

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA, EDO. DE MEXICO

BO 679/90 g 1
Biología

"ANALISIS DE LOS SITIOS DE UNION DE TIPO I Y II PARA ESTRADIOL EN
ENDOMETRIO DE RATA EN RELACION A LA IMPLANTACION DEL BLASTOCISTO"

TESIS

PARA OBTENER LA MAESTRIA EN

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

PRESENTA

HECTOR ALFONSO BERNAL TORRES

MEXICO D F, 1989



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.

CONTENIDO

	página
1.- ANTECEDENTES	1
2.- PLANTEAMIENTO	15
3.- OBJETIVO	16
4.- PROGRAMA DE TRABAJO	17
5.- RESULTADOS	21
6.- DISCUSION	24
7.- CONCLUSIONES	26
8.- BIBLIOGRAFIA	

Este trabajo se desarrollo en el Hospital de Gineco Obstricia No. 4
del Instituto Mexicano del Seguro Social

RESUMEN

En este trabajo se analizan las propiedades de los sitios de unión a estradiol del endometrio de rata durante la mañana del día cinco de gestación. Las ratas utilizadas se ovariectomizaron unilateralmente 30 días antes del apareamiento, se les inyectó (I.V.) azul de tripán para identificar los sitios donde se implantaría el blastocisto; de cada rata se obtuvieron tres muestras de endometrio funcionalmente diferentes, que son: endometrio receptivo al blastocisto, endometrio no receptivo y endometrio de cuerno ovariectomizado, se homogenizaron y se obtuvo el citosol.

Se determinaron las constantes de los sitios de unión a estradiol a 4 y 25 °C (condiciones de intercambio); se identifican dos K_d diferentes, uno con valor cercano a 1 nM y otro con un poco más de 30 nM e igualmente diferentes en capacidad de unión; posiblemente correspondan a los sitios de unión tipo I (receptor clásico) y tipo II. La mayor densidad de sitios tipo I y II (expresado en femtomoles/mg de proteína) corresponde al endometrio de cuerno ovariectomizado y la menor al sitio de implantación.

Se analizó el contenido de estradiol tisular (por radioinmunoensayo) encontrándose que el endometrio de cuerno ovariectomizado mostró el mayor contenido, 1.97 ± 0.24 pmoles/g de peso húmedo, el menor contenido fue para el endometrio no receptivo 0.98 ± 0.17 .

También se hizo análisis por centrifugación en gradiente continuo de sacarosa, de las proteínas que unen el estradiol en forma específica, identificándose dos tipos, una con un valor cercano a 4 S y el otro con valor cercano a 8 S.

ANTECEDENTES

La gestación temprana en la rata requiere de una secuencia estricta de eventos hormonales esteroideos: niveles crecientes de progesterona desde el primer día y niveles basales de 17β -estradiol con una elevación del mismo en la tarde del día tres (1); estos esteroides inducen, al menos parcialmente, la capacidad de ciertas zonas del endometrio para establecer el reconocimiento celular con el blastocisto y permitir su implantación, se les conoce como zonas de endometrio receptivo (ER), estas zonas se encuentran regularmente distribuidas a lo largo del útero y se alternan con zonas de endometrio no receptivo (ENR). La receptividad del endometrio coincide con una serie de cambios en las funciones tisulares, de tipo bioquímico, fisicoquímico y funcional, tales como el incremento en la síntesis de proteínas (2); cambios en las propiedades de carga neta de la superficie de la membrana (3); y el aumento de la permeabilidad vascular, entre otros; todo esto corresponde a lo que se ha designado como "diferenciación funcional del endometrio" de la cual se desconoce en que momento se inicia y cual es la naturaleza del mecanismo que la activa. Se ha sugerido que este proceso requiere de cantidades adicionales, locales, de estradiol que posiblemente sería proporcionado por el blastocisto (4,5); a este respecto se ha logrado establecer experimentalmente la relación entre la presencia local de estradiol y el aumento de permeabilidad de los vasos sanguíneos (4).

