



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

159  
Zej

FACULTAD DE CIENCIAS

"CUANTIFICACION DE LOS RECEPTORES  
HORMONALES PARA ESTRADIOL Y  
PROGESTERONA LOCALIZADOS A NIVEL  
CITOPLASMICO Y NUCLEAR EN  
UTERO DE RATA"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ZEFERINO ENRIQUE PEREZ CARDENAS

MEXICO, D.F.

FALLA DE ORIGEN

1991.



## **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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE:

Resumen	IV
Introducción	1
Hipótesis	23
Objetivos	24
Material	25
Método	
- Manejo experimental de los animales.	26
- Procesamiento de la muestra para la obtención de la fracción citosólica y nuclear.	29
- Cuantificación de los receptores hormonales para estradiol y progesterona.	29
Resultados	
- Registro del peso uterino	33
- Concentración de proteínas	34
- Cuantificación de receptores citosólicos para estradiol y para progesterona a 4, 22 y 37°C	36
- Cuantificación de los receptores de E <sub>2</sub>	
a) En citosol	40
b) En núcleo	42
- Cuantificación de receptores de P <sub>g</sub>	
a) En citosol	44
b) En núcleo	47
Discusión	48
Conclusiones	58
Apendice A	60
Apendice B	65
Bibliografía	77

## INTRODUCCION.

Los dos sistemas que controlan de manera armonica el funcionamiento de los diferentes organos en un organismo son el sistema nervioso y el sistema endocrino. En el caso del sistema endocrino, la comunicacion intercelular se realiza mediante sustancias quimicas vertidas a la sangre u hormonas (1). El mensaje quimico que conlleva cada hormona es ampliamente distribuido por todo el organismo, y puede interactuar potencialmente con una multitud de celulas, pero el mensaje solo es traducible o captable si puede ser leido por las celulas de los organos blanco en los que existe algo capaz de captar este mensaje y de dar respuesta a este estimulo (2). Esta caracteristica de la celula blanco se debe a que contienen ciertos componentes macromoleculares con los que interactua la hormona con alta afinidad y especificidad, los cuales reciben el nombre de receptores hormonales, este evento es indispensable e inicial en el curso de la accion de la hormona sobre las celulas blanco (3,4), por lo que se puede definir a un organo blanco como aquel cuyas celulas poseen receptores de alta afinidad y especificidad para una determinada hormona (2).

Las hormonas pueden ser de dos tipos: hidrosolubles o liposolubles. Las hormonas, los neurotransmisores y los mediadores quimicos locales de naturaleza proteica son hidrosolubles, mientras que las hormonas esteroides y tiroideas son liposolubles (1,5). Las hormonas hidrosolubles viajan facilmente por el plasma, pero al interactuar con las celulas blanco son demasiado hidroflicas para poder pasar directamente a traves de la bicapa lipidica de la membrana citoplasmica. Es por ello que sus proteinas receptoras especificas se hallan situadas en la superficie celular. Las hormonas liposolubles no pueden viajar libremente por el torrente sanguineo, por lo que se une a proteinas fijadoras plasmaticas. Cabe mencionar que solamente la hormona liposoluble libre es capaz de inter-

raccionar con la célula blanco, por ello la hormona que posee una acción fisiológica es aquella no unida a proteínas transportadoras plasmáticas (6). Ya libres, las hormonas liposolubles pueden fácilmente difundir a través de la membrana celular (7,8). Las evidencias sugieren que la captación de estas hormonas no está influida por barreras de membrana ni por procesos de transporte (7,8,9). Una vez que la hormona hidrofóbica ha penetrado al interior celular, puede interactuar con sus receptores específicos. Los receptores de las hormonas tiroideas se localizan en el núcleo celular (5), aunque existe controversia acerca de la ubicación de los receptores de las hormonas esteroides, particularmente estradiol y progesterona, ya que la localización citosólica al parecer es producto de un artefacto experimental al estudiar estas proteínas en homogenados celulares en los que se rompe el equilibrio intracelular (10,11,12), arrancándolos de su verdadera localización en el núcleo (13,14). A pesar de ello, el análisis de la ubicación de los receptores para estas dos hormonas sexuales femeninas es muy útil, ya que da una idea de las diferentes características del receptor al estar ocupado o no por hormona. Así, se ha observado que en las células fraccionadas los receptores hormonales esteroideos se hallan tanto en el citosol como en el núcleo (15,16). En general, los receptores citosólicos se encuentran prestos a captar hormona, por lo que se hallan libres, empero, ya asociados a la hormona forman un complejo hormona-receptor que se desplaza al núcleo (17,18), y se une a sitios específicos de la cromatina (receptores nucleares) (19,20), por lo que es evidente que la mayoría de los receptores localizados en este último compartimento celular se hallan unidos a la hormona (21,22). Es probable que los sitios aceptores nucleares estén constituidos por proteínas no histonas y ADN (19,20). El sitio de interacción del complejo hormona-receptor con la cromatina nuclear es donde finalmente se modula el comportamiento celular. (6)(fig. 1). Aunque las hormonas tienen una amplia variedad de funciones, en general siempre actúan ejerciendo un efecto regulador y ninguna hormona inicia reacciones metabó-

licas de novo, de tal manera que la célula receptora del estímulo hormonal modifica su comportamiento y adecúa de una manera u otra sus esquemas metabólicos (23).

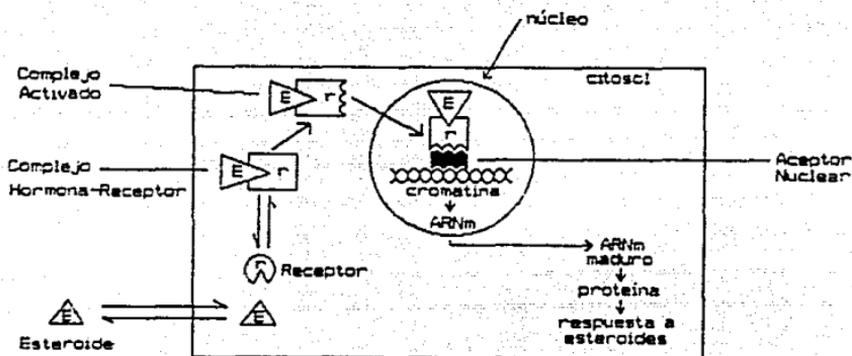


FIGURA 1. Esquema de los pasos de acción de las hormonas lipofílicas (en este caso esteroides). La activación de los receptores intracelulares por sus hormonas es seguida por la unión al núcleo del complejo y la síntesis de ARN mensajero (Felig, P. 1983)(5).

## GENERALIDADES

Las principales clases de hormonas esteroides son los androgenos, los estrógenos, los progestágenos, los glucocorticoides y los mineralocorticoides. En los mamíferos dichas hormonas son secretadas por las gonadas y las glándulas suprarrenales (5). El ritmo global de la síntesis de estos esteroides es regulado, en cada caso, por una o más de las hormonas tróficas hipofisarias: la Hormona Luteinizante (Luteinizing Hormone, LH), la Hormona Foliculo Estimulante (Follicle Stimulating Hormone, FSH), y la Hormona Adrenocorticotropica (Adrenocorticotropic Hormone, ACTH)(5,23).

### - Síntesis del estradiol ( $E_2$ ) y de la progesterona ( $P_4$ ).

Tanto el  $E_2$  como la  $P_4$ , se componen del hidrocarburo tetracíclico saturado ciclo *pentano-perhidro fenantreno* (24, 25). Su biosíntesis abarca una serie compleja de pasos controlados por enzimas (fig. 2). El precursor inmediato es el colesterol, que es obtenido por las células por captación de la sangre (26,27). El  $E_2$  es producido por las células de la corteza adrenal y principalmente por las células de la teca interna de los folículos ováricos. Su síntesis, secreción y concentración en el torrente sanguíneo son controlados por la hormona foliculo estimulante, que es secretada por la Hipofisis (fig. 3). La  $P_4$  es producida por las células del cuerpo luteo o amarillo; su síntesis, secreción y concentración es controlada por la hormona luteinizante, que también es secretada por la Hipofisis (5,23). Ambas hormonas controlan el ciclo reproductor de las hembras en los mamíferos, ejerciendo profundos efectos en sus ciclos reproductivos, en su comportamiento y a nivel tisular (28,29). Aunque la mayoría de los mamíferos poseen las mismas hormonas hipofisarias y ováricas, no existe un ciclo reproductor típico (28), a pesar de ello, se pueden definir dos tipos de ciclos reproductivos: uno es característico en los primates (ciclos menstruales) y en el otro las hembras presentan ciclos estrales (30).

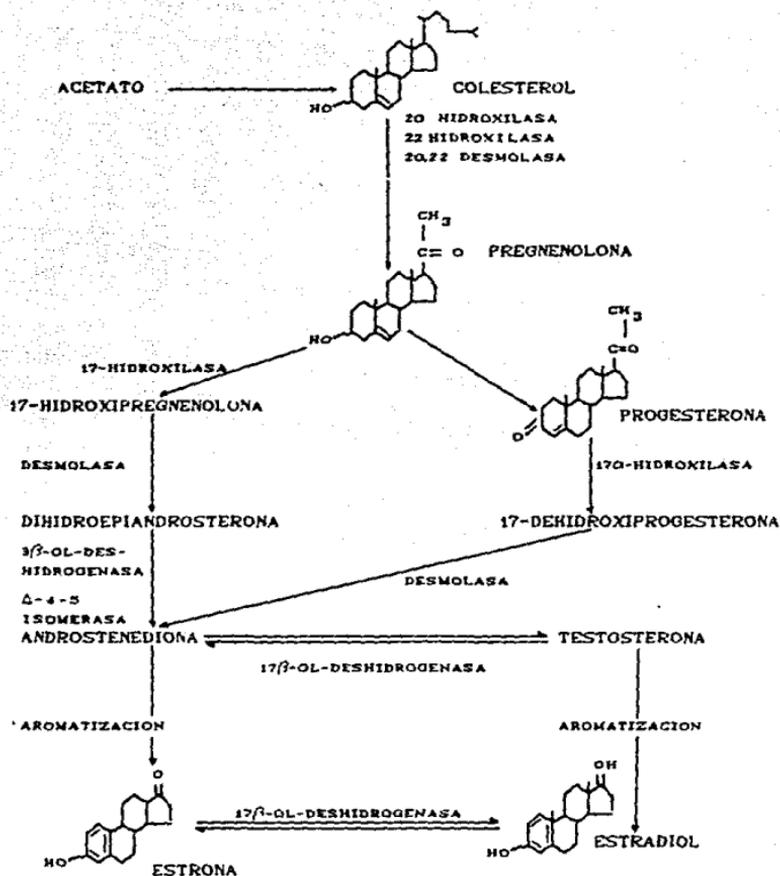


FIGURA 2. Caminos de la esteroidogénesis en el ovario (Felig 1983)(5).

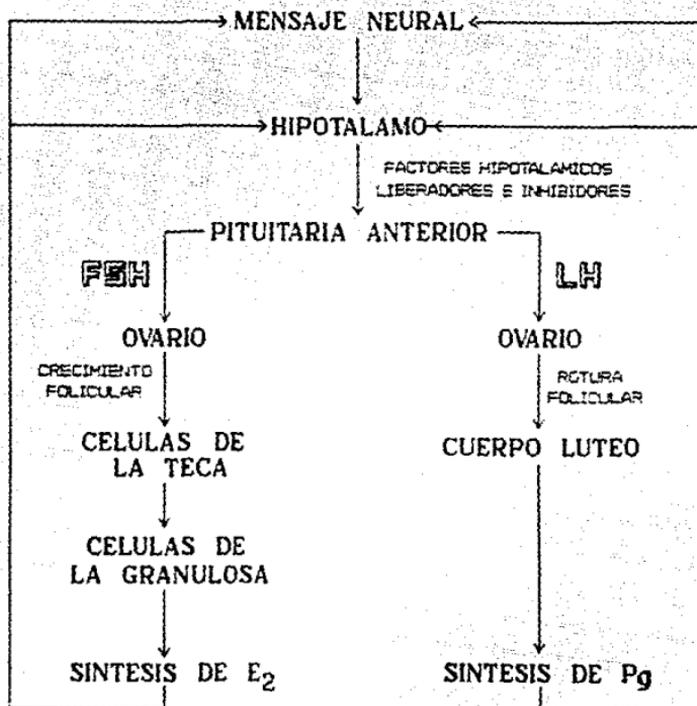


FIGURA 3. Regulación por retroalimentación de las hormonas hipofisarias LH y FSH con el ovario (Felig, 1983; Jensen, 1979)(5,23).

Tanto en las hembras con ciclo menstrual como estral, el estradiol y la progesterona estimulan el crecimiento, división y diferenciación en las células endometriales. Estas células son descamadas al final de cada ciclo menstrual, lo cual no sucede en las hembras con ciclo estral, pero en ambos, a lo largo de cada ciclo se pueden observar cambios morfológicos cíclicos en las células epiteliales uterinas (28, 31). Estos cambios en la morfología celular son un buen parámetro para poder determinar la fase del ciclo en la cual se encuentran (31). Particularmente, el ciclo estral de la rata presenta ciertas semejanzas con el ciclo menstrual de la mujer, aunque no ocurre menstruación (32), si observamos los cambios hormonales que se presentan durante ambos ciclos podrán apreciarse ciertas similitudes generales (fig. 4 y 5).

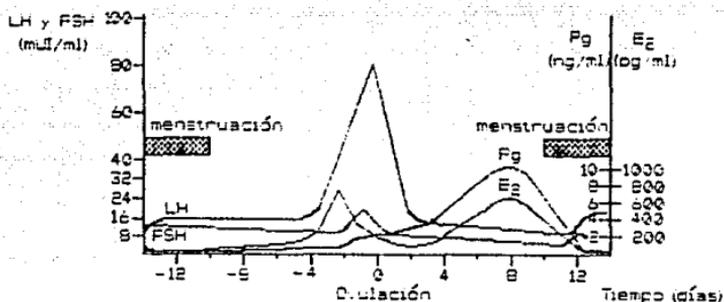


FIGURA 4. Grafica que muestra los cambios hormonales en el ciclo menstrual de la mujer (Felig, P. 1983)(5). Las unidades son las siguientes: miliunidades Internacionales por mililitro (mUI/ml), nanogramos por mililitro ( $1 \times 10^{-9} \text{g/ml}$  o ng/ml), picogramos por mililitro ( $1 \times 10^{-12} \text{g/ml}$  o pg/ml). El lapso de duración de la menstruación está indicado por el símbolo:

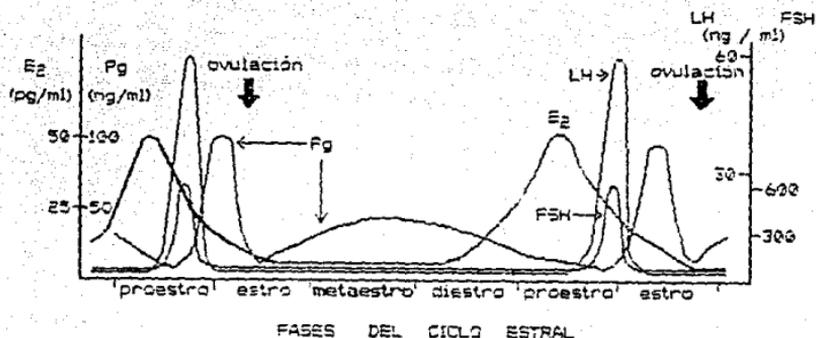


FIGURA 5. Grafica que representa los cambios hormonales en el ciclo estral de la ratona (Campbell, C. 1980)(32).

- Captación del estradiol y la progesterona por las células blanco.

Los esteroides secretados por las gónadas y por las glándulas suprarrenales cuando se encuentran en circulación, pueden estar libres o ligados a proteínas plasmáticas y formar complejos (2). El estradiol es transportado preferencialmente por la Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales (SHBG) o la Albumina; y la progesterona por la Globulina Fijadora de Corticosteroides (CBG), la Albumina o la Proteína que Enlaza Progesterona (PBP)(2,28,39). El 17  $\beta$ -estradiol es el estrógeno más potente que se encuentra en forma natural (24,28). Esta hormona es responsable de los caracteres sexuales secundarios en las hembras, incluyendo el crecimiento del sistema de conductos de la mama, crecimiento del útero y del epitelio vagi-

nal. También es responsable (junto con otros esteroides como los androgenos) de la manifestación de celo en las hembras (23,30). Entre los órganos blanco de esta hormona se encuentran: la mama (34), el hígado (35), la pituitaria (6), el útero (36,37), el cervix uterino (38), el pulmón, las glándulas adrenales, la glándula pineal, el páncreas, el corazón, el timo, el músculo esquelético, las células endoteliales y el hipotálamo (9). La progesterona es responsable de la maduración y desarrollo de la glándula mamaria, aunque no juega un papel muy importante en la aparición de los caracteres sexuales secundarios (39). Es preponderante para adecuar el epitelio uterino para la implantación del huevo y en el mantenimiento del embarazo (28,30). Los órganos blanco de esta hormona son la pituitaria (6), el músculo liso (28), el hipotálamo (29), la mama (39), el cervix (40) y el útero (41).

#### - Características generales de la interacción Hormona-Receptor esteroideo.

Gracias al avance en el conocimiento de los mecanismos íntimos de la acción de las hormonas esteroides sexuales, se ha podido dilucidar en gran parte la función biológica de cada hormona y la serie de eventos que configuran la manera en que estas actúan. El proceso de interacción entre la hormona y la célula blanco se puede esquematizar de la siguiente manera (6):

- 1.- Captación y retención de la hormona en el órgano blanco o efector.
- 2.- Acoplamiento de la hormona a un componente específico de ese tejido en el citoplasma (receptor hormonal).
- 3.- Traslocación o desplazamiento de este complejo formado entre la hormona y el receptor al interior nuclear.
- 4.- Interacción del complejo con sitios particulares en la cromatina nuclear.
- 5.- Modulación del comportamiento celular del órgano blanco como resultado de esta interacción.

