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.* 95, 299-309.
- Auberger, P., Samson, M. y LeCam, A. (1983). Effects of growth factors on hormonal stimulation of amino acid transport in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.* 210, 361-366.
- Barden, W.C., Gonsalus, L. G., Musto, A. N., Cheng, Y. C., Reventos, J., Smith, C. U. y Hammond, G. (1977). Corticosteroid binding globulin testosterone-estradiol binding globulin and androgen binding protein belong to protein families distinct from steroid receptor. *J. Steroid. Biochem.* 252, 1895-1897.
- Barnett, Ch. A., Speck, L. y Litwack, G., (1983). Identification of macromolecular inhibitor of glucocorticoid-receptor complex activation in rat liver cytosol. *Eur. J. Biochem.* 134, 231-235.
- Becker, P. B., Gloss, B., Schind, W., Strhle, U. y Schutz, G. (1986). In vivo protein-DNA interactions in a glucocorticoid

response elements require the presence of the hormone. *Nature*. 324, 686-688.

Bechet, D. M. y Perry, B. N. (1986) A novel class of inactive-binding sites in female rat liver nuclei. *J. Endocrine System*. 119, 27-36.

Berne, M.D., Robert, M. y Matthew, W.L. (1983) *Physiology*. The C. V. Mosby Company. Section IX: The Endocrine System. 1033-1039.

Berry, M. N. y Friends, D.S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* 43, 506-520.

Besedovsky, H., Rey, A., Sorkin, E. y Dinarello, Ch. A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-I and glucocorticoid hormones. *Science*, 233, 652-654.

Bhandari, B. y Miller, R. (1987). Glutamine synthetase gene transcription in cultured 3T3-L1 adipocytes: regulation by dexamethasone, insulin and dibutyryl cyclic AMP. *Mol. Cell. End.* 51, 7-11.

Bianco, A. C., Nunes, M. T., Heli, N. S. y Maciel, M. B. R. (1987). The role of glucocorticoids in the stress-induced regulation of extrathyroidal 3, 5, 3'-triiodothyroine generation in rats. *Endocrinology*. 120, 1033-1038.

Bodine, P. V., y Litwack, G. (1988). Purification and structural analysis of modulator of the glucocorticosteroid receptors bound to the steroids antagonist RU-486. *J. Biol. Chem.* 263, 3501-3508.

Bourgeois, S., Pfahl, M., y Baulieu, E. E. (1984). DNA binding properties of glucocorticosteroid receptors bound to the steroid antagonist RU486. *Embo J.* 3, 751-755.

Bransome, E. D., Hemdry, L. B., Muldoon, T.G., Mahesh, V.M., Hutson, M.S. y Campbell, L. K. (1985). Apparent Stereochemical Complementy of Estrogens end Helical Cavities Between DNA Base Pairs: Implications for the Mechansm of Action of Steroids. *J. Ther. Biol.* 112, 97-108.

Bresnick, H. E., Sanchez, R.E. y Pratt, B.W. (1988). Relationship between glucocorticoid receptor steroid binding capacity and association of the Mr 90 000 heat shock protein with the unliganded receptor. *Steroid Biochem.* 30, 267-269.

Buetti, E y Kühnel, B. (1986) Distinct sequence elements involved in the glucocorticoid regulation of the mouse mammary tumor virus promoter identified by linker scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 190, 379-389.

Calandra, S.R., Nicola, A.F., Baldi, A., Blaquer, J. A., Bozzini, C. E., Calvo, S.C., Cardinali, D.P., Charreau, H.E. Dellacha, J., Lantos, P. C. y Mantalen, C., Negro-Vilar, A., Pisareu, M. L., Santome, J. A. (1985). *Endocrinologia Molecular*. 2a. ed. Editorial

El Ateneo. Argentina. 466 pp.

Carlstedt-Duke, J. y Gustafsson, J.A. (1986). The domain structure of the glucocorticoid receptor. Thioredoxin and glutaredoxin systems: structure and function Edited by A. Holmgren, et al., Raven Press, New York. 391-401.

Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Okret, S. y Gustafsson, J.A. (1984). The glucocorticoid receptor in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 33, 913-916.

Compton, M. M. y Cidlowski, J. A. (1986). Vitamin B₆ and glucocorticoid action. *Endocr. Rev.* 7, 140-148.

Collins, S., Caron, M. G. y Lefkowitz, J.R. (1988). B₂-adrenergic receptors on hamster smooth muscle cells are transcriptionally regulated by glucocorticoid. *J. Biol. Chem.* 263, 9067-9070.

Cunha, F. Q. y Ferreira, S. H. (1986). The release of neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur. J. Pharmacol.* 129, 65-76.

Chrousos, G.P., Cutler, G.B., Sauer, M., Somons, S. S. y Loriaux, L. D. (1983). Development of glucocorticoid antagonists. *Pharmac. Ther.* 20, 261-281.

Danesh, U., Gloss, B., Schimn, W., Schütz, G., Schlé, R. y Rennkawitz, R. (1987). Glucocorticoid induction of rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two separated glucocorticoid-responsive elements. *Embo J.* 6, 625-630.

