

00341

1
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA DE RECEPTOR A ESTRADIOL EN TEJIDOS NO CONSIDERADOS BLANCO DE LA HORMONA

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:

ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRONICA

APLICADA A LAS CIENCIAS BIOLOGICAS

P R E S E N T A :

BIOL. ANGELICA GONZALEZ MACIEL

MEXICO, D. F.

1992.



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.

CONTENIDO

I.- RESUMEN

II.- INTRODUCCION

1.- Hormonas esteroides

a) Un evento inicial en acción hormonal

b) Receptores como mediadores de la acción de hormonas esteroides

c) Localización celular de receptores

d) Modelo de dos pasos

e) Sitio aceptor

2.- Localización inmunocitoquímica

III.- MATERIAL Y METODO

IV.- RESULTADOS

V.- DISCUSION

VI.- CONCLUSIONES

VII.- BIBLIOGRAFIA

I. RESUMEN

La presencia de receptores a estradiol (RE) en núcleos de células de órganos efectoras a esta hormona ha sido estudiada, pero menos conocida es su presencia en núcleos de células no blanco.

La interacción de los complejos hormona - receptor con el núcleo celular es aceptada y se sabe juega un papel importante en la modulación de la estructura y función de la cromatina. Sin embargo, el destino preciso de los complejos hormona - receptor en el núcleo de células blanco, así como los componentes nucleares específicos involucrados en la regulación de la expresión genética no son bien conocidos aún.

En el presente estudio se determinó la localización intracelular de RE por medio de la técnica de inmuno-oro post-inclusión.

Como primer anticuerpo se utilizó el policlonal AT 3A desarrollado contra secuencias de aminoácidos del dominio de unión al ADN de RE humanos.

Se estudiaron células epiteliales del útero, duodeno, de los túbulos contorneados proximales del riñón, hepatocitos y linfocitos del bazo.

La distribución de RE fué determinada en núcleo y citoplasma. En el núcleo se delimitaron las regiones cromatiniana e intercromatiniana. El ruido de fondo se evaluó en el espacio extracelular y en el medio de inclusión.

Los granos de oro se encontraron en mayor cantidad en el núcleo de todas las células estudiadas . En la cromatina compacta hay muy poca marca. Los RE se encuentran principalmente en el espacio intercromatiniano, lo anterior puede estar indicando que los RE están asociados a fibras pericromatinianas (FPC), como ha sido demostrado recientemente en tejidos blanco para esta hormona(38). Estos datos sugieren que los RE están ejerciendo un control postranscripcional en las células aquí estudiadas, como ha sido propuesto para células blanco de la hormona (37).

La densidad de marca en núcleos de linfocitos es similar a la encontrada en células epiteliales de útero. La densidad de marca en citoplasma es significativamente más alta que el ruido de fondo solamente en útero.

Se puede decir que el patrón de distribución de RE en todos los compartimientos estudiados es semejante, por lo que los tejidos mencionados pueden ser considerados blanco genómico para estradiol.

II. INTRODUCCION

Los modelos que explican la acción de las hormonas esteroides dependiendo de su interacción con proteínas receptoras en tejidos blanco específicos, han sido analizados. Inicialmente se propuso que los receptores que no están unidos a la hormona (receptores no ocupados) se encontraban en el citosol de muchos sistemas, procedimientos bioquímicos y autorradiográficos apoyaron esta conclusión. Evidencias adicionales establecieron que cuando la hormona se une al receptor, se induce transformación y movimiento de este, del citosol hacia el compartimiento nuclear (translocación), donde se inicia la respuesta biológica.

La presencia de receptores a estradiol en núcleos de células de órganos efectoras a esta hormona ha sido estudiada, pero menos conocida es su presencia en núcleos de células no blanco. En la actualidad se sabe que las hormonas pueden combinarse con sus receptores, unirse a sus sitios aceptores en la cromatina y activar la transcripción de ARN. Sin embargo aún no se conoce el destino preciso de los complejos hormona - receptor en el núcleo de las células, o si los receptores no ocupados pueden estar predominantemente asociados con componentes nucleares (40).

La localización de receptores en células blanco ha sido estudiada en trabajos anteriores utilizando técnicas bioquímicas, autorradiográficas e histológicas. Sin embargo, el uso de

anticuerpos contra la molécula receptora de hormonas esteroides, proporcionó el primer acceso directo a esta, independientemente de si estaba ocupada por su unión a la hormona.

La utilización de anticuerpos específicos en combinación con la técnica del inmuno-oro permiten 1) la detección de receptores, 2) su localización precisa y 3) el análisis de las interacciones del complejo hormona-receptor, con diversas estructuras de las células, pues la unión de una sola partícula de oro es claramente discernible. Considerando lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo :

DETERMINAR LA LOCALIZACION DEL RECEPTOR A ESTRADIOL EN TEJIDOS NO CONSIDERADOS BLANCO DE LA HORMONA, POR MEDIO DE LA TECNICA DEL INMUNO-ORO POST-INCLUSION, UTILIZANDO COMO PRIMER ANTICUERPO EL POLICLONAL AT 3A Y COMO SECUNDARIO EL GAR G15.

Se incluye información sobre hormonas esteroides , y de estudios realizados para entender su mecanismo de acción, los cuales llevaron al conocimiento de sus receptores hormonales. También se presenta información sobre la localización y distribución celular de los receptores y de la técnica de localización inmunocitoquímica.

1.- Hormonas Esteroides

Los estrógenos son secretados por las células de la teca interna de los folículos ováricos, cuerpo luteo, placenta y, en pequeñas cantidades por la corteza suprarrenal y los testículos. Las células de la granulosa también producen estrógenos y, al parecer a diferencia de los de la teca interna, estos no son vertidos a la circulación y permanecen en el líquido folicular (10).

Los estrógenos ováricos son secretados en forma de 17Beta-estradiol y estrona y representan las transformaciones finales en la cadena biosintética de los esteroides, son compuestos derivados del ciclopentanofenantreno, cuyo núcleo presenta tres anillos ciclohexano condensados con la ordenación propia del fenantreno. Su ruta biosintética implica su formación a partir del colesterol (5). La estrona posteriormente es metabolizada a estriol, probablemente en el hígado en su mayor parte. Ahí los estrógenos son oxidados o conjugados con el ácido glucorónico. Cantidades apreciables son secretadas en la bilis y reintegradas a la sangre (31).

Casi todo el estradiol secretado proviene del ovario, existen dos máximos de secreción : uno justamente antes de la ovulación y otro durante la fase mesoluteal (10). En la mayoría de las especies de mamíferos, el estradiol es un esteroide potente, transportado por vía sanguínea en unión de una molécula de

globulina fijadora de esteroides sexuales, de la que posteriormente se libera para ponerse en contacto con las células blanco (13).

En la rata, las primeras señales de incremento de los niveles de estrógenos en el plasma, se han registrado alrededor del día 10 postnatal. Al llegar a la etapa adulta, se establecen variaciones cíclicas en las que se observa un nivel hormonal más bajo durante el estro y el primer día del diestro; posteriormente se elevan hasta alcanzar el nivel máximo en el proestro (1,21).

Los estrógenos facilitan el crecimiento de los folículos ováricos y aumentan la motricidad de las trompas de falopio. Tienen que ver con los cambios cíclicos del endometrio, cervix y vagina. Incrementan el flujo sanguíneo uterino y tienen efectos importantes sobre músculo liso del útero. En las hembras inmaduras y castradas, el útero es pequeño y el miometrio atrófico e inactivo. Los estrógenos hacen aumentar la cantidad de músculo y su contenido de actomiosina. Bajo la influencia de los estrógenos el músculo uterino se vuelve más activo, exitable y sensible a la oxitocina debido a que se produce cambio en la fijación de calcio en el músculo (10, 13 ,31).

a) Un evento inicial en acción hormonal

Los primeros estudios realizados para entender el mecanismo de acción de las hormonas esteroides, se concentraron en buscar un evento inicial o primario inducido por estas hormonas. La

estimulación del crecimiento uterino después de la inyección de estrógenos a ratas inmaduras o castradas fué un sistema muy utilizado. Se emplearon técnicas elaboradas para detectar cambios bioquímicos en tiempos progresivos después de la inyección de la hormona (18).

Por estudios de respuestas metabólicas a los estrógenos en útero de rata ovariectomizada se sabe que las modificaciones más tempranas en la composición de este órgano son : a una hora de tratamiento; un marcado incremento de materiales como monosacáridos, urea, albúmina marcada con I 131, incrementos de fosfolípidos y ARN marcado con P 32. A las 2 y 3 horas de tratamiento, acumulación de agua y sodio, así como estimulación de incorporación de aminoácidos marcados con C 14 a proteínas uterinas (18).