El aumento de permeabilidad vascular es lo que permite identificar al ER, esto se inicia sólo unas horas antes de que se lleve a cabo la implantación del blastocisto; para identificar este proceso se utilizan colorantes como azul de tripán, azul de Evans, etc. el cual se inyecta por vía intravenosa, en la sangre forma un complejo con albumina el cual difunde rápidamente en el endometrio receptivo y lentamente en otros tejidos; por lo tanto en esta etapa del embarazo (día 5) es posible identificar y obtener las zonas del endometrio en las que se llevará a cabo la implantación; desafortunadamente no hay otro procedimiento que nos indique el posible inicio de la diferencia

ción funcional de esas zonas del endometrio antes del día cinco, lo cual permitiría conocer, posiblemente, los factores que participan en ella.

Actualmente desconocemos la participación que los esteroides pudieran tener en la diferenciación funcional del sitio de implantación; aunque se debe mencionar que, en general, el conocimiento que se tiene sobre el mecanismo de acción de los esteroides en sus tejidos blanco, es mínimo; hasta la fecha sólo se conocen parcialmente algunos de los elementos que participan en este proceso. Un componente importante en el mecanismo de acción de los esteroides son las proteínas receptoras intracelulares, específicas para cada esteroide al cual se unen y de esta forma llevan el mensaje hacia el núcleo. De acuerdo con esto, la acción de los esteroides siempre tendrá una relación directa con la presencia y propiedades de sus proteínas receptoras; por lo tanto, para conocer plenamente el papel intracelular de los esteroides en los tejidos blanco, es necesario identificar los diversos componentes que participan en la interacción esteroide-receptor, así como los factores que regulan la presencia y función de los receptores.

Logeat (6) y Martel (7) han considerado la posibilidad de que el estradiol tuviera alguna participación en la diferenciación funcional del endometrio receptivo, han estudiado las propiedades de sus receptores en el endometrio receptivo al blastocisto en la rata; desafortunadamente estos autores hicieron su estudio incurriendo en una serie de fallas metodológicas (no perfunden a las ratas, no eliminan los esteroides endógenos, no hacen estudios de saturación de los receptores, no analizan sitios de unión secundarios, etc) lo que conduce, por un lado, a obtener muy escasa información y por otro, a resultados contradictorios entre ellos; sin embargo, es posible considerar que la participación que los esteroides tuvieran en la diferenciación funcional del ER podría reflejarse en las características y propiedades de los receptores intracelulares.

Actualmente representa un gran desafío el tratar de resolver el mecanismo de

acción de las hormonas esteroideas a nivel molecular, en las células de los tejidos blanco (8): hasta la fecha son múltiples los reportes en la literatura sobre la posible secuencia de eventos que conducen a la expresión biológica de esas hormonas (9-11); sin embargo, el conocimiento es escaso y contradictorio, la mayor parte de la información se reduce a la interacción de la proteína receptora con el esteroide, pasando por alto otros posibles factores que pudieran participar en el mecanismo hormonal, como son, la naturaleza y características del mecanismo de activación del receptor; la presencia y función de sitios de unión secundarios (a estradiol), los cuales a pesar de que han sido observados desde que se hicieron las primeras descripciones de receptores, no se les había considerado participación alguna en el mecanismo de acción del estradiol, sólo recientemente se ha sugerido esta posibilidad, todo esto únicamente en lo que respecta al citosol; en el núcleo la situación es aun más compleja, sobre todo en lo relacionado a la interacción del complejo receptor-esteroide con el sitio aceptor de la cromatina.

La interacción entre los receptores citoplásmicos, de alta afinidad y capacidad limitada (baja densidad de sitios de unión), con las hormonas esteroideas en los tejidos blanco, es reconocido como el evento inicial en la acción hormonal (12). Una vez que se forma el complejo receptor-hormona es translocado al núcleo donde interactúa con la cromatina para llevar a cabo cambios en la función de la célula blanco (11). Las evidencias sobre la secuencia de este proceso se han derivado de experimentos "in vivo" e "in vitro"; respecto a la localización de los receptores, ciertos autores "han mostrado" la ubicación citosólica del receptor no ocupado por esteroides endógenos (9,12,13); este punto de vista no es compartido por otros autores, hay quienes niegan la presencia del receptor libre en el citosol (14,15), consideran que son exclusivos del compartimiento nuclear; en lo que si hay acuerdo es en que la formación del complejo receptor-esteroide implica un cambio en las características o propiedades del receptor que en conjunto corresponde a lo que se conoce como "activación del receptor" lo cual le permite unirse con gran afinidad a sitios específicos (sitios aceptores) sobre la cromatina, esos cambios pu

dieran ser de tipo conformacional, al menos parcialmente (11).