Damon, M., Rabier, M., Loubatiere, J., Blotman, F. y Paulet, C. A. (1985). Glucocorticoid receptors in fibroblasts from synovial tissue, changes during the inflammatory process. Preliminary results. *AGEN Act.* 17, 478-483.

Darbe, P.D. y King, R. J. B. (1987). Differential effects of steroid hormones on parameters of cell growth. *Cancer Res.* 47, 2937-2944.

Davis, R.E. y Smith, T. J. (1987). Thyroid and glucocorticoid regulation of specific protein abundance in culture of human skin fibroblasts. *Endoc. Res.* 13, 61-67.

D Engelman, G. L. y Richardson. A. G. (1986). Effects of levamisole on primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biochem. Pharmac.* 35, 1547-1554.

Denis, M., Wikström, A. C. y Gustafsson, A. (1988). Subunit composition of the molybdate-stabilized non-activated glucocorticoid receptor from rat liver. *J. Steroid Biochem.* 30, 271-276.

Dieter, P., Schulze-Specking, A., Eythorn, S. y Decker. K. (1986). Glucocorticoid inhibit prostaglandin formation by rat

kupffer cells in primary culture. Cells of the hepatic sinusoid, Kupffer Cell. Fundation, A. Kirn, D. L., Knook and E. Wisse, editors. 1, 77-81.

Diamondstone, T.I. (1986). Assay of tyrosine aminotransferase activity by conversion of α -hydroxyphenylpyruvate to α -p-hydroxybenzaldehyde. Anal. Biochem. 16, 385-401.

DiSorbo, D. M. y Litwack, G. (1981). Changes in the intracellular levels of pyridoxal 5' phosphate affect the induction of tyrosine aminotransferase by glucocorticoids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 1203-1208.

DiSorbo, B.M., Phelps, D. S., Ohn, V. S. y Litwack, G. (1980), Pyridoxine deficiency influences the behavior of the glucocorticoid receptor complex. J. Biol. Chem. 255, 3866-3870.

Distelhorst, Cl. W., Benuto, B.M. y Bergamini, R.A. (1984). Effect of cell cycle position on dexamethasone binding by mouse and human lymphoid cell lines: correlation between and increase in dexamethasone binding during S phase and dexamethasone sensitivity. Blood. 63, 105-113.

Douglas, B. T. y Cidlowski, J. A. (1987). PBR322 contains glucocorticoid regulatory elements DNA consensus sequences. Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 1-10.

Duncan, S., Leon, R.E. y Philip, B. K. (1978). Enfermedades del metabolismo. Tomo II. Endocrinologia. Salvat Editores, S.A., Barcelona, 1978. 859 pp.

Enat, R. Jefferson, D. M., Ruiz-Opazo, N., Gatmaitan, Z., Leinwand, L.A. y Reid, M. L. (1984). Hepatocyte proliferation in vitro: its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrate of extracellular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 1411-1415.

Evans, M. R. y Hollenberg, M. S. (1988). Zinc Fingers: Gilt by association. Cell. 52, 1-3.

Ferber S. y Ciechanover, A. (1986). Transfer RNA is required for conjugation of Ubiquitin to selective substrates of the Ubiquitin-and ATP-dependent proteolytic system. J. Biol. Chem. 261(7)3128-3134.

Fantus, I. G., Saviolakis, K. A., hedo, J. A. y Gorden, P. (1982). Mechanism of glucocorticoids-induced increase in insulin receptors of cultured human lymphocytes. J. Biol. Chem. 257, 8277-8279.

Firestone, G.L., Payvar, F. y Yamamoto, R. K. (1982). Glucocorticoid regulation of protein processing and compartmentalization. Nature. 300, 221-225.