Esta serie de pasos ocurren en la mayoría de las hormonas esteroideas al entrar en la célula blanco. Cada receptor hormonal presenta particularidades y similitudes que son importantes de detallar. Tanto el  $RE_2$  como el  $RP_5$  son miembros de una familia de proteínas intracelulares que regulan la expresión genética y están involucrados en la morfogénesis (42). Entre los diferentes miembros de esta familia se encuentran los receptores para andrógenos, mineralocorticoides (42), glucocorticoides (43), vitamina D<sub>3</sub> (44), ácido retinoico y hormona tiroidea (T<sub>3</sub>)(45). Todas estas proteínas presentan ciertas homologías en su secuenciación de aminoácidos y en sus características funcionales (como son las zonas de reconocimiento a la hormona o al ADN)(46,47,48). Los receptores para E<sub>2</sub> y P<sub>g</sub> ya se han secuenciado (49,50,51), y ambas proteínas contienen en su estructura diferentes zonas o dominios con diferentes funciones. Cada dominio se ha denominado con letras de la A a la F (fig. 6)(42,50). Las regiones A, C, y E se hallan altamente conservadas, es decir, son muy similares en su secuencia de aminoácidos y en su función entre los diferentes receptores ya mencionados, así como entre diferentes grupos de organismos (conejo, rata, pollo y humanos), mientras que las regiones B, D y F se hallan menos conservadas (42). Cada una de estas regiones presentan funciones que están involucradas tanto en el mecanismo de interacción entre la hormona y el receptor, así como en la dinámica de la interacción del receptor con la cromatina (paso 5 del esquema general). De esta manera, cada uno de los dominios participa de una manera u otra en dicha interacción.

El  $RE_2$  está constituido por 595 aminoácidos (correspondiente a aproximadamente 1800 nucleótidos) y su secuenciación ya ha sido determinada (49). En su estructura presenta homologías con el receptor de glucocorticoides, ya que tiene zonas ricas en cisteína, lisina y arginina. Su peso molecular se ha determinado en forma monomérica entre 65 000 a 70 000 Daltons (65 a 70 KDa)(49,52). En la tabla A se pueden observar algunas características del  $RE_2$ . El  $RP_5$  en algunos organismos como en el conejo está formado por una subunidad proteica (53),

mientras en el caso del hombre, la gallina y algunos roedores se halla constituido por dos subunidades denominadas A y B, ambas muy semejantes entre si, y muy parecidas tambien a la que presenta el conejo (6,42,47,51). La secuenciacion del RP<sub>g</sub> tambien ya se ha determinado (50,53) y su vida media en el interior celular es de aproximadamente 5 dias (54). En las Tablas A y B se pueden observar otras caracteristicas generales de dicho receptor.

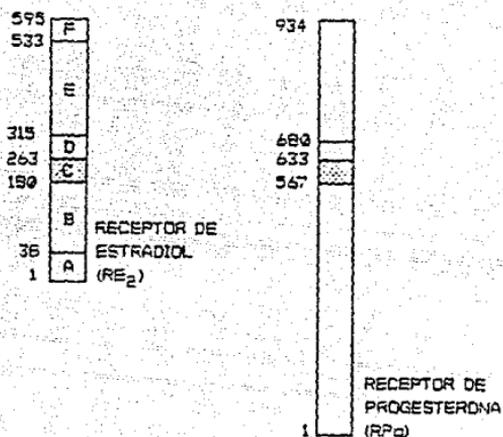


FIGURA 6. Comparación esquemática de los aminoácidos en los RE<sub>2</sub> y RP<sub>g</sub>. Las secuencias de aminoácidos primarios han sido alineados en base de las regiones de máxima similitud entre ellos. Los numeros de aminoácidos son para los receptores humanos. Las zonas en obscuro (■) son de union a la hormona (Sluyser, M. 1990)(42).

TABLA A. Comparación de algunas características fisicoquímicas de los receptores citoplasmáticos para estradiol y progesterona (Calandra, 1980)(2).

CARACTERISTICA	RE <sub>2</sub>	RP <sub>g</sub>
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION (S)	8-9, 4.5, 5	8-9, 3.6-4.5
RADIO DE STOKES (A)	87	79
TIEMPO DE DISOCIACION (T A 0°C)	>1 DIA	>4 HRS <1 DIA
PUNTO ISOELECTRICO	6.2	5.8

TABLA B. Características fisicoquímicas de la subunidad A y B del RP<sub>g</sub>.

CARACTERISTICA	RP <sub>g</sub>	SUBUNIDAD A	SUBUNIDAD B	REF.
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION (S)	8-9	3.6	4.5	55,56
PESO MOLECULAR (KDa)	290-323	71-79	108-117	55,57
RADIO DE STOKES (A)	79	45	83	55,57

REF: NUMERO DE REFERENCIA

- Dinámica intracelular del receptor para estradiol

El RE<sub>2</sub> al unirse con su hormona en las células blanco sigue los pasos ya mencionados en las características generales de dicho receptor: La hormona se une al receptor de manera no covalente y forman un complejo hormona-receptor con

una constante de asociación ( $K_a$ ) de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  ( $K_d = 1/K_a = 1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ ), este complejo se trasloca al núcleo e interacciona con sitios específicos de la cromatina modulando la expresión genética (58). A este mecanismo de acción se le denomina *mecanismo de dos pasos* (10), observándose, tanto *in vivo* como *in vitro*, que al estimular una célula blanco con hormona ocurre el traslado del receptor del citosol al núcleo en un tiempo de 30 a 60 minutos, por lo que la concentración de  $RE_2$  en el citosol disminuye mientras que concomitantemente en el núcleo aumenta. Después de 6 horas se reestablecen las concentraciones de  $RE_2$  como al inicio (59,60). Este mecanismo se esquematiza en la figura 1, aunque el empleo de metodologías de detección del receptor en los que no se requiera destruir la integridad celular (inmunoquímica, inmunohistoquímica, autorradiografía) permite observar que en realidad toda la población de receptores permanece solamente en el núcleo (61,62), por lo que se considera que lo que ocurre en el citosol en realidad ocurre en el núcleo (fig. 7) (63,64).

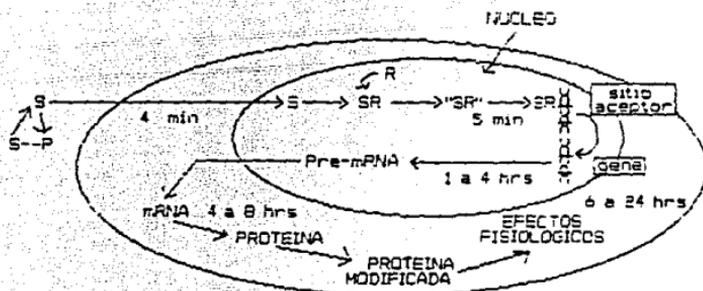


FIGURA 7. Ubicación intracelular del  $RE_2$ , señalando el tiempo en que se realiza cada evento intracelular. (Rorles.C., 1989) (64). S: Esteroide; P: Proteína Transportadora; R: Receptor; SR: Complejo Esteroide-Receptor; "SR": Complejo activado.

a) Cambios conformacionales del RE<sub>2</sub>.

La dinámica del RE<sub>2</sub> en el interior celular involucra una serie de cambios conformacionales y de comportamiento bioquímico del mismo. En la figura 8 se ilustran la serie de cambios que experimenta este receptor al unirse a su hormona y trasladarse al núcleo. En el citosol el receptor se encuentra constituido como una unidad multimérica con un peso molecular de 300 000 Da. y con un coeficiente de sedimentación de 8 unidades Svedberg (8 S) (65). Cuando se forma el complejo hormona-receptor, éste experimenta un cambio conformacional evidenciado por cambiar su coeficiente de sedimentación de 8 S a 4 S (66). La forma 4 S monomérica o nativa liberada de la forma 8S (67), posee un peso molecular de entre 65 y 70 KDa (65). Para trasladarse al núcleo debe experimentar un proceso llamado activación, el cual es discernible porque aumenta la afinidad del complejo estradiol-receptor por la cromatina nuclear, al ADN y a los polianiones (68). También cambia su rango de disociación volviéndose más lento, es decir, aumenta su afinidad por la hormona y además presenta un cambio conformacional de 4 S a 5 S (68).

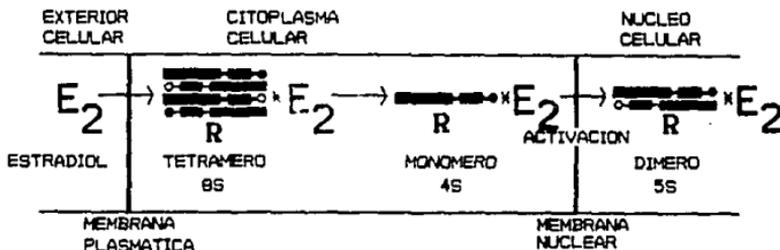


FIGURA 8. Cambios conformacionales del RE<sub>2</sub> (Sherman, M. 1984) (17).

La forma SS se encuentra altamente unido a la cromatina de manera que solo es extraíble del núcleo empleando fuerzas iónicas altas mediante el uso de soluciones amortiguadoras que contengan cloruro de potasio (KCl) en concentraciones entre 0.4 y 0.6 M. Dicho tratamiento solo permite obtener entre el 80 al 90 % de la cantidad total de receptores nucleares (4,6). Las zonas de unión nuclear, también llamados *ceptores nucleares*, están constituidos tanto por secuencias definidas de ADN (elementos de respuesta) como por proteínas no histonas (2). Es aquí donde finalmente el complejo estradiol-receptor modula la expresión de ciertos genes celulares (58). Una vez que el complejo ha interactuado con la cromatina nuclear y modula la expresión genética de la célula blanco, poco se sabe acerca del destino del receptor, pero se ha observado que aproximadamente el 40 % de la concentración total de receptores nucleares son reciclados hacia el citosol, mientras que el 60 % al parecer es degradado (59). La concentración inicial del receptor se mantiene debido a que es reemplazado por una cantidad similar que es sintetizado de novo (figura 9)(59).

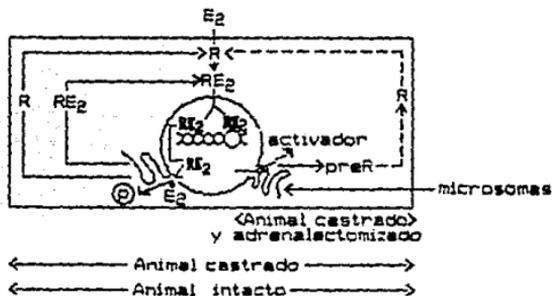


FIGURA 9. Dinámica intracelular de los cambios conformacionales del RE<sub>2</sub> (Muldoon, T. 1980)(6).

PreR: Representa un precursor postulado de un receptor inactivo que existiría en el citoplasma.

P : Se refiere a la degradación del receptor propuesta al parecer en la vecindad de los microsomas.

b) Respuesta uterotrófica al estímulo del estradiol.

En general las células blanco al ser estimuladas con estradiol presentan dos tipos de respuestas: tempranas y tardías. El que ocurra una u otra depende al parecer del tiempo del estímulo hormonal y del tiempo y magnitud de la unión del complejo estradiol-receptor al núcleo celular (18,59). En el útero las respuestas tempranas se presentan dentro de las primeras seis horas después de estimular al órgano blanco con la hormona. Este tipo de respuesta puede desencadenarse tanto por esteroides que poseen un efecto biológico intenso, como el 17  $\beta$ -estradiol o el dietilestilbestrol (DES), o bien por esteroides de potencia biológica baja como la estrona, o el estriol (24,66). Las respuestas tempranas a nivel nuclear son un incremento de la síntesis de ARN y un incremento en la actividad de la ARN polimerasa II. A nivel del citosol se observa un incremento en la oxidación de la glucosa, incremento en el metabolismo de la 2-deoxiglucosa, y aumento en la síntesis de proteínas. Finalmente a nivel del útero existe un incremento en la imbibición de fluido uterino (58,59).

Las respuestas tardías involucran un verdadero efecto biológico de la hormona sobre el órgano blanco y se caracterizan por presentarse entre 6 a 72 horas después del estímulo estrogénico (59). La estrona o el estriol no son capaces de desencadenar este tipo de respuestas, contrario a lo que sucede en el caso del estradiol o DES. Todas estas hormonas se unen al mismo receptor, sin embargo el  $E_2$  y el DES lo hacen con mayor afinidad (59,66). Al unirse con el receptor estrogénico el complejo hormona-receptor formado para las cuatro hormonas es capaz de desplazarse al núcleo, pero a diferencia del estradiol o el DES, el complejo estrona-receptor o estriol-receptor salen rápidamente del núcleo, permaneciendo en este momento de seis horas, mientras que los complejos de los estrógenos potentes permanecen en este compartimento celular más de seis hrs. Entre las respuestas tardías uterotróficas más importantes a nivel nuclear se encuentran la síntesis de ADN

18 a 24 hrs después del estímulo hormonal y la elevación de la actividad de la ARN polimerasa I y II entre 9 a 24 hrs después del estímulo hormonal. En el citosol se observa un incremento en el metabolismo de 2-deoxiglucosa entre 18 a 24 hrs después del estímulo hormonal y en el endometrio un incremento de la división celular y en el peso uterino (24 a 72 hrs.) El estradiol además de modular el comportamiento celular de un órgano blanco, también induce un incremento de la síntesis de diversas proteínas como la ovoalbumina en el pollo (1), una proteína de función desconocida de peso molecular de 28 kDa (70), la cathepsina D (71). Cabe resaltar de manera particular, la síntesis del receptor de progesterona (72). Todo ello conlleva como en el caso del endometrio uterino, a que ocurra división celular (2). Esta característica del efecto del estradiol sobre la división celular en algunos tejidos blanco es importante en el desarrollo de algunos tipos de cáncer, particularmente en aquellos tumores cuyas células de origen poseen receptores para estas hormonas. Así en el cáncer de glándula mamaria (73,74), el cáncer de endometrio, el cáncer de ovario (75) y el cáncer del cérvix uterino (76) son controlados hormonalmente. De esta manera la presencia o ausencia de receptores para estradiol en estos tipos tumorales es indicador del comportamiento biológico del tumor, lo cual se ha correlacionado con el pronóstico de la enfermedad y permite seleccionar pacientes candidatos al empleo de terapias endócrinas (77,78).

#### - Dinámica intracelular del receptor de progesterona.

La localización del receptor de progesterona (R<sub>Pg</sub>) se observó inicialmente en la fracción soluble o citosol de homogenados celulares pertenecientes a los órganos blanco (2). En estos órganos el estímulo con progesterona da como resultado una disminución de los receptores citosólicos, mientras que concomitantemente en un máximo de 30 min en el núcleo se incrementa su población (56). Estas observaciones sugirieron

que el  $RP_g$  se localizaba en el citoplasma de las células blanco, encontrándose no unido a la hormona, y bajo el estímulo de la progesterona forma un complejo hormona-receptor que trasloca al núcleo (16). Mediante el uso de anticuerpos monoclonales se ha demostrado por inmunohistoquímica e inmunocitofluorescencia que estos receptores, al igual que los  $RE_2$  son realmente intranucleares, sin importar si se encuentran unidos o no a la hormona (63). A pesar de ello, la dinámica del desplazamiento del  $RP_g$  del citosol al núcleo y los cambios conformacionales que experimenta esta proteína se han investigado ampliamente, teniendo siempre en cuenta, que la localización del receptor es nuclear. Al igual que el  $RE_2$ , la progesterona se une a su receptor de manera no covalente (51), y posee una constante de disociación de  $1 \times 10^{-9}$  a  $1 \times 10^{-10}$  M. La unión entre  $RP_g$  y su hormona se ve estabilizada por soluciones amortiguadoras que contengan un 30 % de glicerol, efecto del cual todavía no hay explicación (42,56,79). Este receptor es particularmente lábil, pero se ha observado que el uso de inhibidores de fosfatasas como el molibdato de sodio ( $Na_2MoO_4$ ) estabilizan la unión con la hormona (56,67).

#### a) Cambios conformacionales del receptor de progesterona.

El  $RP_g$  en su forma libre posee un coeficiente de sedimentación de 8-9 S (16). Dicha proteína es estabilizada en presencia de molibdato (67). Su peso molecular se ha determinado entre 290 a 320 kDa. Al parecer de esta estructura oligomérica al unirse con su hormona, se derivan dos subunidades denominadas A y B, cuyas características bioquímicas se han resumido en la tabla B. Ambas subunidades presentan una reacción cruzada al ser reconocidas por anticuerpos monoclonales dirigidos contra una u otra subunidad, lo que sugiere la existencia de una gran similitud entre ambas (56) o bien que ambas son iguales como se ha observado en el conejo (80). Es interesante señalar que ambas son capaces de unir hormona y poseen una afinidad semejante por la cromatina (53), para lo cual activarse (2,6,56). Ya en el núcleo la forma activa de

ambos monómeros al parecer se unen para formar un dímero (81), aunque esto no está muy claro. La función fisiológica de cada una de las subunidades tampoco es clara, sin embargo, se ha observado que la subunidad A posee alta afinidad por el ADN mientras que la B es afín tanto al ADN como a proteínas no histonas (6). Esto sugiere que ambas pueden interactuar en la especificidad de la modulación de la expresión celular al unirse a sus aceptores nucleares.

#### b) Efecto de la progesterona en el útero.

La progesterona en las glándulas mamarias influye en la proliferación y diferenciación celular (39). En el útero, se ha observado que estimula la activación del gen de la ovoalbumina en las aves (42), estimula la síntesis de la uteroglobina (6) e inhibe la síntesis de su propio receptor y del receptor de estradiol (2,55). Por ello, para estudiar este receptor en animales de experimentación es conveniente utilizarlos en etapa de diestro de su ciclo estral, ya que los niveles circulantes de esta hormona son bajos (54). También la progesterona es capaz de antagonizar con el estradiol, inhibiendo la formación de líquido uterino (82).

### ANTECEDENTES.

Las hormonas esteroideas como el estradiol y la progesterona están involucradas en el control endócrino del crecimiento y diferenciación de diversos órganos, como por ejemplo la glándula mamaria, el endometrio y el cervix uterino. Dicho control no solo se ejerce en las células blanco normales, sino también en las células tumorales o neoplásicas, como es el caso del cáncer de la glándula mamaria (83,84), cáncer de cervix (85,86) o cáncer de endometrio (75).

Después de la primera detección del RE<sub>2</sub> en el citosol de

tejido uterino de rata por Toft y Gorski en 1966 (87), se descubrió la existencia de diversas proteínas capaces de unirse de manera específica y con alta afinidad a diversas hormonas esteroides en sus correspondientes órganos blanco (88). Posteriormente se demostró por autorradiografía que una hora después de la estimulación con estradiol a una rata el  $RE_2$  se acumulaba en el núcleo (6). Así surgió la hipótesis de los *dos pasos*, que propone que primero se forma un complejo hormona-receptor citosólico que posteriormente se trasloca al núcleo. Este modelo se estableció tanto para el estradiol y la progesterona, así como para otras hormonas esteroides, como los glucocorticoides (89).