La formación del complejo receptor-esteroide, sin embargo, sólo constituye un pequeño eslabon en el mecanismo de acción de los esteroides, el cual es un proceso muy complejo y requiere todavía de mucho trabajo experimental que permita dilucidar las diferentes etapas que componen la respuesta celular, de los tejidos blanco, a la presencia de hormonas esteroideas.

En la actualidad desconocemos aun aspectos relacionados con la síntesis de los receptores y su distribución en los compartimientos de la célula; con las características físico-químicas del receptor "in vivo"; con los factores que modulan su unión al esteroide; con el mecanismo de activación (cambios conformacionales u otros) y por otro lado, con las características y propiedades de los sitios aceptores en la cromatina.

Recientemente ha sido descrita por diversos autores (16,17) la presencia de sitios de unión secundarios, para estradiol, que si bien no son considerados propiamente receptores, se unen al ligando también en forma específica, con menor afinidad pero mayor capacidad de unión que el receptor clásico; han sido descritos en tejido uterino de rata (16) y mamario, en humano (17).

La relación entre el sitio de unión secundario y el receptor se desconoce, aunque se ha sugerido que puedan formar parte del complejo receptor-esteroide actuando sobre este como un mecanismo regulador de su translocación hacia el núcleo (18).

Se ha observado que en el análisis de los receptores a estrógenos la disociación del complejo receptor-ligando exhibe dos fases de primer orden cuando la curva de saturación se hace con una concentración de [^3H]-estradiol en un rango de 0.1 a 60 nM, lo cual no sería explicable desde la disociación del estrógeno a partir de un sólo tipo de sitio de unión. En este análisis, las concentraciones bajas del esteroide marcado nos permitirían identificar a los receptores que tienen alta afinidad y las concentraciones altas permitirían identificar a los sitios de unión secundarios, que son de menor afinidad.

En el útero de rata se hizo una de las primeras descripciones de la presencia de sitios de unión secundarios, para estradiol, así como del procedimiento para analizarlos, estableciéndose que tienen alta capacidad de unión para ese ligando (18); se ha observado que en este tejido, después de la inyección "in vivo" o de la exposición "in vitro" con [³H]-estradiol, el 50 % de la marca intracelular queda unido al receptor o sitio de unión tipo I, el resto se asocia a sitios de unión secundarios o sitios de unión tipo II (16). Esto significa que todos los reportes acerca del contenido de receptores en tejidos blanco, que supuestamente corresponderían a la unión del estradiol a un sólo tipo de sitio de unión (receptor), en realidad corresponden a la determinación de una mezcla de sitios de unión, tipo I y tipo II, sobre todo en los que para su determinación se ha utilizado el "método de un sólo punto"; esto posiblemente ha sido una de las causas por la que los diversos autores reportan valores de receptores con un rango muy amplio, de cero a varios miles de fentomoles/mg de proteína, lo cual no es muy fácil de interpretar, como sucede en el caso de tumores mamarios dependientes de estrógenos (10,12,20), esto hace evidente la necesidad de buscar sitios de unión secundarios en todos los tejidos donde se determine el contenido de receptores a a estrógenos. El análisis de las diversas poblaciones de sitios de unión en los tejidos blanco es particularmente necesaria cuando se intenta conocer el mecanismo y los factores que regulan la acción de los esteroides.

Un procedimiento relativamente simple que nos muestra gráfica y simultáneamente los dos tipos de sitios de unión a estradiol en el útero de rata, consiste en utilizar dos ratas, a una de ellas se le inyecta 2.5 ug de estradiol marcado y se sacrifica a los 60 minutos junto con la otra no tratada, se procesa el útero para obtener el citosol y se hace la determinación, en ambas, de receptores por una curva de saturación, los datos se analizan por el método gráfico de Scatchard (21); en la rata no tratada se obtienen los receptores totales, en la rata inyectada sólo se encontraron sitios de unión secundarios ya que el receptor se ha depletado desde el citoplasma, por translocación ha

cia el núcleo. Los datos del sitio de unión secundario se restan de los receptores totales y se obtienen los datos del receptor a estradiol, los cuales se analizan como se indica arriba, para obtener sus constantes de unión; este experimento nos indica además que el sitio de unión secundario del citosol no se transloca al núcleo (22).