Freedman, L.P., Luisi, B. F., Korsaur, Z. R., Basavappa, R.,

- Sigler, P.B. y Yamamoto, K. R. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature*. 334, 543-546
- Gaillard, R. C., Riondel, A., Muller, A. F., Herman, W., y Baulieu, E. E. (1984). RU486: A steroid with antigluco corticosteroid activity that only desinhibits the human pituitary-adrenal system at a specific time of day. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3879-3882.
- Gamatchu, B., (1987). Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science*, 236, 456-459.
- Godowski, P. J., Rusconi, S., Miesfeld, y Yamamoto, K. R. (1987(a)) Glucocorticoid receptors mutans that are constitutive activator of transcriptional enhancement. *Nature*, 325, 365-367.
- Godowski, P.J., Picard, D. y Yamamoto, R. K. (1987(b)). Signal transduction and transcripcional regulation by glucocorticoid receptor-lex A fusion proteins. *Science*, 24, 812-816.
- Granner, K.D. y Hargrove, J. L. (1983). Regulation of the synthesis of tyrosine aminotransferase: The relationship to mRNA TAT. *Mol. Cell. Biochem.* 53/54, 113-128.
- Green, S. y Chambon, P. (1986). A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. *Nature*. 324, 615-617.
- Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W. y Chambon, P. (1988). The N-terminal DNA-binding "Zinc fingers" of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *Embo J.* 7, 3037-3042.
- Grippo, J.E., Tienrungroj, W., Boborodea, V., Pratt, S. E., Carlson, M. D., y Pratt, W. B. (1986). The role of thioredoxin in determinig the steroid-binding state and the DNA-bindig state of the glucocorticoid receptor. Thioredoxin and glutaradoxin systems: structure and function. Edited by A. Holmgren, et al., Raven Press, New York. 377-390.
- Groenewald, J. V., Terblanche, S. E., y Oelofsen, O. (1984). Tyrosine aminotransferase: Characteristic and properties. *Int. J. Biochem.* 16, 1-18.
- Groothius, G. M. (1981). Plasma membrane specialization and intracellular polarity of freshly isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Cell. Biol.* 26, 43-51.
- Guertin, M. Baril, P., Bartkowiak, J., Anderson, A. Belanger, L. (1983). Rapid supression of al-feto protein gene transcription by dexamethasone in developing rat liver. *Biochem.* 22, 4296-4302.
- Gustafsoon, J. A., Carstedt-Duke, J.J., Okret, S., Wiström, A, Ch., Wrange, O., Payver, F. y Yamamoto, K. (1984), Structure and

specific DNA binding of rat liver glucocorticoid receptor. *J. Steroid Biochem.* 20, 1-4.

Guyette, W.A., Matusok, R. J. y Rosen, J. M. (1979). Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell.* 17, 1013-1023.

Guyre, P. M., Girard, M. T., Morganelli, P.M. y Manganiello. (1988). Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. *J. Steroid Biochem.* 30, 1-6.

Guyton, A. G. (1987). *Tratado de Fisiología Médica.* 6a. ed. Interamericana. México, D.F. Capítulo 77: Hormonas Corticosteroidales. 1159 pp.

Heller, Cl. L., Orti, E. y Nicola. A. F. (1986). Regulatory factors of glucocorticoid binding in early and term rat placenta. *J. Steroid Biochem.* 25, 53-58.

Hendry, L.B., Bransome, E.D., Muldoon, T.G., Mahesh, V.B., Campbell, L. K., y Hurson, M. S. (1980). Unique stereochemical complementarity between estrogens and DNA. Copyright by Elsevier North Holland, Inc. Mahesh, Muldoon, Saxena, Sadler, eds. *Functional correlates of hormone receptors in reproduction*, 565-571.

Hirota, K., Hirota, T., Sanno, Y. y Tamaka, T. (1987). A new glucocorticoid receptor detected in host rat liver but not in various hepatomas. *Cancer Res.* 47, 3742-4746.

Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G., y Evans, R. M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 318, 635-641.

Hollenberg, S. M., Guguere, V., Segui, P. y Evans, R. M. (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 49, 39-46.

Horiuti, Y., Nakamura, T. y Ichihara, A. (1982). Role of serum in maintenance of functional hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.* 92, 1985-1994.

Howard, K. J. y Distelharstz. (1988). Evidence for intracellular association of the glucocorticoid receptor with the 90 KDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 263, 3474-3481.

Hsieh, L. C., Chi Su y Markland, F.S. (1987). Competitive inhibition of (³H)Dexametasone binding to mammary glucocorticoid receptor by leupeptin (42482). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 184, 295-299.

Ichihara, A., Nakamura, T. y Tamaka, K. (1982). Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. *Mol. Cell. Biochem.* 43, 145-168.

Jantzen, H.M., Strähle, U., Gloss, B., Stewart, T., Schimd, W., Boshart, M., Miksicek, R. y Schütz, G. (1987 (a)). Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell*. 29, 29-38.

Jantzen, K., Fritton, P. H. Kemenes, I. T., Espel, E., Kanich, S., Cato, C. B., Mugele, K. y Beato, M. (1987 (b)). Partial overlapping of binding sequences for steroid hormone receptors and DNase I hypersensitive in the rabbit uteroglobin gene region. *Nucl. Acids. Res.* 15, 4535-4552.

Jaurengui, H. O., McMillan, P. N., Deriscoll, J. y Naik, S. (1986). Attachment and long term survival of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture formulations. *In vitro cell. Develop. Biol.* 22,13-21.

Jung, W., Gedhardt, R. y Mecke, D. (1982). Alterations in activity and ultrastructural localization of several phosphatasas on the surface of adult rat hepatocytes in primary culture. *Eur. J. Cell Biol.* 27, 230-241.

Jung-Testas, I. y Baulieu, E.E. (1983). Inhibition of glucocorticoid action in cultured L 929 mouse fibroblasts by RU486, a new anti-glucocorticoid in high affinity for the glucocorticosteroid receptor. *Exp. Cell. Res.* 149, 177-182.

Jungermann, K. (1986(a)). Dynamic of zonal hepatocyte heterogeneity. Perinatal development and adaptive alterations during regeneration after partial hepatectomy, starvation and diabetes. *A. Hist. Suppl.-Band XXXII*, S. 89-98.

