



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

“RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES EN
CELULAS NEURALES DE EMBRION DE POLLO
EN CULTIVO”

BO 1323/97
Ej. 1

T E S I S

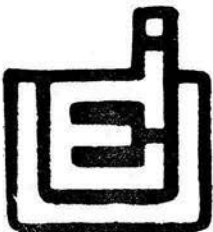
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

RICARDO ARTURO VALDEZ PEREZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO.



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO.

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTO

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARTA C.ROMANO PARDO

DEDICATORIAS

A MI MADRE,

CON AMOR Y ADMIRACIÓN, POR TU FORTALEZA Y APOYO DURANTE
MI VIDA.

A MI PADRE ,

QUE AUNQUE PARTISTE HACE TIEMPO EN EL VIAJE ETERNO NUNCA
HAS ESTADO AUSENTE.

A MARGARITA,

CON TODO MI AMOR, POR COMPARTIR CADA MOMENTO EN EL CAMINO
DE MI VIDA. POR LOS SABIOS CONSEJOS QUE ME DISTE Y POR SER ...FOGATA DE
AMOR Y GUÍA...

A MARLENE,

POR SER ESA CHISPA EN MÍ.

A MIS HERMANOS

LETICIA, PATRICIA, MIGUEL Y GERARDO.

A G R A D E C I M I E N T O S

**A LA DRA. MARTA, POR ORIENTAR ATINADAMENTE MI DESARROLLO, POR SU
CONFIANZA DE POSITADA EN MI.**

**A LA BIOLOGA CAROLINA MIRANDA, POR TODAS LAS ENSEÑANZAS QUE ME DEJO,
POR SU AMISTAD .**

A TODOS LOS CAMPAÑEROS DE LABORATORIO

I N D I C E

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
Desarrollo embrionario de la glándula adrenal.....	2
Síntesis de las hormonas esteroideas adrenales.....	4
Transporte de los glucocorticoides en sangre.....	9
Desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales.....	11
Mecanismo de acción de la hormona adrenocorticotrópica.....	15
Función del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales.....	17
Efecto de los glucocorticoides sobre los tejidos del embrión.....	17
Receptores para glucocorticoides.....	20
<i>ANTECEDENTES</i>	23
<i>OBJETIVOS</i>	25
<i>METODOLOGÍA</i>	26
Cultivo primario enriquecido en células neuronales.....	26
Caracterización de los receptores a ³ H-dexametasona y ³ H-Corticosterona	27
Detección de los receptores a ³ H-dexametasona.....	28
Curva temporal de la unión de ³ H-dexametasona.....	28
Evaluación de los receptores a ³ H-dexametasona.....	29

Experimentos de desplazamiento competitivo	29
Curva de saturación.....	29
Estudio de la especificidad del receptor.....	30
Determinación de proteínas.....	30
Caracterización del cultivo.....	30
Análisis estadístico.....	31
<i>RESULTADOS</i>	32
Detección de los receptores a ³ H-dexametasona.....	32
Curva temporal de la unión de ³ H-dexametasona.....	33
Curva de desplazamiento competitivo.....	36
Curva de saturación.....	36
Competencia por el receptor a ³ H-dexametasona por otras hormonas esteroides.....	40
Experimentos con ³ H-corticosterona.....	40
<i>DISCUSIÓN</i>	43
<i>CONCLUSIONES</i>	49
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	50

R E S U M E N

El embrión durante su desarrollo recibe la influencia de una gran variedad de factores. Entre estos se encuentran las hormonas adrenocorticales, por ejemplo, los glucocorticoides. Estas hormonas realizan diversas funciones sobre el metabolismo embrionario. De las actividades más destacadas se encuentran que puede orientar la diferenciación y maduración de ciertos órganos. El cerebro es un órgano blanco para los glucocorticoides. Debido a la heterogeneidad celular dentro del cerebro no se ha establecido totalmente que regiones responden al estímulo de los glucocorticoides. Se ha demostrado por otros autores, la presencia de receptores a corticosterona y dexametasona en el cerebro completo, en la retina del embrión de pollo, pero estos trabajos se realizaron con fracciones citosólicas del tejido estudiado. En el presente trabajo se detectó la presencia de receptores a glucocorticoides en cultivos primarios de células neuronales de embrión de pollo de 8 días. Las células neuronales fueron capaces de unir dexametasona y corticosterona con alta afinidad. Para el caso del receptor a dexametasona su $K_d = 0.77$ nM; el análisis de Scatchard reveló que existe un solo sitio de unión para dexametasona y que es saturable. En los experimentos donde se estudió la especificidad del receptor, se demostró que la aldosterona no fue capaz de desplazar a la dexametasona del receptor. Cuando el ligando era la corticosterona, la aldosterona sí logró un desplazamiento moderado del glucocorticoide.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario de los vertebrados se lleva a cabo en condiciones complejas. En los mamíferos se establecen relaciones materno-fetales de capital importancia, que le permiten al embrión subsistir, ya que le proporcionan los nutrimentos necesarios para su sobrevivencia, y la posibilidad de eliminar los productos finales de su metabolismo. Además, la madre ejerce influencia sobre el embrión durante la gestación por medio de señales hormonales claramente identificadas, dichas señales orientan hacia la diferenciación de órganos y sistemas.

El embrión de pollo es un buen modelo para conocer de qué manera ocurre la diferenciación de ciertos órganos, sin la influencia materna, lo que permite el estudio de las interacciones de las hormonas con sus órganos blanco durante el desarrollo, el cual tiene lugar en condiciones altamente homeostáticas y es independiente del sistema endocrino materno durante el desarrollo.

En todos los estados del desarrollo del embrión de pollo, existe un equilibrio dinámico entre el embrión y las estructuras extraembrionarias como el vitelo, el alantoides, el amnios y el cascarón, que participan en actividades vitales como la respiración, la nutrición y la excreción y representan una conexión entre el embrión y el medio que le rodea.

La diferenciación fisiológica y morfológica de diversos tipos celulares en el embrión de pollo se encuentra bajo la influencia de factores de crecimiento y/o humorales (Woods, et al. 1971). El tiempo en el cual dichos factores están presentes en el embrión, determina el efecto que tendrán. Asimismo, la sensibilidad y/o respuesta a las hormonas depende del grado de diferenciación en que se encuentren las regiones blanco.

Para que la respuesta biológica a determinada señal tenga lugar en el embrión, es necesario que se haya desarrollado previamente en las células blanco toda la maquinaria responsable de la síntesis de los sistemas que reconocerán dicha señal, por ejemplo receptores membranales, citoplasmáticos y nucleares. Asimismo, deberán estar presentes los componentes celulares involucrados en la cascada de fenómenos desencadenados en la célula después de que la hormona se une al receptor correspondiente.

DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA GLÁNDULA ADRENAL

La glándula adrenal es considerada como un órgano esencial para la vida, ya que controla diversos aspectos fisiológicos en el individuo adulto. De igual forma, en la etapa embrionaria, los corticosteroides producidos por ella influyen, sobre algunos procesos de la diferenciación funcional y estructural de sus órganos blanco.

En el embrión de pollo, la glándula adrenal comienza a desarrollarse muy tempranamente. Tiene un doble origen embriológico, esto es, los dos componentes, el tejido cortical y el tejido medular cromafín, provienen de diferentes capas germinales. La porción cortical es la primera que se distingue, y proviene del epitelio celómico medial al mesonefros (Romanoff, 1960).

Las células cromafines aparecen varios días después, y se originan a partir del primordio del sistema nervioso simpático el cual es de origen ectodérmico (Bellaris, 1960; Freeman y Vince, 1974).

Los elementos celulares de la región cortical se pueden detectar hacia el final del cuarto día de incubación y, dos días después, las células corticales penetran el

tejido cromafín. Posteriormente hacia el día 7, las células corticales se arreglan en cordones característicos de la glándula adrenal en aves (Moog, 1959).

En el día 8 de incubación la actividad mitótica de las células corticales aumenta, y la primera fase de proliferación termina hacia el día 10 (Tóth, Simon y Szekely, 1958). Se sugiere que este fenómeno es iniciado bajo la influencia de la adenohipófisis embrionaria la cual comienza a secretar la hormona adrenocorticotropica (ACTH) (Székely, et al, 1958). Lo anterior es reforzado por los hallazgos de una lenta pero prolongada actividad mitótica en las glándulas adrenales de embriones hipofisectomizados tempranamente. El segundo pico de actividad mitótica en los cordones corticales comienza por el día 14 (Girovard y Hall, 1973) y puede reflejar el establecimiento del control hipotálamo-hipofisiario sobre la actividad adrenal. Tal proliferación de células corticales es responsable del aumento del tamaño de la glándula adrenal y por el día 18 de vida embrionaria los cordones corticales representan el 63% del volumen de la glándula. En cambio en embriones hipofisectomizados tempranamente, los cordones corresponden al 32% del total de la glándula (Case, 1952). La extirpación de la hipófisis por decapitación entre los días 8 y 13 también causa retardo de la proliferación y de la citodiferenciación de los elementos corticales (Adjovi, 1970).

Los ácidos grasos y fosfolípidos se pueden detectar histoquímicamente en las células corticales de embriones de 6 días, mientras que las grasas neutras no se pueden encontrar antes del día 10. El colesterol, un precursor de las hormonas esteroides, se presenta en las glándulas adrenales de embriones de 8 días (Hatier y Grignon, 1971) y se incrementa continuamente en su forma libre, con excepción de un corto período entre los días 15-17. Este decremento transitorio del colesterol libre en la glándula adrenal podría ser el resultado de un aumento en la utilización de esta sustancia para la síntesis de esteroides en la glándula (Adjovi, 1970).

La hipofisectomía, proceso en el cual se extirpan el prosencéfalo y el diencéfalo junto con el primordio de la hipófisis, retarda la diferenciación ultraestructural de las células corticales (Strazniky, et al. 1966) y en embriones de 12 días, disminuye la acumulación de colesterol libre en estas células (Adjovi, 1970).

SÍNTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES ADRENALES

Tanto el desarrollo de la glándula adrenal del embrión de pollo, como la citodiferenciación de los elementos corticales, se acompañan de cambios en aquellas enzimas relacionadas con la esteroidogénesis (Domm y Ericson, 1972).

Las rutas biosintéticas para los esteroides adrenales no han sido totalmente elucidadas, tanto en el embrión como en el ave adulta (Wells y Wight, 1971) pero se ha sugerido un esquema general de biosíntesis.

La estructura química básica de las hormonas esteroides es el núcleo conocido como ciclopentanoperhidrofenantreno. Dicha molécula está constituida por 17 átomos de carbono los cuales están dispuestos en 4 anillo aromáticos, 3 ciclohexanos y 1 ciclopentano, y a este último núcleo se le agregan cadenas laterales que determinan los diferentes tipos de hormonas esteroides. (fig. 1)

Los corticosteroides se sintetizan *de novo* a partir de la acetil Co-A y principalmente de colesterol. El colesterol puede ser obtenido por las células esteroidogénicas por tres vías: i) incorporándolo de la sangre a partir de las

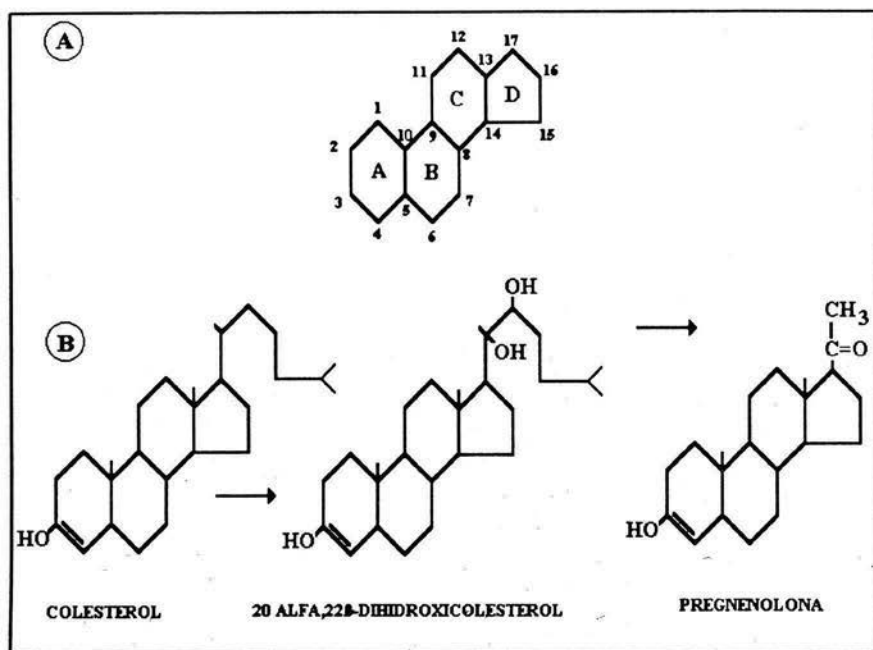


Fig. 1. Representación convencional del ciclopentanoperhidrofenantreno, núcleo básico de los esteroides (A). Inicio de la biosíntesis de los glucocorticoides (B) (ver texto).

lipoproteínas circulantes, ii) utilizando el colesterol almacenado en forma de ésteres sulfatados en los depósitos de lípidos del citoplasma, y iii) sintetizando de ново a partir de acetato (Pedemera, 1993).

Los glucocorticoides se sintetizan a partir de pregnenolona y/o progesterona (fig. 2) siendo las hidroxilaciones y la ruptura de la cadena lateral del colesterol los pasos limitantes, que son regulados por la ACTH en presencia de iones Ca^{++} . Esta hormona trófica, producida por la hipófisis anterior, ejerce su efecto a nivel membranar (activación de la adenilato ciclasa), induciendo la hidrólisis de los ésteres del colesterol y aumentando la disponibilidad de NADPH. (Loza-Arredondo, et al. 1988).

Para la transformación de progesterona y/o pregnenolona a glucocorticoides se presentan 3 hidroxilaciones sucesivas. La primera ocurre en el carbono 17 y es catalizada por la 17 α -hidroxilasa y da como resultado 17-OH pregnenolona y 17-OH progesterona. La segunda ocurre en el carbono 21 de la 17-OH progesterona, y es realizada por la 21 α -hidroxilasa y da como producto 11-desoxicortisol. La tercera hidroxilación ocurre en el carbono 11 del 11-desoxicortisol por la 11- β hidroxilasa dependiente de Mg^{++} y da como producto cortisol. (fig. 2).

Estudios *in vitro* demostraron claramente que los microsomas de la glándula adrenal son el principal sitio de conversión de pregnenolona a progesterona (en presencia de NAD) por la enzima 3 β -deshidrogenasa Δ^4 , Δ^5 isomerasas, y de progesterona a 11-deoxicorticosterona (en presencia de NADPH) por la acción de la 21- β hidroxilasa (fig. 3) (Goodman, 1994).