Por otro lado, el sitio de unión secundario encontrado en el útero, analizado por centrifugación en gradiente de sacarosa, muestra un coeficiente de sedimentación cercano a 4 S, establecido a partir de experimentos paralelos con proteínas de peso molecular y coeficiente de sedimentación conocido, a diferencia del receptor que muestra valores cercanos a 8 S (16), lo que sugiere que el sitio de unión secundario pudiera ser un precursor del receptor. Se sabe que los receptores a esteroides son proteínas ácidas que no contienen carbohidratos, con peso molecular de 65 Kd para su forma monomérica, aunque su forma funcional pudiera ser un dímero o tetramero; es estabilizada por grupos -SH, se asocia en forma estequiométrica con su ligando por medio de uniones débiles como puentes de hidrógeno y fuerzas de Vander- Walls (9,12,23). Si bien se desconoce la función del sitio de unión secundario dentro del mecanismo esteroideo, su gran capacidad de unión sugiere que pudiera formar parte de un sistema de reserva o acumulación de estradiol intracelular el cual sería liberado según las necesidades del tejido para ser captado por el receptor y de esta manera ser translocado al núcleo (24). El procedimiento de análisis para determinar los sitios de unión secundarios implica utilizar mayor concentración del esteroide marcado que la que se utiliza para analizar únicamente al receptor y temperatura de incubación entre 18 y 37 C, a esto se ha llamado "condiciones de intercambio" (el receptor se analiza entre 0 y 4 C); el tiempo de incubación puede ser desde 30 minutos hasta 18 h o más dependiendo de la temperatura de incubación, en estas condiciones el esteroide marcado desplaza al esteroide endógeno que se encuentre unido a los receptores; a tales temperaturas se acelera el proceso de disociación;

hay una relación directa entre la temperatura de incubación y la vida media del complejo receptor-esteroide, entendiéndose por vida media la mitad del tiempo necesario para disociarlo en presencia de un exceso de esteroide marcado (16).

Desafortunadamente el sistema de intercambio no es tan simple, de hecho el resultado del proceso de intercambio corresponde a dos eventos diferentes: uno, el intercambio dependiente de la temperatura y dos, la pérdida de sitios de unión (desnaturalización de la proteína) dependientes de un periodo largo de incubación (posiblemente por acidificación del medio por desarrollo bacteriano) y de la temperatura misma; el resultado final del proceso de intercambio es la suma de estos dos eventos. Estas consideraciones metodológicas enfatizan la necesidad de llevar a cabo controles de tiempo y temperatura que permitan conocer las condiciones óptimas para un tejido determinado.

REQUERIMIENTOS EN EL ANALISIS DE LOS SITIOS DE UNION A ESTRADIOL EN EL CITO SOL.

Para el estudio de receptores a esteroides en general, se requiere una concentración mínima de proteínas de 1 mg/ml, valores fuera de este rango distorsionan el resultado final; cuando se utiliza el método de carbón-dextrán, con concentraciones de proteínas menores de 1 mg/ml, el carbón-dextrán adsorbe el complejo receptor-esteroide (8). El medio de incubación requiere de una mezcla que contenga clorhidrato de tris hidroximetilaminometano; etilendiaminotetracetato de sodio; glicerol y un compuesto con propiedades reductoras como ditiotreitól o monotioglicerol, aunque recientemente se ha propuesto la posibilidad de que estos últimos inhibieran parcialmente la unión del esteroide al sitio de unión secundario (25). El tiempo de incubación más adecuado es de 18 h cuando se incuba a 4 C, a esta temperatura la disociación es muy lenta, aunque se pueden utilizar tiempos menores, como 4 a 8 h, con el inconveniente de que en estas condiciones la unión receptor-esteroide es lábil, en relación inversa al tiempo de incubación, al exponerse a