Jungermann, K. (1986(b)). Functional Heterogeneity of Periportal and Perivenous Hepatocytes. *Enzyme* 35:161-180.

Kaufmann, S. H., Okret, S'. Wikström, A. Ch. y Gustadsson, J. A. y Shaper, J. H. (1986). Binding of the glucocorticoid receptor to the rat liver nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* 261, 11962- 11967.

Katunuma, N., Tanaka, T., Shaheri, T., y Kusumi, T. (1974). Amplifying effects for glucocorticoid actions by a new polypeptide from enteric flora. *Adv. Reg.* 12, 167-183.

Katunuma, N., Tomino, I., Kominami, T., Tsuda, T., Kido, H. y Sabada, Y. (1977). A new factor from enteric bacteria of rats amplifying induction of liver enzyme by glucocorticoid. *Eur. J. Biochem.* 78, 533-539.

Katunuma, N. y Kido, H. (1978) Chemical structure and biological function of amplifying factors of glucocorticoid actions. *Proc. Japan Acad.* 54, 645-651.

Katunuma, T., Asami, O., Tanaka, K. y Ichihara, A. (1984). Increased survival of rat hepatocytes in serum-free medium by

inhibition of a trypsin-like protease associated with their plasma membranes. *Exp. Cell. Res.* 154, 81-91.

Kawai, S., Nieman, L.K., Brandon, D.D., Udelsman, R., Loriaux, L., Chrousos, G. P. (1987). Pharmacokinetic properties of the antigluccorticoid and antiprogesteron steroid Ru38486 in man, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 241, 401-405.

Kelly, F.J. y Goldspink, D.F. (1982). The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochem J.* 208, 147-151.

Keller, B. T., Landis, G.M., Kitos, P.A. (1982). Evidence for more than one mechanism of action of the glucocorticoid hormones. *Biochem. Biophys. Acta.* 717, 228-235.

Kido, H., Fukusen, N. y Katunuma, N. (1987). Inhibition by 1(5-isoquinolinesulfonyl)-methylpiperazine, an inhibitor of protein Kinase C, of enzyme induction by glucocorticoid and of nuclear translocation of glucocorticoid-receptor complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 152-159.

Kishimoto, T. y Tavassoli. (1986) Recovery of transferrin in receptors on hepatocytes membrane after collagenase perfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 711-715.

Konagaya, M., Bernard, P.A. y Marx, S. H. (1986) Blockade of glucocorticoid receptor binding and inhibition of dexamethose induced muscle atrophy in the rat by RU38486, a potent glucocorticoid antagonist. *Endocrinology.* 119, 375-380.

Kovacic-Millivojevic, B. y Vedeckis, M. V. (1986). Absence of detectable ribonucleic acid in the purified, untransformed mouse glucocorticoid receptor. *Biochemistry.* 25, 8266-8273.

Kreamer, B. B. Staecker, S. L., Sawada, N., Sattler, G. L., Hsiah, S., y Pitot, H. C. (1986). Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations. *In vitro cell. Develop. Biol.* 22, 201-211.

Kunh, W. R., Vest, W. Ch. y Schüteri. K. P. (1988). Purification and properties of squirrel monkey (Saimiri sciureus) corticosteroid binding globin. *Biochem.* 27, 2579-2586.

Kühnel, B., Buetti, E. y deggelman, H. (1986). Funtional analysis of the glucocorticoid regulatory elements presents in the mouses mammary tumor virus long terminal repeat. *J. Mol. Biol.* 190, 367-378.

LaPointe, M. C. Chang, Ch. H. y Vedeckis, W. V. (1986). Structure of the mouse glucocorticoid receptor: rapid analysis by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Biochemistry.* 5, 2094-2101.

Lafargues, E. Y. (1957). Cultivation behaviour in vitro of the normal mammary epithelium of the adult mouse. *Anat. Rec.* 127, 117-129.

Lefebvre, Y. A., Golsteyn, E. J., Trenkatraman, J., y Howell, H. M. (1986) Interaction of steroids with the nuclear envelope. *Biochem. Cell. Biol.* 64, 594-600.

Leloux, M., Stalmans, W., y Hers, H. G. (1983). On the mechanisms by glucocorticoids cause the activation of glycogen synthetase in mouse and rat livers. *Eur. J. Biochem.* 136, 175-181.

Lehninger, A.L. *Bioquímica* 2da. Ed. Omega, S.A. Barcelona. 1982. 842-844pp

Lippman, M' E., (1976). Steroid Hormones receptors in human malignancy *Life. Sci.* 18, 143-152.

Lowry, D. H. Rosebrouhg, N. J., Farr, A. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the follin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mahler, R.H. y Cordes, H.E. (1971) *Química Biológica*. Omega. México. 725p.

Magariños, A. M., Somoza, G. y Nicola, A. F. (1987). Glucocorticoid negative feedback and glucocorticoid receptors after hippocampectomy in rats. *Horm. Metabol.* 19, 105-109.

Max, S. R. Thomas, J. W., Banner, C., Vitkovic, L., Konagaya, M. y Konagaya, Y. (1987). Glucocorticoid receptor-mediated induction of glutamine synthetase in skeletal muscle cells in vitro. *Endocrinology.* 126, 1178-1183.