A las 4 horas aumenta la síntesis de proteínas y la glucólisis. Es también notable el cambio en la actividad de ciertas enzimas oxidativas. Más tarde se observan evidencias de crecimiento celular que incluye incremento de nucleótidos, purinas y pirimidinas, del ARN ribosomal, de ADN y un aumento generalizado de la actividad mitótica y sintética (18). Los estudios realizados para investigar la acción del estradiol sobre el comportamiento de las estructuras ribonucleoprotéicas (RNP) en células epiteliales endometriales, ha mostrado que al aplicar esta hormona, dichas partículas varían cuantitativamente. Debido a que las partículas RNP intranucleares se relacionan con

el procesamiento, almacén y/o transporte de ARN del núcleo al citoplasma y representan el sustrato morfológico donde pueden ocurrir tales fenómenos. Se ha concluido que el estradiol produce un importante incremento en la síntesis y transporte de ARN en las células epiteliales del endometrio tanto in vivo como in vitro (35,36,37). Uno de los efectos más notables del estradiol sobre la morfología nuclear es la disminución de gránulos pericromatinianos 15 minutos después de la adición de la hormona, sin embargo, las fibras pericromatinianas visualizadas mediante la técnica de contraste con ácido etildiaminotetracético (EDTA), son más abundantes alrededor de la cromatina densa. En el espacio intercromatiniano las fibras y gránulos son tan abundantes como en los núcleos de células no tratadas (36). Las observaciones en cultivos de células tratadas simultáneamente con estradiol y uridina tritiada durante 15 minutos, indicaron un incremento de marca en las áreas nucleolar y extranucleolar (37). Tales efectos en la síntesis de ARN, conducen en última instancia, al incremento en varias proteínas celulares.

b) Receptores como mediadores de la acción de hormonas esteroideas

La idea de que la acción de las hormonas esteroideas está mediada por receptores, comenzó con los estudios pioneros en los que se demostró que existía una concentración y retención

selectiva de estrógenos marcados con tritio, en tejidos blanco de estrógenos, tal como había sido establecido previamente por sus efectos fisiológicos (14,40). La retención substancial de estrógenos en estos tejidos blanco, se interpretaron como alta afinidad, sin embargo los estudios iniciales sobre retención selectiva de estrógenos por tejidos blanco conocidos, apoyaron la idea de una interacción de esteroides con receptores macromoleculares específicos (7,20). La demostración de la existencia de receptores específicos para hormonas esteroides se llevó a cabo mediante el uso de hormonas estrogénicas marcadas con tritio, ello hizo posible determinar la distribución de las hormonas en los tejidos, así como la localización intracelular de la hormona administrada en cantidades fisiológicas (14,40). De este modo fué conocido que los tejidos del tracto reproductivo, contienen componentes que retienen hormonas por lo que se denominaron "receptores" (7,20). La capacidad de los tejidos reproductivos (útero, vagina y pituitaria anterior) para concentrar estradiol radioactivo, indicaron la presencia, en los tejidos blanco, de sistemas receptores activos (20,40). Al inicio de los años sesentas, el estradiol y otros esteroides marcados con tritio, de alta actividad específica , estuvieron disponibles comercialmente lo que facilitó la investigación sobre los receptores, de tales estudios se concluyó que el receptor es una proteína. Además se conoció su estereoespecificidad (determinada por cromatografía por filtración en gel y análisis en gradientes

de sacarosa), que tiene un número limitado de sitios de unión y que es sensible al calor. Más tarde, por estudios del fenómeno de interacción continua de la hormona con su receptor, surgió la pregunta sobre la localización intracelular de los receptores (20,40).

c) Localización celular de receptores

En cuanto a la localización de los receptores, se realizaron importantes observaciones, principalmente de la interacción in vivo de los estrógenos con las células de los tejidos blanco (20,40). Mediante la administración de estradiol marcado con tritio y el uso de técnicas de fraccionamiento celular, se encontró que el receptor a estradiol se localiza en dos regiones de las células uterinas : el núcleo y el sobrenadante de alta velocidad o fracción citosol. Aunque al principio hubo desacuerdo sobre la distribución relativa de los receptores , en estudios posteriores se encontró que la mayoría de estradiol uterino (más del 70%) está localizado en el núcleo. Estas observaciones fueron reiteradas por medio de la técnica de autorradiografía (20,33,40). El método autorradiográfico ayudó a demostrar la presencia de estrógenos en el hipotálamo y otros tejidos neurológicos en los que la proporción de células que contienen receptores es pequeña pero real, como inicialmente había sido encontrada mediante experimentos bioquímicos (20,40).

Más tarde los trabajos in vitro con tejido uterino mostraron las mismas características observadas in vivo, incluyendo la localización nuclear de los receptores. Además se encontró que el uso de antiestrógenos del tipo ethamoxtriphetol impide la formación de los complejos hormona-receptor nucleares y extranucleares (19,20,24). Posteriormente, con la técnica de extracción con sales se demostró que el estradiol radiactivo en el citosol uterino existe en combinación con una macromolécula y al aplicar la técnica de ultracentrifugación por gradientes de sacarosa para la detección y caracterización de estas macromoléculas se encontró que la hormona se une a una molécula receptora, de naturaleza protéica, con un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 8S. El pico de sedimentación es destruido por la acción de proteasas pero no por nucleasas (20).

Las técnicas de sedimentación mostraron que el complejo 8S localizado en el citosol contiene una subunidad que une esteroides, la cual es diferente a la encontrada en el núcleo, en el que los sedimentos formados son de aproximadamente 4S (20). Sobre la base de experimentos in vivo, en los que se compararon los efectos de nafoxidina sobre las proteínas citoplasmáticas, las nucleares y el estradiol, se propuso que los complejos moleculares 8S reaccionan directamente con el estradiol y podían servir como un receptor, llevando a la hormona hacia el núcleo, donde sería retenida por el receptor nuclear (19,20). Los estudios

posteriores indicaron que el complejo estradiol-receptor del núcleo, es derivado del complejo extranuclear formado inicialmente; Lo anterior se confirmó al administrar dosis fisiológicas de estradiol in vivo y se observó que los receptores contenidos en el citosol uterino de rata son depletados, hecho que es compatible con la idea de movimiento de los complejos hormona-receptor hacia el núcleo (20,40).

d) Modelo de dos pasos

Con base en la información acumulada hasta ese momento, se propuso un modelo que consiste en dos pasos, para explicar el mecanismo de acción de las hormonas esteroides. En el se considera que las hormonas esteroides atraviesan la membrana celular por difusión, se unen a receptores citoplásmicos específicos y forman un complejo hormona receptor (20,40). Inmediatamente después, dichos complejos moleculares sufren una serie de modificaciones fisicoquímicas tales como: cambio en el tamaño molecular y capacidad para penetrar al núcleo y acumularse en el, de esta forma se produce la activación o translocación de los complejos hormona-receptor. La translocación del complejo transformado fué explicada por la adquisición de una alta afinidad por estructuras nucleares, cromatina y o ADN. La habilidad del complejo transformado para pegarse no únicamente a la cromatina y al ADN si no también a una variedad de polianiones, tales como fosfocelulosa,

sugirieron el término activación acidofílica para este proceso (6,12,20). Aunque los eventos de interacción de las hormonas esteroides con la célula pueden ser divididos en una multitud de procesos bien definidos, esta visión simplificada de la interacción célula-hormona, fué ampliamente aceptada (12,27,30,40). Investigaciones recientes han producido resultados que no son muy compatibles con el modelo en dos pasos; este atribuyó una localización extranuclear de las moléculas receptoras no ocupadas o no transformadas, los nuevos datos, tanto histológicos como bioquímicos, demuestran que el receptor se encuentra principalmente en el compartimiento nuclear (12,27,30). Además, se ha mostrado que células enucleadas contenían únicamente 10% de sitios que retienen estrógenos. El otro 90% fué encontrado en el nucleoplasma (30). En las preparaciones de citosol y fracción nuclear obtenidas mediante el fraccionamiento celular, se ha encontrado el receptor a estradiol esencialmente en el núcleo (23).

El uso de anticuerpos contra los receptores de las hormonas esteroides, abrió nuevas posibilidades en el estudio de su localización. En particular, proporcionó el primer acceso directo a la molécula receptora, independientemente de si esta libre o asociada a la hormona, tal habilidad ha sido de gran valor para la detección histológica de los receptores (40). Una primera serie de resultados, mostraron receptores para estradiol (RE), glucocorticoides (RG) y progesterona (RP), en el citoplasma

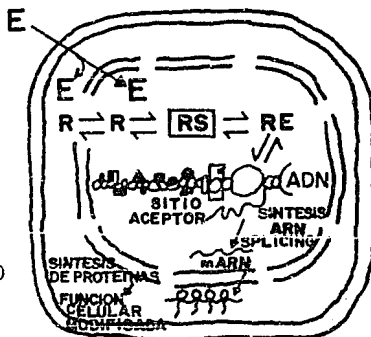
de tejidos blanco, tanto en cultivo celular, como en cortes por congelación o en parafina y ultrafinos (11,16,17,25,28). En algunos de estos estudios se observó un incremento de la inmunotinción en el núcleo en presencia de la hormona, que se interpretó como una evidencia de la translocación del receptor al núcleo. En estudios más recientes realizados por los mismos o diferentes grupos de trabajo, usando técnicas implementadas con anticuerpos específicos se ha mostrado que los RE y RP son detectados exclusivamente en el núcleo celular (40,45). Con base en lo anterior se ha desarrollado el modelo del equilibrio de redistribución intracelular de receptor, considera que existen receptores nucleares y citoplasmáticos en un rápido equilibrio reversible.