la mezcla carbón-dextrán. Cuando se analizan los receptores por el método de intercambio, indicado antes, el tiempo de incubación debe ser mucho menor. En el inicio de todo estudio de receptores a esteroides debe hacerse una curva de saturación del receptor por el ligando, por lo menos con 10 puntos, en el caso de receptores a estradiol debe utilizarse un rango amplio de concentración del esteroide marcado, por la posibilidad de que exista en el tejido a estudiar algún otro sitio específico de unión (sitios de unión secundarios) que tendrían menor afinidad que el receptor; el rango de concentración de $[^3\text{H}]$ -estradiol para el estudio de útero de rata ya se indicó antes (16,17).

Después de la incubación es necesario separar el $[^3\text{H}]$ -esteroide libre, del unido al receptor; esto se puede llevar a cabo por diversos métodos, los dos más usados por accesibles, confiables y que requieren poco tiempo son: 1. el método de carbón-dextrán y 2. el método de hidroxapatita; el primero adsorbe todas las moléculas pequeñas de la mezcla de incubación, entre ellas el $[^3\text{H}]$ -esteroide libre, se separa la parte sobrenadante por centrifugación la cual contiene el complejo receptor-esteroide, se cuantifica su radiactividad para finalmente obtener sus constantes de unión; el segundo se basa en la adsorción del complejo a superficies cargadas, por centrifugación se separa la resina que contiene el complejo y finalmente se hace una extracción con alcohol del esteroide marcado y se cuantifica por centelleo líquido (8,26).

Precauciones en el Análisis de los Receptores

Los resultados del análisis de los receptores, en un determinado tejido, especialmente humanos, reportados por diferentes autores (27,28,29) generalmente muestran una gran dispersión, lo cual no necesariamente pudiera corresponder a las características propias de la célula blanco sino a factores propiamente experimentales, de hecho, el estudio de receptores a esteroides, en general, esta sujeto a una serie de variables que de no ser consideradas bajo un mismo criterio distorcionarían los resultados, haciéndolos en un momento

dato, de difícil interpretación; este es un aspecto de gran importancia que ha inquietado a diversos investigadores y ha dado lugar a la creación de instituciones internacionales (30,31) que regulan y avalan eventualmente la calidad experimental de este análisis. Por lo tanto en todo estudio de receptores a esteroides debe tenerse especial cuidado en los factores que pudieran influir en el resultado final, los más importantes serían: a).- Contenido de sangre en la muestra. En el caso particular del análisis de receptores a estradiol es necesario eliminar la mayor cantidad de sangre de los tejidos antes de procesarlos; la presencia normal de proteínas transportadoras de andrógenos-estrógenos en suero se sumaría a los receptores y sitios de unión secundarios, que sería difícil de advertir, sobre todo si no se utiliza una curva de saturación; en el humano es difícil obtener tejidos libres de sangre, por lo cual es necesario hacer curva de saturación y análisis de los datos por el método gráfico de Scatchard (21), el cual permitiría detectar al gun posible sitio de unión diferente al receptor; en modelos animales de experimentación siempre se debe perfundir el tejido inmediatamente después de sacrificar al animal.

b).- Manejo de la Muestra. Diversos autores han planteado la necesidad de conservar la muestra en condiciones estrictas de temperatura (8,31,32), esto es a -70 C inmediatamente después de obtenerla, en estas condiciones es posible almacenarla durante meses sin pérdida considerable de receptores; cuando es necesario almacenarla por más tiempo lo adecuado es liofilizarla y conservarla entre 0 y 20 C (8). Actualmente no hay una explicación muy clara sobre la inestabilidad de los receptores, aunque esto pudiera deberse a un cierto grado de actividad proteolítica la cual sería más importante a temperatura ambiente.

c).- Homogenización de la Muestra. Este procedimiento debe llevarse a cabo necesariamente entre $0-4\text{ C}$; ya que habitualmente se utiliza el politrón como homogenizador, el proceso de homogenización debe hacerse por periodos no

mayores de 15 segundos, con intervalos de reposo de 1 a 2 minutos para evitar el calentamiento de la muestra; también debemos evitar la formación de espuma que sugiere desnaturalización de proteínas, entre ellas de los receptores.