Max, S. R. y Silbergeld, E. (1987). Skeletal muscle glucocorticoid receptor and glutamine synthetase activity in the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87, 523-527.

Mayo, K. E. y Palmiter, D. P. (1982). Glucocorticoid regulation of the mouse metallothionein gene is selectively lost following amplification of the gene. *J. Biol. Chem.* 27, 3061-3067.

Mayo, K. E., Warrwn, R. y Palmiter, R. D. (1982). The mouse metallothionein-1 gene es transcripcionally regulated by cadmiun following transfection into human mouse cells. *J. Biol. Chem.* 29, 99-108.

McDonnel, D., Mangelsdor, D. J., Pke, J. W., Hausseler, M. R. y O'Maller, B. W. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science*, 25, 1214-1217.

- McDonnell, D. P., Pike, W. y O Maller, B. W. (1988). The vitamin D receptor: a primitive steroid receptor relates to thyroid hormone receptor. *J. Steroid Biochem.* 30, 41-46.
- Mc Grath, J. A. y Goldspink, D. F. (1982). Glucocorticoid action on protein synthesis and protein breakdown in isolated skeletal muscles. *Biochem. J.* 206, 641-645.
- Mendel, D. B., Bodwell, J. E. y Munck, A. (1987). Activation of cytosolic glucocorticoid receptor complexes in intact WEHI-7 cells does not dephosphorylate the steroid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 262-5644-5648.
- Metzler, H., Gebhardt, R., Oberrauch, W. y Mecke, D. (1982). A convenient and highly sensitive spectrophotometric assay for tryptophan 2, 3-dioxygenase. *Anal. Biochem.* 121, 10-16.
- Miksicek, R., Bormeyer, U. y Nowock, J. (1987). Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequences is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus. *EMBO J.* 6, 1355-1360.
- Moguilewsky, M. y Philibert, D. (1984). RU38486: Potent antiglucocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic glucocorticoid receptor followed by one impaired activation. *J. Steroid. Biochem.* 20 271-276.
- Moudgil, V. K., Lombardo, G., Eessalu, T. y Eliezer, N. (1986). Hormone dependency of transformation of rat liver glucocorticoid receptor in vitro: effects of heat, salt, and nucleotides. *J. Biochem.* 99, 1005-1016.
- Moudgil, V. K. Mukami, N., Eassalu, T. E., Caradonna, V. M., Singh, V. B., Healy, S. P. y Quattrociochi, T. M. (1984). Modulation of rat liver glucocorticoid receptor by inhibitors. Adrenal steroid antagonism. Walter de Gruyter y Co. Berlin. New York- Printed in Germany. 131-167.
- Moudgil, V. K., Healy, S. p. y Signgh, V. B. (1985) . Chromatographic separation of nontransformed and transformed glucocorticoid-receptor complexes from rat liver cytosol. Use of tungstate in the purification inactivation, and resolution of receptor forms. *J. Biochem.* 98, 963-973.
- Mukai, J. I. (1979). Guanosine-3 -diphosphate synthesis by nucleotide pyrophosphokinase-ribonuclease reaction. *Agric. Biol. Chem.* 43, 1163-1164.
- Munck, A., Guyre, P. y Holbrook, N. (1984). Physiological functions of glucocorticoid during stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5, 25-29.
- Nagai, K. Nakaseko, Y., Nasmyth, K. y Rhodes, D. (1988). Zinc-finger motifs expressed in *E. coli* and folded in vitro direct specific binding to DNA. *Nature.* 332, 284-286.

Nakamura, T., Nakayama, Y., Ichihara, A. (1984 a). Reciprocal modulation of growth and liver functions of mature rat hepatocytes in primary culture by an extract of hepatic plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259, 8056-8058.

Nakamura, T., Tomomura, A., Kato, S., Noda, Ch. y Ichihara, A. (1984 b). Reciprocal expressions of $\alpha 1$ and B- α adrenergic receptors, but constant expression of glucagon receptor by rat hepatocytes during development and primary culture. *J. Biochem.* 96, 127-136.

Nakamura, T., Teramoto, H. y Ichihara, A. (1986). Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 6489-6493.

Naylor, H. P. y Rosen, F. (1982). Antigluccorticoids: Differential antagonism of in vivo response to dexamethasone. in "Hormone antagonists" M. K. Agarwal, E. D., Walter de Gruyter y Co., Berlin N. Y. pp 365-380.

Nevis, J. R. (1983). The pathways of eukaryotic mRNA formation *Annu. Rev. Biochem.* 52, 441-4466.

Nieman, L.K, Chrousos, G. P., Killner, C., Spitz, I. M., Nisula, B. C., cutler, G.B., Merriam, G. K., Barden, C. W. and Loriaux D. L. (1985) Successful treatment of Cushing's syndrome with the glucocorticoid antagonist RU486. *J. Clin. Endocrinaol. Metab.* 61: 536-540.