La mitocondria es la estructura en donde se da la conversión de 11-deoxycorticosterona a corticosterona (en presencia de NADPH). Este paso es catalizado por la 11 β -hidroxilasa. La corticosterona y la aldosterona son los principales corticoesteroides en la adrenal del ave adulta. La conversión de precursores está asociada a la actividad de la Δ^5 3 β -hidroxilasa, Δ^5 - Δ^4 isomerasa y 21-hidroxilasa en los microsomas, mientras que la enzima 11- β -hidroxilasa está concentrada en la mitocondria (Nakamura y Tanabe, 1973).

La enzima 17 α -hidroxilasa, convierte la progesterona a 17 α -hidroxiprogesterona, un precursor del 11-desoxicortisol y cortisol en los mamíferos, no ha detectada en la glándula adrenal del pollo adulto. En contraste, la conversión

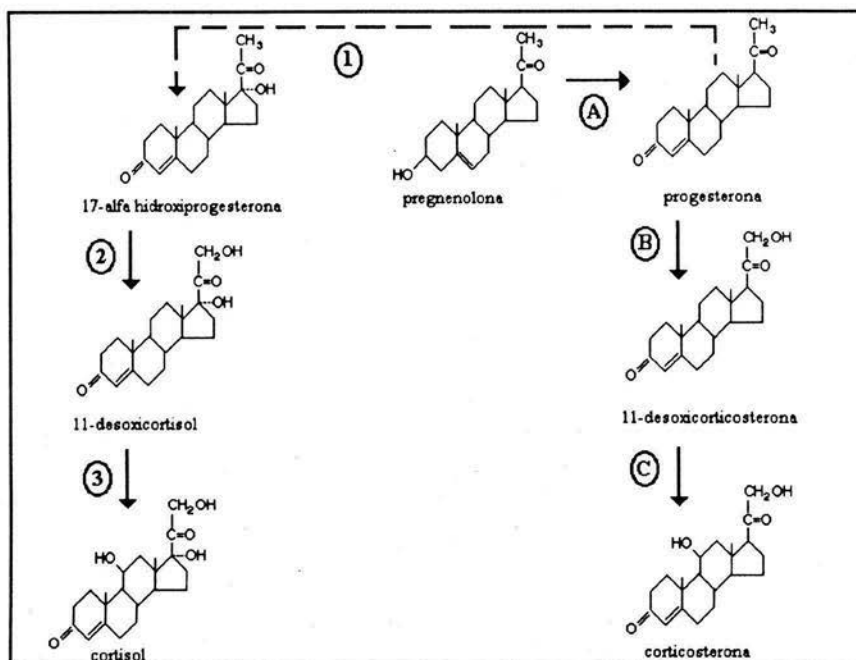


Fig. 2. Biosíntesis de los Glucocorticoides. Los números (1), (2) y (3) indican que enzima cataliza cada paso, para la obtención de cortisol. La 17 α -hidroxilasa, 21 α -hidroxilasa y la 11 β hidroxilasa para la obtención de cortisol. Y para la síntesis de corticosterona, la 3 β deshidrogenasa isomerasa (a); la 21 β hidroxilasa (B) y la 11 β hidroxilasa (C).

de progesterona a 17 α -hidroxicorticosterona fue detectada en la glándula adrenal del embrión de pollo (Nakamura, et al. 1978). Sin embargo, la actividad de la 17 α -hidroxilasa es alta en el día 17 de incubación pero descende con la edad del embrión. Así, la actividad de esta enzima es muy baja por el día 3 después del nacimiento y es indetectable en pollos de entre 7 y 14 días. De modo que se ha demostrado la producción de 11-deoxicortisol y cortisol en homogenados de la glándula adrenal del embrión de pollo de 17 y 21 días, y por la adrenal de polluelos de 3 días de edad; pero ninguno de estos dos esteroides son sintetizados por la

adrenal de polluelos de 7 días (Nakamura, et al.,1978). Asi mismo, Kalliecharan y Hall mostraron que además del cortisol la adrenal del embrión de pollo sintetiza

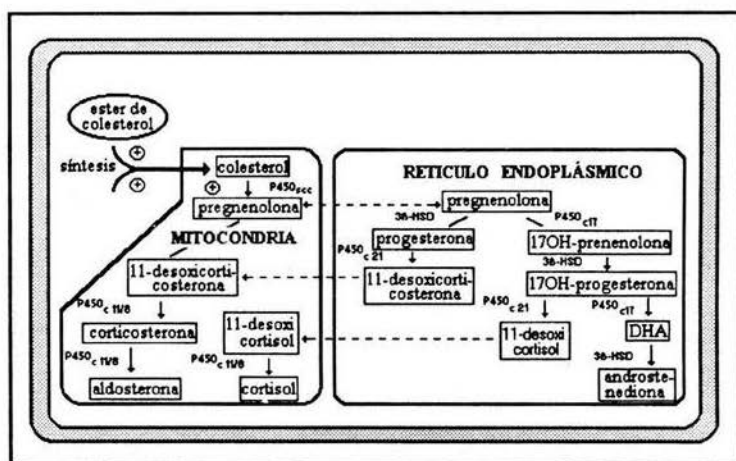


Fig. 3. Localización esquemática de las enzimas que intervienen en la esteroidogénesis en una célula adrenal. Se muestra la localización intracelular de 5 enzimas esteroidogénicas p450scc (rompe la cadena lateral del colesterol), p450c17 (17-hidroxilasay 17,20 desmolasa), p450c21 (21-hidroxilasa), p450c4/c18 (11B-hidroxilasa, 18-hidroxilasa y aldehído sintetaza), 3BHSO 3B-hidroxiesteroide deshidrogenasa y D5 3-cetoesteroide isomerasa). Los símbolos (+) indican a procesos que son acelerados por ACTH y AMPc.

corticosterona (Kalliecharan y Hall, 1977). Estos datos indican que la glándula adrenal embrionaria no es un órgano especializado en la síntesis de determinados tipos de hormonas esteroides, sino que presenta, en un periodo de su desarrollo, la capacidad de producir diversos esteroides, entre los que se hallan la progesterona, el estradiol, la testosterona, el cortisol, la cortisona y por último la corticosterona. Después del nacimiento, sin embargo, la glándula se convierte en un órgano más especializado y produce principalmente corticosterona y aldosterona.

De estos hallazgos se puede asumir que en la glándula adrenal del embrión de pollo se produce una rápida diferenciación esteroidogénica de las células corticales durante el último tercio del desarrollo embrionario (Boucek, et al., 1966). No obstante, Pedernera (1971) mostró que la glándula adrenal de embriones de 8 días es capaz de secretar glucocorticoides después de la administración de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) aún en el día 5 de incubación. Aunque esto puede sugerir que la secreción de corticosterona comienza entre los días 8 y 10 de incubación, los datos *in vitro* no son directamente comparables con el desarrollo normal *in vivo* ya que existe la posibilidad de que las condiciones de cultivo puedan alterar la velocidad normal de diferenciación funcional.

Sin embargo, el embrión tiene los sistemas enzimáticos maduros para la corticoesteroidogénesis en el día 5, como se mostró por su respuesta a ACTH, pero los niveles de síntesis de estas enzimas en la glándula adrenal alcanzan un máximo en el día 10, cuando la capacidad secretora llega a una meseta (Pedernera, 1971).

Las concentraciones máximas de glucocorticoides (corticosterona, cortisol, cortisona) en el plasma del embrión de pollo tienen un pico en el día 17 de incubación con un dramático aumento entre los días 14 y 15. Las concentraciones plasmáticas de corticosterona se mantienen estables hasta el nacimiento, mientras que en el caso del cortisol su nivel en plasma baja después del día 16 de incubación (Kalliecharan y Hall, 1974).

TRANSPORTE DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN SANGRE

Los glucocorticoides, una vez sintetizados, son secretados a la circulación general para ser transportados y posteriormente captados específicamente por sus

órganos blanco. En términos generales, los glucocorticoides son de naturaleza lipofílica y parcialmente insolubles en medios acuosos. El mecanismo por el cual los glucocorticoides son parcialmente incorporados en medios acuosos y transportados a los diversos órganos blanco se realiza por la interacción de la hormona con componentes de naturaleza proteínica presentes en el torrente sanguíneo, con los que forma complejos hormona-proteína. Para el caso de los glucocorticoides, la proteína encargada de transportarlos en sangre es la α -1-globulina transportadora de corticoesteroides (CBG) o transcortina, con un peso molecular de 52 kDa. La transcortina es una glicoproteína que contiene 26% de carbohidratos y se caracteriza por la gran velocidad de disociación del complejo hormona-proteína ($k_a = 10^{-8} M$). La CBG se produce en el hígado (Hammond, et al., 1991) y tiene especificidad por la corticosterona, el cortisol y la progesterona, mientras que exhibe poca o nula afinidad por los corticoesteroides sintéticos como la dexametasona. Cuando los glucocorticoides se encuentran unidos a la CBG no presentan actividad biológica. (De Nicola y Lantos, 1980).

En los embriones de pollo la concentración de CBG y su capacidad de unión aumenta entre los días 6 al 12 permaneciendo sin cambio hasta el día 15 (Siegel y Gould, 1976; Martin, et al., 1977). En los días subsecuentes la capacidad de unión disminuye considerablemente. Esto podría explicar porqué los embriones pueden tolerar altas concentraciones de corticosteroides entre los días 10 y 15 sin que se produzca un efecto dañino en la proliferación de los órganos embrionarios, particularmente el cerebro. Pero después del día 15, cuando los niveles totales de glucocorticoides en el plasma alcanzan un pico, en tanto que la capacidad de unión de CBG disminuye, la concentración de glucocorticoides libres en el plasma va en aumento (Martin, et al., 1977). Este incremento en la fracción biológicamente activa de los glucocorticoides sugiere, un papel esencial de éstos en la

citodiferenciación, y en la maduración funcional de las poblaciones celulares en los tejidos blanco durante el último tercio de la vida embrionaria.

Este cambio en la capacidad de unión de las CBG en el embrión parece ser dependiente de la hipófisis y tal vez del hipotálamo. Al parecer en estadios tardíos del desarrollo, la efectividad biológica de los glucocorticoides está bajo un control dual hipofisiario: por un lado la regulación de la concentración total de glucocorticoides y por otro el control del nivel de glucocorticoides libres a través de la unión de los mismos a CBG en el plasma. Este control dual puede asegurar una regulación muy sensible de la diferenciación celular tardía (Gasc, y Martin, 1978).

Todo esto lleva a la conclusión de que las cambiantes concentraciones plasmáticas de los glucocorticoides que se observan en el desarrollo reflejan no solamente la maduración funcional de las células suprarrenales corticales sino también, directa e indirectamente, el control hipotálamo-hipofisiario de la secreción de corticosteroides en el embrión de pollo. El desarrollo del patrón normal de la secreción de los glucocorticoides es entonces el resultado de los cambios bioquímicos y fisiológicos en la glándula adrenal y también del desarrollo funcional de los corticotropos de la hipófisis anterior y/o el desarrollo de las neuronas neurosecretoras en el hipotálamo las cuales producen el factor liberador de corticotropina (CRF).

DESARROLLO DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL

La totalidad del sistema endocrino se desarrolla durante la vida embrionaria del *Gallus domesticus*. Dicho desarrollo involucra la génesis y diferenciación de las

células endocrinas y la adquisición progresiva de las interacciones entre los tejidos, el sistema nervioso central y las glándulas de secreción interna para establecer los sistemas que controlarán la función secretora de las glándulas endocrinas. Es decir, el desarrollo de la glándula adrenal no solamente involucra su capacidad para secretar hormonas, sino también el desarrollo funcional del eje neuroendocrino completo, incluyendo el hipotálamo la hipófisis y las glándulas adrenales.

Los primeros corticotropos aparecen en la región cefálica de la adenohipófisis hacia el día 8 del desarrollo embrionario del pollo, en este mismo periodo se detectó la producción de ACTH en la hipófisis. La síntesis y secreción de ésta hormona por parte de la hipófisis embrionaria aumenta en función de la edad (Wilson, 1952)

La producción de corticoesteroides por parte de la glándula adrenal embrionaria, se inicia antes de que la hipófisis produzca ACTH, esto parece sugerir que la hipófisis no es esencial para la diferenciación funcional temprana de la adrenal en el embrión de pollo (Pedemera, 1972). Lo anterior es reforzado por experimentos en los que se hipofisectomizan embriones de pollo. La hipofisectomía se realiza en embriones de pollo de 33-38 horas de incubación. Éstos se desarrollan normalmente hasta el día 12 cuando se observa una disminución en el peso de la glándula adrenal, alcanzándose una diferencia estadística por el día 15 de incubación (Case, 1952). Asimismo, en los embriones hipofisectomizados la actividad mitótica de las células corticales es baja por el día 8, alcanzándose un pico entre los días 12-14 cuando ocurre el cese de las mitosis en embriones normales (Girouard y Hall, 1973). El crecimiento de la glándula adrenal en embriones anencéfalos no desaparece, pero es significativamente menor, aunado a ello se observa un retardo en la citodiferenciación de los elementos corticales de estos animales (Straznický, et al., 1966).

Por otro lado, glucocorticoides potentes, tales como la prednisolona y la dexametasona pueden inducir retroalimentación negativa en la secreción de ACTH, con la consecuente atrofia de la glándula adrenal, además de alteraciones ultraestructurales en las células corticales de la misma (Kovács, 1974). También, el tratamiento con dexametasona resulta en la atrofia adrenal en los días 14 y 16 del desarrollo, lo que sugiere que la adenohipófisis embrionaria es capaz de responder tanto a glucocorticoides exógenos como endógenos (Kalliecharan y Buffett, 1982). Por lo tanto, existe una fase autónoma de desarrollo de la glándula adrenal que se extiende hasta el día 14, cuando la secreción de glucocorticoides no depende del control hipotálamo-hipofisiario. Sin embargo, el subsecuente aumento que se observa en la producción de glucocorticoides en condiciones normales es dependiente de la actividad funcional de la hipófisis y/o del hipotálamo. De tal forma que, las concentraciones de glucocorticoides aumentan durante la segunda mitad del desarrollo embrionario (Ringer, 1976). En el embrión de pollo, dichas concentraciones presentan dos picos diferentes, el primero, aproximadamente en el día 17 y el segundo inmediatamente antes del nacimiento .