Este concepto también fué apoyado por estudios de distribución de receptores a estrógenos ocupados entre citosol y núcleo bajo un amplio rango (5-95%) de saturación del receptor. La ocupación de este causó, un rápido cambio de un gran porcentaje de receptores dentro del núcleo, en una proporción de 9:1 de receptores nucleares-citosol. Lo anterior indica que no es barrera para el receptor la translocación a través de la membrana nuclear, como se consideró en el modelo de dos pasos antes mencionado (40,43). Un modelo de equilibrio similar ha sido recientemente propuesto para receptores a glucocorticoides. Por lo tanto la idea de la translocación del complejo hormona-receptor debe ser modificada a la luz de los conceptos

actuales de localización intracelular del receptor: 1) existe una constante redistribución de receptores entre el citoplasma y el núcleo, 2) los receptores son repartidos entre el citoplasma y el núcleo sobre la base de volumen de agua entre cada compartimiento; y 3) los receptores ocupados en el núcleo son unidos a componentes nucleares antes que comiencen a liberarse para ser movidos hacia el citoplasma (32,40). Es decir, la distribución de los receptores en el núcleo y el citoplasma es un equilibrio dinámico que depende de la concentración de los receptores y su afinidad relativa por componentes nucleares, así como del volumen de los compartimientos (32,40).

Fig. 1. MODELO DE LA INTERACCION DEL COMPLEJO ESTEROIDE-RECEPTOR EN EL NUCLEO. PARA INDUCIR UNA RESPUESTA CELULAR. PARA SIMPLIFICAR, ASPECTOS MOLECULARES DE LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR HAN SIDO OMITIDOS.

E = esteroide
 R = receptor (tomado de Walters, 1985)



e) Sitio aceptor

Es un reto determinar como las señales hormonales son transmitidas hacia el núcleo para alterar eventos celulares tales como la diferenciación, expresión específica de genes y

división celular. En la actualidad la interacción de los complejos esteroide-receptor con el núcleo es ampliamente aceptada y se sabe juega un papel en la modulación de la estructura y función del ADN, sin embargo aún no existe un entendimiento detallado de los procesos, y componentes nucleares específicos involucrados en la transducción de la señal, algunos componentes nucleares han sido propuestos como candidatos para ser los sitios que unen receptores a esteroides o "aceptores" y que por lo tanto son de relevancia en el proceso de la acción biológica de estas hormonas. Debido a que por medio de ensayos de afinidad, se ha demostrado que en la matriz nuclear de los tejidos blanco para hormonas sexuales, existe una mayor proporción (50-100%) de afinidad por los complejos esteroide-receptor, es decir, existen sitios aceptores, esta ha sido propuesta para ser el sitio en el núcleo, con quién estos complejos deben actuar para modular la estructura y función del ADN. Así mismo, se ha mostrado que en la cromatina de los hepatocitos de tortuga también existen sitios que tienen gran afinidad por estos complejos (2,46). Mediante la autorradiografía, se ha demostrado una asociación de estradiol con la cromatina pero no con el nucleolo (20) y bajo condiciones apropiadas se ha extraído el complejo estradiol-receptor de núcleos uterinos en combinación con ribonucleoproteínas (RNP). Estos hechos permiten postular que las RNP están involucradas en la recepción nuclear de los complejos hormona-receptor

(20,44). Se puede decir que el destino preciso del complejo hormona-receptor en el núcleo de las células blanco es poco conocido, aunque ha sido objeto de considerables investigaciones.

2.- Localización inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica comprende una serie de técnicas que utilizan las reacciones específicas entre antígenos y anticuerpos para localizar diversas sustancias dentro de una célula o tejido.

Para efectuar la inmunolocalización, se debe contar con un anticuerpo específico (primario), que reconoce en el tejido, a la sustancia buscada. La inmunolocalización puede ser directa o indirecta. En la primera el anticuerpo específico está marcado, de tal suerte que al incubar el tejido con este, se evidencia la sustancia en estudio.

En el caso de una inmunolocalización indirecta el tejido se incuba con el anticuerpo primario que reconocerá a la sustancia buscada, después se incuba con un anticuerpo marcado que reconocerá al primero. Los marcadores pueden ser visualizados en el microscopio de luz o en el electrónico (ME), estos son los que finalmente ponen en evidencia la sustancia buscada. La evolución de este campo durante las tres pasadas décadas ha sido grande. En el presente, la mayoría de los métodos de inmunolocalización pueden ser divididos dentro de cuatro grandes

categorías, dependiendo del tipo de reactivos que utilicen: inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, avidina-biotina y oro coloidal.

A nivel de microscopía electrónica (ME), la técnica de oro coloidal parece ser superior a la de la inmunoperoxidasa. De los diferentes métodos de oro coloidal evaluados, el más sensitivo es el de dos pasos , (localización indirecta) que emplea un antígeno-anticuerpo específico primario seguido por un anticuerpo secundario marcado con oro.

El uso de controles apropiados es importante, tales controles pueden ser :

- 1) substitución del antisuero específico con suero normal
- 2) el uso de anticuerpo adsorbido con el antígeno
- 3) el uso de antisuero con especificidad para antígenos no presentes en el tejido que va a ser estudiado
- 4) el uso del tejido en el que se mostró previamente que es inmunolocalizado por el antígeno y
- 5) si se usan células en cultivo, el uso de un número de tipos celulares que no contienen el antígeno (29).

Se utilizan coloides como marcadores inmunocitoquímicos en ME para localizar antígenos sobre la superficie de células. Las ventajas de esta técnica son muchas ya que una gran variedad de proteínas, incluyendo anticuerpos, pueden ser adsorbidas a las partículas de oro (15). El oro coloidal es una suspensión hidrofóbica, cargada negativamente formada por partículas

metálicas de muy alta densidad electrónica. En condiciones apropiadas de pH y concentración, estas partículas se unen por adsorción electrostática a las macromoléculas, hecho que no parece alterar su actividad biológica, por lo que son muy útiles para realizar estudios de afinidad citoquímica (15).

Debido a que el oro coloidal permite la obtención de suspensiones con partículas metálicas de muy diversos diámetros, es posible utilizarlo para realizar la localización simultánea de varios antígenos en el mismo corte de tejido. Primero, los tejidos se incuban con los anticuerpos obtenidos de dos antígenos (anticuerpos primarios), después se incuban con el segundo anticuerpo marcado con oro. Asumiendo que únicamente un brazo del anticuerpo primario se une con el antígeno, el otro estará libre para unirse a un antígeno cubierto con una partícula de oro.

La presencia de cada antígeno con una partícula de oro de diferente medida será visualizada simultáneamente con el ME ya que la unión de una sola partícula de oro es claramente discernible (15).

Los mayores problemas con esta técnica son :

- 1) la dependencia de una unión monovalente del anticuerpo primario
- 2) el costo y carencia de disponibilidad de antígenos para el estudio
- 3) la posible necesidad de unir proteínas pequeñas a oro, hecho que solo es posible si estas proteínas están primeramente

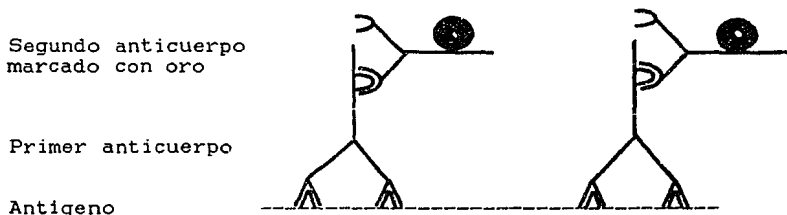
unidas a una proteina grande, via glutaraldehido (15).

Los problemas antes mencionados son eliminados por el uso de un segundo anticuerpo marcado con oro.

En este método , anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos y de dos fuentes animales diferentes son incubados con tejido conocido por contener los antígenos bajo estudio. Los anticuerpos secundarios marcados con oro, van dirigidos contra el primario, al reconocerlo y unirse a el, las particulas de oro permiten visualizar el sitio que ocupa el antigeno buscado dentro de la célula. En este punto es donde convergen la morfología y la biología molecular moderna conformando así la inmunocitoquímica ultraestructural .

FIG. 2. EL DIAGRAMA REPRESENTA LA TECNICA DE INMUNOLocalización INDIRECTA (INMUNO-ORO), EN ELLA SE UTILIZA UN SEGUNDO ANTICUERPO MARCADO CON PARTICULAS DE ORO.

(tomado de Gosselin, 1986)



Mucha de la información acerca de la localización de receptores a esteroides, proviene de ensayos bioquímicos, dichos estudios presentan varios inconvenientes, ya que los tejidos deben ser homogenados, además la mayoría de las veces son heterogéneos, de tal suerte que el contenido de receptores dentro de células individuales no puede ser identificado, normalmente este tipo de estudios, promedian los resultados de varios tipos celulares. Considerando lo anterior, se puede decir, que las técnicas morfológicas permiten definir mejor la localización y distribución de receptores en las células.

A pesar de que los anticuerpos policlonales y monoclonales para reconocimiento de hormonas esteroides, han estado disponibles en el mercado desde 1960, no habían sido producidos para reconocer epítomos específicos de las proteínas receptoras. Ahora es posible su obtención gracias a los avances recientes en la biología molecular, lo que ha proporcionado información concerniente a los dominios funcionales de estas proteínas (34). Las cadenas de ADN de los RE humanos han sido clonadas (cADN) y la secuencia de aminoácidos ha sido deducida.