Okret, S., Wikström, A. Ch., Wränge, O., Andersson, B. y Gustadsson, J. A. (1984). Monoclonal antibodies against the rat liver glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 1609-1613.

Ochoa, B y Suckling, K. E. (1987). Short term metabolism of cholesteryl ester from low-density lipoprotein in primary monolayer of adrenal cortical cells. *Biochem. Biophys. Acta.*(18, 159-167.

O'Connor-McCourt, Soley, M., Hayden, L. J. y Hollenberg, M. D., (1985). Receptors for epidermal growth factor (urogastrone) and insulin in primary cultures of rat hepatocytes maintained in serum-free medium. *Biochem. Cell. Biol.* 64, 803-810.

Parcker, M. G. (1986). Mechanism of steroid hormone action. *Can. Surv.* 5, 625-633.

Pasqualine, R. Q., (1973). *Endocrinologia.* 6a Ed. Vol III. Ed. Científico Médica. México. 674 pp.

Perlham H. (1988). Comingin from the the cold. Heat-Shock proteins. *Nature.* 322(28)776-777.

Perlmann, T. y Wrangle, O. (1988). Specific glucocorticoid receptor binding to DNA reconstituted in a nucleosoma. EMBO J. 7, 3073-3079.

Philibert, D. (1984). RU38486: an original multifaceted antihormone in vivo. Adrenal Steroid Antagonism. Walter de Gruyter & Co, Berlin. New York. Printed in Germany 77-80.

Picard, D. y Yamamoto, K. R. (1987). Two signales mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. EMBO J. 6, 3333- 3340.

Pratt, W. B., Jolly, J. D., Hollenger, m. S., Cadepond, M. F., Schweizer, G. G., Catelli, G. M., Evans, M. R. y Baulieu, E. E. (1988). A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA binding 9S glucocorticoid receptor complex. J. Biol. Chem. 263, 267-273.

Rabur, M., Damon, M., Loubatiere, J., Blotman, F. y Craster de Paulet, A. (1985). A glucocorticoid receptors in fibroblast from synovial tissue. Changes during the inflamatory process. Preliminary results. Agen. Act. 17, 478-483.

Rajpert, E. J., Lewaigne, F. P., Eliard, P. H., Place, M, Lafontaine, D. A., Economics, J. V. Belayew, A., Martial, J. A. y Rousseau, G. G. (1987). Glucocorticoid receptors bound to the antagonist RU486 are not downregulated despite their capacity to interact in vitro with defined gene regions. J. Steroid Biochem. 26, 513-520.

Resine, T., Affolter, H. U., Rougon, G. y Barbet, J. T. (1986). New insight in to the molecular mechanisms of stress. TINS, Nov-Dic. 574-579.

Rexin, M., Bush, W. y Gehring, U. (1988). Chemical cross-linking of heteromeric glucocorticoid receptors. Biochemistry. 27, 5593-5601.

Rhim, J. S. (1983). Glucocorticoid Enhancer viral transformation of mammalian cells (41728). Proc. Soc. Biol. Med. 174, 217-223.

Rosewicz, S., Mc. Donald, A. R. Maddux, B. A., Goldfine, I. D., Miesfeld, R. L. y Logdson, C. D. (1988). Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoid. J. Biol. Chem. 263, 2581-2584.

Saez, S. Y Bertrand, J. (1977). Recepteurs cellulaires et mecanisme d'action des hormones steroïdes. Lyon Pharmaceutique. 28, 11-34.

Sanchez, E. S., Meshinchi, W. T., Schlesinger, M. J., Toft, D. O. y Pratt, W. B. (1987). Relationship of the 90 kDa murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L Cell glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 262, 6986-6991.

- Sapolsky, R. M., Krey, L. C. y Ewnn Mc, B. S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid, cascade hypothesis. *Endocr. Rev.* 7, 284-301.
- Sap., J., Muñoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., ennström. B., (1986). The C-erb-A protein is a high-afinity receptor for thyroid hormone. *Nature.* 324, 635-640.
- Schwarze, P. E. y Seglen, O. (1980). Protein metabolism and survival of rat hepatocytes in early culture. *Exp. Cell. Res.* 130, 185-190.
- Schiwek, D. R. y Loffler, G. (1987). Glucocorticoid hormones contribute to the adipogenic activity of human serum. *Endocrinology.* 120, 469-474.
- Schlechte, J. A. y Schmidt, T. (1987). Use of (H3) Cortivazol to characterize glucocorticoid receptors in a dexamethasone-resistant human leukenmic cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 64, 441-446.
- Schule, R., Muller, M., Otsuka-Murakami, H. y Renkawitz, R. (1988). Cooperativity of the glucocorticoid receptor and the CACCC-box binding factor. *Nature.* 332, 87-92.
- Schwarz, L. C., Makowka, L., Falk, J. A., Falk, R. (1985). Characterization and partial purification of hepatocyte proliferation factor. *Hepatic Regeneration.* 202, 292-301.
- Seifert, S. C. y Galehrter, T. D. (1978). Mechanism of dexamethasone inhibition of plasminogen activator in rat hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 6130-6133.
- Seglen, O. (1977). Protein-catabolic of state of isolates rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 496,182-191.
- Sekula, B. C., Schmidt, T. J. y Litwack, g. (1981). Redefinition of modulators as an inhibitor of glucocorticoid receptor activation . *J. Steroid Biochem.* 14, 161-166.
- Sekula, B. C., Schmidt, T. J., Oxenham, E. A., Di Sorbo, D. M. y Litwack, G. (1982). Dual effects of pyridoxal 5'-phosphate on glucocorticoid-receptor complexes. *Biochemistry.* 21, 2915-2922.
- Sharma, R. y Timiras, P.S. (1987). Regulatory changes in glucocorticoid receptors in the skeletal muscle inmature and mature male rats. *Mech. Ageing Dev.* 37, 249-256.
- Sheidreit, C. L. y Beato, M. (1984). Cnts between hormone receptor and DNA double helix within a glucocorticoid regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 3029-3033.
- Simons, S. S., Thompson, E. B. y Johnson, D. F. (1980). Unique long-acting antiglucocorticoid in whole and broken cells systems.