La producción de esteroides por la glándula adrenal embrionaria es peculiar ya que el primer pico contiene tanto cortisol como corticosterona (Kalliecharan y Hall, 1974). Más tarde la glándula adrenal secreta predominantemente corticosterona (Nakamura, et al. 1978; Carsia, et al. 1987), debido a un incremento en la actividad de la 21-hidroxilasa durante el desarrollo embrionario tardío.

Por el día 14.5 de incubación, la secreción de adrenocorticoides aumenta independientemente de si el embrión está intacto o ha sido hipofisectomizado (Woods, et al. 1971). Esto probablemente refleja un aumento del número de células corticales. Después de la hipofisectomía este incremento en el número de células

corticales se atenúa pero no se evita. Así, el aumento en la concentración de glucocorticoides después del día 14.5 es parcialmente independiente de la hipófisis. Hacia el día 15 de incubación la ACTH puede estimular la producción de cortisol, corticosterona y cortisona (Kalliecharan y Hall, 1977). El aumento de corticosterona en plasma antes del nacimiento ocurre porque las células adrenales responden a la ACTH (Carsia, et al. 1987).

Lo anterior sugiere que el crecimiento de la glándula adrenal se hace dependiente de la hipófisis alrededor de los días 14.5 y 16 cuando el contenido de colesterol es bajo en este tejido (Case, 1952; Adjovi, 1970). La hipofisectomía evita el aumento de la concentración de corticosteroides en plasma lo que normalmente ocurre durante este período (Wise y Frye 1973; Kalliecharan y Hall, 1974).

Puntualizando tenemos que:

i) Durante el desarrollo del embrión de pollo la función de la glándula adrenal es controlada en tres niveles, la glándula adrenal por sí misma, la hipófisis y el hipotálamo.

ii) La glándula adrenal es capaz de secretar glucocorticoides en forma autónoma. Esta autonomía es revelada por la persistencia de un nivel significativo de corticosterona después de la hipofisectomía por decapitación.

iii) El control de la hipófisis sobre la actividad secretora de la glándula adrenal embrionaria se observa después del día 14. La hipófisis se hace necesaria para el aumento progresivo de la concentración de corticosterona en el plasma. lo que ocurre normalmente después del día 14 de incubación.

iiii) La regulación hipotalámica sobre la actividad adrenal se hace evidente entre los días 14 y 16. El hipotálamo parece que no tiene influencia sobre los niveles basales de corticosterona, pero sí es necesario para responder al "stress".

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal es funcional aproximadamente en el día 15, tres días después del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, pero sólo un día después del hipotálamo-hipófisis-gónadas (Romanoff, 1960).

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA HORMONA ADRENOCORTICOTROPICA

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) mantiene la actividad secretora normal de las células corticales uniéndose con los receptores membranales específicos en las células adrenocorticales. Luego de la unión de la ACTH al receptor se produce la estimulación de la enzima adenilato ciclasa, que convierte al ATP en AMP cíclico (adenosina-3',5'-monofosfato cíclico). El AMPc activa la proteína cinasa A que posee dos subunidades, una catalítica y otra reguladora, siendo la segunda inhibitoria de la primera. Luego del acoplamiento del AMPc con la subunidad reguladora, la subunidad catalítica queda activada y ejerce dos funciones. Por un lado, viaja a las gotas lipídicas del citoplasma que son depósitos de colesterol esterificado, y allí activa a la colesterol esterasa, enzima que convierte al colesterol esterificado en libre. La otra función de la subunidad catalítica de la proteína cinasa A es viajar a los ribosomas citoplasmáticos, donde estimula la fosforilación de proteínas ribosomales que promueven a su vez la elaboración de una proteína que actúa como transportador del colesterol libre a la mitocondria. La consecuencia final del aumento en la concentración de AMPc en las células corticales de la adrenal es la biosíntesis de pregnenolona formada a partir del colesterol. Una vez que la pregnenolona ha sido formada los pasos subsecuentes en la ruta biosintética de los glucocorticoides pueden proseguir sin la participación de la ACTH (fig. 4) (DeNicola y Lantos, 1980).

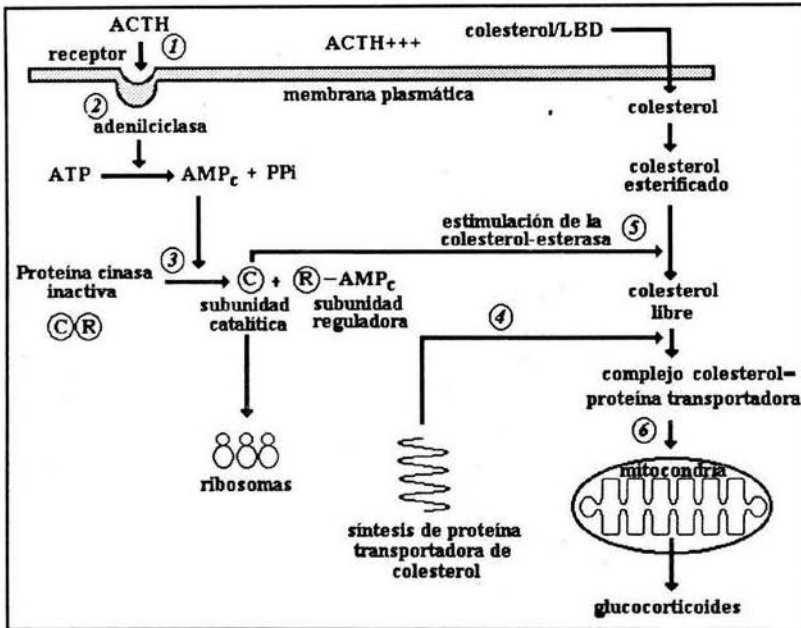


Fig. 4. Mecanismo de acción de la ACTH. Luego de la unión (1), se activa la adenilciclase (2), la que produce AMPc a partir de ATP. El AMPc activa a la proteína cinasa, separando la subunidad reguladora de la catalítica (3). La subunidad catalítica por un lado estimula la síntesis ribosómica de una proteína transportadora de colesterol (4), y por otro estimula la colesterol-esterasa que hidroliza el colesterol esterificado de las gotas lipídicas (5). el complejo colesterol libre con la proteína transportadora se introduce en la mitocondria donde se inicia su conversión a esteroides (6).

Los efectos de la ACTH en la esteroidogénesis adrenal no se limitan solamente a un paso en la vía sintética. Además la ACTH mejora el almacenamiento de colesterol, ya que promueve la captación de lipoproteínas de baja densidad las cuales son ricas en colesterol; también activa, como se mencionó arriba, una esterasa que libera colesterol del reservorio intracelular. Esta acción hace que el colesterol libre esté disponible para ingresar a la secuencia biosintética. Ya sea de manera directa o indirecta, la ACTH aumenta el flujo sanguíneo a la adrenal, proporcionando de esta manera el oxígeno necesario y los elementos metabólicos; a

su vez aumenta la capacidad de liberar las hormonas recién sintetizadas a la circulación general (Goodman, 1994)

FUNCIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL

Los glucocorticoides son el producto final del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. La secreción de estos esteroides por parte de la glándula adrenal se encuentra bajo la regulación de la unidad hipotálamo-hipófisis. En condiciones normales dicho eje está bajo el dominio de péptidos secretados por las neuronas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo (Meaney, et al., 1993). El más notable de estos péptidos es el factor liberador de corticotropina (CRF), que se caracteriza por ser un potente estimulador de la secreción adenohipofisaria de ACTH (Vale, et al., 1981). El CRF es sintetizado en el hipotálamo (Merchenthaler, et al., 1983) y es liberado hacia el sistema porta-hipofisario (Gibbs, 1982). Actuando vía receptores específicos (Wynn, et al., 1984;) para estimular la producción y liberación de ACTH por las células hipofisarias. La ACTH causa una estimulación tanto en la síntesis como en la secreción de glucocorticoides (Dallman, et al., 1987; Jones, et al., 1982), y éstos a su vez ejercen efectos de retroalimentación negativa tanto en el hipotálamo como en la hipófisis. Estos efectos están mediados por receptores a glucocorticoides (Gustafsson, et al., 1987).

EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LOS TEJIDOS DEL EMBRIÓN

El desarrollo funcional de los cordones corticales de la glándula adrenal en el embrión de pollo es de interés desde varios puntos de vista: (1) Los corticosteroides producidos son reguladores fisiológicos del balance iónico y del agua, del mismo modo juegan un papel importante en el metabolismo de proteínas, lípidos y

carbohidratos; (2) Tienen efectos específicos sobre el crecimiento corporal; (3) Son relevantes para la diferenciación funcional y estructural de la mayoría de las poblaciones celulares de varios órganos durante la ontogénesis y además el modo de acción en un tejido difiere de otros (Bellairs, 1960).

El tratamiento temprano con glucocorticoides produce un amplio espectro de efectos sobre el crecimiento general del embrión y el feto y sobre el proceso de crecimiento de varios órganos del individuo en desarrollo. El individuo tolera el tratamiento con cortisona o cortisol y esta tolerancia aumenta con la edad embrionaria. Así, dosis de 2 mg de cortisona o 1.25 mg de cortisol, administrada en la membrana coriónica, causa una mortalidad elevada en embriones de pollo durante los primeros estadios de su desarrollo; en el caso del cortisol alcanza casi el 100% durante los siguientes 5 días, cuando este es administrado en los días 8 y 9 del desarrollo embrionario (Pantic y Pauloeie, et al., 1970). La cortisona causa malformaciones relacionadas con el tejido mesodermal y en especial caudo-mesodermal (Goel y Furand, 1976). De tal forma que la acción de los glucocorticoides sobre el desarrollo se manifiesta de dos diferentes maneras dependiendo de la etapa del desarrollo del embrión: I) Si la administración es dentro de los días 3-5 del desarrollo embrionario, las alteraciones se caracterizan por el acortamiento del cuerpo y malformaciones de los huesos. II) Si se administran entre los días 6-10, se presentan entonces pérdida de peso corporal y malformaciones menores (Frantisék, 1983).

El tejido conectivo es alterado por el tratamiento con cortisol, reduciéndose el número de fibroblastos y el tamaño de los mismos junto, con una disminución del material fibrilar (Pantic y Pauloeie, 1970). También se altera la síntesis de colágeno en embriones de pollo pretratados con glucocorticoides, los que presentan una disminución de los ARNm de proalfa-1(I) y proalfa-2(I) (Oikarinen y Ryhanen,

1984). La dexametasona reduce específicamente la cantidad de ARNm de procolágeno tipo I en la piel de embriones de pollo (Stering, et al. 1983). El cartilago también es afectado, inhibiéndose la división celular, las células cartilaginosas permanecen pequeñas, y como consecuencia el proceso de osificación se retarda. El cortisol altera la síntesis de sulfato de condroitina en el hueso la cortisona, a diferencia del cortisol, provoca un efecto menos pronunciado (Murota, et al., 1969).

En el músculo, la cortisona induce citodiferenciación. El tratamiento con cortisol disminuye el peso de músculo esquelético del embrión e induce cambios histológicos como pérdida del núcleo y desorganización de las miofibrillas (Bellamy y Leonard, 1965). Asimismo, en el epitelio del tracto respiratorio el cortisol causa un adelgazamiento de la capa epitelial (Pantic y Pauloeie, 1970)

También los glucocorticoides pueden inducir prematuramente la diferenciación del intestino delgado y la retina neural en el embrión de pollo, tanto *in ovo* como *in vitro*.

La inyección de cortisona o hidrocortisona *in ovo* produce una acumulación de la enzima fosfatasa alcalina en la células duodenales. Además la hidrocortisona aceleró la acumulación de dicha enzima en fragmentos de duodeno de embriones de 16 días *in vitro*. En el desarrollo normal del embrión de pollo, la fosfatasa alcalina aumenta abruptamente durante el período comprendido entre el día 17 y el nacimiento (Moog y Kairsch, 1959).

En cuanto al tejido nervioso, dosis altas de cortisol en el cerebro en desarrollo producen retardo de la citodiferenciación de neuroblastos y glioblastos (Pantic y Pauloeie, 1970). Sin embargo, dosis bajas tienen un efecto estimulador en la

diferenciación del cerebro en desarrollo y sobre el proceso de mielinización (Granich y Timiras, 1971). En el caso de la retina neural, la enzima glutamina-sintetasa, la cual cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio, es considerada como un marcador del desarrollo de esta en el embrión de pollo. La actividad de esta enzima fue inducida prematuramente por la adicción de hidrocortisona en cultivos de retina neural de embriones de pollo de 12 días de incubación; resultados similares se obtuvieron inyectando hidrocortisona a embriones de 14 días de incubación (Moscona, et al. 1966); la inducción de la glutamina-sintetasa involucra la síntesis de su ARNm. En el desarrollo embrionario normal del embrión de pollo la actividad de dicha enzima aumenta rápidamente después del día 16 de incubación (Piddington, 1967).

El papel regulador de los glucocorticoides sobre la actividad celular del sistema nervioso depende de que se haya completado la fase principal de proliferación. Ésta se caracteriza por el inicio de la diferenciación celular y la maduración funcional de las regiones que serán afectadas por dichas hormonas. Este proceso coincide con la aparición de células sensibles a hormonas en los tejidos blanco y es seguida por un incremento en la actividad de muchas enzimas relacionadas con la potencia metabólica de las células en las estructuras en desarrollo. Esta inducción enzimática se debe a un incremento en el número de moléculas de la enzima específica, ya sea con un aumento en la velocidad de síntesis o un decremento en la velocidad de degradación.

RECEPTORES PARA GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides son moléculas hidrofóbicas, que una vez liberadas de su proteína acarreadora (CBG), pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática de las células blanco y unirse a macromoléculas receptoras de alta afinidad.

Los receptores a glucocorticoides pertenecen a una superfamilia de proteínas reguladoras de genes que funcionan como transductores de señales y como factores de transcripción (Evans, 1988; Hassler, 1986), que incluye también los receptores a progestágenos, andrógenos, estrógenos, mineralocorticoides, vitamina D3 y ácido retinóico, y al parecer pueden actuar por un mismo mecanismo (Petkovic, et al., 1987).

En ausencia de los ligandos específicos, los receptores a glucocorticoides son inactivos *in vivo*. Al unirse la hormona al receptor, éste rápidamente manifiesta un cambio del estado inactivo al activo, este proceso ha sido referido como *activación* (Walters, 1985). Antes de la activación, los receptores a glucocorticoides forman complejos transitorios con *proteínas de choque térmico* (hsp), como por ejemplo las hsp 90, hsp 70 (Baulieu, 1987) y la hsp 56 (Sánchez, 1990). La función de estas proteínas no ha sido completamente elucidada, pero existen evidencias que sugieren que dichas proteínas le confieren estabilidad al receptor, este complejo receptor-hsp es incapaz de unirse al ADN (Gustafsson, et al. 1987). La unión de la hormona al receptor inicialmente da como resultado un complejo hormona-receptor inactivo. Bajo condiciones fisiológicas, este complejo inmediatamente inicia su activación, proceso que involucra cambios conformacionales acompañados de la disociación de todas las hsp y la exposición del sitio de unión al ADN en el receptor. La activación es un proceso termodinámicamente irreversible (Carson-Jurica et al., 1990; O'Malley y Tsai, 1992).