Análisis de las terminaciones hidropáticas indican que los RE contienen una región hidrofílica rica en cisteína, arginina y residuos de lisina, pobres en leucina y residuos de prolina. La región hidrofílica probablemente está expuesta a la superficie de la molécula y posiblemente representa el sitio de unión entre el receptor y el ADN (4,34). El desarrollo de anticuerpos a

receptores específicos conjuntamente con la técnica del inmuno-oro, permite la localización del receptor con diversas estructuras celulares, lo que aportará información para el entendimiento de la acción de los estrógenos. Recientes estudios realizados con la técnica del inmuno-oro post-inclusión para la localización de RE, usando un anticuerpo policlonal dirigido contra una secuencia de aminoácidos del sitio de unión entre ADN y RE, un anticuerpo monoclonal contra ácido ribonucleico heterogeneo nuclear (hnARN) y un anticuerpo anti-ADN. Demostraron una predominante localización de RE en el núcleo de células epiteliales, musculares y fibroblastos de útero de rata. Además poca pero significativa marca en el citoplasma de las células epiteliales. En cortes contrastados con el procedimiento de EDTA para ribonucleoproteínas (RNP), demostraron una estrecha relación entre los RE y RNP nucleares, especialmente con fibras pericromatinianas (FPC) (38). Es importante para el entendimiento de la acción de los estrógenos, determinar la localización de RE en varios tejidos. El uso de anticuerpos contra epitopos específicos y la técnica del inmuno-oro post-inclusión, proporciona un medio preciso y sensible para determinar la localización y distribución intracelular, del complejo estradiol-receptor.

III. MATERIAL Y METODO

Se utilizaron para este trabajo cinco ratas de la cepa Wistar, vírgenes en proestro de aproximadamente tres meses de edad. La fase de proestro se determinó por medio de frotis vaginal. Las ratas seleccionadas fueron anestesiadas con éter, se extrajeron trozos de útero, hígado, bazo, riñón y duodeno, se fragmentaron en porciones menores de 1 x 1mm se fijaron por inmersión, en paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos de Sorensen (PBS) 0.1M a pH 7.3 durante 2 horas a 4 grados centígrados (g.c.). Después los tejidos fueron lavados con el mismo buffer, y se trataron con cloruro de amonio 0.5 M durante 30 min., de este modo se bloquean grupos aldehído, posibles grupos reactivos libres que pueden conducir a unión no específica y por lo tanto proporcionar datos falsos sobre la inmunolocalización. La inclusión de los tejidos se realizó en una resina acrílica polihidroxi aromática, LR White (London Resin Company). Es una resina hidrosoluble, de uso preferente para estudios de inmunocitoquímica.

Inclusión con LR White (LRW).

Deshidratar en etanol al 30%, 50%, 70%, 90% y absoluto . Una hora en cada uno a 4 g. c. Infiltrar en una mezcla 1:2 de etanol absoluto y LRW respectivamente, durante 3 horas a 4 g.c.

Preinclusión

3 cambios de LRW , de una hora cada uno a 4 g.c.

Polimerizar en capsulas de gelatina bien cerradas a 50 g.c. durante 20 horas.

Se realizaron cortes semifinos de los diferentes tejidos, en un ultramicrotomo Reichert- Jung (ULTRACUT E), se tñieron con azul de toluidina y se seleccionaron en ellos los siguientes tipos celulares : células epiteliales del útero, de los túbulos contorneados proximales del riñón, del duodeno, hepatocitos y linfocitos del bazo (41).

Se obtuvieron cortes ultrafinos con un grosor de entre 60 a 90 nm y se montaron sobre rejillas de níquel cubiertas con formvar.

La técnica de inmunolocalización se realizó en una cámara húmeda, las gotas de las diferentes soluciones utilizadas se colocan sobre una superficie plana cubierta con parafilm. Las rejillas conteniendo los cortes ultrafinos de tejido se flotan sobre ellas. Las rejillas nunca se dejan secar durante el procedimiento. El exceso de los reactivos se quita con papel filtro y se flotan inmediatamente en el siguiente.

Los anticuerpos primarios se obtienen generalmente liofilizados, se disuelven en agua bidestilada como indique el donante, de manera de recuperar el agua perdida. Posteriormente se dividen en alicuotas que se colocan en tubos de plástico con unos pocos microlitros de la solución en cada uno y se congelan (-70 g.c., si es posible, de lo contrario -20 g.c. en un refrigerador común). Se deben evitar los repetidos ciclos de congelación-descongelación, si sobra algo del contenido de un

tubo se debe enfriar a 4 g.c. hasta usarlo en otro experimento. En este estudio se utilizó como anticuerpo primario el policlonal AT 3A, desarrollado contra secuencias de aminoácidos del dominio de unión al ADN de RE humanos (34).

Como marcador (segundo anticuerpo) el Goat Anti-Rabbit unido a partículas de oro de 15 nanómetros (GAR G15).

La dilución de los anticuerpos se lleva a cabo en PBS- Albúmina de Suero Bovino- Tween 20 : en 10 ml de PBS se agrega 1 mg. de BSA y 5 microlitros de tween 20, 0.05% (PBS-BSA-Tween). Se agita suavemente varias veces, para evitar que se formen burbujas. Esta operación se realiza inmediatamente antes de utilizar los anticuerpos.

Técnica de Inmunolocalización Post-inclusión con Segundo Anticuerpo Marcado con Oro.

1.- Para disminuir el ruido de fondo producido por el GAR, se pre-incuba el tejido en PBS-Leche-Tween, durante 15 min. El exceso de reactivo en la rejilla se elimina con papel filtro. Posteriormente las rejillas se flotan en Suero Normal de Cabra (Normal Goat Serum NGS), a una dilución 1:50 en PBS durante 3 min.

2.- Incubar en AT 3A (dilución 1:60) de 17 a 24 horas a 4 g.c. en gotas de 30 microlitros.

3.- Lavar por goteo con PBS-Tween (5 microlitros por cada 10 ml de PBS).

- 4.- Lavar por goteo con PBS puro.
- 5.- Flotar 15 min. en PBS en un vidrio de reloj.
- 6.- Flotar 3 min. en gotas de 10 microlitros de NGS.
- 7.- Incubar 30-60 min. a temperatura ambiente en gotas de 30 microlitros de GAR G15 (dilución 1:60).
- 8.- Lavar por goteo con PBS , con piseta, luego flotar 15 min. en PBS, lavar por goteo nuevamente con PBS.
- 9.- Lavar por goteo con agua bidestilada y flotar 15 min. en agua bidestilada .

Como control de los experimentos se substituyó el anticuerpo específico con suero normal. Se incubaron cortes ultrafinos de todos los tejidos en PBS-BSA-Tween. Todos los procedimientos y tiempos restantes fueron los mismos.

Los cortes una vez secos, fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Puesto que después de la inmunolocalización los tejidos quedan muy permeables , los tiempos empleados fueron de 2 y 1 min. respectivamente, para evitar el exceso de contraste, que enmascararía a los granos de oro sobre los tejidos. Las micrografías para análisis morfométrico fueron tomadas a una amplificación de 8800 X y 12000 X en un microscopio Carl Zeiss EM9 y EM10 respectivamente. Para fotografiar las células, en cada una de las rejillas se siguió un orden para evitar tomar más de una foto de cada célula. La ampliación final de las micrografías fué de aproximadamente 32560X. Para estimar la densidad numérica de receptor a

estradiol. sobre las micrografías se delimitaron con un lápiz
graso los siguientes compartimientos : núcleo, citoplasma,
espacio cromatiniano e intercromatiniano , extracelular y medio
de inclusión. Después se contó el número de granos de oro en cada
uno de estos espacios.

El area de los compartimientos señalados se determinó con una
tableta digitalizadora (Tablet Graphic, Apple), conectada a una
computadora personal. Se utilizó el programa GPC desarrollado por
el Dr. G. H. Vázquez-Nin. Investigador del Laboratorio de
Microscopia Electrónica de la Fac. de Ciencias UNAM. El área se
determinó colocando y fijando la micrografia con masking sobre la
tableta. Se activa el lápiz y se pasa sobre los
contornos previamente marcados del área a determinar, teniendo
cuidado de marcar el punto inicial y de llegar a este mismo
lugar, donde finalizará la medición. Inmediatamente después la
computadora se encarga de calcular el área, al proporcionarle el
número de granos de oro, también calcula la densidad de marca por
unidad de área, obteniendose así la densidad numérica. La
densidad numérica se determinó por lo menos en 45 micrografías de
cada uno de los tipos celulares estudiados, provenientes de 10
bloques de cada tejido (2 bloques por cada rata).

Los datos de densidad obtenidos para cada tipo celular y
para cada compartimiento, fueron evaluados estadísticamente
utilizando la prueba de t de Student y graficados utilizando el
programa Harvard Graphic.