Simons, S. S. Miller, P. A., Wasner, N. N., y Mercier, L. (1988). Inverse correlation between dexamethasone 21-mesylate agonist activity and sensitivity to dexamethasone for induction of tyrosine aminotransferase in rat hepatoma cells. *J. Steroid Biochem.* 31, 1-7.

Slater, E. P., Anderson, T., Cattini, P., Issaca, R., Birnbaum, M. J., Garder, D. G., Eberhardt, N. L. y Baxter, J. D. (1986). in "Steroid hormone resistance" Ed. J. D. Chrousos et al., Plenum Press, N. Y. pp 67-80.

Sluyer, M. (1983). Interaction of steroid hormone receptors with DNA. *TIBS.* July, 236-238.

Smith, A. C. y Harmon, J. M. (1987). Structural Organization of the human glucocorticoid receptor determined by one and two dimensional gel electrophoresis of proteolytic receptor fragments. *Biochemistry.* 26, 646-652.

Smith, A. C. Elsas, M. S. y Harmn, J. M. (1986). Analysis of glucocorticoid receptor activation by high resolution two-dimensional electrophoresis of affinity-labeled receptor. *J. Biol. Chem.* 28, 13285-13292.

Smith, P. y Vonn Holt, Cl. (1981). Interaction of the activated cytoplasmic glucocorticoid hormone receptor complex with the nuclear envelope. *Biochemistry.* 20, 2900-2908.

Snoek, G. T., Voorma, H. O. y Van Wijk, R. (1981). A post-transcriptional site of induction of tyrosine aminotransferase by dexamethasone in reuber H35 hepatoma cells. *Febbs lett.* 125, 266-270.

Stanley, M., Hollenberg, G. V., Segui, P. y Evans, R. M. (1987). Colocation of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 40, 39-46.

Strähle, U., Schmid, W. y Schütz, G. 1988. Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcriptional factors. *EMBO J.* 7, 3389-3395.

Suckling, K. E. y Ochoa, B. (1986). Receptor mediated endocytosis in steroid hormone-producing tissue. *Bioch. Soc. Transac.* 15, 191-194.

Stepanek, B. W., Pratt, K. K., Barela, T. y Staller, K. (1983). Studies on the mechanisms of glucocorticoid hormone induced alterations in rat thymic transcription. evidence from reconstituted cross over transcription essays, that sequential increases and decreases in transcription are due the change in the activity of RNA polymerase II rather than in the activity of cromatin template. *J. Steroid Biochem.* 19, 1695-1703.

Tai, P. K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N. G., Duhring, J. L. y Faber, L. E. (1986). A 59 Kilodalton protein associated with progesterin, estrogen, androgen and glucocorticoid receptors. *Biochemistry*, 25, 5269-5275.

Tienrungroj, W., Meshinchi, S., Sanchez, E. R., Pratt, S. E., Grippo, J. F., Holmgren, A. y Pratt, W. B. (1987). The role of sulfhydryl groups in permitting transformation and DNA binding of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 262, 6992-7000.

Thompson, E. B. y Lippman, M. C. (1974). Mechanism of action of glucocorticoids. *Metabolism*, 23, 159-202.

Vedeckis, W. V. (1983). Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation. *Biochemistry*. 22, 1983-1989.

Voigt, J. y Sekeris, C. E. (1978). Differences in inducibility by glucocorticoid of rat liver TO and TAT. *Am. J. Physiol.* 235, E374-E380.

Webb, M. L., Schmidt, T. J., Robertson, N. M. y Litwack, G. (1986). Evidence for an association of a ribonucleic acid with purified, unactivated glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 204-211.

Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Gruol, D. J. y Evans, R. M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 324, 641-646.

Weiner, F. R., Czaja, M. L., Jefferson, D. M., Giambrone, M. A., Kasper, R. T., Reid, L. M. y Zern, M. A. (1987). The effects of dexamethasone on in vitro collagen gene expression. *J. Biol. Chem.* 15, 6955-6958.