El complejo hormona-receptor reside en el núcleo celular, esto ha sido demostrado inmunocitoquímicamente (Walters, 1985). En contraste, la localización de los receptores desocupados, ya sea nuclear o citoplasmática, no está clara.

Después de la activación, el complejo glucocorticoide-receptor se transloca al núcleo a través de la envoltura nuclear y se une a la cromatina, modulando la transcripción de genes específicos (Ringold, 1985; Rosusseau, 1984; Yamamoto, 1985). Los receptores a glucocorticoides son responsables de la transducción de información que estas hormonas llevan al sistema nervioso central. Después de la unión del ligando apropiado el complejo hormona-receptor actúa como factor de transcripción en el núcleo, uniéndose como homodímeros a los elementos de respuesta a glucocorticoides en las secuencias promotoras de los genes blanco. Dependiendo de la naturaleza de la secuencia del ADN al cual se une en complejo o a la interacción con otros factores de transcripción el complejo hormona-receptor puede actuar, ya sea, positiva o negativamente, en la regulación de la expresión genética. El complejo activado se une preferentemente a ciertas secuencias del ADN, las cuales son conocidas como *elementos de respuesta a glucocorticoides* (GRES), esta unión es requerida para los efectos transcripcionales de los glucocorticoides (Burstein y Cidilowski, 1989) (fig. 5)

Las proteínas receptoras poseen una estructura, que consta de tres regiones: 1) el sitio de unión del ligando de alta afinidad, 2) el sitio de unión al ADN y 3) el sitio modulador de la transcripción (Gustafsson, et al. 1987).

Los glucocorticoides auto-regulan los niveles de sus propios receptores. Esta auto-regulación es reflejada de dos maneras: a) Se presenta un descenso de los niveles de unión de la hormona (Cidilowski y Cidilowski, 1981) y b) Existe una disminución de los niveles de su ARNm (Kalinyak, et al. 1987), lo cual tal vez se deba a una reducida transcripción del gene que codifica para el receptor a glucocorticoides.

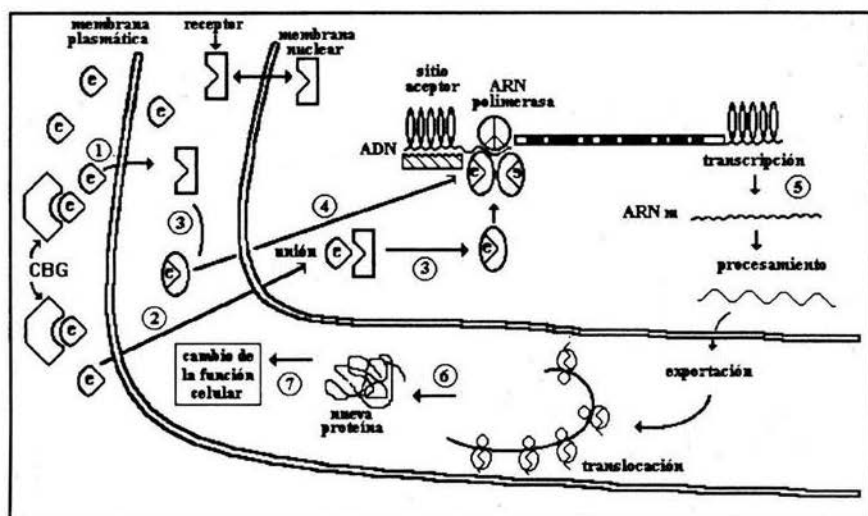


Fig. 5. Representación esquemática del mecanismo de acción de los glucocorticoides. (1) Difusión; (2) Unión del esteroide (e) al receptor; (3) Activación del receptor; (4) Translocación al núcleo del complejo esteroide-receptor activado; (5) Transcripción; (6) Síntesis de una nueva proteína y (7) Modificación de la función celular.

ANTECEDENTES

Los procesos de citodiferenciación y maduración de las poblaciones celulares durante el desarrollo son promovidos por hormonas, destacando entre ellos los glucocorticoides y las hormonas tiroideas (Sugimoto, et al., 1976).

Gran parte de las regiones del cerebro, especialmente aquéllas que aparecen de manera temprana en el desarrollo, son afectadas en diferente grado por el medio hormonal característico de este período. Las alteraciones dependen del estado de diferenciación en el que se hallen las células sensibles a dichas hormonas (Franstisek, 1983).

Los glucocorticoides controlan numerosos procesos del desarrollo cerebral en el embrión de pollo, tales como la proliferación celular, el crecimiento dendrítico y la mielinización axonal (Woodbury, 1972). Estudios en células en cultivo, han demostrado que los glucocorticoides inducen la síntesis de sistemas enzimáticos involucrados en la diferenciación de células gliales y neuronales. Como se mencionó anteriormente, en la retina inducen la glutamina sintetasa y la glicerol esteroide deshidrogenasa (Meyer, 1985).

Se ha reportado la presencia de receptores a glucocorticoides en diferentes tejidos del embrión de pollo. Wiggert y Chadre (1975) mostraron que existe un sitio de alta afinidad que une dexametasona en el tectum óptico en embriones de 15 días de incubación; en este mismo estadio del desarrollo, Ben-Or y Chrambach (1981) demostraron la presencia de un sistema de alta afinidad que une glucocorticoides en la retina neural. Por su parte, Koheler y Moscona (1975) detectaron receptores a glucocorticoides en la retina neural y el cerebelo, en diferentes estadios del desarrollo embrionario, desde el día 8 hasta el 18. Recientemente Oikarinen (1987) trabajando con embriones entre 12 y 20 días localizó receptores a glucocorticoides en el riñón, el cartilago y el hígado. En todos los trabajos anteriores se utilizaron fracciones citosólicas del tejido estudiado. Cuando se detectaron receptores para glucocorticoides en el cerebro, se partió de un homogenado del cerebro en su totalidad. Debido a la gran heterogeneidad de las poblaciones neuronales y gliales que existen en el cerebro y a la utilización de este tipo de metodología, no fue

posible la detección de dichos receptores en regiones específicas de este órgano durante el desarrollo y no se pudo tener una visión clara con respecto a que tipo(s) celular(es) son los que poseen tales receptores para glucocorticoides.

Resultados previos de Romano y colaboradores sugieren que los glucocorticoides desempeñan un papel en el desarrollo de las células neurales en cultivo. Estos autores mostraron que la corticosterona y prednisona tienen un efecto positivo sobre el desarrollo del potencial de membrana en células neuronales del telencéfalo de embrión de pollo en cultivo (Romano, et al. 1985). Asimismo, se ha reportado que una dosis de corticosterona adicionada al medio de cultivo de células neuronales inmaduras de embrión de pollo acelera la aparición de la permeabilidad al potasio y de los parámetros bioeléctricos característicos de estas células. (Fuentes-Pardo, et al., 1990).

Es evidente que los glucocorticoides ejercen efectos sobre las neuronas en cultivo provenientes del telencéfalo del embrión de pollo; sin embargo, el mecanismo por el cual dichos esteroides actúan no es bien conocido. De ahí la necesidad de estudiar si este tipo de neuronas poseen receptores para glucocorticoides, que tal vez estuvieran relacionados con los efectos descritos anteriormente.

O B J E T I V O S

Objetivo general: Estudiar los receptores a glucocorticoides en cultivos enriquecidos en neuronas obtenidos del telencéfalo de embrión de pollo de 8 días.

Objetivos específicos: 1) Identificar la presencia de receptores específicos para glucocorticoides en una población enriquecida en neuronas obtenidas del

telencéfalo de embrión de pollo. 2) Caracterización del receptor a glucocorticoides en cuanto a número y afinidad. 3) Estudiar la especificidad del receptor para glucocorticoides por medio de estudios de competencia y desplazamiento de esta hormona por otros esteroides.

M E T O D O L O G I A

Cultivo primario enriquecido en células neuronales

Se emplearon 9-12 embriones de pollo de 8 días, adquiridos en la granja experimental de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los embriones se mantuvieron a 39°C y con una humedad relativa del 95%.

En condiciones de asepsia se perforó el cascarón en la parte donde se localiza el saco de aire, se extrajo el embrión el cual se colocó en una solución salina isotónica estéril libre de calcio y magnesio. Los embriones fueron decapitados y las cabezas transferidas a otra caja de Petri que contenía la misma solución. Posteriormente, con la ayuda de un microscopio estereoscópico se retiraron las membranas meninges, obteniéndose de esta forma los cuatro lóbulos cerebrales.

A continuación los telencéfalos se separaron y colocaron en una solución de tripsina al 0.025% en solución salina isotónica estéril libre de calcio y magnesio. Inmediatamente después se incubaron a 37°C con agitación suave (2 ciclos por seg) en baño María durante 15 minutos. Al cabo de este lapso se retiró la tripsina por decantación y se agregaron 2 ml de medio completo Eagle (medio Eagle más 15% suero bovino fetal (BSF) y glucosa al 22.20 mM) La disociación se continuó mecánicamente, mediante pasos repetidos por una pipeta Pasteur. Una vez lograda

la disociación de las células se añadió Eagle completo a razón de 1 ml por embrión (2 telencéfalos) y posteriormente se filtró dicha suspensión celular a través de una malla de nylon con diámetro de poro de 50 μm con el propósito de eliminar los agregados celulares. De esta suspensión se sembraron 2 millones de células/ml en cada caja de Petri a la que se había agregado previamente 2 ml de medio de cultivo completo. Las cajas de cultivo fueron pretratadas con poli-l-lisina (1 mg/100 ml de agua des-ionizada).

Las células se mantuvieron en cultivo con una atmósfera que contenía 95% de aire y 4% de CO_2 , con una humedad relativa del 96%, a 37°C.

Dos días después, se procedió al cambio del medio de cultivo y, tras 5 días de incubación de las células se realizaron los experimentos para la detección de receptores a glucocorticoides.

Caracterización de los receptores a ^3H -dexametasona y ^3H -corticosterona.

En todos los experimentos donde se investigaron los receptores para ^3H -dexametasona y ^3H -corticosterona, las cajas de cultivo se lavaron tres veces con Eagle MEM tibio (HEPES 25 mM, pH 7.4) antes de comenzar el experimento. A continuación las células se incubaron durante 40 y 90 minutos con ^3H -dexametasona (1.56 nM) y 40 minutos para corticosterona (10^{-9} M) a 37°C en baño María, con agitación suave. Al término de este período las cajas se lavaron 5 veces con PBS escurriendo perfectamente entre cada lavado. Posteriormente se agregó tripsina en solución libre de Ca^{++} y Mg^{++} (al 0.25%) y se incubaron nuevamente por 15 minutos; para levantar la monocapa celular. Al finalizar esta incubación se recogió todo el contenido de las cajas y se colocaron de manera individual en un vial agregándose líquido de centelleo. Se procedió entonces a cuantificar la

radiactividad utilizando un contador para emisiones beta con una eficiencia del 50%.

Detección de receptores a dexametasona y corticosterona

En esta primera serie de experimentos el protocolo a seguir fue el siguiente: Se formaron dos grupos experimentales designados como no competido (NC) y competido (C). El primero le fue agragado solamente ^3H -dexametasona (^3H -Dex) y es considerada como unión total (UT). En tanto que el segundo grupo, además de ^3H -Dex, recibió dexametasona no radiactiva al mismo tiempo a una concentración 1000 veces mayor que la de ^3H -Dex, este grupo representa la unión no especifica (UNE). Substrayendo el valor de la UNE al valor de la UT se obtiene la unión especifica (UE), que representa la unión del ligando a posibles moléculas receptoras.

CURVA TEMPORAL DE LA UNIÓN AL RECEPTOR PARA ^3H -DEXAMETASONA

Con la serie anterior de experimentos se determinó la existencia de un sistema capaz de unir con alta afinidad a la ^3H -Dex lo que nos permitió suponer que se trata de receptores específicos para esta hormona.

El siguiente paso era conocer el tiempo en el cual el ligando alcanzaba el equilibrio con el sitio de unión (receptor). Por lo tanto se realizó una curva temporal: Se formaron 2 grupos experimentales el NC y C, los cuales fueron incubados en baño María a 37°C con agitación suave por diferentes períodos 5, 20, 40, 60 y 90 minutos. Al término de cada período se retiraron las cajas de cultivo y se procedió a

lavarlas 5 veces con PBS y se les agregó tripsina en solución libre de Ca^{++} y Mg^{++} (al 0.25%), incubándose nuevamente por 15 minutos. Finalizando dicha incubación se recogió la monocapa celular y se contó la radiactividad, como se mencionó anteriormente.

EVALUACIÓN DE LOS RECEPTORES A DEXAMETASONA

EXPERIMENTOS DE DESPLAZAMIENTO COMPETITIVO

Una vez conocido el tiempo en el cual el ligando alcanza el equilibrio con el sistema receptor se realizaron experimentos de desplazamiento competitivo.

Se establecieron varios grupos competidos, en cada uno de ellos se utilizó una concentración diferente de dexametasona no radiactiva, en un rango de 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M, manteniéndose fija la concentración de la $^3\text{H-Dex}$ (1.76 nM). De estos experimentos se obtuvieron curvas de desplazamiento competitivo, que se construyen graficando en las ordenadas la cuentas por minuto unidas (cpm) versus el logaritmo de la concentración de la hormona no radiactiva.

CURVA DE SATURACIÓN DEL RECEPTOR

A $^3\text{H-DEXAMETASONA}$

En esta serie de experimentos se emplearon diferentes concentraciones de $^3\text{H-Dex}$ desde 0.60 hasta 6.25 nM manteniendo fija la concentración de dexametasona no radiactiva. Estas curvas se sometieron al análisis de Scatchard el cual nos permite conocer los parámetros, constante de afinidad (K_a) y constante de disociación (K_d), y la máxima capacidad de unión (mcu).

ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL RECEPTOR

Al contrario de los experimentos de desplazamiento competitivo en los cuales el ligando que competía por el sitio de unión era la dexametasona o la corticosterona, en esta serie de experimentos el ligando que compitió por el receptor fue un esteroide diferente al radiactivo: dexametasona, corticosterona o aldosterona según el caso. La concentración de estos esteroides se mantuvo fija al igual que la concentración de la $^3\text{H-Dex}$. Del resultado de estas curvas se obtuvo información que permitió saber si el receptor reconoce otras hormonas, de la misma familia, y que tanto estas fueron capaces de desplazar a la hormona homóloga.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

El método de Lowry se utilizó para determinar el contenido de proteínas totales en los cultivos enriquecidos en células neuronales. Brevemente, una serie de cajas (6 por experimento) se lavaron y se incubaron de igual manera que los grupos experimentales, con la excepción de que a éstas cajas no se les adicionó ningún tipo de hormona. Al término del experimento las cajas destinadas para medir la cantidad de proteínas fueron lavadas con buffer de fosfatos (pH 7.4) 3 veces. Se escurrieron perfectamente y se les agregó 800 μl de Hidróxido de Sodio 0.5 M, con el objeto de desprender la monocapa. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta la determinación de proteínas. Utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR

Los cultivos se realizaron sobre cubreobjetos 22x22mm pre tratados con poli-lisina (1mg/100ml de agua desionizada). Después de tres días de cultivo se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4%. A continuación se lavaron con PBS-tritón 0.2% (PBSt), para permeabilizar las células. Se bloquea la unión inespecífica con albúmina al 0.5%. Se lavaron con PBSt por 20 minutos y se pusieron en contacto con el primer anticuerpo IgG anti GFAP (proteína ácida fibrilar glial) en una dilución 1:400. Se incubaron toda la noche a 4°C. Se lavaron con PBSt 3 veces. Entonces se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con fluoriseina (FITC) alfa-IgG con una dilución 1:60 por 60 minutos a temperatura ambiente. Se lavan con PBSt. Se hace una contratinción con iodura de propidio para la visualización de los núcleos y se montan. se observan en una microscopio confocal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos estan expresados como la media \pm EEM. La significancia estadística fue evaluada usando la prueba T Student para observaciones no pariadas. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas a un valor de p mayor al 0.05.

RESULTADOS

Caracterización del cultivo enriquecido en células neuronales

Empleando de 18-24 telencéfalos de embrión de pollo de 8 días cultivados por 5 días bajo las condiciones descritas en la metodología, se obtienen células que son principalmente neuronas (fig., 6). La observación al microscopio de contraste de fases reveló la presencia de numerosas células con abundantes procesos (ramificaciones). Estos conectan tanto a las células individuales entre sí como a los agregados la gran mayoría de estos procesos se marcan con el anticuerpo antisinaptofisina. La presencia en el cultivo de células gliales utilizando una técnica que detecta la proteína fibrilar acida en la glia (GFAP) fue menor al 20 %.

DETECCIÓN DE LOS RECEPTORES A ³H-DEXAMETASONA

En la figura 7 se observa que la dexametasona es capaz de unirse específicamente al sitio receptor para ³H-dexametasona. La unión total de la hormona, representada por el grupo "no competido" disminuye en presencia de la dexametasona no marcada [10^{-4} M] en un 56%, lo que indica que ésta desplazó, como se espera, a la hormona marcada.

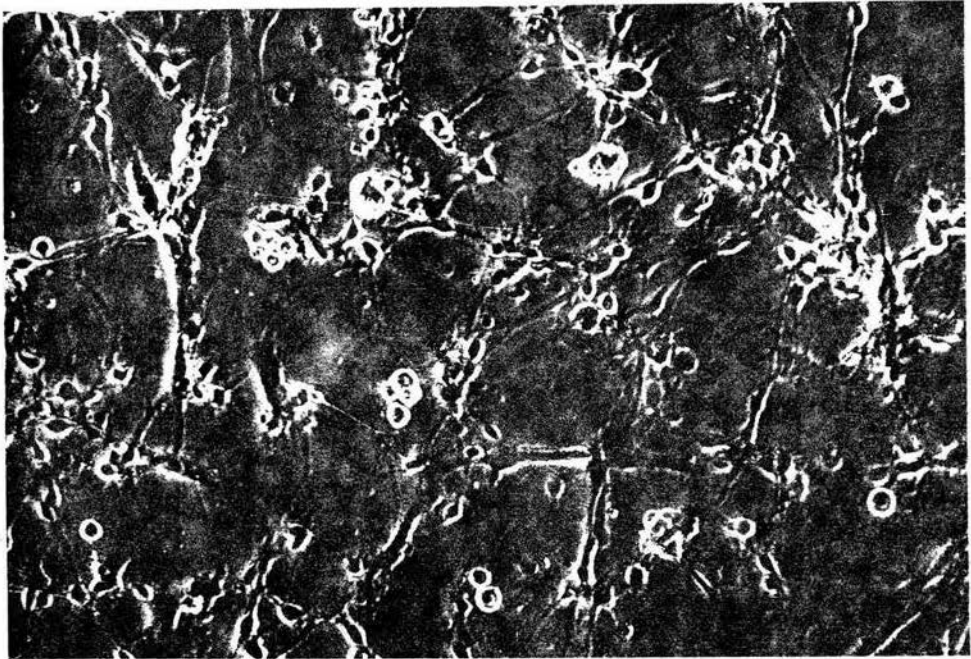


Figura 6. Fotomicrografía de un cultivo enriquecido en células neuronales de embrión de pollo (160x). *Se observa células con numerosas ramificaciones, después de 5 días en incubación. El porcentaje de células neuronales se estimó mayor al 95%. Notese la gran cantidad de intercomunicaciones (axones y/o dendritas) entre los acumulos celulares.*

CURVA TEMPORAL DE LA UNIÓN AL RECEPTOR PARA 3H-DEXAMETASONA

A temperatura ambiente la monocapa de células neurales se desprende fácilmente del sustrato. Por esta razón se eligió efectuar los estudios del receptor a glucocorticoides a 37°C. Cuando incubamos los cultivos con la ³H-dexametasona [1.56 nM] la unión específica se mantiene en una meseta a partir de los 20 hasta los

90 minutos (fig. 8). De tal forma que los experimentos realizados dentro de este lapso no presentan variaciones significativas en la unión específica.

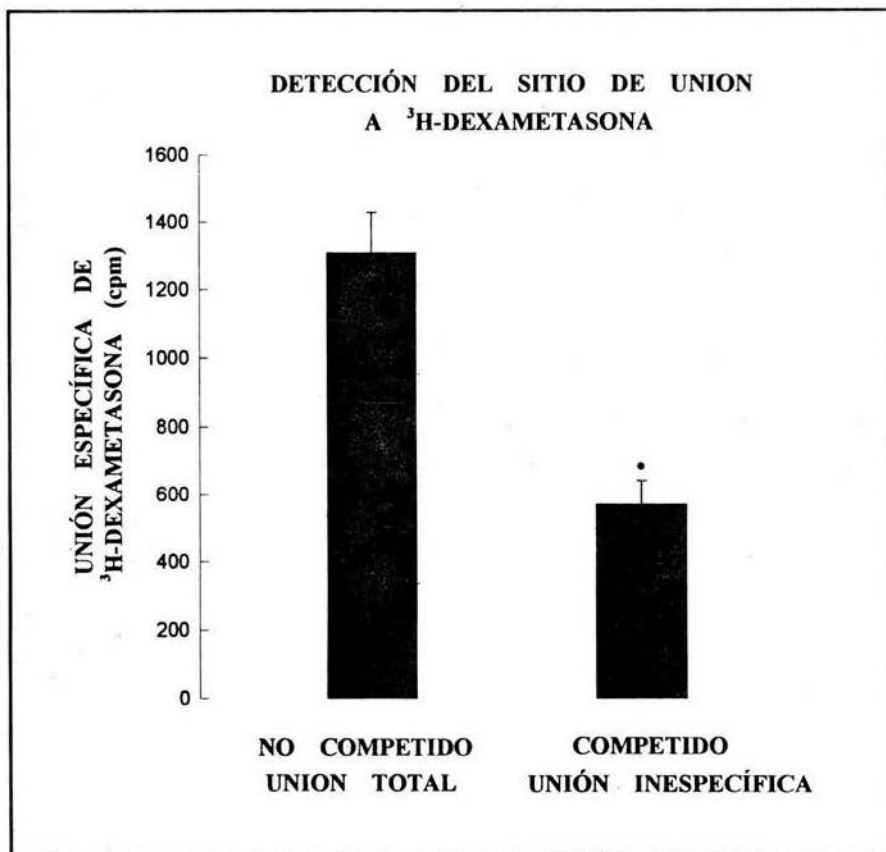


Figura 7. Detección del receptor a ³H-dexametasona. Los cultivos enriquecidos en células neuronales se incubaron con ³H-dexametasona, en tanto que a otras células se les agregó además de la dosis de ³H-dexametasona con un exceso (1000 veces) de dexametasona no radiactiva. En el grupo competido se observa que la dexametasona desplazó a la ³H-dexametasona del sitio de unión específico (receptor), este desplazamiento fue de un 56% de la unión total. Se presenta la media \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm DS$) de 4 experimentos por triplicado. (*) diferencia significativa con $p > 0.05$.

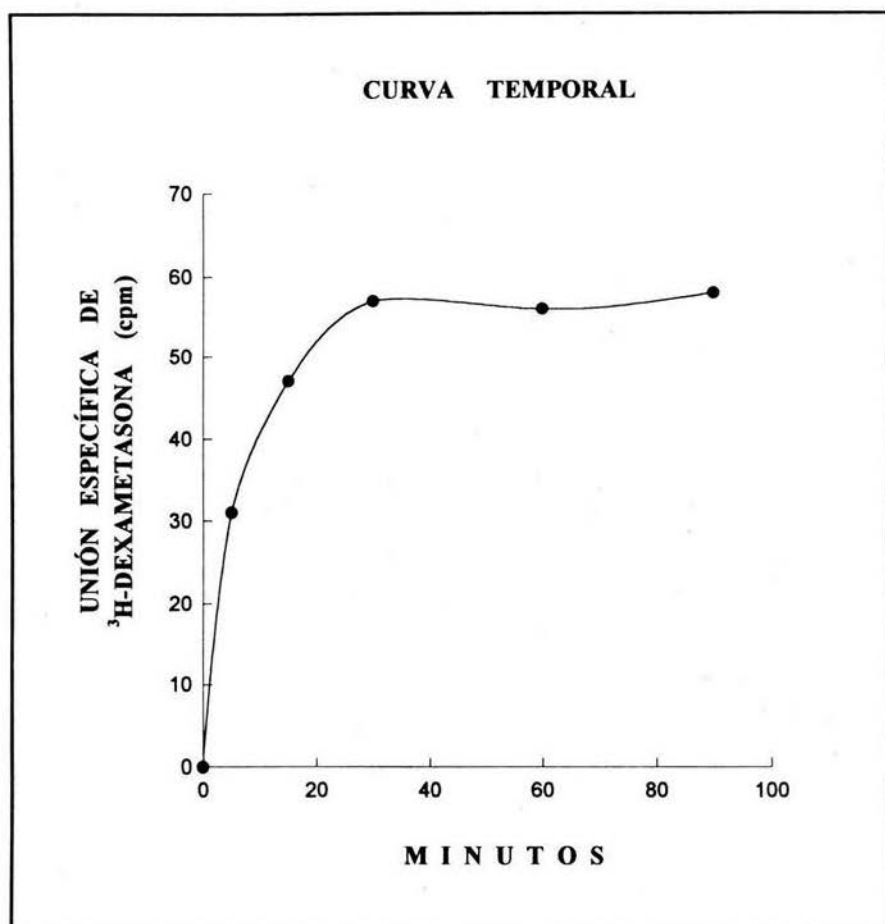


Figura 8. **Curva temporal de la unión al receptor para ³H-dexametasona.** Se muestra la unión específica de ³H-dexametasona al receptor en función del tiempo, en cultivos neuronales de embrión de pollo. La células fueron incubadas con ³H-dexametasona, con o sin dexametasona no radiactiva [10^{-4} M]. Se muestra la $X \pm DS$ de 5 experimentos por triplicado.

DESPLAZAMIENTO COMPETITIVO

La dexametasona no radiactiva reduce la unión al receptor de la ^3H -dexametasona, con un patrón dosis-dependiente. Las células fueron incubadas con ^3H -dexametasona [1.76 nM] y con concentraciones crecientes de dexametasona no radiactiva [10^{-10} hasta 10^{-4} M] (Fig. 9). El comportamiento sigue una curva del tipo sigmoidal. Este tipo de curvas son representativas, de que el ligando se está uniendo específicamente a una molécula receptora .

CURVA DE SATURACIÓN

El receptor para ^3H -dexametasona alcanza su saturación con una concentración menor a 5 nM. La adición de una mayor concentración de ^3H -dexametasona no aumentó la unión específica sugiriendo que existe una cantidad finita de receptores (fig. 10).

El análisis de Scatchard nos revela la presencia de un sola población de receptores (una clase de receptor) con alta afinidad y baja capacidad. La figura 11 muestra un análisis de Scatchard representativo.

La constante de disociación del receptor a glucocorticoides en la neuronas de embrión de pollo de 8 días fue de 7.7×10^{-10} M, mientras que la máxima capacidad de unión fue de 1.5 nM/mg de proteína, en tanto que la concentración de sitios de unión fue de 1.165 pM/mg. de proteína.