El empleo de hormona marcada radiactivamente con un isótopo permite marcar a la vez a la proteína receptora. Esto ha sido muy útil no solo para localizar la ubicación del complejo hormona-receptor, sino también para determinar su concentración, y la afinidad del receptor por la hormona mediante el empleo de *gráficas de Scatchard*. A partir de estas gráficas, se puede obtener la constante de afinidad ( $K_a$ ), que es un parámetro que indica la avidez que posee el receptor por su hormona y cuya contraparte es la constante de disociación ( $K_d = 1/K_a$ ) (94). El uso de hormona marcada involucra utilizar células completas o fracciones celulares obtenidas de homogenados de un tejido blanco a los que se les adiciona la hormona marcada. La incubación con la hormona se realiza hasta alcanzar el equilibrio, es decir, cuando el número de complejos hormona-receptor formados como producto de la reacción es igual a la cantidad de proteínas receptoras y moléculas de hormonas que se encuentran no unidas, de tal manera que la velocidad de la reacción es similar en ambos sentidos, estableciéndose por lo tanto un equilibrio (90,91) (ecuación 1):



H: Hormona esteroide, R: receptor y HR: complejo hormona-receptor.

Para que la totalidad de receptores se encuentren unidos a la hormona marcada se requiere emplear concentraciones saturantes de la misma que rebasen la concentración de sitios receptores, con el fin de que sean ocupados la mayoría de ellos.

La presencia de receptores hormonales para estradiol y progesterona en un tejido dado es considerada como si *ne qua non* para la acción hormonal (92,93). Dichos receptores se pueden encontrar en el interior celular, ya sea en el citosol y/o en el núcleo, y pueden estar libres o unidos a la hormona endógena. En general, los receptores localizados en el citosol se encuentran libres, mientras que en el núcleo están ya ocupados por la hormona (6). La mayoría de los métodos para determinar la concentración de estas proteínas mediante hormona marcada radiactivamente involucra ensayos directos, es decir, se adicionan concentraciones crecientes de hormona marcada hasta llegar a la saturación. Esto es seguido por la separación del ligando libre (95). Debido a que los receptores no ocupados son muy sensibles a la temperatura, pH y fuerza iónica, estos ensayos normalmente se realizan a temperaturas de 0 a 4 °C, y empleando soluciones amortiguadoras que contengan pocas sales (96). Sin embargo, el ensayo directo realizado a 0 °C no determina la concentración de proteínas receptoras que se hallan unidas a la hormona endógena ya que el rango de disociación y de intercambio de la hormona endógena por la marcada es muy lento a dicha temperatura. Como se indica en la ecuación I, para aumentar la dinámica de esta reacción, se requiere incrementar la temperatura, esto es aconsejable para la cuantificación de receptores ya ocupados como es el caso de los receptores nucleares (95).

La importancia de la unión del complejo hormona-receptor al núcleo radica en que es en este compartimento celular donde reside la acción biológica real de la hormona. El principal problema para su cuantificación se haya en la extracción de los complejos hormona-receptor de la cromatina. Para ello, se ha realizado la cuantificación de los receptores en extractos crudos no purificados del núcleo, los cua-

les pueden contener otros organelos celulares como membranas, mitocondrias, etc.(5). Otra opción es extraer los receptores del núcleo mediante fuerzas iónicas altas, empleando soluciones amortiguadoras que contengan cloruro de potasio (KCl) de 0.4 a 0.6 M (22).

El análisis del receptor para  $E_2$  y  $P_6$  tanto a nivel citoplasmico como nuclear, no solo proporciona una mayor comprensión del papel de estos receptores en el desarrollo y crecimiento de un tejido u órgano dado, sino también son marcadores de la sensibilidad hormonal de un tejido dado. En oncología clínica, la medición de receptores esteroideos ha sido ampliamente usada para la predicción de la respuesta endocrina y conducta biológica del cancer de la glándula mamaria, endometrio o del cervix-uterino (73,76,77). Particularmente en caso del cáncer mamario, la presencia de  $RE_2$  y  $RP_6$  no solo indica la factibilidad de emplear sustancias capaces de eliminar el efecto hormonal bloqueando a sus respectivos receptores, como es el caso del tamoxifen o de la hidroxiprogesterona, sino que también son un indicador del comportamiento tumoral. Los tumores que no presentan receptores hormonales tienen un comportamiento biológico más agresivo (78, 92,97). Debido a la importancia y al papel que juegan esta clase de receptores esteroideos en el desarrollo y crecimiento de diversos tejidos tanto normales como tumorales y la escasa información acerca de los receptores localizados a nivel nuclear, particularmente en relación al papel que pueden jugar en las diferentes neoplasias que presentan comportamientos hormonodependientes, hace importante encontrar una técnica más precisa para la cuantificación total de dichos receptores hormonales. Con este proposito se realizó un estudio experimental en utero de rata en el que se cuantificarón los receptores citoplasmicos y nucleares para estradiol y progesterona mediante el uso de hormona radiactiva y empleando diferentes temperaturas.

## HIPOTESIS.

La mayoría de los procedimientos de cuantificación de los receptores de  $E_2$  y Pg empleando hormona radiactiva se realizan solo en el citosol celular. Debido a que dichos receptores pueden encontrarse tanto en el citosol como en el nucleo celular, para determinar su concentración total es necesario realizar la cuantificación en ambos compartimentos celulares. Además, el desplazamiento de los receptores hormonales del citoplasma al nucleo requieren de la asociación de estos a su hormona correspondiente. Esto sugiere que casi la totalidad de los receptores nucleares se encuentran ocupados por el ligando, por lo tanto, la temperatura de reacción en el ensayo puede afectar el número de receptores asociados a la hormona marcada, por lo que se espera encontrar mayor número de receptores nucleares con hormona marcada radiactivamente si se aumenta la temperatura de reacción por arriba de 20 °C, en comparación de los hallados a 4°C.

## OBJETIVOS

- a) Cuantificar la concentración de los receptores para  $E_2$  y  $Pg$  en el citosol y en el núcleo celular.
- b) Precisar las condiciones óptimas de temperatura en las que se determine la mayor concentración de receptores nucleares.
- c) Comparar los datos obtenidos de concentración para ambos receptores ( $RE_2$  y  $RPg$ ) entre los localizados en el citoplasma y el núcleo celular.

## MATERIAL.

La cuantificación de los receptores hormonales para estradiol se realizó empleando  $17\beta$ -estradiol, marcado radiactivamente con tritio,  $16,7\text{-}^3\text{H}$  (N)(New England Nuclear, Dupont) a una concentración de  $22 \times 10^{-5}$  M ( $22 \mu\text{M}$ ) y con una actividad específica de 45.6 Curies por milimol (Ci/mmol). Para la cuantificación de los receptores de progesterona se empleó promegestona (R5020) marcada con tritio [ $17 \alpha$ -metil- $^3\text{H}$ ](New England Nuclear, Dupont) a una concentración de  $12.25 \mu\text{M}$  y con una actividad específica de 82 ci/mmol. La unión inespecífica se determinó usando el estrógeno sintético Dietilestilbestrol (DES)(Merck) y el progestageno R5020, ambos sin marca radiactiva. Para eliminar la hormona no unida se empleó carbón activado (Sigma) cubierto con Dextran T-70 (Sigma). El líquido de centelleo se preparó con Tolueno (Merck) y 2,5 Difeniloxasol (PPO)(Sigma). Todos los reactivos empleados fueron grado analítico.

El material biológico empleado consistió de 20 ratas hembras vírgenes (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, de 4 a 6 meses de edad, las cuales fueron donadas por el bioterio del Hospital Juárez. Se utilizaron en este rango de edad porque es el intervalo en el cual se considera a estos animales como adultos y maduros sexualmente (98,99). Se mantuvieron 4 ratas por jaula bajo ciclos de luz-obscuridad de 12/12 hrs, con agua y comida (nutricubos) *ad libitum* y en jaulas de acrílico transparentes, utilizando como lecho una capa de aserrín.

## METODO.

### - Manejo experimental de los animales.

Se emplearon 18 animales experimentales y dos adicionales para substituir las ratas que llegaron a morir. Durante dos semanas se mantuvieron sin tratamiento alguno con el fin de que se adaptaran a las condiciones de luz y alimento en el vivario de la Division de Investigación Clínica del Instituto Nacional de Cancerología. Pasado este tiempo se procedió a determinar el peso de cada animal y la fase del ciclo estral mediante monitoreo citológico. Los animales en etapa de diestro fueron sometidos a la extirpación de las glándulas adrenales y de los ovarios con el fin de disminuir la hormona endógena circulante (figura 10). Para corroborar que los órganos extirpados correspondían a los ya mencionados, se procedió a fijarlos en formol al 10%, y posteriormente realizar cortes histológicos de los mismos. De esta forma se observó la arquitectura histológica del tejido (APENDICE A). La operación se realizó en esta etapa del ciclo estral, porque en ella ocurre una importante disminución de la concentración de estradiol y progesterona plasmáticos (28,32).

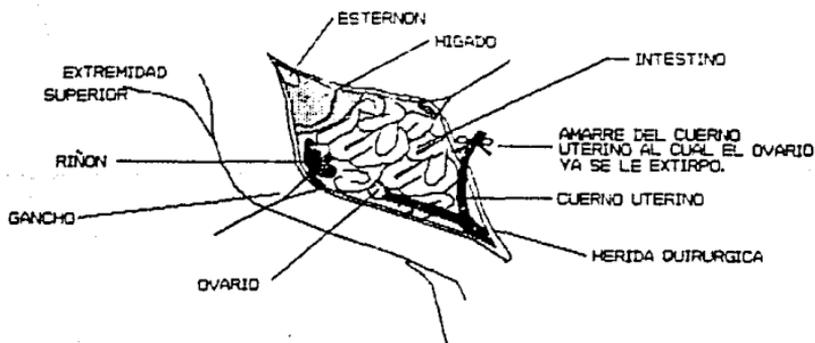


FIGURA 10. Vista lateral superior del área quirúrgica (100).

Después de la cirugía, los animales fueron pesados (Balanza granataria Ohaus) y monitoreados mediante citología exfoliativa para determinar cualitativamente la disminución de la concentración de la hormona endógena. Esto se presentó entre el tercer y quinto día posterior a la operación. Después de este tiempo ya no se observaron cambios morfológicos de las células del epitelio vaginal, por lo que se tomó a este tiempo como límite para estimular a cada animal con hormona exógena, inyectándose por vía intraperitoneal. Se eligió esta vía por su efectividad y rapidez en el efecto de la hormona (24).

En el diseño experimental los animales fueron distribuidos en 4 grupos constituidos de 4 ratas cada uno. A cada grupo se le designó una letra, de la A a la D. El manejo experimental de cada grupo se describe en la TABLA C, y consistió en lo siguiente:

Grupo A. Grupo testigo (sin tratamiento). Estos animales no fueron castrados (operados) y no se les administró hormona. Se les sacrificó por dislocación cervical el día que se encontraban en fase de diestro.

Grupo B. Grupo blanco (A+O+Va). Estos animales fueron adrenalectomizados y ovariectomizados (u ooforectomizados)(A+O) el día que se encontraban en fase de diestro en su ciclo estral. Cinco días después de la operación se inyectó a cada animal 1 ml del vehículo de administración (Va) o placebo el cual consistió de una solución de 0.1 ml de etanol y 0.9 ml de solución de NaCl al 0.9 %.

Grupo C. Grupo estimulado con estradiol (A+O+E<sub>2</sub>). A estos animales se les manejó de manera similar que el grupo B, pero disuelto en el vehículo de administración se les inyectó 10 µg de 17 β-estradiol a los cinco días de haber sido operadas.

Grupo D. Grupo estimulado con progesterona (A+O+Pg). Cinco días después de haber sido operadas, las ratas fueron estimuladas con 0.5 mg de R5020, disueltas en el vehículo de administración anteriormente descrito.

La cantidad de ambas hormonas inyectadas excede las concentraciones fisiológicas plasmáticas en la rata, las cuales se encuentran entre 0.1 a 0.3  $\mu\text{g}$  para el  $\text{E}_2$  y de 0.1 mg para la progesterona (18,54,99).

TABLA C. Manejo experimental de los animales.

Grupo	Extirpación de ovarios y adrenales	Periodo de disminución de hormona endógena	Estímulo hormonal	
			$\text{E}_2$ (10 $\mu\text{g}$ )	R5020 (0.5 mg)
A (testigo)	-	-	-	-
B (A+O+Va)	+	+	-	-
C (A+O+ $\text{E}_2$ )	+	+	+	-
D (A+O+Pg)	+	+	-	+

- : Animales a los que no se les realizó el manejo experimental

+ : Animales a los cuales se les realizó el manejo experimental indicado.

e : Periodo de cinco días después de la extirpación de los ovarios y adrenales hasta el estímulo con hormona.

Treinta minutos después de administrada la hormona o el vehículo de administración, se procedió a dar muerte a los animales mediante dislocación cervical. Una vez sacrificadas las ratas de los 4 grupos experimentales y en un tiempo no mayor de 1 minuto se extirpó el órgano uterino, colocandose inmediatamente en una caja de Petri a 4 °C (en hielo). Posteriormente, en un tiempo no mayor de 5 minutos, se almacenó cada útero debidamente etiquetado (# de rata, hormona inyectada, y día de sacrificio) a - 70 °C en un ultracongelador (REVOO), del cual se rescató hasta su empleo.

- Procesamiento de la muestra para la obtención de la fracción citosólica y nuclear.

Cada ensayo consistió en el procesamiento de cuatro uteros correspondientes a cada uno de los grupos experimentales (A, B, C y D), con el fin de realizar dichos ensayos bajo condiciones similares en cada grupo. Los uteros congelados fueron rescatados del ultracongelador y colocados en hielo. Posteriormente el tejido fue cortado en pequeños fragmentos con bisturí, se pesaron y se les adicionó 5 volúmenes de solución amortiguadora de homogenización (Tris-HCl 10mM, EDTA 1.5 mM,  $\beta$ -Mercaptoetanol 0.5 mM y  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  10 mM, pH 7.4) por mg de tejido, es decir, 1 ml de tampón por cada 200 mg de útero. Los fragmentos se homogenizaron en un homogenizador Politrón (GmbH, Kinemática). De los homogenados de cada uno de los úteros se obtuvo tanto el citosol como el núcleo celular como se muestra en la figura 11 y 12 mediante la metodología descrita por Zava y col. (22). La extracción de los receptores nucleares se realizó mediante la incubación de la fracción miofibrilar en tampón de KCl 0.4 M (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1.5 mM,  $\beta$ -Mercaptoetanol 0.5 mM, KCl 0.4 M, pH 8.5). Para la centrifugación a 800 xg se empleó una Centrifuga clínica GLC2, rotor HL-4; y para la centrifugación a 105 000 xg se empleó una ultracentrifuga Beckman L5-65B, rotor tipo 50.

Quantificación de los receptores hormonales para estradiol y progesterona.

La cuantificación de los receptores hormonales se realizó mediante la metodología descrita por McGuire y cols. (101) para el receptor de estradiol, y por Pichon y cols. (79) para el receptor de progesterona. Alícuotas de 100  $\mu$ l de citosol fueron incubados por triplicado con 25  $\mu$ l de ambas hormonas marcadas, en concentraciones crecientes de 0.2 a 4.8 nM (concentración final) para determinar la unión total del extra-

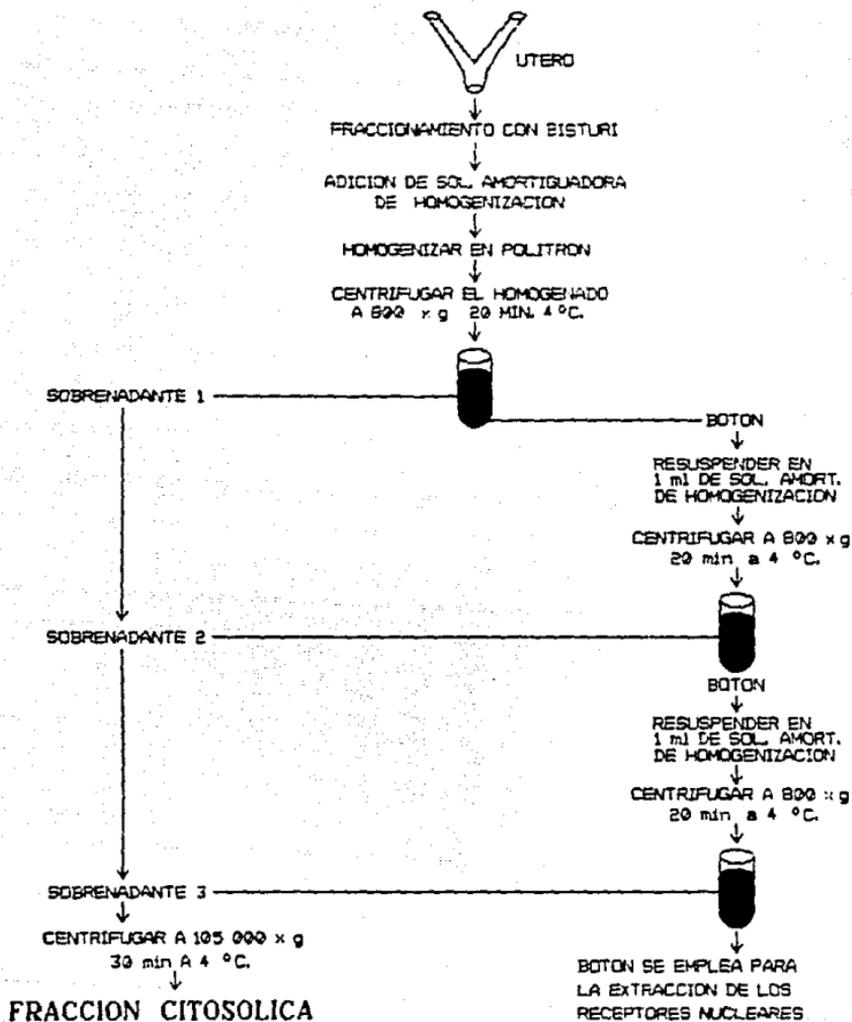


FIGURA 11. Pasos seguidos para la obtención de la fracción citosólica y fracción miofibrilar (Zava, D.) (22).