IV.- RESULTADOS

La distribución de los RE fué estimada mediante la determinación del área de cada uno de los compartimientos delimitados previamente y considerando el número de granos por unidad de área, obteniéndose de esta manera la densidad de marca en cada uno de ellos, los espacios celulares estudiados fueron : núcleo, citoplasma, espacio cromatiniano, intercromatiniano, extracelular o medio de inclusión. El compartimiento "cromatina" se refirió exclusivamente al área de cromatina compacta, el intercromatiniano incluyó regiones pericromatinianas e intercromatinianas y el ruido de fondo fué estimado en el espacio extracelular o en el medio de inclusión.

Los cinco tipos de células estudiadas, las epiteliales del útero, del duodeno, de los túbulos contorneados proximales del riñón, hepatocitos y linfocitos del bazo, presentaron un patrón de distribución de RE similar. En las micrografías de los diferentes tipos celulares se puede observar que la inmunolocalización indirecta realizada, utilizando como anticuerpo primario el AT 3A desarrollado contra secuencias de aminoácidos del dominio de unión al ADN de RE humanos y como secundario el GAR G15, marcado con granos de oro, pone en evidencia a los RE.

Las figuras 3 y 4 corresponden a núcleos de células de útero y linfocito, respectivamente. En ellas se demuestra claramente que

la densidad de marca es mayor en el núcleo, específicamente en el espacio intercromatiniano, en la cromatina se observó poca marca. La densidad de marca en núcleos de linfocitos, fué solo un poco menor a la encontrada en células epiteliales de útero (Gráfica 1). Además, la distribución de RE en los espacios cromatiniano e intercromatiniano de estos dos tipos celulares, también fué muy parecida (Gráfica 2). La marca en el citoplasma es significativa solo en células uterinas (Gráfica 1). Los granos de oro en el citoplasma se encontraron frecuentemente asociados con componentes fibrilares, granulares y ocasionalmente con mitocondrias.

Las micrografías 5, 6 y 7 pertenecen a núcleos de hepatocito, célula epitelial del duodeno y de los túbulos contorneados del riñón, respectivamente. Estos tipos celulares también presentaron mayor densidad de marca en el núcleo, particularmente en el espacio intercromatiniano. La prueba de t de student demuestra que la densidad de marca en núcleo y citoplasma, así como en cromatina e intercromatina, no presenta diferencias significativas entre hepatocitos, células epiteliales del duodeno y de los túbulos contorneados proximales del riñón (Gráfica 1 y 2).

Aunque las células epiteliales del útero y linfocitos presentaron mayor densidad en comparación con los otros tipos celulares estudiados, el patrón de distribución de RE en todos los compartimientos observados es semejante, tanto en células de

útero como en las pertenecientes a órganos no considerados efectores para estradiol.

Por otro lado, aunque la densidad de marca no se evaluó cuantitativamente en nucleolo, debido a que en muchas de las células estudiadas no se encontró, posiblemente por la orientación del corte, debe hacerse notar, que se observó poca marca en este compartimiento, específicamente en células epiteliales de útero y en células de los tubulos contorneados proximales del riñón, células en las que se tuvo la suerte de observar nucleolo.

Puesto que los cortes de tejido se flotaron en NGS y en PBS-BSA-Tween, antes de incubar con el anticuerpo específico, el ruido de fondo no fué significativo en ninguna de las inmunolocalizaciones realizadas (Gráfica 1).

Cortes ultrafinos de todos los tejidos estudiados, en los que se substituyó el anticuerpo AT 3A por suero normal (control de inmunolocalización), no presentaron marca.

FIG. 3. NUCLEO DE CELULA EPITELIAL UTERINA MARCADA CON ANTICUERPO POLICLONAL AT 3A UNIDO A GAR G15. LA MARCA SE ENCUENTRA PREFERENCIALMENTE EN EL ESPACIO INTERCROMATINIANO (flechas grandes) Y MENOR CANTIDAD EN CROMATINA (flechas pequenas). EL CITOPLASMA (C) MUESTRA MENOR DENSIDAD DE GRANOS DE ORO. NUCLEOLO (Nu) CONTRASTE Ur- Pb. 50160X

C



FIG. 4. NUCLEO CELULAR DE LINFOCITO MARCADO CON ANTICUERPO POLICLONAL AT 3A UNIDO A GAR G15. LA MARCA SE ENCUENTRA PREFERENCIALMENTE EN EL ESPACIO INTERCROMATINIANO (flechas grandes) Y EN MENOR CANTIDAD EN CROMATINA (flechas pequeñas). EL CITOPLASMA (C) MUESTRA MENOR DENSIDAD DE GRANOS DE ORO. CONTRASTE Ur - Pb. 66880 X

0



FIG. 5. NUCLEO DE HEPATOCITO MARCADO CON ANTICUERPO
POLICLONAL AT 3A UNIDO A GAR G15. LA MARCA SE
ENCUENTRA PREFERENCIALMENTE EN EL ESPACIO INTER-
CROMATINIANO (flechas grandes) Y EN MENOR CANTIDAD
EN CROMATINA (flechas pequeñas). EL CITOPLASMA
(C) MUESTRA MENOR DENSIDAD DE GRANOS DE ORO.
CONTRASTE Ur - Pb. 40480 X

C

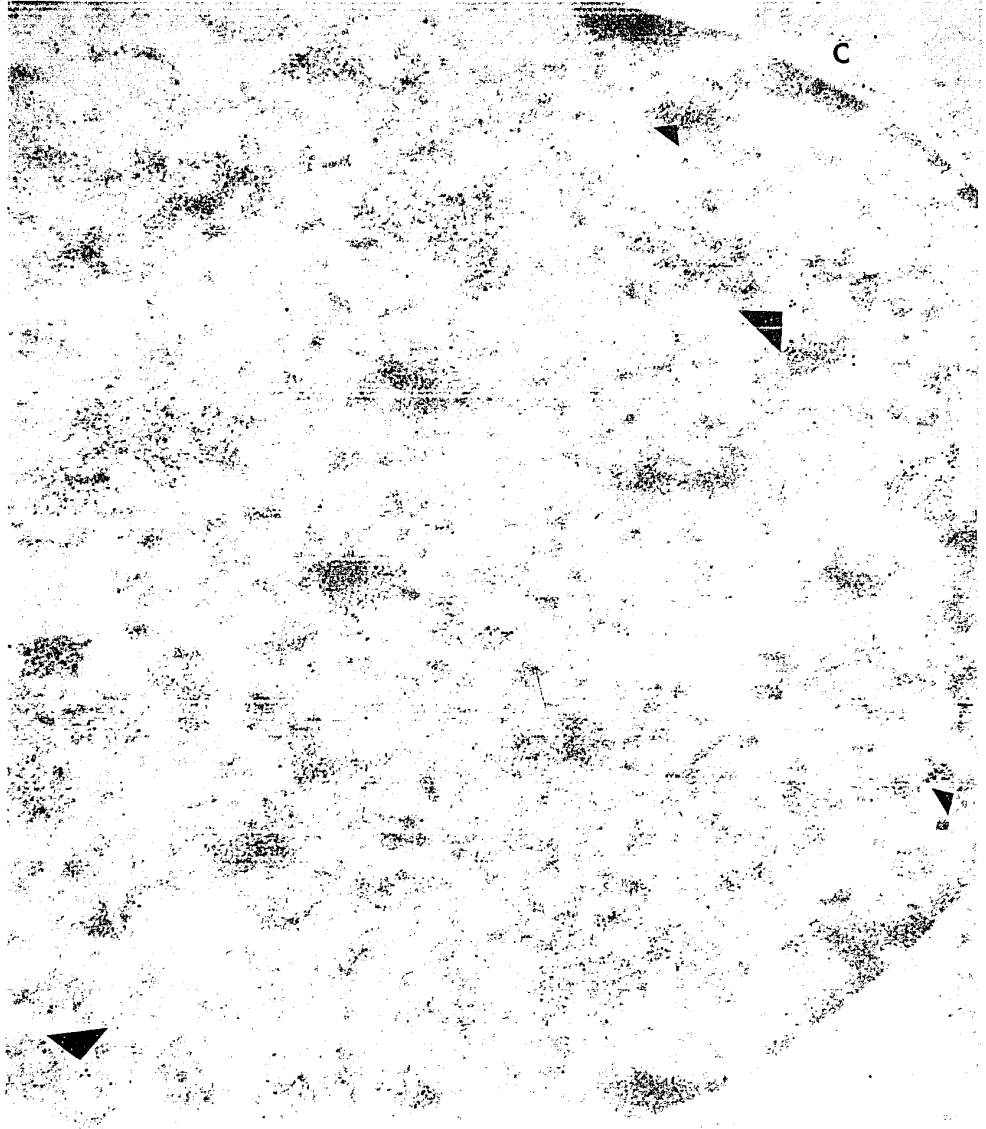


FIG. 6. NUCLEO DE CELULA EPITELIAL DUODENAL MARCADA CON ANTICUERPO POLICLONAL AT 3A UNIDO A GAR G15. LA MARCA SE ENCUENTRA PREFERENCIALMENTE EN EL ESPACIO INTERCROMATINIANO (flechas grandes) Y EN MENOR CANTIDAD EN CROMATINA (flechas pequeñas). EL CITOPLASMA (C) MUESTRA MENOR DENSIDAD DE GRANOS DE ORO. CONTRASTE Ur - Pb. 78000 X.