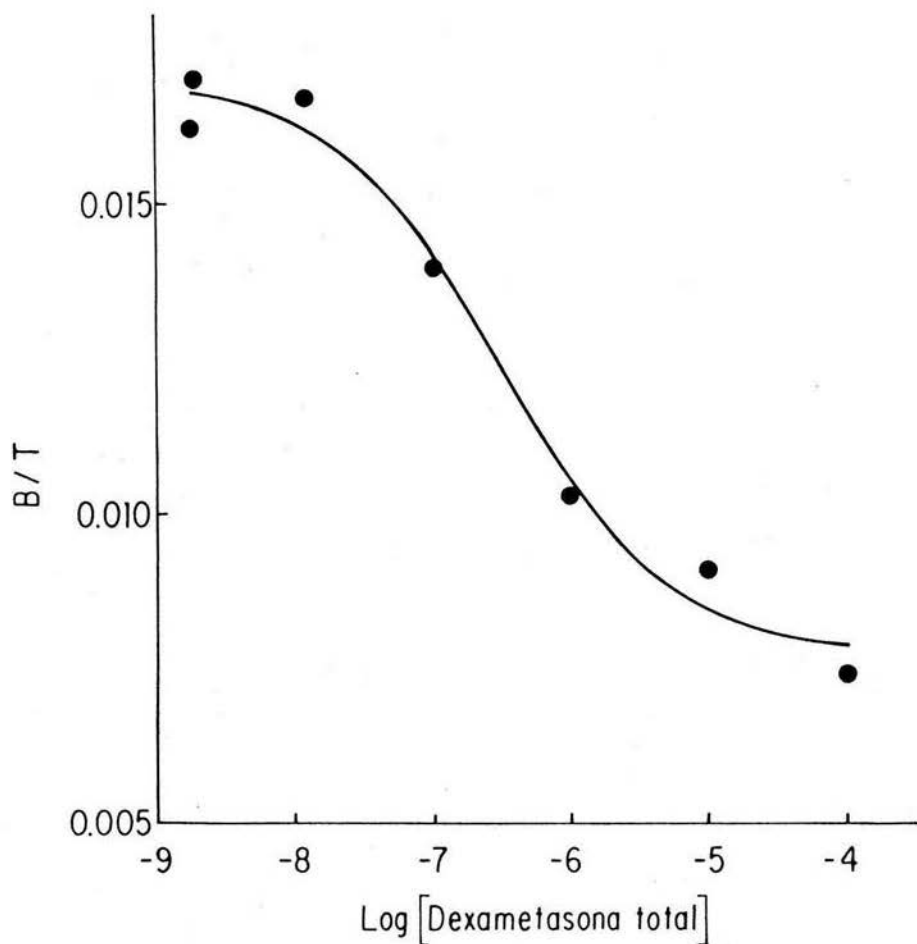


Figura 9. **Curva de desplazamiento competitivo del receptor a ^3H -dexametasona.** En cultivos neuronales de 5 días la ^3H -dexametasona [1.76 nM] es desplazada del sitio de unión específico, por concentraciones crecientes de dexametasona no radiactiva [10^{-10} a 10^{-4}]M. En la ordenada se representa la razón de la hormona unida específicamente/hormona total, (B/T) versus el logaritmo de la concentración total de hormona no marcada. Curva representativa de tres experimentos, en la que cada punto es la media de por lo menos 4 determinaciones con una DS menor al 9%.

CURVA DE SATURACION AL RECEPTOR
PARA DEXAMETASONA

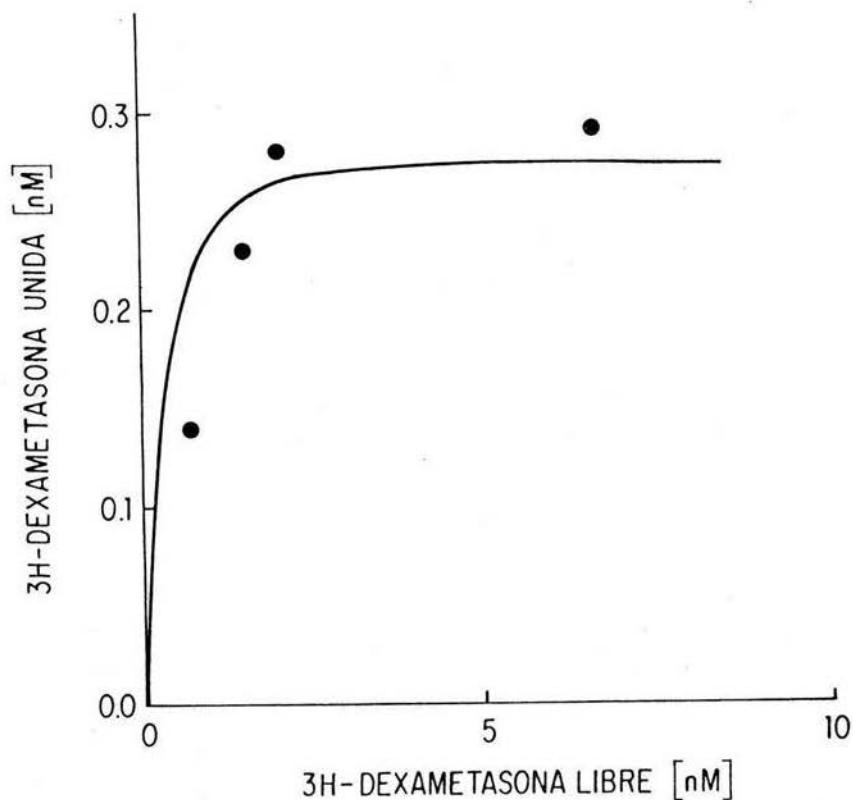


Figura 10. Curva de saturación para el sitio de unión específica a ^3H -dexametasona en neuronas en cultivo. Las células son incubadas con ^3H -dexametasona en presencia (para determinar la unión inespecífica) o en ausencia (para determinar la unión total) de un exceso 1000 veces de dexametasona no radiactiva. Concentraciones de ^3H -dexametasona en un rango de 0.60 a 6.25 nM se usaron para el análisis de saturación. La unión específica fue determinada por la diferencia aritmética de la unión inespecífica y la unión total. El experimento se realizó 3 veces por triplicado cada punto.

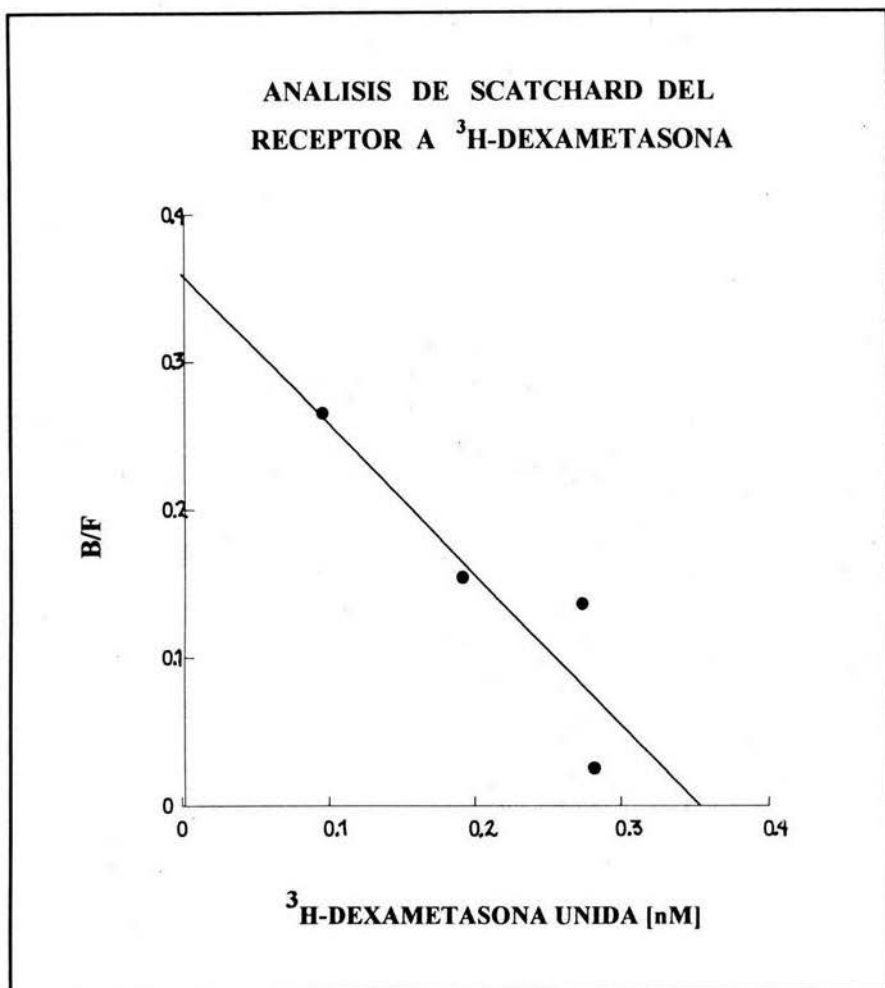


Figura 11. **Análisis de Scatchard de la unión al receptor de ³H-dexametasona en neuronas en cultivo.** Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes [0.60 a 6.25 nM] de ³H-dexametasona. Los valores de K_d y B_{max} son determinadas por regresión lineal con un coeficiente de correlación de 0.92. De este experimento el valor de K_d es de $7.7 \cdot 10^{-10}$ M y el de B_{max} 1.5 nM/mg de proteína. La concentración total de sitios de unión fue de 1.165 pM/mg de proteína. El experimento se realizó 3 veces por triplicado cada punto.

COMPETENCIA POR EL RECEPTOR A ^3H -DEXAMETASONA POR OTROS ESTEROIDES

Los resultados anteriores parecen indicar que las neuronas del embrión de pollo en cultivo poseen una sola clase de receptores para glucocorticoides.

La dexametasona es un glucocorticoide sintético que se une exclusivamente a los receptores tipo II para esteroides adrenales, con alta afinidad; no obstante es desplazada por otros esteroides del sitio de unión. Este tipo de estudio nos daría indicios de la especificidad del receptor en este estadio del desarrollo del telencéfalo del embrión de pollo.

En la figura 12 se muestra el desplazamiento del sitio aceptor para ^3H -dexametasona causado por la misma dexametasona o bien por corticosterona, que fue de un 44 y 33% respectivamente. Por el contrario la aldosterona no desplazó a la ^3H -dexametasona del receptor.

EXPERIMENTOS CON ^3H -CORTICOSTERONA

Se realizaron experimentos en los cuales el ligando fue la ^3H -corticosterona. La dexametasona fue capaz de unirse al receptor causando un desplazamiento del 39% de la unión total mientras que la corticosterona desplazó a la ^3H -corticosterona en un 45%. La aldosterona interesantemente fue capaz de desplazar al ligando marcado aunque en una menor proporción (el 29%) que la dexametasona y la corticosterona (fig. 13).

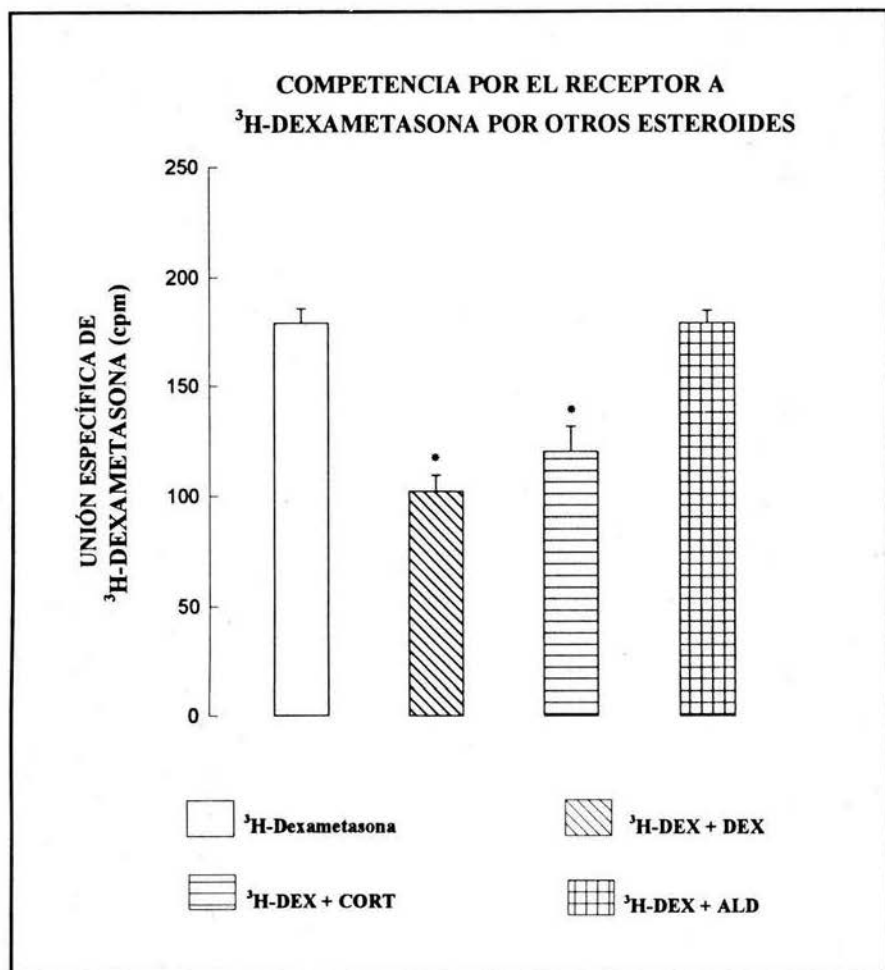


Figura 12. Competencia por el receptor para ³H-dexametasona. Los cultivos enriquecidos en células neuronales de embrión de pollo fueron incubados por 40 minutos a 37°C con una dosis de ³H-dexametasona [10^{-9} M] en el grupo no competido, asimismo se adicionó dexametasona, corticosterona y aldosterona a los grupos competidos en una concentración de [10^{-7} M]. El desplazamiento del sitio de unión para ³H-dexametasona causado por la dexametasona y la corticosterona representa el 44 y 33% respectivamente, en tanto que la aldosterona no desplazó. Los resultados mostrados son la $X \pm DS$ ($n = 11$). (*) Diferencia significativa $p > 0.05$.

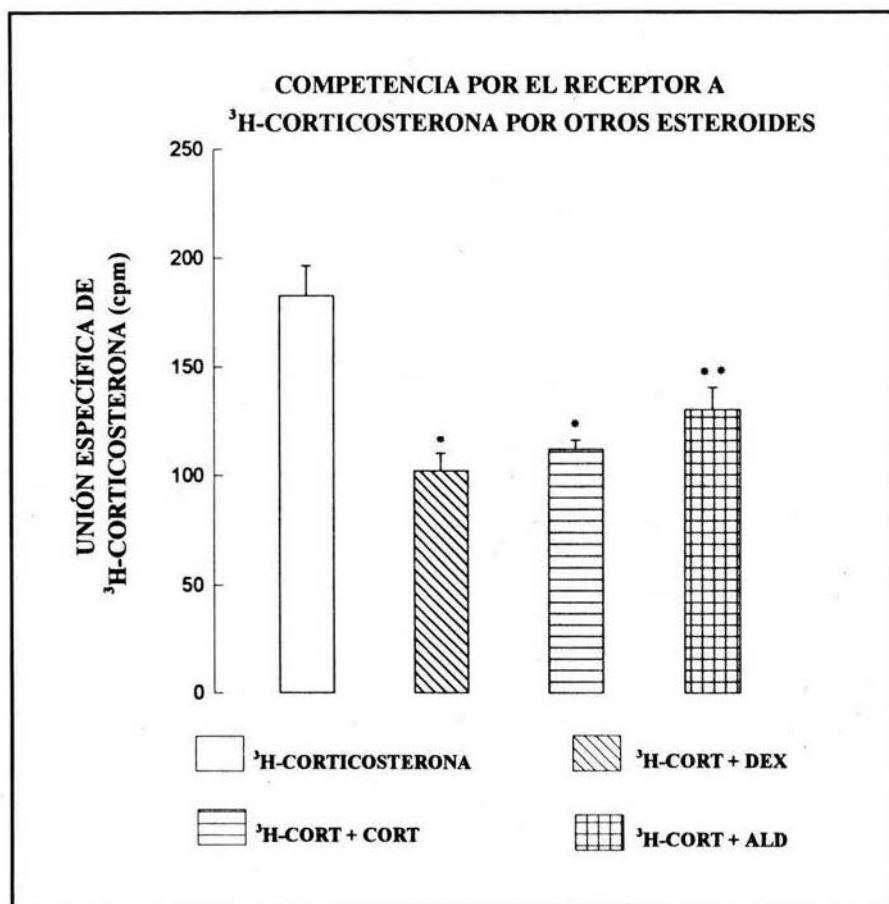


Figura 13. Competencia por el receptor para ³H-corticosterona. Los cultivos enriquecidos en células neuronales de embrión de pollo fueron incubados por 40 minutos a 37°C con una dosis de ³H-corticosterona [10⁻⁹M] en el grupo no competido; asimismo se adicionó dexametasona, corticosterona y aldosterona a los grupos competidos en una concentración de [10⁻⁷M]. El desplazamiento del sitio de unión para la ³H-corticosterona causado por la dexametasona y la corticosterona representó el 39 y 45% respectivamente, en tanto que la aldosterona desplazó un 29%. Los resultados mostrados son la X ± DS (n = 11). (*) diferencia muy significativa con p > 0.05. (**) diferencia significativa con p > 0.05.