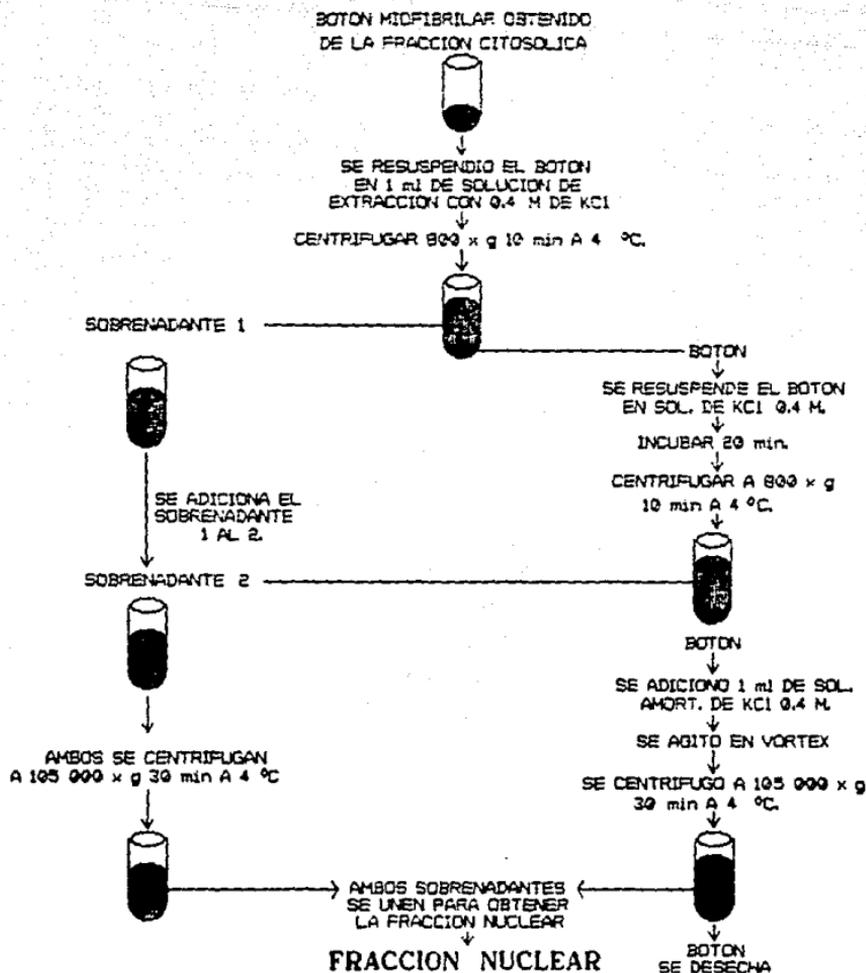


FIGURA 12. Proceso de extracción del receptor nuclear (Zava, D.) (22)

diol; y de 0.4 a 8.8 nM (concentración final) para promegestona, construyendo una curva dosis-respuesta y realizando la incubación a 4°C. Alicuotas similares de los extractos nucleares fueron incubados con las mismas concentraciones de hormona, pero realizando la incubación a tres diferentes temperaturas (4, 22 y 37 °C). Para determinar la unión inespecífica se emplearon tubos con las mismas concentraciones de hormona marcada mas hormona no radiactiva, esta ultima en una concentración 200 veces superior a la marcada. La hormona no unida fue eliminada mediante el empleo de carbon cubierto con dextran (70,101,102). La hormona unida al receptor se cuantifico mediante un contador de centelleo liquido.

De cada muestra se determinó su concentración de proteínas mediante el metodo colorimetrico descrito por Lowry y cols. (103).

Finalmente los resultados fueron expresados en femtomoles por mg de proteína (fmoles/mg de prot.), construyendo graficas de Scatchard para obtener el numero total de receptores y la constante de disociación (Kd) de cada receptor. Toda la serie de calculos realizados para la determinación de los receptores hormonales se encuentra descrito en el APENDICE B. Los resultados fueron analizados estadisticamente mediante la prueba parametrica de Analisis de Varianza (ANOVA). Al encontrar alguna diferencia estadisticamente significativa se hicieron comparaciones multiples mediante las pruebas no paramétricas de Wilcoxon y grados minimos de Fisher, así como la prueba de Newman-Keuls para corroborar dichos hallazgos.

Todo el material radiactivo desechado al final de cada reacción se colocó en garrafones de plastico debidamente etiquetados, con la cantidad de radiactividad desechada, así como el material de cristaleria contaminado con material radiactivo se lavo en una tarja destinada especialmente para ello con trampa de carbón en el tubo de desagüe.

## RESULTADOS.

### - Registro del peso uterino.

La Tabla D muestra las diferencias de peso de acuerdo al manejo experimental. El grupo TESTIGO fue el que presentó el mayor valor promedio de peso, seguido por el A+O+Pg y al final los grupos A+O+E<sub>2</sub> y A+O+Va. Al comparar al grupo TESTIGO con el resto de los grupos se observó que esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p=0.02$ ). El grupo de animales estimulados con progesterona presentaron también un peso superior al de los grupos A+O+Va y A+O+E<sub>2</sub>, sin embargo no fue significativa esta diferencia ( $p=0.1$ ). Al final de la Tabla D se pueden observar el promedio de peso de cada grupo experimental con su respectivo valor de desviación estándar, la cual se encuentra alrededor de un 15 % con respecto del valor promedio. En la TABLA E se muestran los valores promedio del peso corporal de cada animal, ya que este factor podría estar involucrado en la diferencia del peso uterino. No se encontró variaciones de peso entre los grupos experimentales ( $p>0.5$ ).

TABLA D.

Peso del útero (g).

Manejo Experimental	Numero de experimento				Promedio (D.E.)
	I	II	III	IV	
Testigo	0.400	0.391	0.342	0.297	0.358 (0.041)*
A+O+Va	0.217	0.180	0.221	0.161	0.190 (0.029)
A+O+E <sub>2</sub>	0.189	0.180	0.128	0.173	0.170 (0.025)
A+O+Pg	0.255	0.210	0.311	+++	0.259 (0.051)

D.E.: DESVIACION ESTANDAR. +++: EXPERIMENTO NO REALIZADO  
\*  $p=0.02$  (prueba de Wilcoxon).

Testigo: Ratas sin manejo experimental sacrificadas en fase de diestro.

A+O+Va: Ratas adrenalectomizadas y ovariectomizadas tratadas con vehículo de administración.

A+O+E<sub>2</sub>: Ratas operadas y estimuladas con E<sub>2</sub> (10 µg).

A+O+Pg: Ratas operadas y estimuladas con R5020 (0.5 mg).

TABLA E.

Peso corporal promedio por grupo experimental (g)

Grupo	Peso*	D.E.
TESTIGO	184.4	12.5
A+O+Va	188.8	12.8
A+O+E <sub>2</sub>	180.4	16.8
A+O+Pg	185.8	20.2

D.E.: Desviación estandar

\*: P&gt;0.05 (Análisis de varianza)

- Concentración de proteínas.

La Tabla F muestra los diferentes valores obtenidos de concentración de proteínas tanto citosólicas como nucleares, determinados por el método colorimétrico de Lowry (1951)(103). En general la concentración de proteínas cuantificada en el citosol fue mayor que la determinada en el núcleo. La distribución de los grupos con mayor concentración de proteínas citosólicas a los de menor concentración es la siguiente: grupo TESTIGO > A+O+Va > A+O+Pg  $\approx$  A+O+E<sub>2</sub>. El valor promedio de la concentración de proteínas presentó una desviación estandar muy alta (de casi un 50 % con respecto al valor promedio). Los dos grupos estimulados con hormonas presentaron una concentración citosólica de proteínas muy cercana con un valor de alrededor de 0.80 mg/ml siendo la diferencia entre ambos mínima ( $p > 0.5$ ). Al comparar al grupo TESTIGO con respecto a los otros tres grupos experimentales, fue el único con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.005$ ).

En el caso de las proteínas nucleares el panorama cambia con respecto a las citosólicas. Los valores promedio de concentración de proteínas en el núcleo son muy similares entre los grupos experimentales ( $p = 0.39$ ). Si se observan los promedios de los grupos A+O+Va, A+O+E<sub>2</sub> y A+O+Pg, éstos se encuentran alrededor de 0.35 mg/ml (obsérvese que esta es la tendencia de cada experimento). El grupo restante o TESTIGO, presentó una concentración de proteínas nucleares ligeramente mayor a la de los tres grupos ya mencionados (0.52  $\pm$  0.28 mg/ml).

TABLA F.

Concentración de proteínas en el citosol y extracto nuclear de células uterinas (mg/ml).

MANEJO EXPERIMENTAL	CITOSOL					NUCLEO $\times$				
	I	II	III	IV	P (DE.)	I	II	III	IV	P (DE.)
TESTIGO	1.08	4.50	2.64	2.74	2.39 (1.35)*	0.32	0.84	0.74	0.17	0.52 (0.28)
A+O+Va	0.57	1.78	1.50	1.77	1.41 (0.50)	0.35	0.25	0.43	0.65	0.42 (0.15)
A+O+E <sub>2</sub>	0.89	0.57	1.08	0.45	0.75 (0.25)	0.30	0.31	0.26	0.30	0.29 (0.02)
A+O+Pg	0.70	0.87	1.08	+	0.88 (0.19)	0.41	0.15	0.34	+	0.30 (0.13)

P (DE.): Valor promedio (desviación estandar)

+: No determinado

\*:  $p < 0.05$  (prueba de Duncan y prueba de Newman-Keuls).

$\times$ :  $p > 0.05$  (prueba de Duncan y prueba de Newman-Keuls).

- Cuantificación del RE<sub>2</sub> y RP<sub>2</sub> citosólicos a 4, 22 y 37 °C.

La TABLA G muestra los resultados promedio de la cuantificación de RE<sub>2</sub> y RP<sub>2</sub> citosólicos a 4, 22 y 37 °C. El objetivo de estos experimentos fue el determinar la temperatura óptima para estos receptores. Para ello se usaron dos uteros de dos ratas A+O+Va, empleándose bajo estas condiciones debido a que por no existir estímulo hormonal endógeno y exógeno, era de esperarse que toda la población de receptores se localizaran en el citosol celular. En la figura 13 A, se pueden observar las tres curvas de saturación para los ensayos a 4, 22 y 37°C para el RE<sub>2</sub>. Puede notarse que en las tres curvas se alcanza la unión máxima a una concentración de Hormona radiactiva de 2 y 3 nM de hormona libre, lo cual se observa al formarse la meseta entre estos dos valores, pero la concentración de receptores va disminuyendo conforme aumenta la temperatura de reacción. En la figura 13 B, se muestran las gráficas de Scatchard correspondientes a cada temperatura. En esta gráfica se han linearizado las curvas obtenidas a 4, 22 y 37 °C. Puede observarse que conforme aumenta la temperatura, el valor de la pendiente de cada línea va disminuyendo; lo cual se refleja en los valores de Kd (constante de disociación) en la Tabla G. También la concentración de receptores se puede determinar en estas gráficas extrapolando cada línea en el eje de las abscisas (hormona unida). El valor de las pendientes, se determino mediante regresión lineal con el fin de obtener la ecuación más representativa de cada recta. Al incrementarse la temperatura va disminuyendo el estatus del receptor de estradiol, de 171 femtomoles por mg de proteína (fmoles/mg proteína), hasta 36 fmoles/mg proteína.

TABLA G.

Cuantificación de RE<sub>2</sub> y RPg citosólicos a 4, 22 y 37 °C.

TEMPERATURA (°C)	RE <sub>2</sub> (fmoles/mg prot)	Kd (nM)	RPg (fmoles/mg prot)	Kd (nM)
4	171.05	0.52	153.5	1.6
22	147.89	1.19	114.4	6.9
37	38.12	0.92	negativo	---

prot: proteína

Kd: Constante de disociación

En el caso del receptor para progesterona que se determinaron junto con los de estradiol, se obtuvo unión de la hormona radiactiva sólo a 4 y 22 °C se (TABLA G), y se observa que conforme se incrementa la temperatura disminuye la afinidad del receptor por la promesterona, ya que la Kd obtenida a 22 °C es de 6.9 nM y la obtenida a 4 °C de 1.6 nM. La concentración de receptores obtenida a 4 y 22 °C fue muy semejante (TABLA G). Como puede observarse en la gráfica de saturación (figura 14 A), se puede definir una meseta entre 6 y 8 nM a 22 °C, mientras que a 4 °C se vislumbra una meseta de la curva entre 4 y 6 nM, que posteriormente se dispara, a valores superiores a 8 nM. En las curvas de Scatchard (figura 14 B) se observa claramente la diferencia de pendientes entre ambas temperaturas y la diferencia de Kd.

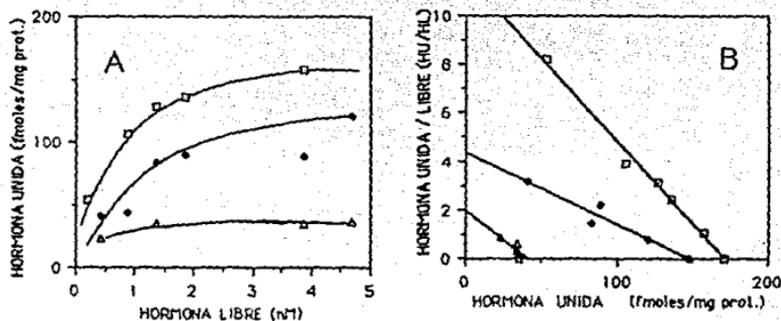


FIGURA 13. Comportamiento del receptor citosólico de estradiol a 4 (□), 22 (♦) y 37 (Δ) °C.

A) Gráfica de dosis-respuesta donde se representan directamente los valores de la concentración de la hormona unida en femtomoles/mg de proteína (fmoleles/mg de prot.) en función de la concentración de hormona libre expresada en nanomolar (nM).

B) Gráfica de Scatchard donde se linealizan los puntos de la gráfica de saturación, representando el cociente de la Hormona Unida/Hormona libre (HU/HL) en función de la hormona unida (HU). El intercepto en X es la concentración total de sitios receptores.

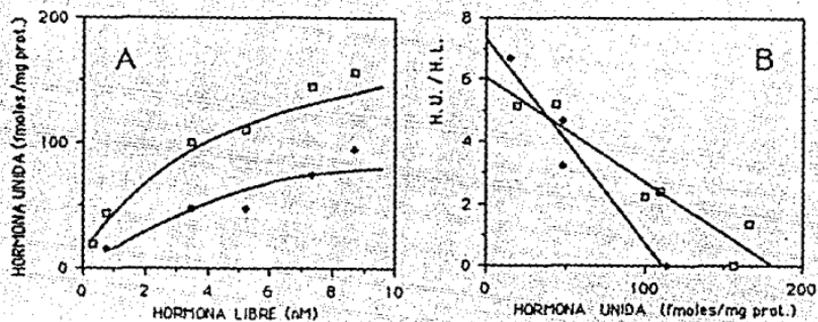


FIGURA 14. Comportamiento del receptor citosólico de progesterona a 4 (□) y 22 (◆) °C.  
 A) Gráfica dosis-respuesta.  
 B) Gráfica de Scatchard.

- Cuantificación de los Receptores para estradiol.

a) Cuantificación de RE<sub>2</sub> citosólico a 4 °C.

Analizando al RE<sub>2</sub> citosólico en la figura 15 A, se grafican la concentración de RE<sub>2</sub> en función de la concentración de estradiol radiactivo, con el objeto de observar el comportamiento de dicho receptor, dependiendo del manejo experimental de cada animal. Resulta evidente la disminución de este tipo de receptor en el grupo A+O+E<sub>2</sub>, en comparación a los otros grupos experimentales. Aunque como se observa en la Tabla H, la variación de la concentración de receptores de un experimento a otro es muy amplia la tendencia en general puede sintetizarse en el promedio. En el caso de los tres grupos no estimulados con estradiol (TESTIGO, A+O+Va y A+O+Pg), la concentración promedio de hormona unida es relativamente cercana ( $p > 0.5$ ), tendiendo a un valor de alrededor de 230 fmoles/mg proteína, lo cual es de 2.5 veces mayor al valor promedio obtenido para el grupo A+O+E<sub>2</sub> ( $p = 0.05$ ). Las tres curvas en los grupos no estimulados alcanzan la saturación (meseta de la curva) a concentraciones mayores de 2nM de estradiol, lo cual no se observa en el grupo estimulado, cuya curva esboza ligeramente una meseta, sin que sea muy clara, de tal manera que pareciera alcanzarse la saturación rápidamente.

TABLA H

Concentración de RE<sub>2</sub> citosólicos (fmoles/mg proteína).

MANEJO EXPERIMENTAL	NUMERO DE EXPERIMENTO				P
	I	II	III	IV	
TESTIGO	260.29	81.24	204.26	71.41	154.30
A+O+Va	363.21	94.26	213.36	269.59	236.11
A+O+E <sub>2</sub>	171.05	79.34	.....	42.61	97.67 *
A+O+Pg	385.55	205.12	282.02	+++	294.77

F: Promedio      .....: Negativo      +++: No procesado

\*:  $p = 0.05$  (prueba de Fisher).

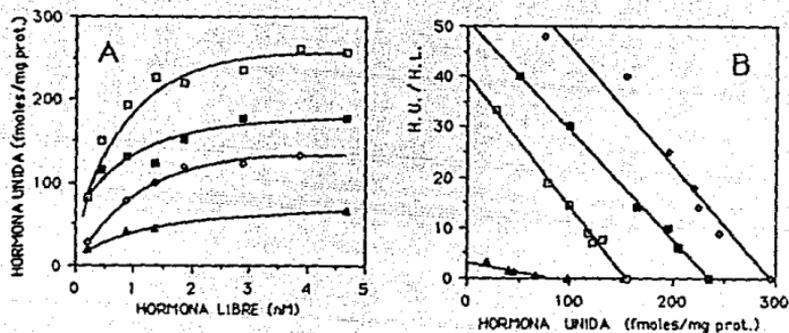


FIGURA 15. A) Gráficas de saturación para el receptor citosólico de estradiol a 4 °C dependiendo del manejo experimental: TESTIGO (○), A+O+Va (■), A+O+Pg (△) y A+O+E<sub>2</sub> (▲). B) Gráfica de Scatchard para receptor citosólico de estradiol, correspondiente a la linearización de los puntos graficados en la figura 15 A.

En la figura 15 B se muestran las gráficas de Scatchard para los cuatro grupos experimentales. Las rectas para el grupo TESTIGO, A+O+Va y A+O+Pg presentan pendientes semejantes ( $p > 0.5$ ), lo cual es observable en sus  $K_d$  (Tabla I). Estos tres grupos presentan una  $K_d$  de alrededor de 0.52 nM ( $K_a$  de  $2 \times 10^6 M^{-1}$ ). Cabe señalar que a pesar de que el grupo estimulado con estradiol (A+O+Ex) presenta una menor concentración total de receptores, ello no cambia su  $K_d$  con respecto a los otros tres grupos (0.49 nM) ( $p > 0.5$ ).