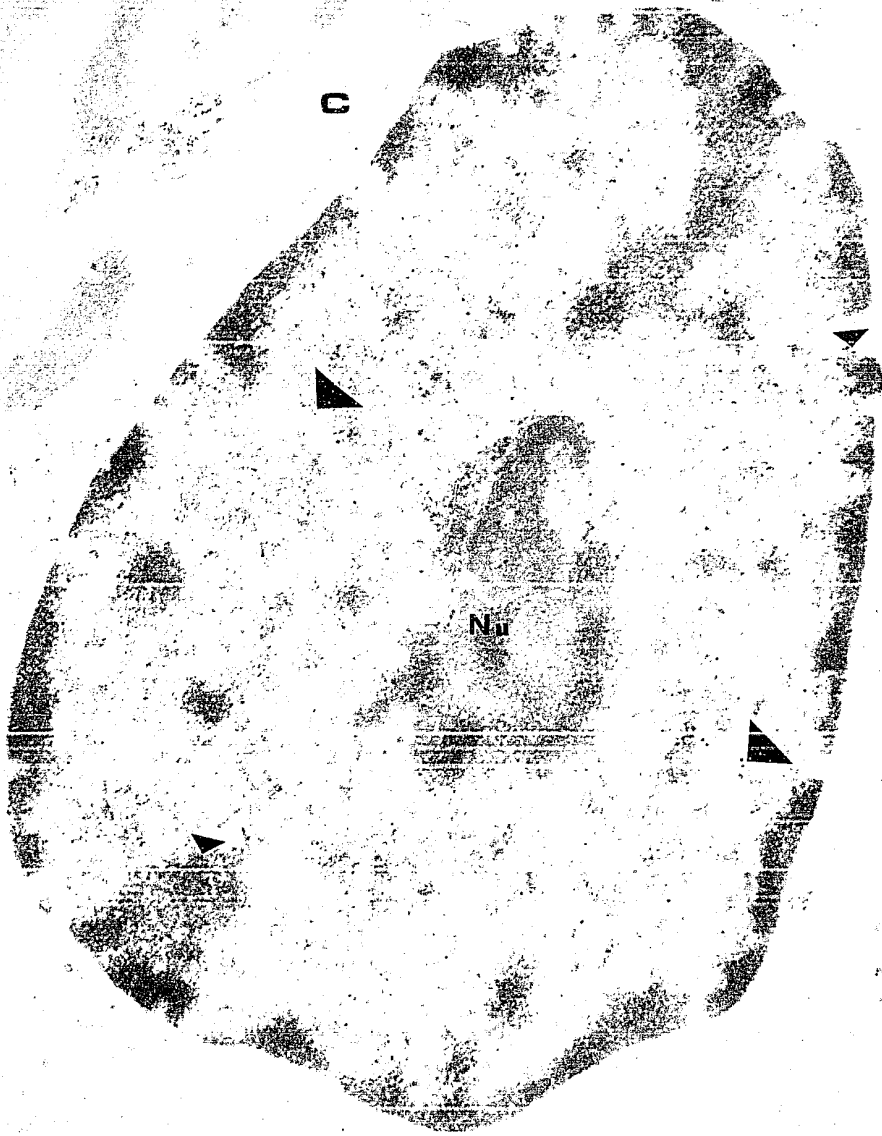
0

The image shows a circular object, possibly a coin or a medallion, with a highly textured and grainy surface. The object is centered in the frame. Three black arrowheads are placed on the surface to highlight specific features: one at the top, one on the right side, and one on the left side. The overall appearance is that of a heavily worn or aged metal piece. The background is white with some faint, illegible markings.

FIG. 7. NUCLEO DE CELULA DE TUBULO CONTORNEADO DE RINON
MARCADO CON ANTICUERPO POLICLONAL AT 3A UNIDO A
GAR G15. LA MARCA SE ENCUENTRA PREFERENCIALMENTE EN
EL ESPACIO INTERCROMATINIANO (flechas grandes) Y EN
MENOR CANTIDAD EN CROMATINA (flechas pequeñas). EL
CITOPLASMA (C) MUESTRA MENOR DENSIDAD DE GRANOS DE
ORO.
CONTRASTE Ur - Pb. 63360 X.

C

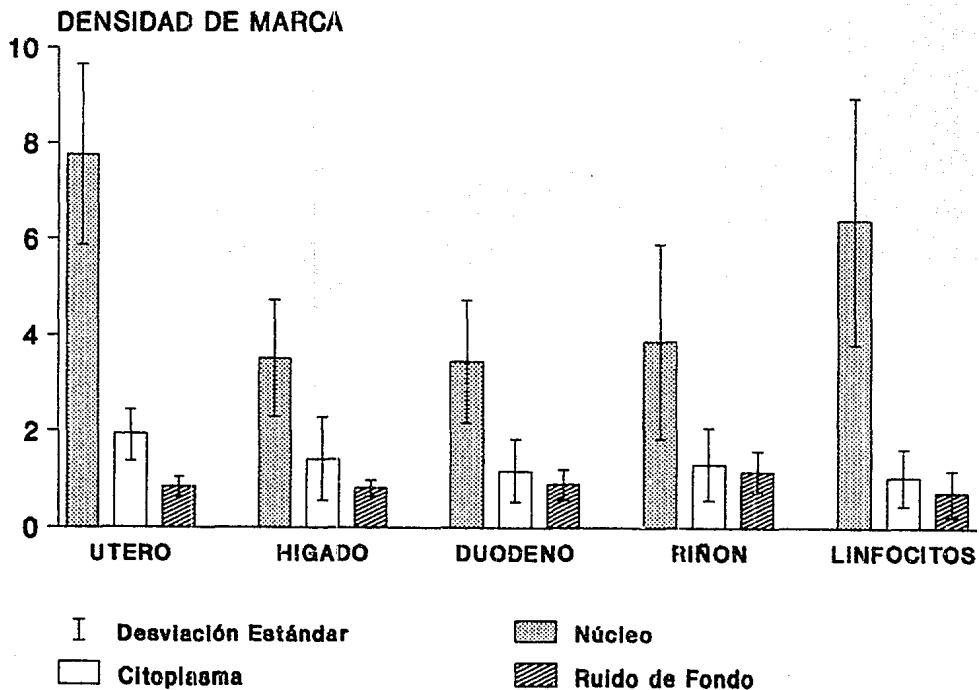
Nu



GRAFICA 1. DISTRIBUCION DE RE EN CELULAS DE RATA EN PROESTRO, LOCALIZADOS CON ANTICUERPO AT 3A UNIDO A GAR G15 MARCADO CON GRANOS DE ORO. EL COMPARTIMIENTO MAS DENSAMENTE MARCADO ES EL NUCLEO. MENOR DENSIDAD EN EL CITOPLASMA, SEGUIDO POR EL RUIDO DE FONDO. LA SIGNIFICANCIA ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS DE MARCA ENTRE NUCLEO Y CITOPLASMA SON:

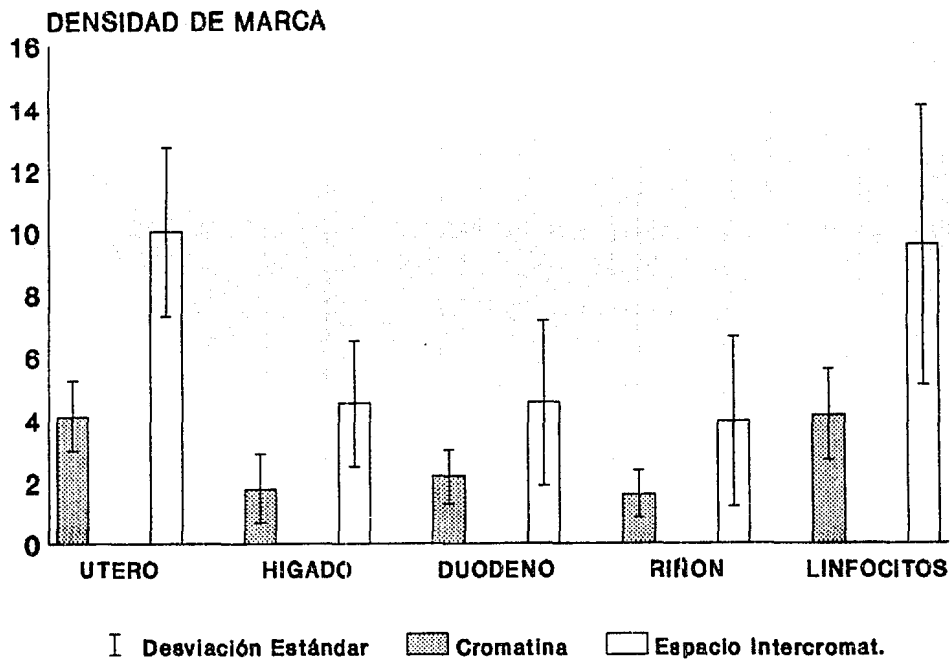
UTERO $p < .001$; HIGADO $p < .001$;
DUODENO $p < .001$; RISON $p < .001$ Y
LINFOCITOS $p < .001$.