D i s c u s i ó n

Los receptores a glucocorticoides son factores de transcripción activados por la hormona, y tienen el potencial de influir sobre la expresión genética en una gran variedad de neuronas del sistema nervioso central (Burnstein y Cidlowski, 1989). Asimismo, están amplia pero no uniformemente localizados en el sistema nervioso central y la regulación de estos receptores es compleja interviniendo los mismos glucocorticoides y los esteroides gonadales, así como neurotransmisores (Herman, 1993).

La importancia de los cambios inducidos por los glucocorticoides en la fisiología y el desarrollo embrionario del sistema nervioso central no se conocen del todo debido, en parte, a la influencia que tienen estas hormonas sobre la expresión de una amplia gama de genes. Estos hechos indican que los receptores a corticoesteroides pueden influir virtualmente sobre casi todos los aspectos funcionales, tanto de las células neuronales como de las gliales (Frantisek, 1983). Receptores a glucocorticoides han sido descrito en cultivos de neuronas de rata (Bonh y Mcewen, 1984) pero ningún análisis o caracterización se habían realizado para las euronas del telencéfalo del embrión de pollo.

En el presente estudio se utilizó una técnica de cultivo en la cual se disociaron los telencéfalos y se cultivaron las células en un medio con suero bovino fetal y con poli-l-lisina como sustrato (Sensenbrener, et al. 1978, Hanson, et al. 1982) y se obtuvieron así cultivos primarios altamente enriquecidos en neuronas, los que mostraron una abundancia de procesos celulares, posiblemente axones y/o dendritas. La tinción con un anticuerpo contra sinaptofisina comprobó que se trataba de axones y dendritas ya que se encontró esta fluorescencia en un alto porcentaje en los cultivos (95% de las células). El bajo número de células gliales fue debido en

parte, al hecho de que la gliogénesis ocurre *in vivo* después del día 8 del desarrollo embrionario y al efecto inhibitorio de la poli-l-lisina sobre el crecimiento glial (Pettman, et al. 1979). De tal forma, que la caracterización de los receptores a glucocorticoides de este estudio pertenece básicamente a células neuronales de embrión de pollo de 8 días.

En el sistema utilizado en este estudio de neuronas en cultivo se encontró que la cinética de unión de al receptor a dexametasona alcanzó el equilibrio entre los 20 y 90 minutos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Koehler y Moscona (1975) para la unión de hidrocortisona radiactiva. Estos autores observaron que el equilibrio de la unión específica de la hidrocortisona a su receptor se alcanzó entre los 20 y 60 minutos, empleando una fracción citosólica del cerebro del embrión de pollo de 12 días.

Nuestros datos de los experimentos llamados de "un punto" indican que las neuronas provenientes del telencéfalo del embrión de pollo en cultivo primario, poseen sitios de unión para glucocorticoides. El desplazamiento que sufrió la dexametasona radiactiva de dicho sitio en presencia de la dexametasona no radiactiva muestra que se trata de una unión específica a un receptor y no es un desplazamiento desde lugares inespecíficos de unión. Lo anterior se pudo confirmar y ampliar realizando curvas de saturación en la cuales claramente se demostró que además de ser finito el número de receptores para ^3H -dexametasona, estos receptores, como era de esperarse, mostraron una capacidad de unión limitada, es decir que son saturables. El análisis de Scatchard de nuestros datos, en el cual se observa una línea recta, revela la presencia de una sola población de receptores con alta afinidad para dexametasona con una constante de disociación de 7.7×10^{-10} M.

Koehler y Moscona en cambio encontraron dos sitios de unión para hidrocortisona con un K_d de 0.8 nM con un rango de 0.5 a 1.1 nM, para el sitio de alta afinidad y para el de baja afinidad una K_d de 4.4 nM con un rango de 4.3 a 4.5 nM. Sin embargo, como en este trabajo, encontró un solo sitio de unión para dexametasona con una K_d de 1.3 nM con un rango de 1.0 a 1.5 nM. Asimismo, en el cerebro completo de embrión de pollo se detectó un sitio de unión para dexametasona con un K_d de 1.6 nM con un rango de 1.25-2.0 nM. Nuestros datos son diferentes a los obtenidos por Oikarinen (1984) para los receptores a glucocorticoides en tejidos provenientes de la misma especie, ya que los valores determinados de sus constantes de disociación (K_d) de los receptores para la ^3H -dexametasona varían dependiendo del tipo de tejido de que se trate, así el tendón, el cartilago, el piel, el hígado, el corazón, y el músculo, presentaron un valor de 3.2, 5.5, 12.8, 12.3, 13.7 y 10.3 nM respectivamente. Sin embargo, los datos obtenidos en el valor de K_d para el presente estudio son similares a los que se encontraron para los receptores a glucocorticoides en el ganglio cervical superior (Bohn y McEwen, 1984) con un valor de su K_d cercano a 1 nM, que se ha considerado como característico del receptor a corticoides en el cerebro.

Los diferentes valores de las constantes de disociación y número de receptores encontrados por otros autores pueden ser explicados en base a la metodología empleada y/o a la heterogeneidad celular, ya que dichos autores emplearon el cerebro o la retina completos, los que en particular contienen una gran variedad de neuronas y además poseen un gran número de células gliales.

Una vez establecida la existencia de un receptor para ^3H -dexametasona en las neuronas en cultivo se investigó qué tipo de receptor estaba presente. En el cerebro de los mamíferos se conocen actualmente 2 moléculas receptores para los corticoesteroides, por medio de las cuales ejercen su(s) acción(es), uno para

glucocorticoides y otro para mineralocorticoides. Las diferencias entre los receptores para mineralocorticoides y los de glucocorticoides son muchas: su estructura primaria, localización, la regulación del mismo y la función (Eekelen, et al. 1991).

Tanto los receptores a mineralocorticoides (tipo I) como los receptores a glucocorticoides (tipo II) están presentes en el desarrollo embrionario, lo que implicaría la habilidad de estos factores de transcripción para influir en la diferenciación neuronal, y el crecimiento del cerebro; ambos tipos parecen depender de la edad del sujeto lo que sugiere que existe una relación entre las poblaciones de receptores y la maduración del cerebro.

Los receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides tienen un 94% de homología en la región de unión al ADN, y un 57% de la región de unión al esteroide. La fuerte similitud entre los receptores en su región de unión al ADN sugiere que pueden interactuar con elementos de respuesta a hormonas (HRE) similares o cercanos en el genoma, se ha propuesto que ambos controlan cadenas de genes (Yamamoto, 1985).

El receptor a glucocorticoides fue aislado del hígado y tiene una constante de disociación para corticosterona con un rango de 2.5. a 5 nM y la saturación de estos receptores se da solamente con altos niveles de glucocorticoides circulantes (Reaul y de Kloet, 1985). Esta población de receptores corresponden a los del tipo II citados en la literatura. Por otra parte el receptor para mineralocorticoides une corticosterona con alta afinidad, con un valor de su constante de disociación en un rango de 0.5 a 1nM y está altamente ocupado en presencia de niveles bajos de glucocorticoides circulantes (Spencer, et al. 1990). El receptor a mineralocorticoides es referido como receptor del tipo I.

Una diferencia crítica entre los receptores es su afinidad por los esteroides naturales y sintéticos. El receptor para glucocorticoides muestra alta afinidad por la dexametasona, el RU 26988 y el RU 28362, un poco menos de afinidad para el ligando natural corticosterona en rata y cortisol en hámster y mucho menos para la aldosterona (deKloet, et al. 1993). En contraste, *in vitro* el receptor a mineralocorticoides muestra afinidad tanto para la corticosterona como para la aldosterona, con una K_d 0.5 nM que es un orden de magnitud más alta que la de los receptores a glucocorticoides para estos mismos ligandos. Los receptores a mineralocorticoides muestran una insignificante afinidad para RU 26988 y RU 28362 y nula afinidad por la dexametasona (de Kloet, 1993).

Como se mencionó anteriormente la ^3H -dexametasona se une casi exclusivamente al receptor tipo II (que une preferencialmente glucocorticoides sintéticos) con alta afinidad. Por lo tanto, el sitio determinado y caracterizado en nuestro estudio parecería pertenecer al tipo II de receptor. Debido a que la ^3H -dexametasona posee afinidad por el receptor para glucocorticoides mucho mayor que su ligando natural, la corticosterona, ésta no fue capaz de desplazar completamente a la ^3H -dexametasona del receptor. Sin embargo, el hecho de que la haya desplazado aunque sea en parte sugiere que el receptor une a su ligando natural, la corticosterona. Nuestros datos concuerdan además con los obtenidos por Pavlik y Buresova (1984), quienes demostraron, que la corticosterona fue capaz de desplazar a la ^3H -dexametasona del sitio de unión.

Interesantemente, Pavlik reportó que la aldosterona desplaza moderadamente a la ^3H -dexametasona. Sin embargo, en el caso del presente trabajo, la aldosterona no desplazó a la ^3H -dexametasona, pero en cambio lo hizo con la ^3H -corticosterona. Esto reflejaría por un lado, que la ^3H -dexametasona presenta una

gran afinidad por el receptor en el telencefalo del embrión de pollo, como en el caso de los mamíferos, y por lo tanto no permitió que la aldosterona se uniera al receptor. Por otra parte sugiere la posibilidad de la existencia de receptores para mineralocorticoides (tipo I) en los cultivos enriquecidos en neuronas de embrión de pollo de 8 días. En este sentido es importante comentar que en las aves la corticosterona es el corticoide más importante y presenta propiedades tanto de gluco, como de mineralocorticoide. Ante estos elementos, parece lógico que en las neuronas del embrión de pollo se encuentren receptores para gluco y mineralocorticoides. Por otra parte, se ha descrito, que la aldosterona es capaz de desplazar a la ^3H -dexametasona del receptor tipo II en la hipófisis de ratas en periodo infantil.

Por último, con la utilización de estos sistemas de cultivo, podemos evitar la complejidad de los estudios *in vivo* y manejar las poblaciones celulares. También es posible realizar manipulaciones directas de la condiciones de cultivo y observar la respuesta celular durante el desarrollo embrionario. Además, estos cultivos son una herramienta útil para conocer el efecto de otras hormonas o reguladores de la función, maduración y diferenciación de las células del cerebro del embrión de pollo.

En conjunto, los datos presentados es esta tesis demuestran la presencia de receptores para glucocorticoides en las neuronas del telencéfalo del embrión de pollo. Los estudios de la unión de la hormona al receptor en neuronas cultivadas vivas reproducen más cercanamente los eventos fisiológicos en las células íntegras, a diferencia de otros trabajos adonde se utilizan fracciones citosólicas o nucleares. Asimismo se logró caracterizar el receptor y realizar los estudios de competencia pertinentes, que permiten identificarlo en la población neuronal del telencéfalo del embrión de pollo durante el desarrollo temprano.

CONCLUSIONES

I) Las células en cultivo del telencéfalo provenientes del embrión de pollo de 8 días presentan receptores para glucocorticoides (corticosterona y dexametasona).

II) Los datos obtenidos sugieren que hay un solo sitio de unión de alta afinidad y capacidad limitada para ^3H -dexametasona.

III) Otros esteroides relacionados compiten por el receptor. Corticosterona y dexametasona compiten entre ellos, en tanto que la aldosterona sólo lo hace en el caso de la corticosterona. No se puede excluir la posibilidad de la existencia de receptores tipo I en las células estudiadas en cultivo.

IV) En resumen, los datos presentados sugieren la presencia de receptores del tipo II (receptores para glucocorticoides) en una población enriquecida en células neurales del telencéfalo de embrión de pollo de 8 días.

BIBLIOGRAFÍA

Adjovi, Y. (1970) Morphogenèse et activité de la glande corticosurrénale de l'embryon de Poulet normal et décapité. *Arch. Anat. Micr. Morphol. Expériment.* 50:185-200.

Baulieu, E.E. (1987) Steroid hormone antagonists at the receptor level: a role for the heat shock protein MW 90,000 (hsp 90) *J. Cell Biochem.* 35: 161-8.

Belamy, P. y Leonard, R.A. (1965) Effect of cortisol on growth of chick. *Gen. Comp. Endocr.* 5: 402-416.

Bellairs, R. (1960) Development of birds En: *Biology and comparative physiology of birds.* ed. Marshall A.J. Academic Press N.Y. Vol.1, 511 p.

Ben-OR, S. y Chrambach, A. (1981) Multiples forms of glucocorticoid receptors in the neural retina of chick embryo revealed by polyacrylamide gel electrophoresis. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 206 (2): 318-330.

Bohn, M.C. McEwen, B., Luine, V.N. y Black, I.B. (1984) Development and characterization of glucocorticoid receptors in rat superior cervical ganglion. *Develop. Brain. Res.* 14: 211-218.

Boucek, R.F., Gyori, E. y Alvares, R. (1966) Steroid dehidrogenase reactions in developing chick adrenal gland and gonadal tissues. A histochemical study. *Gen. Comp. Endocr.* 7: 292-303.

Burnstein, K.L. y Cidlowski, J.A. (1989) Regulation of gene expression of glucocorticoids. *Ann. Rev. Physiol.* 51: 683-699.

Carsia, R.V., Morin, M.E. Rosen, H.D. y Weber, H. (1987) Ontogenetic corticosteroidogenesis of the domestic fowl: response of isolated adrenocortical cell. *Proc. Soc. Exp.*

Carson-Jurica, M.A., Scharader, W.T. y O'Malley, B.W. (1990) Steroid receptors family: structure and functions. *End.. Rev.* 11(2): 201-220.