TABLA I.

MANEJO EXPERIMENTAL	Constantes de disociación promedio ( $K_d$ ) para los receptores citosólicos (nM).	
	RE <sub>2</sub> *	RPg*
	P ± D.E.	P ± D.E.
TESTIGO	0.52 ± 0.12	1.65 ± 0.14
A+O+Va	0.56 ± 0.19	1.54 ± 0.64
A+O+E <sub>2</sub>	0.50 ± 0.10	.....
A+O+Pg	0.49 ± 0.20	.....

P ± D.E.: Promedio ± Desviación Estandar

\* :  $p > 0.05$  (ANOVA).

b) Cuantificación de los RE<sub>2</sub> nucleares (RnE<sub>2</sub>).

En la figura 16 A puede observarse las curvas de saturación o dosis respuesta para el RnE<sub>2</sub>. Como se observa en la Tabla J, solo el grupo A+O+E<sub>2</sub> presentó niveles cuantificables de este receptor a 4, 22 y 37 °C. Los ensayos realizados a 4

y 22 °C presentan un nivel de receptores superior a los detectados a 37 °C, encontrándose una pérdida de hasta 120 fmoles/mg proteína, si comparamos los promedios obtenidos a 22 y 37 °C ( $p = 0.003$ ). En la misma figura 16 A puede notarse que conforme aumenta la temperatura del ensayo la concentración de hormona necesaria para alcanzar la saturación va incrementándose, siendo de  $>5$  nM para 37 °C, sin que se deficiara una meseta; de 3 a 4 nM para 4 y 22 °C. Al realizar la gráfica de Scatchard (fig. 16 B) es evidente la diferencia en las pendientes obtenidas. En la Tabla J se encuentran los valores promedio de  $K_d$  obtenidos a éstas tres temperaturas, siendo muy semejantes los obtenidos a 4 y 22°C, con valores de alrededor de 2.5 nM ( $p > 0.05$ ) y siendo menor a 37 °C, donde se incrementa el valor de  $K_d$  hasta el doble de valor obtenido para las otras dos temperaturas (5 nM) ( $p > 0.05$ ).

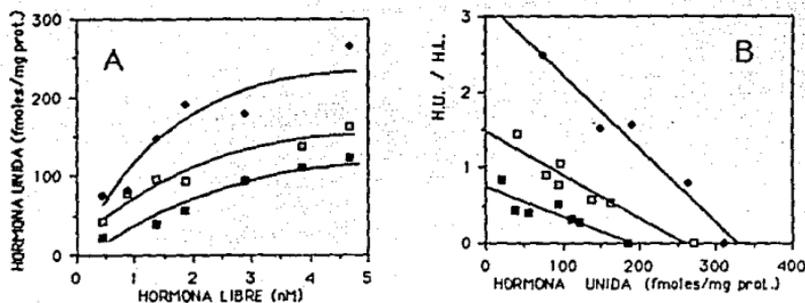


FIGURA 16. A) Gráfica de saturación para el receptor nuclear de estradiol en el grupo  $A+O+E_2$ , dependiendo de la temperatura de reacción: a 4 (□), 22 (◆) y 37 (■). B) Gráfica de Scatchard correspondiente a la linealización de los datos de la figura 16 A.

TABLA J

Concentración de RE <sub>2</sub> nucleares promedio (fmole/mg proteína).			
MANEJO	4 °C	22 °C	37 °C
EXPERIMENTAL	P ± D.E.	P ± D.E.	P ± D.E.
TESTIGO	.....	.....	.....
A+O+Va	.....	.....	.....
A+O+E <sub>2</sub>	271.0 ± 108.7	30.1 ± 74.2	185.0 ± 33.9
A+O+Pg	.....	.....	.....
Constante de disociación (Kd) para el grupo A+O+E <sub>2</sub> (nM).			
	2.60 ± 0.55	2.39 ± 1.37	5.54 ± 4.55

P ± D.E.: Promedio ± Desviación Estandart

.....Negativo

\*p < 0.003 (prueba de Fisher)

†p < 0.05 (prueba de Fisher)

- Quantificación de los receptores de progesterona.

a) Quantificación de RPg citosólico a 4 °C.

Los grupos no estimulados con hormona (A+O+Va y TESTIGO), presentaron RPg citosólicos, mientras que los grupos estimulados con estradiol y progesterona no presentaron niveles detectables de este tipo de receptor. En la figura 17A se encuentran las curvas de saturación para el RPg de los grupos que presentaron este receptor. Analizando estas gráficas se puede observar que el grupo TESTIGO alcanza la saturación entre 4 y 5 nM de progesterona, mientras que el grupo A+O+Va lo alcanza en valores superiores a 6 nM. Al representar los valores obtenidos de unión específica

(fmoles/mg proteína) en una gráfica de Scatchard (figura 17B) se pueden observar las rectas correspondientes para ambos grupos no estimulados. En ambas gráficas es mínima la diferencia en la concentración de receptores, siendo ligeramente menor en el grupo TESTIGO ( $p=0.1$ ), mientras que sus  $K_d$  son semejantes con un valor de alrededor de 1.6 nM (Tabla I). En la Tabla K se muestran las concentraciones promedio del RPg citosólico para ambos grupos, siendo ligeramente semejante el valor promedio, de aproximadamente de 150 fmoles/mg proteína.

TABLA K

Concentración de RPg citosólicos (fmoles/mg proteína).

MANEJO EXPERIMENTAL	NUMERO DE EXPERIMENTO				P*
	I	II	III	IV	
TESTIGO	34.50	17.26	308.20	113.36	154.30
A+O+YA	322.80	30.24	63.60	368.54	196.26
A+O+E <sub>2</sub>	117.02	*	.....	.....	.....
A+O+Pg	*	.....	.....	+++	.....

P: Promedio      .....: Negativo      +++: No procesado

\*: Unión no Especifica

\*  $p=0.1$  (prueba de Wilcoxon)

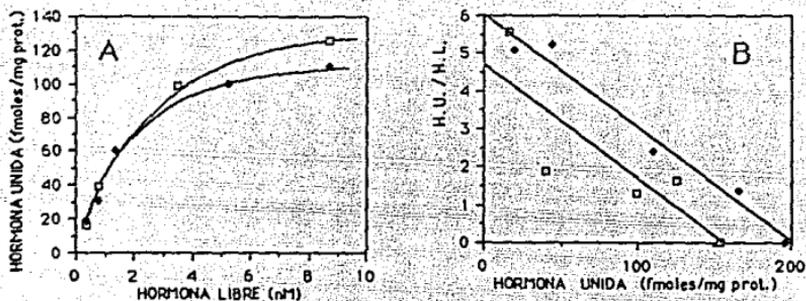


FIGURA 17. A) Gráfica de saturación para el receptor citosólico para progesterona a 4 °C dependiendo del manejo experimental: grupo TESTIGO (□) y A+O+Va (●). B) Gráfica de Scatchard resultante de la linealización de los datos de la figura 17 A.

b) Cuantificación del R<sub>Pg</sub> nuclear.

En el caso del R<sub>Pg</sub>, solo un grupo presentó niveles detectables para este receptor (grupo A+O+Pg a 37 °C) en una concentración promedio de  $78 \pm 2$  fmoles/mg proteína. En las gráficas de dosis-respuesta no se observaron resultados que siguieran un comportamiento como en las gráficas ya previamente presentadas (figura 18 A). Al realizar con estos resultados una gráfica de Scatchard, no se obtuvo una línea recta con pendiente negativa, sino una gráfica como la que se muestra en la figura 18 B. También el grupo testigo presentó gráficas de Scatchard con este mismo comportamiento, en la mitad de los experimentos en cada temperatura en los grupos TESTIGO y A+O+Pg.

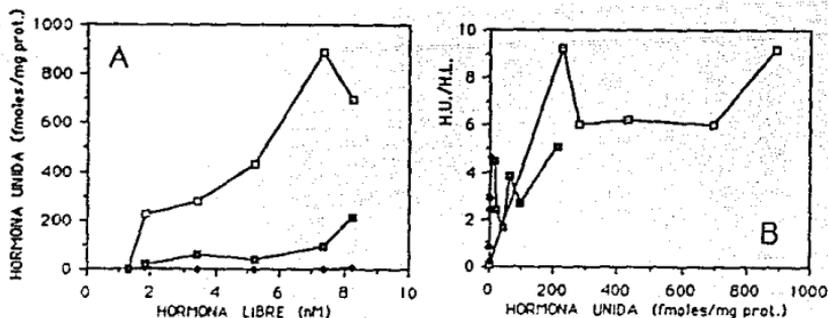


FIGURA 18. Gráfica de saturación (A) y de Scatchard (B) mostrando la unión no específica del Receptor nuclear de progesterona, los símbolos corresponden a 3 diferentes experimentos: experimento 1 (○), experimento 2 (◊) y experimento 3 (■).

## DISCUSION.

Como puede observarse en la tabla D, el peso uterino de los cuatro grupos de animales presento variaciones de acuerdo al manejo experimental. Junto con este parametro se determino el peso corporal de cada animal (TABLA E), ya que este factor podria ser importante en la diferencia del peso uterino, sin embargo no se encontraron variaciones de peso corporal entre los grupos experimentales ( $p > 0.5$ ) que explicaran estas diferencias. Cabe señalar que otro factor importante en la variación de este parámetro fue el fragmento de cuerno uterino disectado al castrar a cada animal, ya que de esta manera se aseguro la extracción total del ovario, lo cual se comprobó de manera histológica. Tomando ello en cuenta, se pudo observar que el grupo TESTIGO (no castrado ni estimulado) fue el que presentó el peso uterino más alto, así como una ligera elevación en la concentración de proteínas citosólicas y nucleares (TABLA F). Este hecho puede ser la explicación de que en éste grupo presente un incremento en el peso y en la concentración proteica, ya que en comparación a los animales castrados, sigue existiendo el estímulo hormonal.

En cuanto al peso uterino del resto de los grupos experimentales, el grupo A+O+Pg presentó un valor de 0.259 mg. Este valor se halla entre el obtenido para el grupo testigo (de 0.358 mg) y los grupos A+O+Va y A+O+E<sub>2</sub> (de alrededor de 0.175 mg). Este valor de peso no puede atribuirse al efecto de la progesterona, ya que en general, para un verdadero estímulo los esteroides requieren un tiempo mayor de 6 horas (6), mientras que los animales de este trabajo fueron sacrificados a los 30 min después de la inyección de hormona, por lo que esta diferencia en peso entre el grupo TESTIGO y los tres grupos de animales castrados puede atribuirse a atrogía por falta de estímulo hormonal.

En el caso de la concentración de proteínas citosólicas, el grupo A+O+Va también presentó un valor intermedio entre el grupo TESTIGO y los grupos A+O+Pg y A+O+E<sub>2</sub>, siendo en

estos dos últimos muy similares (de alrededor de 0.80). Este valor es 1.7 veces menos concentrado con respecto al grupo A+O+Va y 3 veces menos concentrado con respecto al grupo TESTIGO. Cabría esperar que este grupo (A+O+Va) presentara una concentración de proteínas semejante a la de los otros dos grupos castrados (A+O+Pg y A+O+E<sub>2</sub>). Esta diferencia se mantiene constante en casi todos los experimentos realizados en este grupo (Tabla F). Esto indica que apesar de homogenizar cada utero con una relación peso-volumen de tampon de homogenización similar (1:5), la concentración de proteínas per se fue diferente. No se ha reportado que la estimulación temprana (menor de 6 hrs) con estradiol o progesterona provoquen en primera instancia una disminución de la concentración de proteínas de un órgano blanco (2,6). Ya que se emplearon relaciones semejantes de dilución peso/volumen las diferencias de concentración entre el grupo de animales castrados A+O+Va con respecto a los otros dos grupos de animales castrados A+O+E<sub>2</sub> y A+O+Pg pueden ser atribuibles al azar.

En el caso de la concentración de las proteínas nucleares, como se observa en la tabla F, la concentración en los tres grupos de animales castrados fue muy semejante (de alrededor de 0.05 mg/ml), inferior a la determinada en el grupo TESTIGO (de 0.08 mg/ml), lo cual apoya que en este último grupo los niveles basales de hormona no solo mantienen la diferencia en peso o en la concentración de proteínas, sino también en la concentración de proteínas nucleares, como se ha observado en la literatura (7,23).

Es importante el aclarar que estas diferencias en el peso uterino o en la concentración de proteínas no tuvo algún efecto en la concentración de receptores hormonales, ya que no se encontró una relación entre ambos parámetros bajo las condiciones empleadas en este ensayo, por lo que estas diferencias en peso o en concentración no intervinieron en la determinación de dichos receptores en forma importante.

Cuando se modificaron las condiciones de temperatura en la determinación de los receptores para estradiol y progesterona

na citosólicos, se pudo observar que estos disminuyen en concentración conforme se aumenta la temperatura del ensayo (TABLA G). Katzenellenbogen y col. (95) han sugerido que la labilidad que presentan los receptores citosólicos en comparación con los nucleares, estriba en los dos siguientes factores:

1.- Los receptores citosólicos en su gran mayoría se encuentran libres de hormona, lo cual los hace muy susceptibles a temperaturas entre 20 a 37 °C.

2.- El receptor libre citosólico que se encuentra en forma monomérica (forma 4S)(65), posee *per se* poca estabilidad a la temperatura en comparación a la forma nuclear dimérica (forma 5S). Probablemente esta diferencia conformacional sea determinante, ya que esta última forma posee una mayor afinidad por la hormona que le confiere una mayor estabilidad a la temperatura.

Todos los grupos experimentales presentaron receptores para estradiol citosólicos, sin importar el manejo experimental proporcionado (TABLA H). Si comparamos los valores obtenidos de concentración para los RE<sub>2</sub> citosólicos y nucleares en las tablas H y K, es evidente que al estimular a los animales con estradiol disminuyen los receptores citosólicos para esta hormona, mientras que concomitantemente aparecen los receptores hormonales en el núcleo. Este efecto no es observable en los animales estimulados con progesterona o cuando no hay estímulo hormonal (grupo TESTIGO y A+0+Va). El proceso de disminución del RE<sub>2</sub> citosólico y aparición de los receptores nucleares es iniciado por la estimulación del estradiol, el cual al unirse con su receptor forma un complejo con éste, y así se traslocan o desplazan al núcleo (4,69). Se ha determinado que tanto dosis fisiológicas como altas concentraciones de estradiol en la rata (las dosis farmacológicas se consideran en la rata entre 1 a 10 µg)(18,22), provocan en un lapso de 30 min a 1 hora el desplazamiento del receptor al núcleo, obteniendo por consiguiente la disminución de la población citosólica de RE<sub>2</sub> y un aumento en la población nuclear (4).

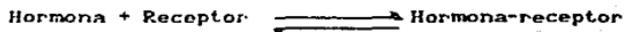
Si analizamos los efectos de la temperatura sobre los  $RE_2$  nucleares se podrá notar un incremento de un 13 % en la concentración del receptor detectado a 22 °C. En la gráfica 18 B (sección de resultados) se muestran las gráficas de Scatchard para este receptor a 4, 22 y 37 °C. Las pendientes entre las rectas son muy semejantes como se observa en la TABLA I, donde se encuentran los valores de  $K_d$  promedio. Ello sugiere que a pesar de aumentar la temperatura a 22 °C, la afinidad por el receptor no se ve alterada, ya que es muy similar a la determinada a 4 °C, pero sin embargo, se detectó un 13 % más de receptores a 22 °C que a 4 °C. Samborn y col. (104) y Katzenellenbogen y col. (95) observaron que el ensayo de determinación de los  $RE_2$  a 4 °C, también llamado ensayo directo, no determina la concentración total de proteínas unidas con alta afinidad a su hormona, sino solamente aquellos sitios no ocupados al momento del análisis. Al aumentar la temperatura del ensayo se incrementa la dinámica de la reacción de intercambio, permitiendo que los sitios receptores que se encuentran unidos a hormona, se liberen de ésta y que la hormona marcada tenga mayor probabilidad de unirse al receptor. De acuerdo con Katzenellenbogen, el rango de disociación a 4 °C del estradiol de la proteína receptora es más lento y el mínimo intercambio ocurre durante el tiempo de ensayo. En este trabajo, bajo las condiciones experimentales del ensayo empleado, la diferencia encontrada de concentración de  $RE_2$  a 4 y 22 °C fue solo de un 13 %. Esta diferencia aunque es evidente no es muy alta. Si a 4 °C solo se detectan los sitios receptores vacíos, es decir sin hormona, cabría suponer que en el núcleo los niveles de estos sitios deben ser mínimos, ya que es un prerrequisito para su localización en el núcleo el que se encuentren previamente unidos a hormona, sin embargo, la concentración obtenida a 4 °C es relativamente cercana a la encontrada a 22 °C.

Lo descrito a 4 y 22 °C no ocurre a 37 °C. En este último caso se observó una disminución en la concentración de  $RE_2$  nuclear de casi un 50 %, y un aumento de hasta el doble de su  $K_d$  lo que significa la pérdida de la mitad de su afinidad

por la hormona o  $K_d$ ) en comparación a lo obtenido en las otras dos temperaturas (TABLA I). El decremento de la unión de la hormona con su receptor debido al incremento de la temperatura puede resultar de dos procesos (104):

1.- Inestabilidad del complejo receptor-estradiol por la temperatura.

Como ya se indicó, al aumentar la temperatura del ensayo se incrementa la dinámica de la interacción hormona-receptor. Esto involucra que conforme se incrementa la dinámica de la reacción, la formación del complejo es menos estable, es decir, la velocidad hacia un lado u otro del equilibrio aumenta.



2.- Incremento de la actividad de proteasas.

Al homogenizar cada útero y romper la estructura celular, se liberan una gran cantidad de enzimas proteolíticas. En este trabajo se empleó al EDTA, que es un inhibidor de proteasas (105,106), el cual junto con el empleo de temperaturas entre 0 y 4 °C disminuye la actividad de estas enzimas. Pero al aumentar la temperatura, muchas de estas enzimas incrementan su actividad, lo cual puede afectar al receptor, degradándolo y por tanto, disminuir su concentración y su actividad.