RECEPTOR A ESTRADIOL



GRAFICA 2. DISTRIBUCION DE MARCAJE CON AT 3A UNIDO A GAR G15
EN ESPACIO INTERCROMATINIANO Y CROMATINA DE
CELULAS DE RATA EN PROESTRO. LA SIGNIFICANCIA
ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS DE MARCA ENTRE
CROMATINA E INTERCROMATINA SON: UTERO $p < .001$;
HIGADO $p < .001$; DUODENO $p > .001$; RIÑON
 $p > .001$; LINFOCITOS $p < .001$.

RECEPTOR A ESTRADIOL



DISCUSION

Para comprobar la especificidad de la reacción se substituyó el anticuerpo policlonal AT 3A utilizado en este estudio, por PBS-BSA-Tween y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo marcado. Este experimento control no produjo marca en ninguno de los tipos celulares analizados.

Es importante señalar que el uso de la técnica del inmuno-oro post-inclusión, utilizando como primer anticuerpo el AT 3A, desarrollado contra secuencias de aminoácidos del dominio de unión al ADN de RE y como secundario el GAR G15, ha permitido determinar la localización y distribución intracelular de receptores a estradiol en los diferentes tejidos estudiados.

Lo anterior es de gran importancia ya que la variación de resultados en cuanto a la distribución celular de receptores, obtenidos en el pasado, se cree pudieron ser por fallas técnicas o metodológicas en el procedimiento inmunocitoquímico, así como en la caracterización insuficiente de los anticuerpos usados (20, 40). Por lo tanto, se puede decir que el uso de anticuerpos específicos debidamente caracterizados combinado con la técnica del inmuno-oro post-inclusión, proporciona una localización precisa y sensible para el análisis de las interacciones del complejo estradiol-receptor con diversas estructuras celulares.

El ruido de fondo no fué significativo, por lo tanto, el uso de PBS-leche-Tween seguido de NGS antes de incubar con el

anticuerpo primario, son efectivos para evitar marca inespecifica.

Los resultados de este estudio demostraron una localización predominantemente nuclear de los RE en los diferentes tejidos de rata, sin importar si provienen de organos blanco o no a estradiol. Lo anterior concuerda con datos histológicos y bioquímicos recientes en los que se ha demostrado que el receptor se localiza en el compartimiento nuclear principalmente, en organos blanco para la hormona (12,27). El espacio intercromatiniano de todas las células estudiadas fué el que presentó mayor densidad de marca, esto sugiere que los RE pueden estar asociados a fibras pericromatinianas (FPC), como fué demostrado recientemente por Vázquez-Nin y col., en cortes ultrafinos de células epiteliales, musculares y fibroblastos de utero de ratas bajo diversas condiciones hormonales. En ese trabajo, los cortes se contrastaron con el procedimiento del EDTA para RNP y se demostró una estrecha relación entre los RE y RNP nucleares, especialmente FPC (38). La localización intercromatiniana del RE sugiere que en tejidos tradicionalmente no considerados efectores de estradiol, la hormona ejerce un control postranscripcional sobre la expresión genética, similar al encontrado por Vázquez-Nin y col., en útero, es decir, podría estar mediando genéticamente la migración de las partículas que contienen ARNm hacia el citoplasma (35, 36,37).

Aunque no se evaluó cuantitativamente la presencia de marca en nucleolo, debe hacerse notar que al menos cualitativamente, en nucleolos de células epiteliales de útero se observó mayor cantidad de marca y menor en nucleolo de células del riñón. Lo anterior no es de extrañar ya que se ha sugerido una acción directa del complejo estradiol- receptor sobre el sitio de transcripción de pre-rARN (38). La densidad de marca en citoplasma solo es significativa en células epiteliales de útero y su presencia se explica considerando que este es un órgano blanco y que los receptores no ocupados migran entre compartimientos (núcleo-citoplasma), después de haber sido primero concentrados en el núcleo en un estado de unión en equilibrio reversible con los componentes de la matriz nuclear y/o componentes de la cromatina (32,40).

La semejanza en densidad de marca nuclear encontrada entre células epiteliales del útero y linfocitos puede estar sugiriendo que estos son sensibles a estradiol. Estudios en los que se determine la densidad de RE en linfocitos de rata bajo diversas condiciones hormonales, podrían dar indicios sobre lo anterior. Por otro lado, se ha demostrado que la secuencia de aminoácidos de receptores a diferentes hormonas, son muy semejantes (3, 4, 22). Lo anterior se ha confirmado para receptores a estrógenos, glucocorticoides y progesterona (8, 9, 27, 39). Por aislamiento de DNAs a los que se unen receptores a esteroides, se ha identificado una familia de genes relacionados

cuyas regiones reguladoras se unen a moléculas receptoras muy diversas, debido a la existencia de una estructura común entre ellas. Se ha determinado además, que diferentes receptores son capaces de activar la transcripción, actuando a través de los mismos elementos reguladores. Todos estos receptores presentan una región terminal-N variable, un dominio central bien conservado rico en cisteína y una región terminal-C bien conservada (8, 9, 22).

Con base en lo anterior se sugiere que la densidad de RE en linfocitos, más que sensibilidad a estradiol, nos está mostrando una reacción cruzada del anticuerpo AT 3A con otros receptores, probablemente el de glucocorticoides, a los que los linfocitos son muy sensibles. Como se mencionó, todos los tipos celulares estudiados mostraron una concentración nuclear característica, esto sugiere un efecto genómico de la hormona. Por tal razón pueden ser designados como tejidos blanco genómicos para estradiol. El efecto citofisiológico que ejerce sobre estos tejidos debe ser determinado.

Hasta el momento, el papel de hormonas y por tanto la presencia de sus receptores en "organos blanco" está bien establecido. El hecho de que receptores para estradiol y quizás para otras hormonas estén presentes en pequeñas cantidades en muchos, si no es que en todos los tejidos, produce la pregunta ¿ en que forma los requerimientos para la estimulación hormonal en núcleos de células blanco , están acoplados para el aumento en la

producción de proteínas receptoras para estas células ?.

Ha sido claramente establecido que el hipotálamo y pituitaria anterior contienen receptores para hormonas estrogénicas y androgénicas que son similares en muchos aspectos a aquellas del útero y próstata; la significación biológica de estos receptores en relación a retroalimentación de inhibición de la producción y / o acción de factores gonadotrópicos liberados sin embargo, no ha sido determinada (26).

La presencia de receptores a estradiol en riñón de ratas adultas y en perros, ha sido relacionada con el balance sodio-potasio al final de la preñez (2,21).

Durante muchos años se manejó la idea de que cada hormona tenía su glándula de origen. La idea ahora es muy diferente: hormonas de la pituitaria se han encontrado en el cerebro y la placenta. La somatostatina es encontrada en el tracto gastrointestinal, en islotes pancreáticos así como en el hipotálamo (26). Moléculas comparables a hormonas liberadoras de gonadotropinas han sido encontradas en las gónadas y la placenta (26). Hormonas gastrointestinales están presentes en el cerebro. Esta situación confusa se ha combinado con el hallazgo de que la insulina se puede encontrar en tejidos extrapancreáticos de ratas y humanos, en cerebro por ejemplo, hígado, cultivo de linfocitos humanos y cultivo de fibroblastos humanos (26).

Se pueden hacer algunos comentarios al respecto: puesto que todas

las células tienen la misma información genética, no debería existir ninguna razón para que algun receptor en particular no pudiera ser producido por cualquier célula.

Lo anterior sugiere la posibilidad de que todas las células puedan producir todos los receptores, aunque sea en pocas cantidades, como se ha visto en el presente estudio, ello sugiere entonces que la represión de genes puede no ser un fenómeno total; quizás todos los genes están expresandose, aunque a un nivel bajo, y sus productos pudieran ser detectados con ensayos muy sensitivos, por ejemplo con localización inmunocitoquímica.

VI. CONCLUSIONES

- La técnica del inmuno-oro post-inclusión permitió observar la localización y distribución de receptores a estradiol en los diferentes tejidos.

- Los receptores a estradiol se encuentran predominantemente en el núcleo celular de todos los tipos celulares estudiados.

- Los receptores a estradiol se encuentran predominantemente en el espacio intercromatiniano, probablemente asociados a fibras pericromatinianas.

- El efecto del estradiol y por tanto la respuesta desde el punto de vista fisiológico sobre órganos no blanco, debe ser determinada en estudios futuros, con diferentes metodologías científicas.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Baird, D. T., 1975. Reproductive Hormones Reproduction in Mammals; Hormones in Reproduction. Austin., C. R. and Short. R. V. eds., Cambridge University Press. 3; 1-28.
- 2.-Barrack, E. R., 1987. Steroid Hormone Receptor Localization in the Nuclear Matrix: Interaccion With Acceptor Sites. J. Steroid Biochem. Vol. 27, No. 1-3, 115-121.
- 3.- Beato, M., Arneemann, J., Chalepakis, E. S., 1987. Gene Regulations by Steroid Hormones. J. steroid Biochem. Vol. 27, No. 1-3, pp. 9-14.
- 4.- Beato, M., 1989. Gene Regulation by Steroid Hormones. Cell, Vol. 56, 335-344.
- 5.- Bersin, T., 1972. Bioquimica de las Hormonas. Revista de Occidente, Biblioteca IBYS de Ciencias Biológicas. Madrid . 239-241.
- 6.- Beppu, K., 1989. An Electron Microscopic Study of the Steroid Hormone Receptor in Uterine Cells by the Colloidal Gold-Labeled Steroid Hormone. J. Electron Microsc., Vol. 38. No. 6, 430-440.
- 7.- Boomsma, R. A., Jaffre, R. C., Verhage, H. G. 1982. The Uterine Proggestational Response in cats: Changes in Morphology and Progesterona Receptors during Chronic Administration on of Progesterone to Estradiol- Primed and non Primed Animals. Biol. Reprod 26: 511. 89-93.