Case, J.F. (1952) Adrenal cortical-anterior pituitary relationships during embryonic life. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55: 147-158.

Cidlowski, J.A. y Cidlowski, N.S. (1981) Regulation of glucocorticoid receptors by glucocorticoid in cultured HeLa cells. *Endocrinology*. 109: 1975-82.

Dallman, M.F. Akama, S., Cascio, c.S., Darlington, D.N. Jacobson, L. y Aewin, N. (1987) Regulation of ACTH secretion Variations on a theme of β . *Rec. Prog. Horm. Res.* 43: 113-173.

deKloet, E.R., Oitzl, M.S., y Joels, M. (1993) Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cellular and Mol. Neurobiol.* vol. 13. No.4:433-455.

De Nicola, A.F. y Lantos, C.P. (1980) Adrenocorticotrofina (ACTH). En: *Endocrinología Molecular*. Calandra, R.S. y de Nicola A.F. (eds). "El Ateneo" Argentina pp. 109-120.

Domm, L.V., y Ericson, G.C. (1972) The 3β -hidroxisteroid dehydrogenase activity in the adrenals of normal and hypophysectomized chick embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 140: 1215-1220.

Eekelen, J.A.M., Rots, N.Y., Sutanto, W., Oitel, M.S., y deKloet, E.R. (1991) Brain corticosteroid receptor gene expression and neuroendocrine dynamics during aging. *Molec. Biol.* vol. 110. No.4-6: 679-683.

Evans R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240: 889-895.

Frantisek, S. (1983) *Glucocorticoids and brain development*. Avicenum Medical-Press. Praga

Freeman, B.M. y Vince, M.A. (1974) *Development of the avian embryo "A behavioural and physiological study"* Chapman and Hall London .

Fuentes-Pardo, B., Hernández-Flacón, J., Velázquez, P.N., y Romano, M.C. (1990) Role of corticosterone on the development of passive electrical properties of cultured chick embryo neurons. *J. of Develop. Physiol.* 13 : 67-73.

Gasc, F.M. y Martin, B. (1978) Plasma corticosterone binding capacity in the partially decapitated chick embryos. *Gen. Comp. Endocr.* 35: 274-279.

Gibbs, D.M. y Vale A. (1982) Presence of corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in hipophyseal portal blood. *Endocrinology*. 111: 1418-1420.

Girovard, R.J. y Hall, B.K. (1973) Pituitary-adrenal interaction and growth of the embrionic avian adrenal gland. *J. Exp. Zool.* 183: 323-332.

Goel, S.C., y Furand, A. (1976) Effects of hidrocortisone acetate of the development on chicken embryos. *Teratology* 13: 139-150.

Goodman, M.M. (1994) *Basic Medical Endocrinology*. Second Edition. Raven Press. New York. 318 p.

Gramich, M. y Timiras, P.S. (1971) Mechanism of action of cortisol maturation of brain lipid patterns in embrionic and young chicks. En: "Hormones in Developmmnt" H. Hamburg y E.J.W. Barritong (eds.) Appleton-Century-Creffs, Meridith Corp. New York pp 213-218.

Gustafsson, J., Carlstedt-Duke, J., Poellinger, L., Okreet, S., Wikstromm, A., Bronnegard, M., Gillner, M., Donh, Y., Fuxe, K., Cintra, A., Harfstrand, A., y Agnati, L., (1987) Biochemistry, Molecular Biology, and Physiology of the Glucocorticoid Receptor. *Endocrine Reviews*. 8 (2): 185-234.

Haiter, R., y Grignon, G. (1971) Étude histochemique de la corticosurrénale de l'embryon de Poulet an cours du developpment. *Bull. Assoc. Anat.* 151: 349-355.

Hanson, G.R., Iversen, P.L., Dartlow, L.M., (1982) preparation and partial characterization of highly purified primary cultures of neurons and non-neuronal (glial) cells from embryonic chick cerebral hemispheres and several other region of the nervous system. *Develop. Brain. Res.* 3:329-345.

Hammond, G.L., Smith, C.L. y Underhill, D.A. (1991) Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40 (4-6): 755-762.

Haussler, M.R. (1986) Vitamin D receptors: Nature and Function. *Ann. Rev. Nutr.* 6: 527.

Herman, J.P. (1993) Regulation of adrenocorticosteroid receptor mRNA expression in the central nervous system. *Cell and Mol. Neurobiol.* vol. 13. No. 4: 349-371.

Jones, M.T., Gillham, B., Greenstein, B.D. Beckford, V. y Holmes, N.C. (1982) Feedback actions of adrenal steroid hormones. En: *Current Topics in Neuroendocrinology.* vol. 2. Genten, D. y Pfaff, D. (eds) Springer, New York. pp. 45-68.

Kalinyak, J.E., Dorin, R.J. Hoffman, A.D., y Perlman, A. (1987) Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasona. *J. Biol. Chem.* 262:10441-44.

Kalliecharan, R. y Bufferr, B.R. (1982) The influence of cortisol on ACTH-producing cells in the pituitary gland of the chick embryo: An immunocytochemical study. *Gen Comp. Endocr.* 46: 435-443.

Kalliecharan, R., y Hall, B.K. (1974) A developmental study of the levels of progesterone, corticosterone, cortisol and cortisone circulating in plasma of chick embryos. *Gen. Comp. Endocr.* 24: 364-372-

Kalliecharan, R., y Hall, B.K. (1977) The in vitro biosynthesis of steroids from pregnenolone and cholesterol and the effects of bovine ACTH in corticosteroid production by adrenal glands of embrionic chicks. *Gen Comp. Endocr.* 33: 147-159.

Koheler, D.E., y Moscona, A.A., (1975) Corticosteroid receptors in the neural retina and other tissues of the chick embryo. *Arch. of Biochem. and Biophy.*, 170 : 102-113.

Kovács, A. (1974) Effects of ACTH and prednisolone on the ultrastructures of interrenal cells of chicken adrenals. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 25: 255-268.

Loza-Arredondo, M.C., Lemus, A.E., Pérez-Palacios, G. (1988) Metabolismo de hormonas esteroides. En: "Bioquímica e inmunología" Gómez Hicks, J.J. y Díaz Zagoya, J.C. (eds) Fac. de Med. UNAM. México. 54-92.

Martin, B. Gasc, F.M. y Thibrer, M. (1977) C₂₁-steroid binding proteins and progesterone levels in chick plasma during ontogenesis. *J. Steroid Biochem.* 8:161-166.

Meaney, M.J. Bhatanagar, S., Diorino, J., Larocque, S., Francis, D., O'Donaell, D., Shanks, N., Sharma, D. Smythe, J., y Vian, V. (1993) Molecular basis for development of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *Cell. and molec. neurobiol.* 13: 4, 321-347.

Merchenthaler, U., Vigh, S., Petroz, S., y Shcally, A.V. (1983) The paraventriculo-infundibular corticotropin-releasin factor (CRF) pathway as revealed by immunocytochemistry in long-term hypophysectomized or adrenalectomized rats. *Reg. Pep.*5: 595-305.

Meyer, J.S., (1985) Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol. Review.* 65 (4): 946-1020.

Moog, F. (1959) The development of function in the adrenal cortex. In *Comparative Endocrinology*. Gorkman, J. (ed.). Wiley and Sons, New York. 624-638.

Moog, F. y Richardson, D. (1955) The functional differentiation of the small intestine. IV. The influence of adrenocortical hormones on differentiation and phosphatase synthesis in the duodenum of chick embryo. *J. Exp. Zool.* 130: 24-55.

Moscona, A.A. y Paddington, R. (1966) *Biochem. Biophys. Acta.* 121: 409-411.

Murota, S.I., Kawashima, K., y Endo, H. (1969) Effects of hormones on the chondroitin sulfate metabolism of chick embryo femora growing in vitro. 2. Differential effects of cortisol on chondroitin sulfate synthesis in the cartilagenous bones growing in various natural and synthetic media. *Endocrinol. Jpn.* 16: 109-114.

Nakamura, T. and Tanabe, Y. (1973) *In vitro* corticosteroidogenesis by the adrenal gland of the chick (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocr.* 21:99-107.

Nakamura, T. Tanabe, Y. Hirano, H. (1978) Evidence of the *in vitro* formation of cortisol by the adrenal gland of embrionic and young chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocr.* 35: 302-308.

O'Malley, B.W. y Tsai, M.J. (1992) Molecular pathways of steroid receptor action. *Biol. Reprod.* 46, 163-167.

Oikarinen, A., (1987) Developmental changes in the level of glucocorticoids receptors in the chick-embryo tissues. *Med. Biol.* 65: 199-202.

Oikarinen, J. y Ryhanen, L. (1984) Cortisol decreases the concentration of translatable type-I procollagen mRNA species in developing chick-embryo calvaria. *Biochem. J.* 198: 519-524.

Pantic, K. y Pauloeie, R. (1970) Effects of hidrocortisones on the chick embriogenesis. *Endocr. Exp.* 4: 95-107.

Patel, A.J., y Hunt, A. (1985) Observations on cell growth and regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocytes. *Develop. Brain Res.* 18:175-184.

Pavlik, A. y Buresouá, M. (1984) The neonatal cerebellum, the highest level of glucocorticoid receptors. *Develop. Brain. Res.* 12:13-20.

Pedernera, E. (1971) Development of the secretory capacity of the chick embryo adrenal glands. *J. Embryol. Exp. Morpho.* 25: 312-322.

Pedernera, E.A. (1972) Adrenocorticotrophic activity in vitro of the chick embryo pituitary gland. *Gen. Comp. Endocr.* 19: 589-591.

Pedernera, E.A., (1993) Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: *Comunicación Neuroendócrina, bases celulares y moleculares.* Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (eds). 292 pp.

Petkovic, M. Brand, N.J., Krust, A., y Chambon, P. (1987) A human retinoic acid receptor which belong to the family of nuclear receptors. *Nature* 330: 444-7.

Pettman, B., Lous, J.C., and Sensenbrenner, M. (1979) Morphological and biochemical maturation of the neurons cultured in the absence of glial cells. *Nature*, 281, 378-380.

Piddington, R. (1967) Hormone effects on the development of glutamine synthetase in the embrionic chick retina. *Develop. Biol.* 16: 168-188.

Reul, J.M., y de Kloet, E.R. (1985) Two receptor system for corticosterone in the rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505-2511.

Ringold, G.. (1985) Steroid hormone regulation on gene expression. *Annu. Rec. Pharmacol. Toxicol.* 25: 529-566.

Ringer, K. (1976) *Adrenals In: Avian physiology* Ed. Sturkey, D. Springer-Verlag. Ed. 3ra.

Romano, M.C., Velazquez, P.N., Bonilla, N.M., y Fuestes-Pardo, B. (1985) Effect of glucocorticoid in development of the membrane resting potential of chick embryo brain cells in culture. *Int. J. Dev. Neurosci* 5 (3): 189-194..

Romanoff, A. L. (1960) "The avian embryo. Structural and functional development" MacMillan, New York.

Rousseau. G.G: (1984) Control of gene expression by glucocorticoids hormones. *Biochem. J.* 224: 1-12.

Sánchez, E.R. (1990) Hsp 56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *J. Biol chem.* 265: 22067-22070.

Sensenbrenner, M., Maderspach, K., Latzkovits, L. y Jaros, G.G. (1978) Neuronal cells from chick embryo cerebral hemispheres cultivated on polylysine-coated surfaces. *Dev. Neurosci.* 1:90-101.

Siegel, H. S. y Gould, L.F. (1976) Chick embryonic plasma proteins and binding capacity for corticosterone. *Develop. Biol.* 50: 510-516.

Spencer, R.L., Young, E.A., Choo, P.H. y McEwen, B.S. (1990) Adrenal steroid type I and type II receptor binding: Estimates of *in vivo* receptor number, occupancy and activation with varying level of steroid. *Brain Res.* 514:37-48.

Stering, K.M. Jr., Harris, M.D., Di Petrillo, T., Beleney, G., y Cutroneo, K.R. (1983) Glucocorticoids decrease the amount the type 1 procollagen mRNAs *in vivo* and fibroblastic culture. *J. Biol. Chem.* 258: 7644-7647.

Straznicky, K., Hájos, F., y Bohos, B. (1966) Relationship between the ultrastructure and cortical activity of the embryonic adrenal gland in the chicken. *Acta Biol. Hung.* 16: 261-274.

Sugimoto, M., Kosima, A., y Endo, H. (1976) Role of glucocorticoid in the terminal differentiation and tissue-specific function (a review). *Develop. Growth and Different.* 18 (3) : 319- 327.

Székely, G. Endroczi, E., y Szentágothai, F. (1958) Erscheinen der argentaffinen Substanz und beginn der sekretion adrenocorticotrophen hormons in der hypophyse von hühner-embryonen. *Acta Biol. hung.* 8: 283-288.

Tóth, N. Simon, P., y Székely, G. (1958) Dependence of early differentiation of the adrenal cortex from the anterior pituitary in the chick embryo *Acta Biol. Hung* 8: 289-294.

Vale, W., Spiess, J., River, C., y River, J. (1981) Characterization of the 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science* 214: 1394-1397.

Walters, M.R. (1985) Steroid hormones receptors and the nucleus. *End. Rev.* vol. 6. No. 4: 512-543.

Wells y Wight (1971) *The avian biology.* Raven Press

Wiggert, B.O., y Chadre, G.J. (1975) A glucocorticoid and progesterone receptors in the chick optic tectum. *J. of Neurochem.* 24: 285-286.

Wise, P.M. y Frye, B.E. (1973) Functional development of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal cortex axis in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 135: 277-291.

Wilson, E.M., (1952) The embryological and cytological basis of the regional patterns in the definitive epithelial hypophysis of the chick embryo. *Am. J. Anat.* 91:1-40.

Woods, J.E., de Vries, G.W., y Thommes, R.C. (1971) Ontogenesis of the pituitary-adrenal axis in the chick embryo. *Gen Comp. Endocr.* 17: 407-415.

Woodbury, D.M., (1972) Biochemical effect of adrenocortical steroids in the central nervous system. En: "The handbook of neurochemistry" vol. 7, Lastha, A. ed. Plenum Press New York-London. 255-287.

Wynn, P.C., Hauger, R.L., Holmes, M.C., Milan, M.A., Catt, K.J. y Aguilera, G. (1984) Brain and pituitary receptors for corticotropin releasing factor: localization and differential regulation after adrenalectomy. *Peptides* 5: 1077-1084.

Yamamoto, K.R. (1985) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.* 19: 209-252.