Al comparar las  $K_d$  citosólicos para  $RE_2$  ( $K_d \approx 0.5$  nM) con los obtenidos en el núcleo a 4 y 22 °C ( $K_d \approx 2.5$  nM) se puede observar un incremento de este valor en el núcleo. En general, se ha descrito en la literatura una  $K_d$  para  $RE_2$  citosólico entre 0.3 nM a 1 nM (11,22,69,104) y para el receptor nuclear de 0.02 a 3.3 nM (104). Las variaciones de los valores de  $K_d$  de un ensayo a otro puede deberse a factores biológicos o a factores intrínsecos de la metodología (33). Entre estos factores se hallan los siguientes:

### Biológicos.

- a) Variación biológica de un organismo a otro y de una especie a otra.
- b) Variación en la afinidad de un tejido a otro.

### Metodológicos.

- a) Variación en las condiciones de reacción de un experimento a otro.
- b) Alteración del receptor.
- c) Influencia de proteínas contaminantes.

El valor superior de la  $K_d$  en el núcleo en relación al del citosol involucra una menor afinidad ( $K_a$ ) del  $RE_2$  por su hormona. Las condiciones experimentales entre el ensayo realizado en el citosol y en el núcleo varían en 2 factores:

- i) El manejo de la temperatura.
- ii) La extracción del receptor nuclear empleando KCl 0.4 M.

Weichman y Notides (69) describen resultados diferentes a los aquí descritos, ya que ellos observan que el  $RE_2$  nuclear posee una mayor afinidad que la forma citoplasmática, mientras que Zava y col. (22) presentan resultados en los que ambas formas poseen  $K_d$  similares. También en la literatura se ha descrito resultados similares a los de este trabajo. Molvihill y Palmiter, así como Kalamí y col. (107,108), han encontrado valores de  $K_d$  superiores en el núcleo en comparación con el citosol.

El esclarecer estas diferencias es muy importante, ya que el papel biológico en cuanto a estas discrepancias de afinidad por la hormona de un mismo receptor en un compartimento celular u otro, nos puede estar indicando diferentes estados funcionales del mismo receptor (109). Como se comentó al principio de esta discusión, los receptores nucleares para estradiol presentan una mayor estabilidad a cambios térmicos

en comparación a los citosólicos, lo cual se ha inferido que esto se debe a sus diferencias de unión y afinidad por su hormona. Aunque cabe aclarar que en el presente trabajo, un factor muy importante empleado para la cuantificación del RE<sub>2</sub> nuclear fue el KCl, lo que implica una alta fuerza iónica no solo capaz de extraer al receptor nuclear, sino también de inestabilizar al complejo estradiol-receptor, repercutiendo en la afinidad del mismo (42,59,65,110).

La temperatura también es un factor que puede estar involucrado en la variación del valor de la Kd (6). Cabe señalar que en el grupo A+O+E<sub>2</sub> el ensayo nuclear también se realizó a 4 °C como en el citosol, observándose las mismas diferencias de Kd. Este resultado sugiere precisamente que el KCl puede estar jugando un papel más preponderante en esta diferencia. En el caso del ensayo del receptor nuclear incubado a 37 °C se observa una Kd >5 nM, por lo que a esta temperatura es evidente que el complejo hormona-receptor es más inestable que a 4 y 22 °C.

El RP<sub>2</sub> citosólico solo fue detectable en los grupos experimentales que no fueron estimulados con ninguno de los dos esteroides sexuales femeninos: el grupo TESTIGO y el grupo A+O+Va, mientras que los grupos A+O+E<sub>2</sub> y A+O+Pg no presentaron niveles detectables del receptor. El valor de Kd de ambos se determinó alrededor de 1.6 nM, el cual se halla dentro del rango reportado en la literatura entre 1.0 a 10 nM (41). Cabe resaltar que la concentración promedio de receptores de un experimento a otro es muy variable, pero la afinidad de los receptores por la promegestona no varía. La presencia en estos grupos del receptor citosólico sugiere que se encuentran ahí por no existir hormona capaz de interactuar con el receptor, y por lo tanto no se desplaza al núcleo. Cabe esperar que en el grupo estimulado con estradiol (A+O+E<sub>2</sub>) presentara un resultado semejante. El hecho de que en estos animales no se detectara el receptor en el citosol, sugiere que de alguna manera el estradiol a las dosis empleadas (10 µg) en este trabajo (superiores a 0.2 µg se consideran en la rata como farmacológicas), interfieren de alguna manera en

la cuantificación del  $RP_g$ . Se ha determinado de manera amplia que esteroides como el estradiol, DES o estrona no presentan unión cruzada con el  $RP_g$  (39,41), por lo que no es factible el suponer que este esteroide se uniera con el  $RP_g$  e interactuara con éste. Este resultado es especialmente interesante y abre el tema para una investigación dirigida a responder esta interrogante.

El grupo estimulado con progesterona ( $A+O+Pg$ ) tampoco presentó niveles detectables de  $RP_g$  nuclear como sucedió para el grupo  $A+O+E_2$ . El que este grupo no presente este receptor no implica que no lo poseyera, ya que los dos grupos blanco si lo presentaron y el manejo experimental fue similar, lo que permite pensar que en este grupo el receptor se desplazó al núcleo estimulado por la  $Pg$ , como ya se ha reportado (6).

Como ya se indicó, solo los grupos  $A+O+Va$  y TESTIGO presentaron  $RP_g$  en el citosol. En el grupo  $A+O+Pg$  cabría esperar la presencia de éste en el núcleo como respuesta al estímulo hormonal. Sin embargo, no se detectaron niveles del receptor en este grupo, y de hecho, tampoco en el resto de los grupos. Cabe aclarar que en el grupo  $A+O+Pg$  al graficar los resultados mediante ecuaciones de Scatchard, éstas presentaron comportamientos semejantes a los ejemplificados en la figura 19B, en donde a pesar de encontrar cierta unión, no se forma una línea recta con pendiente negativa, sino se forma una nube de puntos sin una tendencia aparente. Soutter y col. (1981)(111) ha reportado en cáncer cérvico-uterino comportamientos similares para  $RE_2$  citoplásmico y nuclear, de tal manera, que este tipo de comportamiento refleja una baja afinidad del receptor por su hormona. Para el  $RP_g$  se ha reportado que, en comparación al  $RE_2$ , es particularmente lábil ya que es fácilmente inestabilizado por la temperatura y fuerza iónica, no formándose complejo receptor-progesterona (2). En los experimentos a 22 y 37 °C podría esperarse que la temperatura participara de manera importante en la desestabilización del receptor, pero a 4 °C, es factible observar el receptor en el citosol, por lo que cabría esperar que de igual manera sucediese en el núcleo, sin embargo, no es así.

Por presentarse un comportamiento no lineal en el Scatchard con las tres temperaturas ensayadas (figura 19B), indica que la unión al receptor de  $P_g$  sí ocurrió, pero la diferencia en el citosol con respecto al núcleo fue la presencia de KCl, y al parecer, el  $RP_g$  es altamente sensible a él, en comparación al  $RE_2$ .

En el caso del receptor de progesterona, la  $K_d$  detectada para los grupos A+O+Va y TESTIGO se encontró dentro de los rangos observados para la progesterona, pero también para la promegestona (de aproximadamente 2.5 nM)(39).

De acuerdo con Katzenellenbogen y col. (95), todo estudio que pretenda optimizar el ensayo de cuantificación de receptores mediante el ensayo de intercambio de hormona radiactiva, debe considerar varios de los siguientes factores:

- a) Proveer un rango razonable de tiempo para permitir el intercambio,
- b) Reducir al mínimo la pérdida de sitios de unión,
- c) Minimizar la unión no específica de la hormona a otros sitios,
- d) Emplear las condiciones adecuadas de temperatura,
- e) Determinar la concentración óptima de hormona radiactiva y de las proteínas de la muestra.

Uno de los objetivos de este trabajo fue el manejar diferentes condiciones de temperatura en el ensayo de intercambio, para determinar con mayor precisión la concentración de receptores nucleares de estradiol y progesterona, observando el efecto de este manejo en la capacidad de unión de los receptores con su ligando correspondiente, mediante la determinación de su constante de disociación ( $K_d$ ). Un paso importante para poder lograr este objetivo fue eliminar las fuentes endógenas de las hormonas, con el fin de minimizar su interferencia en la concentración de receptores, lo cual alteraría los resultados en la cuantificación de los mismos, ya que la hormona propia del animal puede unirse a los receptores y competir por éstos (93). Bajo las diferentes condiciones hormonales en un animal no castrado, los niveles de  $RE_2$  y  $RP_g$

pueden localizarse de manera gradual en un compartimento celular u otro, dependiendo de la fase en el ciclo menstrual o sexual en el que se encuentre. Ya que este no es un fenómeno "de todo o nada", la concentración de receptores citosólicos y nucleares puede fluctuar de un compartimento celular a otro dependiendo de los niveles hormonales. Ello involucra que para determinar en un órgano blanco la presencia de estos receptores se requiere de la cuantificación en ambos compartimentos celulares. La determinación en un solo compartimento establece de manera parcial la hormonodependencia de un tejido dado, ya que es de manera incompleta si se desea obtener y cuantificar la mayor concentración de estas proteínas receptoras.

## CONCLUSIONES.

- I.- Los receptores hormonales citosólicos para  $E_2$  y Pg son altamente sensibles a temperaturas de 22 y 37 °C, por lo cual, en este diseño experimental el ensayo realizado a 4 °C fue el más adecuado para determinar la mayor concentración de receptores.
- II.- El ensayo para detectar el  $RE_2$  nuclear realizado a 22°C permite cuantificar un 13 % más de receptores sin que estos se vean afectados en su afinidad por la hormona, ya que su  $K_d$  a 4 y 22 °C son similares.
- III.- El receptor de  $E_2$  se desplaza del citosol al núcleo en respuesta a la presencia y unión de su hormona, lo que confirma la importancia biológica de la localización nuclear de este receptor para estimular y modular el comportamiento celular de sus órganos blanco. En el caso del RPg los datos sugieren que este trasloca al núcleo por su decremento en el citosol al estímulo con R5020, pero no fue detectado en este compartimento celular.
- IV.- El empleo de soluciones con KCl 0.4 M para extraer al receptor nuclear para  $E_2$  traen consigo un detrimento en la afinidad del mismo por su hormona, ya que la  $K_d$  determinada para el receptor citosólico fue menor que en el núcleo.
- V.- El RPg nuclear es muy sensible a la fuerza iónica empleada con el KCl 0.4 M, ya que mediante el método aquí empleado no fue factible detectar este receptor en el núcleo, y a diferencia del  $RE_2$  nuclear, pierde la capacidad de unión de la hormona radiactiva y solo se detecta unión de tipo inespecífico.

- VI.- El empleo de procedimientos para eliminar la sal, en este caso el KCl, como la diálisis o la cromatografía por exclusión de peso molecular pueden ser una buena opción para la cuantificación de los receptores nucleares, tanto para  $E_2$  como para Pg. pudiéndose eliminar de esta forma el KCl y con ello, el efecto de la fuerza iónica sobre la unión no covalente del complejo hormona-receptor.
- VII.- Para poder determinar la presencia total de receptores, así como la hormonodependencia de un tejido dado, es necesario cuantificar los receptores tanto citosólicos como nucleares. Su concentración en un compartimento celular u otro dependerá de los niveles de hormona circulante, y por tanto, esto estará relacionado con la fase del ciclo estral (o menstrual) del organismo en estudio.
- VIII.- Finalmente, el papel fisiológico de los receptores unidos fuertemente al núcleo, es decir, aquellos que solo son extraídos con altas fuerzas iónicas, se ha tratado de determinar no solo en animales experimentales, sino también en neoplasias o tumores humanos, sin llegar a una conclusión clara. Por ello, la optimización de metodologías para determinación es importante para poder comprender mejor no solo su importancia biológica, sino también el papel que juegan estos en problemas clínicos.

## APENDICE A.

### - Corroboración histológica de la extirpación de las glándulas adrenales y de los ovarios.

Se extirparon tanto las glándulas adrenales como los ovarios para abatir los niveles circulantes endógenos de estradiol y progesterona. Para corroborar su extirpación se identificó cada órgano extraído mediante cortes histológicos teñidos con Hematodilina-Eosina.

#### a) Glándulas adrenales.

Las glándulas adrenales o suprarenales se encuentran localizadas en la porción anterosuperior de cada riñón (112,113).

Histológicamente se hallan constituidas por dos regiones claramente definidas: una externa denominada corteza, y una central denominada médula, la cual se encuentra completamente rodeada por la corteza. La corteza adrenal se halla constituida por tres regiones: Una zona externa o glomerular de pequeño espesor y formada por células globosas; una zona intermedia o fasciculada, la cual se encuentra muy desarrollada con respecto a la anterior, y finalmente la zona reticular, la cual es reducida y compuesta de pocas células (113,114) (figura 19).

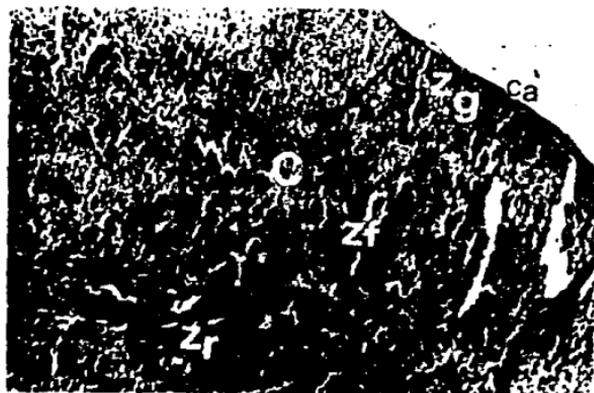


FIGURA 19. Regiones de la glándula adrenal: la corteza (C) rodeada de tejido conectivo (cápsula, Ca) y la médula (M). A su vez se muestran las diferentes zonas de la corteza adrenal: La zona glomerular ( $Z_g$ ) rodeada de la cápsula, y la zona fasciculada ( $Z_f$ ) y la zona reticular ( $Z_r$ ). Obsérvese el mayor desarrollo de la zona fascicular (Tinción de Hematoxilina-Eosina, H-E-; 95 X).

b ) Ovarios.

Los ovarios al igual que las glándulas adrenales son órganos pares localizados en el extremo distal del oviducto bicorné que presenta la rata (98,99). Ambos órganos presentan una forma ovalada de contornos irregulares, y su tamaño en general es de aproximadamente 8 mm por 5mm.

Al corte histológico, el ovario se compone de dos zonas (113,114). La zona interna o medula, formada de tejido conectivo laxo y vasos sanguíneos; y b) una zona externa o corteza, la cual contiene los folículos ováricos.

En el estroma cortical se pudieron identificar folículos de diferentes tamaños y etapas de desarrollo. Se pudieron observar folículos primarios, y folículos maduros. Finalmente también pudo observarse cuerpos lúteos o cuerpos amarillos (figura 20).

Junto con el corte del ovario, se pudo observar partes del oviducto, distinguiéndose en su morfología la capa interna o mucosa, la capa intermedia o muscular y la capa más externa o serosa. El hecho de encontrar fragmentos del oviducto indica que la extirpación del ovario fue más allá de su unión al oviducto, lo que garantizó su completa extracción (figura 21).



FIGURA 20. Panorámica en donde se muestra parte del ovario en la cual pueden observarse en la corteza ovarica folículos en diferentes etapas de desarrollo: Folículos primarios (Fp), cuerpos luteos (Cl) y la médula ovárica (M)(Tinción H-E, 95 X).



FIGURA 21. Secciones del cuerno uterino (CU) y trompas de Falopio (TF), en las cuales pueden observarse la mucosa (Mu), capa muscular (Cm), lumen uterino (Lu) (Tinción H-E, 95 X).

## APENDICE B.

### Cálculos para obtener la concentración de receptores hormonales.

- a) Preparación de la curva dosis-respuesta para el receptor de estradiol.

La cuantificación de los receptores para estradiol en el citosol se realizó de acuerdo a la metodología descrita por McGuire y col. (1977)(101), empleando la fracción citosólica o nuclear obtenida de cada útero homogenado. Cada ensayo se realizó por duplicado entre 0 y 4 °C, a menos que se indique lo contrario. El procedimiento fue el siguiente:

- 1.- Por cada útero se colocaron dos series de tubos de vidrio. A una serie se le denominó UT para la determinación de la unión total, empleando únicamente 17  $\beta$ -estradiol marcado radiactivamente y a la otra, se le denominó UI para la determinación de la unión inespecífica, empleando estradiol radiactivo más DES. Cada serie constó de 8 tubos por duplicado.
- 2.- A los tubos de la serie UI (con DES) se les adicionó 25  $\mu$ l de cada una de las 8 concentraciones del esteroide no radiactivo DES: 0.2, 0.4, 0.8, 1.4, 18, 2.8, 3.8 y 4.8  $\mu$ M.
- 3.- A estos tubos se les dejó a temperatura ambiente por 18 hrs (toda la noche) con el fin de evaporar el solvente (etanol) en el que se encontraba disuelta la hormona, de esta forma el DES quedó en el fondo del tubo.
- 4.- Posteriormente, tanto a los tubos de la serie UT (sin DES) como de la serie UI (con DES) se les adicionó 25  $\mu$ l de cada una de las 8 concentraciones de estradiol radiactivo en concentraciones crecientes de 1, 2, 4, 7, 9, 14, 19 y 24 nM. En los tubos de la serie UI la concen-

tración de DES correspondió a una relación 200 veces mayor a la de la hormona radiactiva.

- 5.- A cada tubo se le adicionaron 100  $\mu$ l de citosol.
- 6.- Todos los tubos se agitaron en vortex por 5 seg.
- 7.- Se les incubó 18 hrs a 4 °C para citosol y 4, 22 y 37 °C para núcleo.
- 8.- Pasado este tiempo se les adicionaron 250  $\mu$ l de la solución de carbón cubierto con dextrán.
- 9.- Se les agitó en vortex por 5 seg cada tubo.
- 10.- Se les incubó 10 min a 4 °C para permitir la separación de la hormona no unida al receptor (hormona libre).
- 11.- Se centrifugaron los tubos en una centrifuga refrigerada (RC-5B Sourvall) a 3000 rpm (rotor HS-4 Sourvall) por 10 min a 4 °C.
- 12.- De cada tubo se tomo una alicuota de 250  $\mu$ l del sobrenadante para contar la hormona marcada unida al receptor y se coloco en un vial de conteo. El boton restante de carbón-dextrán se eliminó en una tarja con trampa de carbón para desechos radiactivos.
- 13.- A cada vial de conteo se le adicionaron 10 ml de liquido de centelleo.
- 14.- Cada vial se agitó por 15 seg en vortex.
- 15.- Finalmente se pusieron a contar en un contador de centelleo liquido (Beckman LS-7500) durante 4 min para determinar la cantidad de radiactividad por muestra, obteniéndose los resultados del contador en cuentas por minuto (CPM).