Westphal, H. M., Moldenhauer, G. y Beato, M. (1981). Monoclonal antibodies to the rat liver glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1, 1467-1472.

White, A. et al., *Principios de Bioquímica*. Ed. Mc-Graw-Hill. México 1983. 613 pp.

Wikström, A. Ch., Bakke, O., Okret, S., Brönnegard, M. y Gustafsson, J. A. (1987). Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and Nuclear localization. *Endocrinology*, 120, 1232-1242.

Williams, M. D. *Tratado de endocrinología*. 2a ed. Salvat Editores, S. A. Barcelona (1981). Capitulo 5. Suprarrenales. Grant W, Liddle Kenneth L. Melmon, 293-353 pp.

Willman, T. y Beato, M. (1986). Steroid-free glucocorticoid receptor binds specifically to mouse mammary tumor virus DNA. *Nature*. 324, 688-690.

Wosu, L. O. y Shyamala, G. S. (1987). NADPH depent steroid binding by mammary cytoplasmic glucocorticoid receptors. *Biochem. Arch.* 13, 103-112.

Yamada, S., Nakai, T., Kutsum, Y. Takeda, R., Kurskane, K., Otto, P.S., Kennedy, D. L., Whayne, T. F.(1981). Primary monolayer culture of of adult rat hepatocytes in a serum-free system: metabolic and morphological studies. *Biomedical Res.* 2, 491-500.

Yamada, S., Otto, P. S., Kennedy, D. L. , Whayne, F. T. (1980). The effects of dexamethasone on metabolic activity of hepatocytes in primary monolayer culture. *In vitro.* 16, 550-570.

Yamamoto., A., Isohashi, F., Okamoto, K., Hiriuchi, M. Mitsui, Y. y Sakamoto, Y. (1986). Change in activity of an adenosine triphosphate stimulated glucocorticoid receptor translocation promoter in the cytosol and nucleus of rat liver under various physiological conditions. *Endocrinology.* 119, 357-361.

Yoeh, G., Douglas, A. y Brighton, V. (1986). Long-term culture of fetal rat hepatocytes in media supplement with fetal calf-serum Ultrosor SF or Ultrosor G. *Biol. Cell.* 58, 53-64.

Yoshida, A., Noguchi, T., Taniaguchi, S., Mitani, Y., Ueda, U., Urabe, K., Adachi, T. y Mashida, H. (1986). Receptor dynamics and tyrosine aminotransferase induction during the course of chronic treatment of rat with glucocorticoid. *Endocrinol. Japon.* 33, 769-775.

APENDICE I

- Dexametasona (16a-methyl-9a-fluoruro-1,4-pregnadiene-11 β ,17a,21-triol-3,20-dione)
- Prednisolona (4, pregnene-11 β ,17a,21-triol-3-20-dione)
- RU38486 (17 β -hidroxy-11 β ,4-dimethylaminophenyl-17a-propynyl estra 4,9, diene-3-one)
- Cortisol 21 mesilate (4-pregnene-11- β , -17a,21-triol-3,20-dione-21-methanewsulfonate)
- 1,9⁽¹¹⁾-11 deoxicortisol (17,21-dihidroxy,1,4,9,(11)-pregna triene-3,20-
- Cortexolona (11-deoxicortisol,17,21, dihidroxy-4-pregnene-3,20-dione))
- K-7 (1-5-isoquinolinesulfonil-2-metil-piperazina hidrocloruro)
- RU5020 (17a,21-dimethyl-19-nor-pregna-4,9-dien-3,20-dione).

APENDICE II.

Abreviaturas usadas.

-TAT	Tirosina Aminotransferasa.
-TDO	Triptofano Dioxigenasa.
-tej	Tejido.
-CBG	Glubulina que une corticosteroides.
-ARN	Acido ribonucleico.
-ADN	Acido desoxiribonucleico.
-ACTH	Hormona adrenocorticotropina.
-CRF	Factor liberador de corticotropina.
-VASO	Vasoprsina arginina.
-CCK	Colestocinina.
-dxc	Dexametasona.
-hspm 90	Proteina de 90 KDa que se activa con shock de calor.
-CRG	Complejo glucocorticoide-receptor.
-PLP	Fosfato de piridoxal
-MMT	Inhibidor macromolecular de la translocación.
-ASTP	Promotor de la translocación estimulado por ATP'
-N	Nucleótido.
-ERG	Elementos que responden a glucocorticoides.
-MMTV	Virus de tumor mamario de ratón.
-TK	Timidina Cinasa.
-HSV	Virus de herpes simple.
-hMT	Metallothionein.
-MSV	Virus sarcoma murino.
-X	Aminoácidos.
-TFIIIZ	Factor de transcripción de <u>Xenopus</u>
-FNI	Factor Nuclear I.
-hGH	Hormona de crecimiento.
-AMP	Monofosfato de adenosina.
-ATP	Trifosfato de adenosina
-ADN	Acido desoxirribonucleico.
-NADPH	Fosfato-dinucleotido-nicotinamida-adenina reducido.
-ARN	Acido ribonucleico.