- 8.- Cato, A. C., Ponta, H. 1989. Different Regions of the Estrogen Receptor are Required for Synergistic Action with the Glucocorticoid and Progesterone Receptors. *Molecular and Cellulae Biology*. Vol. 9. No. 12 5324-5330 .
- 9.- Evans, R. M. 1988. The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. *Science*, Vol. 24 pp. 889-894.
10. Ganong, F. W. 1980. *Manual de Fisiologia Médica*. Ed. El Manual Moderno, S. A. México, 389-394.
- 11.- Gasc, J. M. , Rencor, J. M. ,Radanyi, C. 1982. Etude immunohistologique de l'oviducte de poulet à l'aide d'anticorps anti- récepteur de la progestérone . *C. R. Acad. Sci. Paris*. 295, 707-713.
- 12.- Gasc, J. M., Baulieu, E. E. 1986. Steroid Hormone Receptors: Intracelular Distribution . *Biology of the Cell*. 56, 1-6.
- 13.- Gayton, A. C. 1971. *Tratado de Fisiologia Médica*. Interamericana, México; 1011-1023.
- 14.- Glascock, R. F. Hoekstra, W. G. 1959. Selective Accumulation of Tritium- Labeled Hexoestrol by the Reproductive organs of Immature Female Goats and Sheep. *Biochem J*. 72: 673.
- 15.- Gosselin, E. J., Cate, Ch. C., Pettengill, O. S., Sorenson, G. D. 1986. Immunocytochemistry: Its Evolution and Criteria for its Application in the Study of Epon- Embedded Cell and Tissue. *The American Journal of Anatomy*. 175:135-160.

- 16.- Gowindan, M. V. 1980. Immunofluorescence Microscopy of the Intracellular Translocation of Glucocorticoid Receptors in Different Cell Types and their Translocation from the Cytoplasm to the Cell Nucleus in the Presence of dexamethasone. *Exp. Cell Res.* 125. 490-493.
- 17.- Greene, G. L., Jensen, E. V. 1982. Monoclonal Antibodies as Probes for Estrogen Receptor Detection and Characterization. *J. Ster. Biochem.* 16. 353-359.
- 18.- Hamilton, T. H. 1968. Control by Estrogen of Genetic Transcription and Translation. *Science*, Vol. 161, pp. 649-661.
- 19.- Horwitz, K. B., Mc Guire, W. L. 1978. Nuclear Mechanisms of Estrogen Action. Effects of Estradiol and anti-estrogens on estrogen receptors and nuclear receptor processing. *The Journal of Biological Chemistry* . Vol.253, No. 22, pp. 8185-8191.
- 20.- Jensen, E. V. 1977. Receptor Proteins: Past, Present and Future. *Research on Steroid*. ELSEVIER / NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL, PRESS.
- A. Vermeulen et . al. Editores. Vol. VII, pp. 2-45.
- 21.- McDonald, L. E. 1978. Reproducción y Endocrinología Veterinarias. Interamericana, México, 236-285.
- 22.- Meyer, M. E., Gronemeyer, H. et. al. 1989. Steroid Hormone Receptors Compete for Factors that Mediate their Enhancer Function. *Cell*, Vol. 57. 433-442.

- 23.- Molinari, A. M., Medici, N. , Armetta, I., Nigro, V. 1985. Particulate Nature of the Unoccupied Uterine Estrogen Receptor. Biochem. Biophys Res. Commun. 128, 634-642.
- 24.- Morel, G., Dubois, P., Benassayag, C., Nufiez, E., Radanyi, C., Baulieu, E. E. 1981. Ultrastructural Evidence of Oestradiol Receptor by Immunochemistry. Exp. Cell Res. 132,249-257.
- 25.- Morel, G., Dubois P., Gustafsson, J. A. 1984. Ultrastructural Evidence of Progesterone Receptor by Immunochemistry. Exp. Cell Res. 155, 283-288.
- 26.- Nial, H. D. 1982. The Evolution of Peptide Hormones. Ann. Rev Physiol, 44: 615-624.
- 27.- Parik, H. I., Rajendron, K. G., Su, J. L., López, T. 1987. Are Estrogen Receptors Cytoplasmic or Nuclear? Some Immunocytochemical and Biochemical Studies. J. steroid Biochem, Vol. 27. No. 1-3. pp . 185-192.
- 28.- Raam, S., Richardson, G. S., Bradley, F., McLanghlin, D., Sun, L., Frankel, F. 1983. Translocation of Cytoplasmic Estrogen Receptors to the Nucleus: Immonohistochemical demonstration Utilizing Antibodies to Estrogen Receptors of Mammary Carcinomas. Breast Canc. Res. Treat. 3, 179-199.
- 29.- Romano, E. L., Romano. M. 1984. Immunolabelling for Electron Microscopy. Capitulo I. Elsevier Science Publishers B. V. 8- 43.

- 30.- Sar, M., Parikh, I. 1986. Immunohistochemical Localization of Estrogen Receptor in Rat Brain, Pituitary and Uterus with Monoclonal Antibodies. J. steroid Biochem. Vol. 24G. , No. 2 ,pp. 497-503.
- 31.- Sawin, C. 1971. Las Hormonas. Fisiología Endócrina. Salvat Editores, S. A. España ,pp. 156-163.
- 32.- Sheridan, P. J., Buchanan, J. M., Anselmo, V. C., Martin, P. M. 1979. Equilibrium: the intracellular distribution of steroid receptors. Nature , Vol.282,pp. 579-582.
- 33.- Stumpf, W. E. 1968. Nuclear Concentration of 3H- estradiol in Target Tissues. Dry- Mount Autoradiography of Vagina, Oviduct, Ovary, Testis, Mammary Tumor , Liver and Adrenal. IIIrd International Congress of Endocrinology (Exerpta Med. International Congress Series).157: 10.
- 34.- Traish, A., Kim, N., Wotiz, H. H. 1989. Characterization of Polyclonal Antibodies to Preselected Domains of the Human Estrogen Receptor, Endocrinology, Vol. 125, No. 5, 1-8.
- 35.- Varman, R. T. 1984. The nuclear Binding of Estradiol Stimulates Ribonucleoprotein Transport in the Rat Uterus. Biological Chemistry. Vol. 260, No. 9, pp. 5420-5426.
- 36.- Vázquez-Nin, G. H., Echeverría, O. M., Molina, E. y Frago, J. 1978. Effects of Ovariectomy and Estradiol Inyection on Nuclear Structures of Endometrial Cells. Acta Anatómica, 102: 308-318.

- 37.- Vázquez- Nin, G. H., Echeverría, O. M. y Pedron, J. 1979. Effects of Estradiol on the Ribonucleoprotein Constituents of the nucleus of Cultured Endometrial Epithelial Cells. *Biol. Cellulaire*, 35, 221-228.
- 38.- Vázquez- Nin, G. H., Echeverría, O. M., Fakan, S., Traish, A. M., Wotiz, H. H. and Martin, T. e. 1991. Immunoelectron Microscopic Localization of Estrogen Receptor on Pre- mRNA Containing Constituents of Rat Uterine Cell Nuclei. *Experimental Cell Research* 192, 396-404.
- 39.- Vijay, K., Chambon, P. 1988. The Estrogen Receptor Binds Tightly to Its Responsive Element as a Ligand- Induced Homodimer, *Cell*. Vol. 55, 145-156.
- 40.- Walters, M. R. 1985. Steroid Hormone Receptors and the Nucleus, *Endocrinology*, Vol. 6, No. 4, pp. 512-543.
- 41.- Weiss, L., Greep, R. O. 1977. *Histology*. McGraw- Hill Book Company. Fourth Edition. U. S. A.
- 42.- Welshons, W. V., Lieberman, M. E., Gorski, J. 1984. Nuclear Localization of Unoccupied Oestrogen Receptors. *Nature* 307, 747-749.
- 43.- Williams, D. , Gorski, J. 1972. Kinetic and Equilibrium Analysis of Estradiol in Uterus: A Model of Binding-Site Distribution in Uterine Cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 69, No. 11, 3464-3468.

44.- Yamashita, S., Korach, K. S. 1987. Immunological Analysis of Biochemical Properties of the Estrogen Receptor. J. Cell Biol 105: 148a (abstract).

45.- Yamashita, S., Korach, K. S. 1989. A modified Immunohistochemical Procedure for the Detection of Estrogen Receptor in Mouse Tissues, Histochemistry 90 : 325-330.

46.- Yu, M. S., Mei-Ho, S. 1989. Nuclear Acceptor Sites for Estrogen- Receptor Complexes in the Liver of the Turtle, *Chrysemys picta*. Molecular and Cellular Endocrinology 61,37-48.