En cada ensayo se adicionaron tres series de tubos testigo:

- Blancos de carbón-dextrán. A estos tubos se les adicionaron todos los reactivos ya mencionados, excepto el citosol o núcleo. En vez de ello, se les adicionaron 100  $\mu$ l de solución amortiguadora de homogenización, y fueron puestos bajo las mismas condiciones experimentales, también por duplicado. El objetivo de estos tubos fue el determinar la eficiencia de arrastre de la hormona marcada por el carbón-dextrán.
- Blancos de cuentas totales. Esta serie de tubos fueron corridos bajo las mismas condiciones experimentales que los

tubos problema. La diferencia entre estos tubos y los experimentales fue que en vez de citosol se les adicionó 100  $\mu$ l de tampón de homogenización, y en vez la solución de carbon-dextrán, se les adicionaron 250  $\mu$ l de tampón de Tris-HCL 10 mM, EDTA 1.5 mM,  $\beta$  Mercaptoetanol 0.5 mM, pH 8.0. El fin de estos tubos fue el de verificar la cantidad y concentración final de hormona radiactiva adicionada para cada concentración.

- Blanco de cuentas de fondo. Finalmente se adiciono un vial con 250  $\mu$ l de tampón de homogenización y 10 ml de líquido de centelleo, con el fin de determinar la radiactividad ambiental o de fondo.

#### b) Preparación de la curva dosis-respuesta para el receptor de progesterona.

Para la cuantificación de los RcPg se siguió la metodología descrita por Pichon (1977)(79), la cual es muy semejante a la empleada para RcE<sub>2</sub>. Cada ensayo se realizó por duplicado entre 0 y 4 °C, a menos que se indique lo contrario. El procedimiento fue el siguiente:

- 1.- Por cada útero se colocaron dos series de tubos de vidrio. A una serie se le denominó UT (con R5020 radiactivo) y a la otra UI (con R5020 radiactivo más R5020 no radiactivo). Cada serie constó de 8 tubos por duplicado.
- 2.- A los tubos de la serie UI se les adicionó 25  $\mu$ l de cada uno de los 8 puntos de la promegestona (R5020) no radiactiva de las siguientes concentraciones: 0.4, 0.8, 1.4, 1.8, 3.5, 5.2, 7.3 y 8.8  $\mu$ M.
- 3.- A los tubos mencionados en el punto anterior, junto con los de la serie UT, se les adicionaron 25  $\mu$ l de cortisol 5  $\mu$ M. con el fin de eliminar la unión inespecifica del R5020 con la proteína que une corticosteroides (CBG).
- 4.- A las dos series de tubos se les dejó a temperatura am-

biente por 18 hrs (toda la noche) con el fin de evaporar el solvente (etanol) en el que se hallaban disueltos tanto el R5020 no radiactivo como el cortisol. El objetivo de ello fue el eliminar el solvente.

- 5.- Pasado este tiempo, a ambas series de tubos se les adiciono 25  $\mu$ l de cada uno de los 8 puntos de promegestona radiactiva en concentraciones crecientes de 2, 4, 7, 9, 17, 26, 37 y 44 nM. En los tubos de la serie de UI la concentración de R5020 no marcado radiactivamente fue 200 veces superior a la de la hormona radiactiva.
- 6.- A cada tubo se le adicionaron 100  $\mu$ l de citosol.
- 7.- Todos los tubos se agitaron en vortex por 5 seg.
- 8.- Se les incubó 2 hrs a 4 °C para los de citosol, o 4, 22 y 37 °C los del nucleo.
- 9.- Pasado este tiempo se les agreguegaron 125  $\mu$ l de solución amortiguadora de glicerol al 60 %.
- 10.- Se agitaron todos los tubos en vortex por 5 seg.
- 11.- De nuevo se les dejo incubar por otras dos hrs a 4 °C.
- 12.- Posteriormente se les adicionaron 200  $\mu$ l de carbón cubierto con dextrán.
- 13.- Todos los tubos fueron agitados en vortex por 5 seg y se les incubó por 10 min a 4 °C.
- 14.- Se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada.
- 15.- Del sobrenadante se tomó una alcuota de 250  $\mu$ l para contar la hormona marcada unida al receptor. Cada alcuota se colocó en un vial de conteo de líquido de centelleo.
- 16.- A cada vial de conteo se le adicionaron 10 ml de líquido de centelleo.
- 17.- Se adicionó al igual que en los tubos de RCE<sub>2</sub>, un blanco de carbón-dextrán para determinar la eficiencia de arrastre de la hormona marcada no unida al receptor.
- 18.- También se adicionó un blanco de cuentas totales y un vial con solo tampón como blanco para determinar las cuentas de fondo.
- 19.- Cada vial fue mezclado en vortex por 15 seg.

20.- Finalmente, se pusieron a contar en un contador de centelleo líquido 4 min por cada muestra.

c) Cálculos realizados con los datos obtenidos de cada curva de dosis-respuesta.

Los resultados obtenidos del contador de centelleo fue en cuentas por minuto (CPM). Los datos de cada muestra fueron los siguientes:

- 1.- CPM del blanco de las cuentas de fondo.
- 2.- Cuentas por minuto de los 8 puntos de unión total (tubos de la serie UT, es decir, con hormona radiactiva - sin hormona no radiactiva).
- 3.- Cuentas por minuto de los 8 puntos de unión inespecífica (tubos de la serie UI, es decir, con hormona radiactiva mas hormona no radiactiva).
- 4.- Cuentas por minuto de los 8 blancos de carbón-dextrán de la unión total.
- 5.- CPM de los 8 blancos de carbón-dextrán de la unión inespecífica.

A partir de estos datos, el procesamiento de los mismos fue el siguiente (15):

1.- Todos los valores expresados en CPM, se expresaron en desintegraciones por minuto (DPM), empleando la siguiente ecuación:

$$DPM = (CPM/E) \times 100$$

Donde "E" es el porcentaje de eficiencia con el cual es contada cada muestra en CPM. Este valor es dado automáticamente por el contador de centelleo.

2.- Con los valores ya expresados en DPM, se realizó lo

siguiente:

i- A todos los datos se les substrajo los DPM del blanco de cuentas de fondo, para eliminar este valor extra a todos los datos experimentales. De manera esquemática el procedimiento seguido se puede ilustrar de la siguiente manera:

8 - 2 (serie UI - blanco de cuentas de fondo).

9 - 2 (serie UI - blanco de cuentas de fondo).

10 - 2 (blancos de carbón-dextrán de UI - blanco de cuentas de fondo).

11 - 2 (blancos de carbón-dextrán de UI - blanco de cuentas de fondo).

ii- Para obtener la unión real de la hormona radiactiva al receptor se procedió a restar al valor obtenido de unión total y unión inespecifica sus correspondientes blancos de carbón-dextrán, ya que de esta manera se eliminó el valor en DPM de la hormona marcada que el carbón-dextran no fue capaz de eliminar. El procedimiento seguido fue el siguiente:

12 - 10: Las DPM de los 8 puntos de UI de cada muestra menos las DPM de los 8 blancos de carbón-dextrán para UI.

13 - 11: Las DPM de los 8 puntos de UI de cada muestra menos las DPM de los 8 blancos de carbón-dextrán para UI.

iii- A los resultados en DPM de cada substracción se les denominó de la siguiente manera:

14 - 12 = Z

15 - 13 = Y

iii- Posteriormente los resultados entre unión total (UI o Z) y unión inespecifica (UI o Y) se substra-

ieron con el fin de obtener la unión real o específica (UE) de la hormona radiactiva (2). La ecuación es la siguiente:

$$\text{Unión específica} = \text{Unión Total} - \text{Unión inespecífica}$$

$$UE = Z - Y$$

3.- Los datos de UE en DPM se expresaron en Curies (Ci) mediante la siguiente relación:

$$2.22 \times 10^6 \text{ DPM} = 1 \times 10^{-6} \text{ (Ci)}$$

por lo tanto:

$$UE \text{ (Ci)} = \frac{UE \text{ (DPM)} \times 1 \times 10^{-6} \text{ (Ci)}}{2.22 \times 10^6 \text{ (DPM)}}$$

4.- Los ocho datos de UE expresados en Ci se expresaron en unidades de concentración (moles) empleando la siguiente relación:

$$1 \times 10^{-9} \text{ moles de hormona marcada} = \text{Actividad específica de la hormona radiactiva.}$$

es decir:

Actividad específica para el 17  $\beta$ -estradiol radiactivo = 45.6 Ci / mmol

Actividad específica para el R5020 radiactivo = 82.0 Ci/nmol  
por lo tanto:

$$UE \text{ (mol)} = \frac{UE \text{ (Ci)} \times 1 \times 10^{-9} \text{ (mol)}}{\text{Actividad específica (Ci)}}$$

- 5.- En cada vial de conteo se colocó para la cuantificación del receptor de estradiol y de progesterona 250  $\mu$ l. En los tubos de reacción, el volumen final fue de 375  $\mu$ l para estradiol:

25  $\mu$ l de hormona marcada  
100  $\mu$ l de citosol o fracción nuclear  
250  $\mu$ l de carbón-dextrán

para progesterona el volumen fue de 450  $\mu$ l:

25  $\mu$ l de hormona marcada  
100  $\mu$ l de citosol o fracción nuclear  
125  $\mu$ l de solución amortiguadora con glicero  
    rol al 60 %  
200  $\mu$ l de carbón-dextrán

Esta diferencia en el volumen total de reacción con respecto al volumen colocado en cada vial de conteo se tomó en cuenta para determinar la radiactividad total en cada tubo de reacción. Para ello, se multiplicó la UE (mol) por los siguientes factores:

para  $E_2$             UE (mol) \* 1.5

para Pg            UE (mol) \* 1.8

- 6.- El resultado de UE fue expresado en moles, el cual finalmente se dividió entre la concentración de proteína en el medio de reacción, expresada en mg/ml:

UE (mol) / [proteína en 100  $\mu$ l de citosol o núcleo] (mg/ml)

Con ello se estableció la concentración total de receptores por muestra, la cual se expresó en femtomoles/mg de proteína ( $1 \times 10^{-15}$  moles/mg de proteína).

- 7.- Se tomó como resultado positivo un valor de concentración de  $RE_2$  o  $Rp_6 \geq 10$  femtomoles/ mg de proteína (79,101).
- 8.- Toda la serie de cálculos ya expuestos se pueden resumir de la siguiente manera:

$RE_2$

$$\frac{\text{fmoles/}}{\text{mg prot.}} = \text{UE (DPM)} \cdot 1.5 \cdot \frac{1 \times 10^{-6} \text{ Ci}}{2.22 \times 10^6 \text{ DPM}} \cdot \frac{1 \times 10^{-3} \text{ mol}}{45.6 \text{ Ci}} \cdot \frac{1}{[\text{prot}]}$$

$Rp_6$

$$\frac{\text{fmoles/}}{\text{mg prot.}} = \text{UE (DPM)} \cdot 1.8 \cdot \frac{1 \times 10^{-6} \text{ Ci}}{2.22 \times 10^6 \text{ DPM}} \cdot \frac{1 \times 10^{-3} \text{ mol}}{82 \text{ Ci}} \cdot \frac{1}{[\text{prot}]}$$

donde prot. = proteína.

d) Graficas de Saturación y Graficas de Scatchard.

La gráfica de saturación se construyó colocando en el eje de las ordenadas (Y) la concentración de la hormona unida (UE), expresado en femtomoles/mg de proteína (fmoles/mg prot.), y en el eje de las abscisas (X) la hormona no unida al receptor o libre expresada en nano molar (nM). Esta última (la hormona libre) se obtuvo substrayendo la hormona radiactiva colocada para cada concentración (blancos de

cuentas totales) menos la hormona unida (2):

$$\text{Hormona libre} = \text{Hormona total} - \text{Hormona unida}$$

En la gráfica de la figura 22 se observa la construcción típica de una gráfica de saturación, en la cual el comportamiento dosis-respuesta alcanza una meseta conforme aumenta la hormona libre. La meseta es el número máximo de sitios receptores (N) y representa la saturación de los mismos por hormona, y la mitad de la cantidad necesaria para la saturación es igual a la constante de disociación (Kd) (2). Esta curva de saturación no es útil para poder obtener los parámetros de unión N (concentración total de receptores) y Kd ( $Kd = 1/Ka$ ) ya que su construcción requiere una cantidad apreciable de números experimentales y el valor asintótico N no es determinable de manera práctica experimentalmente, por tal motivo, se prefiere linearizar la ecuación de la misma y de manera más simple interpretar dichos parámetros. Ecuaciones como las de *Lineweaver-Burk*, *Wilkinson* y *Scatchard* (2) se representan formas alternas de la reordenación de la gráfica de saturación y obtener curvas de tipo lineal. La gráfica de *Scatchard* es la más empleada para describir las interacciones hormona-receptor (116,117)(figura 23), en la cual la pendiente de la línea recta es igual a  $-Ka$  y extrapolando en el eje de las abscisas hasta que la recta corte dicho eje (es decir, hasta que  $Y = 0$ ) se obtiene un punto correspondiente al número de total de receptores (N)(2,91).

La gráfica de *Scatchard* se construyó colocando en el eje Y el cociente de la hormona unida entre la hormona libre (UE/HL) para cada una de las 8 concentraciones de hormona radiactiva empleada, y en el eje de las X la hormona unida (UE)(2,94,117).

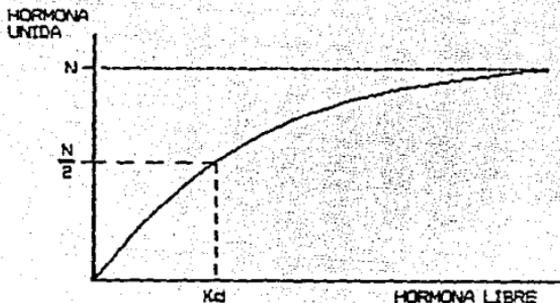


FIGURA 22. Curva de saturación, donde se observa en las ordenadas la hormona unida y en las abscisas la hormona libre. El punto  $N$  corresponde a la saturación del receptor por la hormona, y  $K_d$  es la cantidad de hormona libre necesaria para ocupar el 50% de los sitios receptores (Calandra, 1980) (2).

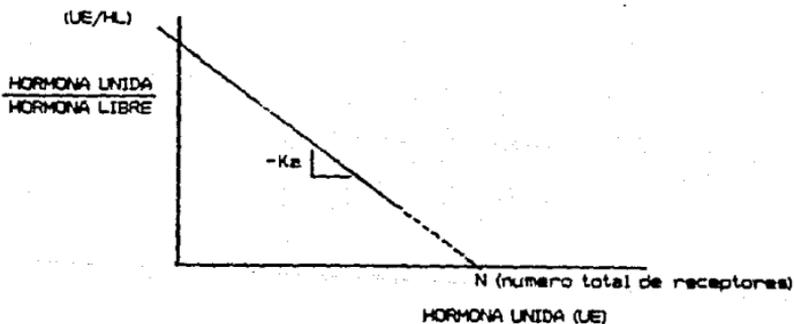


FIGURA 23. Gráfica de Scatchard (117).

Para obtener la recta más representativa y equidistante de cada uno de los puntos experimentales se determinó la ecuación de la recta mediante regresión lineal, tomando como valor del coeficiente de correlación como mínimo de 0.9 ( $r = 0.9$ ). Los valores obtenidos de pendiente ( $-K_a$ ) u ordenada al origen se substituyeron en la ecuación de la recta:

$$UE/HL = -K_a (M^{-1}) * UE (M) + b$$

donde:

$K_a$ : Constante de asociación =  $1/K_d$ ; donde  $K_d$ : Constante de disociación.

$UE$ : Hormona unida específicamente al receptor, expresada en fmoles/mg proteína o en molaridad.

$b$ : Ordenada al origen de la recta.

Extrapolando la recta hasta cortar el eje de las abscisas, es decir, hasta que  $UE/HL = 0$  se obtuvo la concentración total de receptores, por lo tanto:

Si  $UE/HL = 0$ ; entonces

$$\circ -K_a * UE + b = 0$$

ó  $UE = -b/-K_a$ , y esto es =  $b/K_a$  = número total de sitios receptores  $N$

Con ello se determinaron los datos de  $K_a$ ,  $K_d$  y  $N$ .

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alberts, B. Bray, D., Lewis, J., Raft. M., Roberts, K. y Watson, J. (1983). Biología molecular de la célula. Garland Pub. Inc. New York, EUA. pp. 767-820.
- 2.- Calandra, R.S. (1980). Endocrinología molecular. Ed. El Ateneo. Argentina. 471 pp.
- 3.- Nenci, I. Receptor and centriole pathways of steroid action in normal and neoplastic cells. Cancer Res. 1978; 38: 4204-4211.
- 4.- Clark, J., Eriksson, H. y Hardin, J. Uterine receptor-estradiol complexes and their interaction with nuclear binding sites. J. Steroid Biochem. 1976; 7: 1039-1043.
- 5.- Felig, P., Baxter, J. Broadus, A. y Frohman, L.. (1983). Endocrinología y Metabolismo. McGraw-Hill. México. pp. 17-110; 711-774.
- 6.- Muldoon, T.G. (1980). Regulación de la actividad de los receptores de las hormonas esteroideas. GINE dips. España. pp 339-438.
- 7.- Müller, R.E. y Wotis, H. Kinetics of estradiol entry in to uterine cells. Endocrinol. 1979; 105 (5): 1107- 1104.
- 8.- Laguna, J. y Pifia, E. (1981). Bioquímica. Prensa Médica Mexicana. México. pp. 681-749.
- 9.- Szego, C. y Pietras, R. (1981). Membrane recognition and effector sites in steroid action. Academic Press. Vol VIII. New York, EUA. pp. 307-463.
- 10.- Jensen, E.V. Intracellular localization of estrogen receptors: implications for interaction mechanism. Lab. Invest. 1984; 51 (5): 487-488,488.
- 11.- Welshons, W., Lieberman M. y Gorski, J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. Nature. 1984; 307: 747-749.
- 12.- Sheridan, P., Buchanan, J., Anselmo, V. y Martin, P. Equilibrium: the intracellular distribution of steroid receptors. Nature. 1979; 282: 579-582.

- 13.- King, W.J. y Greene, G.J. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. Nature. 1984; 307: 745-747.
- 14.- Schrader, W.T. New Model for steroid hormone receptors ? Nature. 1984; 308: 17-18.
- 15.- Calaf, G., Ramírez, G. y Jordan, C. Acción de estrógenos y antiestrógenos en cancer mamario: algunos aspectos básicos. Rev. del INCAN. 1985; 31 (3-4): 81-87.
- 16.- Guichon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M. y Milgrom, E. Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence of interaction between monomers. Cell. 1989; 57: 1147-1154.
- 17.- Sherman, M. y Stevens, J. Structure of mammalian steroid receptors: evolving concepts and methodological developments. Ann. Rev. Physiol. 1984; 46: 83-105.
- 18.- Müller, R., Traish, A. y Wotiz, H. Interaction of receptor estrogen complex (R<sub>2</sub>E) with uterine nuclei. J. Biol. Chem. 1977; 152 (22): 8206-8211.
- 19.- Littlefield, B. y Spelsberg, T. Problems and artifacts in identification of nuclear acceptor sites for the avian oviduct progesterone receptor. Endocrinol. 1985; 117 (1): 412-414.
- 20.- Puca, G., Sica, V. y Nola, E. Identification of a high affinity nuclear acceptor site for estrogen receptor of calf uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974; 71 (3): 979-983.
- 21.- Golding, T.S. y Korach, K.S. Nuclear estrogen receptor. molecular heterogeneity in the mouse uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 69-73.
- 22.- Zava, D., Harrington, N. y McGuire, W. Nuclear estradiol receptor in the adult rat uterus: a new exchange assay. Biochemistry. 1976; 15 (19): 4292-4297.
- 23.- Jensen, D. (1979). Fisiología. Interamericana. México. pp. 979-1129.
- 24.- Nalvandou, A.V. (1958). Reproductive physiology. W.H. Freeman Co. EUA. pp. 145-161.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 25.- Lehniger, A.L. (1982). Bioquímica. Omega. España. pp. 817-837.
- 26.- Miller, W.R. Steroid metabolism in breast cancer. Rev. Endo. Rel. Cancer. 1986; 23: 23-30.
- 27.- Streiwieser, A. y Heathcock, C. (1982). Química orgánica. Interamericana. Méxco. pp 643-648.
- 28.- Austin, C. y Short, R. (1982). Hormonas en la reproducción. Prensa Médica Mexicana. S.A. Méxco. pp 1-27, 41-71.
- 29.- Schwarts, S., Blaustein, J. y Wade, G. Inhibition of estrous behavior by progesterone in rats: role of neural estrogen and progesterin receptors. Endocrinol 1979; 105 (5): 1078-1082.
- 30.- Villee, C. Biología. Interamericana. Méxco. pp 471-497.
- 31.- McDonal, L.E. (1971). Reproducción y endocrinología veterinaria. Interamericana. Méxco. pp 23-47.
- 32.- Campbell, C.S. y Schwartz, N.B. The impact of constant light on the estrous cycle of the rat. Endocrinol 1980; 106: 1230-1238.
- 33.- Ratajaczac, T. y Hänel, R. Estradiol receptors: influence of plasma proteins on detection and quantitation. J. Steroid Biochem. 1976; 7: 741-744.
- 34.- Klinge, C., Bambara, R., Zain, S. y Hilf, R. Estrogen receptor binding to nuclei from normal and neoplastic rat mammary tissues in vitro. Cancer Res. 1987; 47: 2852-2859.
- 35.- Wrangé, O., Norstedt, G. y Gustafsson, J. Estrogen receptor in rat liver: quantitative and qualitative analysis by isoelectric focusing in polyacrilamide gel. Endocrinology. 1980; 106 (5): 1455-1462.
- 36.- Sumida, C. y Pascualini, J. Determination of cytosol and nuclear estradiol-binding sites in fetal guinea pig uterus by [<sup>3</sup>H] estradiol exchange. Endocrinology. 1979; 105 (2): 406-413.
- 37.- Payne, D. y Katzenellenbogen, J. Differential effects of estrogens in tissues: a comparison of estrogen receptor in rabbit uterus and vagina. Endocrinology. 1980; 106 (5): 1345-1352.

- 38.- Samborn, B., Held, B. y Kuo, H. Specific estrogen binding proteins in human cervix. J. Steroid Biochem. 1975; 6: 1107-1112.
- 39.- Haslam, S. y Shyamala, G. Progesterone receptors in normal mammary glands of mice: characterization and relationship to development. Endocrinology. 1974; 105: 786-795.
- 40.- Samborn, B., Held, B. y Kuo, H. Hormonal action in human cervix-II. Specific progestagen binding proteins in human cervix. J. Steroid Biochem. 1976; 7: 665-672.
- 41.- Smith, H., Smith, R., Toft, D., Neergaard, J., Burrows, E. y O'Malley, B. Binding of steroids to progesterone receptor proteins in chick oviduct and human uterus. J. Biol. Chem. 1974; 249 (18): 5924-5932.
- 42.- Sluysers, M. Steroid/thyroid receptor-like proteins with oncogenic potential: a review. Cancer Res. 1990; 50:431-458.
- 43.- Danielsen, M., Hinck, L. y Ringold, G. Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by glucocorticoid receptor. Cell. 1989; 57: 1131-1138.
- 44.- McDonnell, D., Mangelsdorf, D., Pike, J., Haussler, M. y O'Malley B. Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. Science. 1987; 236: 1214-1217.
- 45.- Unesono, K. y Evans, R. Determinants of target gene specificity for steroid thyroid hormone receptors. Cell. 1989; 57: 1139-1146.
- 46.- Baker, M. Computer-based search steroid and DNA sites on estrogen and glucocorticoid receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986; 139 (1): 281-286.
- 47.- Berg, J. DNA binding specificity of steroid receptors. Cell. 1989; 57: 1065-1068.
- 48.- Weinberg, C. y Bradley, D. Gene regulation by receptors binding lipid-soluble substances. Annu. Rev. Physiol. 1990; 52: 823-840

- 49.- Greene, G., Gina, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. y Shine, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. Science. 1986; 231: 1150-1154.
- 50.- Huckaby, C., Connely, O., Beattie, W., Dobson, A., Tsai, M. y O'Malley, B. Structure of the chromosomal chicken progesterone receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987; 84: 8380-8384.
- 51.- Schrader, W. y O'Malley, B. Structure of chick progesterone receptors. Cancer Res. 1978; 38: 4199-4203.
- 52.- Hutchens, W., McNaught, R., Yip, T-T., Suzuki, T., Li, C. y Besch, P. Unique molecular properties of a urea- and salt-stable DNA-binding estrogen receptor dimer covalently labeled with antiestrogen [3H] desmethyl-nafoxidina aziridine. Mol. Endo. 1990; 4 (2): 255-267.
- 53.- Berkenstan, A., Glaumann, H. y Gustafsson, J. Unspecific and sequence-specific deoxyribonucleic acid binding of the partially purified human progesterone receptor. Mol. Endo. 1982; 2 (6): 571-578.
- 54.- Milgrom, E., Atger, M. y Baulieu, E. Mechanism regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. J. Biol. Chem. 1973; 248 (18): 6366-6374.
- 55.- Myatt, L. y Wittlif, J. Characterization of progesterone receptor induced by oestradiol and tamoxifen in the immature rat uterus. Biochem. Soc. Trans. 1986; 14 (5): 960-961.
- 56.- Wolfson, A., Mester, J., Chang-Ren, Y. y Baulieu, E. "Non-activated" form of the progesterone from chick oviduct: characterization. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980; 95 (4): 1577-1584.
- 57.- Parmar, G. The clinical relevance of oestrogen receptor binding to oligo(dT)-cellulose in human breast cancer. Biochem. Soc. Trans. 1986; 14 (5): 961-962.
- 58.- Goldberg, R. y Yamamoto, K. (1989). Biological regulation and development. Plenum Press. EUA. pp 169-212.

- 59.- Katzenellenbogen, B. Dynamics of steroid hormone receptor action. Annu. Rev. Physiol. 1980; 42: 17-35.
- 60.- Yuh, K-C. y Keyes, L. Properties of nuclear and cytoplasmic estrogen receptor in the rabbit corpus luteum: evidence for translocation. Endocrinol. 1979; 105 (3): 690-696.
- 61.- Korach, K., Horigome, T., Tomooka, Y., Yamashita, S., Newbold, R. y McLachlan J. Immunodetection of estrogen receptor in epithelial and stromal tissues of neonatal mouse uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 3334-3337.
- 62.- Rochefort, H. y Andre, J. Comparison between different forms of estrogen cytosol receptor and the nuclear receptor extracted by micrococcal nuclease. Cancer Res. 1978; 38:4229-4232.
- 63.- Perrot-Appianat, M., Logeat, F., Groyer-Picard, M. y Milgrom E. Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. Endocrinol. 1985; 116 (4): 1473-1484.
- 64.- Rories, C. y Spelsberg, T. Ovarian steroid action gene expression: mechanisms and models. Annu. Rev. Physiol. 1989; 51: 653-681.
- 65.- Redeuilh, G., Moncharmont, B., Secco, C. y Baulieu, E. Subunit composition of the molybdate-stabilized "8-9 S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus. J. Biol. Chem. 1987; 262 (15): 6969-6975.
- 66.- Hansen, J. y Gorski, J. Conformational transitions of estrogen receptor monomer. Effects of estrogens, antiestrogen and temperature. J. Biol. Chem. 1986; 261 (30): 13990-13996.
- 67.- Dahmer, M., Housley, P. y Pratt, W. Effects of molybdate and endogenous inhibitors on steroid-receptor inactivation, transformation and translocation. Annu. Rev. Physiol. 1984; 46: 67-68.
- 68.- Myatt, L., Cukier, D., Elder, M. y White, J. High-performance chromatofocusing of oestrogen- and antiestrogen-receptor complexes. Biochem. Soc. Trans. 1986; 14 (5): 959

- 69.- Weichman, B. y Notides, A. Estradiol-binding kinetics of the activated and nonactivated estrogen receptor. J. Biol. Chem. 1977; 252 (24): 8856-8862.
- 70.- Ciocca, D., Puy, L. y Lo Castro, G. Localization of an estrogen-responsive protein in the human cervix during menstrual cycle, pregnancy, menopause and in abnormal cervical epithelia without atypia. Am. J. Obstet. Gynecol. 1986; 155 (5): 1090-1096.
- 71.- Tandon, A., Clarck, G., Channes, G., Chirgwin, J. y McGuire, W. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. N. Engl. J. Med. 1990; 322 (5): 297-302.
- 72.- Kassis, J., Walent, J. y Gorski, J. Estrogen receptors in cultured rat uterine cells: induction of progesterone receptors in the absence of estrogen receptor processing. Endocrinol. 1986; 118 (2): 603-608.
- 73.- McGuire, W. Steroid receptors in human breast cancer. Cancer Res. 1978; 38: 4289-4291.
- 74.- Chevallier, B., Heintzmann, F., Mosseri, V., Dauce, J., Bastit, P., Graic, Y., Brunelle, P., Basuyau, J., Comoz, M. y Asselain, B. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in operable breast cancer. Cancer. 1988; 62 (12): 2517-2524.
- 75.- Spona, J., Gitsch, E., Kubista, E., Salzer, H. y Köhler, B. Enzyme immunoassay and Scatchard plot. Estimation of estrogen receptor in gynecological tumors. Cancer Res. (supl). 1986; 46: 4310-4312.
- 76.- Potish, R., Twiggs, L., Adcock, L. y Prem, K., Savage, J. y Leung, B. Prognostic importance of progesterone and estrogen receptors in cancer of the uterine cervix. Cancer. 1986; 58 (8): 1709-1713.
- 77.- Key, T. y Pike, M. The role of the estrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of the breast cancer. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1988; 24 (1): 29-43.
- 78.- Borkowski, A., Body, J. y Leclercq, G. Hormone receptors and cancer. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1988; 24 (3): 509-511.

- 79.- Pichon, M. y Milgrom, E. Characterization and assay of progesterone receptor in human mamary carcinoma. Cancer Res. 1977; 37: 464-471.
- 80.- Logeat, F., Pamphile, R., Loosfelt, H., Jolivet, A., Fournier, A. y Milgrom, E. One-step immunoaffinity purification of active progesterone receptor. Further evidence in favor of the existence of a single steroid binding subunit. Biochemistry. 1985; 24: 1029-1035.
- 81.- Rodriguez, R., Weigel, N., O'Malley, B. y Schrader, W. Dimerization of the chicken progesterone receptor in vitro can occur in the absence of hormone and DNA. Mol. Endo. 1990; 4 (12): 1782-1790.
- 82.- Walthers, M. y Clark, J. Relationship between the quantity of progesterone receptor and the antagonism of estrogen-induced uterotrophic response. Endocrinol. 1979; 105 (2): 382-386.
- 83.- Clark, M., Osborne, K. y McGuire, W. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor and patient characteristics in human breast cancer. J. Clin. Oncol. 1984; 2 (10): 1102-1106.
- 84.- Kinsel, L., Szabo, E., Greene, G., Konrath, H., Leight, G. y McCarty K. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. Cancer Res. 1989; 49: 1052-1056.
- 85.- Gao, Y., Twiggs, L., Leung, B., Yu, C., Potish, R., Okagaki, T., Adcock, L. y Prem, K. Cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in primary cervical carcinoma. Am. J. Obstet. Gynecol. 1983; 146: 299-306.
- 86.- Twiggs, L., Potish, R., Leung, B., Carson, L., Adcock, L., Savage, J. y Prem, K. Cytosolic estrogen and progesterone receptors as prognostic parameters in stage IB cervical carcinoma. Gynecol. Oncol. 1987; 28: 156-160.
- 87.- Toft, D. y Gorski, J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1966; 55: 1574-1581.

- 88.- McGuire, J. y Lisk, R. Estrogen receptors in the intact rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968; 61: 497-503.
- 89.- Sato, B., Noma, K., Nishizawa, Y., Nakao, K., Matsumoto, K. y Yamamura, Y. Mechanism of activation of steroid receptors: involvement of low molecular weight inhibitor in activation of androgen, glucocorticoid and estrogen receptor systems. Endocrinol. 1980; 106 (4): 1142-1148.
- 90.- Ritzén, E., French, F., Weddington, S., Nayfeh, S. y Hansson, V. Steroid binding in polyacrylamide gels. J. Biol. Chem. 1974; 249 (20): 6597-6604.
- 91.- Segel, I. (1976). Biochemical calculations. John Wiley & Sons. E.U.A. 441 pp.
- 92.- Bojar, H. Receptors and cancer. Tumor Biol. 1987; 8: 120-129.
- 93.- Bojar, H. Quality control requirements in estrogen receptor determination. Cancer Res. 1986; 46 (supl): 4299-4250.
- 94.- Chamness, G. y McGuire, W. Scatchard plots: common error correction and interpretation. Steroids. 1975; 26 (4): 538-542.
- 95.- Katzenellenbogen, J., Johnson, H. y Carlson, K. Studies on the uterine cytoplasmic estrogen binding protein. Thermal stability and ligand dissociation rate. An assay of empty and filled sites by exchange. Biochemistry. 1973; 12 (21): 4092-4099.
- 96.- Sherman, M., Alierza, S., Shansky, J. y Hoffman, L. Progesterone receptors of chick oviduct. Steroid-binding "subunit" formed with divalent cations. J. Biol. Chem. 1974; 249 (17): 5351-5363.
- 97.- Baum, M. Adjuvant "novaldex" therapy: Six-year analysis of NATO trial. Rev. Endocrine-Related Cancer. 1985 (supl); 17: 5-6.
- 98.- Farris, E. y Griffith, J. (1949). The rat in laboratory investigation. Hafner Press. New York, E.U.A. 452 pp.
- 99.- Baker, H., Lindsey, J. y Weisbroth, S. (1979). The laboratory rat. Academic Press. New York. E.U.A. pp 155-166; 416-417.

- 100.- Bowett, M. (1952). Dissection guides. Vol III, the rat. John Morray. Inglaterra. pp 11, 22.
- 101.- McGuire, W., De La Garza, M. y Chamness, G. Evaluation of estrogen receptor assays in human breast cancer tissue. Cancer Res. 1977; 37: 737-739.
- 102.- Hertog, R., Heyden, I. y Ekka, E. "Unbound" ligand adsorption on dextran-coated charcoal practical considerations. J. Steroid Biochem. 1975; 6: 1333-1337.
- 103.- Lowry, O. Rosebrough, N., Farr, L. y Randall, R. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
- 104.- Samborn, B., Rao, B. y Koremman, S. Interaction of  $17\beta$ -estradiol and its specific uterine receptor. Evidence for complex kinetic and equilibrium behavior. Biochemistry 1971; 10 (26): 4955-4961.
- 105.- Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R. y Otterbein, E. (1983). The Merck index. Merck. New Jersey, E.U.A. pp 3490.
- 106.- Findlay, J. y Evans, W. (1987). Biological membranes. IRL Press. E.U.A. pp 304.
- 107.- Mulvihill, E. y Palmiter, R. Relationship of nuclear estrogen receptors level to induction of ovalbumin and conalbumin mRNA in chick oviduct. J. Biol. Chem. 1977; 252 (6): 2060-2068.
- 108.- Kalami, M., Tsai, S. Tsai, M-J, Clark, J. y O'Malley, B. Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct. J. Biol. Chem. 1976; 251 (2): 516-523.
- 109.- Markaverich, B. y Clark, J. Two binding sites for estradiol in rat uterine nuclei: relationship to uterotrophic response. Endocrinol. 1979; 105 (6): 1458-1462.
- 110.- Saidapur, S. y Greenwald, G. Regulation of  $17\beta$ -estradiol synthesis in the proestrous hamster: role of progesterone and luteinizing hormone. Endocrinol. 1979; 105 (6): 1432-1439.
- 111.- Soutter, W., Pegoraro, R., Green-Thompson, R. Maidoo, D. Joubert, S. y Philpott, R. Nuclear and cytoplasmic oestrogen receptors in squamous carcinoma of the cervix. Br. J. Cancer. 1981; 44: 154-159.

- 112.- Aguilar, X. (1987). Estudio histológico comparado de la glándula adrenal de *Crotophaga sulcirostris* s.y de *Neotomodon alstonia*. Tesis de licenciatura, UNAM. 66pp.
- 113.- Smith, E. y Calhoun, M. (1972). The microscopic anatomy of the white rat. A photographic atlas. Iowa State University Press. E.U.A. pp 129-137, 153.
- 114.- Leeson, T. y Leeson, C. (1983). Atlas de histología. Interamericana. México. pp 209-238.
- 115.- Cooper, T. (1977). The tools of biochemistry. John Wiley & Sons. E.U.A. pp 423.
- 116.- Morris, J. (1987). Fisicoquímica para biólogos. Ed. Repla. México. pp 280-286.
- 117.- Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1949: 51: 660-671.