Métodos de Cálculo y Obtención de las Constantes de Unión.

La obtención de los parámetros de unión de los sitios que unen específicamente estradiol implica la resolución de componentes de alta afinidad-poca capacidad (receptores), de los componentes de menor afinidad-mayor capacidad y finalmente de los sitios de unión inespecífica, posterior a la resolución de estos componentes se pueden obtener las constantes de unión, K_d como medida de afinidad, así como la capacidad de unión (densidad o número de sitios). Para el caso de un tejido que tuviera un sólo tipo de sitio de unión a un cierto esteroide, los cálculos se efectuarían cuantificando la unión total a la que se le resta la unión inespecífica, con los datos de la diferencia se podría aplicar el método de Scatchard (21), que es útil para analizar reacciones en las que participa un sólo componente de unión; esto en realidad corresponde a un análisis de regresión lineal a partir de la relación del $\frac{[^3H]\text{-esteroide unido al receptor}}{[^3H]\text{-esteroide libre}}$ (eje Y) con respecto al $\frac{[^3H]\text{-esteroide unido al receptor}}{[^3H]\text{-esteroide unido al receptor}}$ (eje X); el resultado es una pendiente cuya recíproca nos indica la afinidad del receptor por su ligando, K_d ; la intersección con el eje X de esta pendiente nos indica la densidad de sitios de unión (33).

MODELO DE RECEPTOR

La interacción entre un esteroide y su receptor puede ser descrita por el equilibrio



En ausencia de cualquier otro componente de unión, una expresión para la concentración de esteroide unido al receptor puede ser derivada desde la ecuación

ción de acción de masas (33)

$$\frac{[R][H]}{[RH]} = K_d \quad 2$$

donde $[R]$ y $[H]$ son la concentración de receptor no unido y hormona respectivamente y $[RH]$ es la concentración de hormona unida al receptor.

La concentración total del receptor esta dada por

$$[R]_t = [R] + [RH] \text{ en donde } [R] = [R]_t - [RH]$$

por lo tanto

$$K_d = \frac{([R]_t - [RH])[H]}{[RH]}$$

y escribiendo U y N para la concentración de esteroides unido y no unido, respectivamente, se obtiene que

$$K_d = \frac{([R]_t - U)N}{U} \quad 3$$

esto se puede reacomodar y queda

$$K_d = \frac{[R]_t N - UN}{U}$$

por lo tanto

$$K_d = \frac{[R]_t N}{U} - \cancel{\frac{UN}{U}}$$

$$K_d = \frac{[R]_t N}{U} - N \quad \text{o bien} \quad N + K_d = \frac{[R]_t N}{U}$$

y finalmente

$$U = \frac{[R]_t N}{N + K_d} \quad 4$$

La cuantificación de $[R]_t$ y K_d (o $K_a = 1/K_d$) es facilitada por el

reacomodo de la ecuación 3 desde donde se han originado varias formas de gráficas lineares como la obtenida por Lineweaver y Burk para analizar las constantes de disociación enzimática (34) o la obtenida por Scatchard para analizar la atracción por pequeñas moléculas y iones por parte de grandes moléculas (21); para el caso de receptores, estas ecuaciones sólo se pueden aplicar después de corregir por unión inespecífica.

Gráficas Lineares

Varias ecuaciones derivadas desde la ecuación de acción de masas pueden ser usadas para obtener gráficas lineares (34,35) en el análisis de la unión receptor-esteroide, en cualquiera de los sistemas propuestos se busca relacionar el equilibrio entre receptores y hormonas, no son aplicables en situaciones de no equilibrio.

La ecuación de Scatchard (21) es la más ampliamente usada en cualquiera de estas formas

$$\frac{U}{N} = \left(\frac{1}{K_d} \right) \left(\frac{U + U_{\max}}{K_d} \right) \quad 5$$

donde U y N corresponden a varias concentraciones de ligando unido y libre

U/N y U son las variables

U_{\max} es la densidad de sitios

$$K_d = \frac{1}{\text{pendiente}} \quad U_{\max} = - \frac{\text{intercepto en Y}}{\text{pendiente}}$$

o tambien

$$\frac{U}{N} = \frac{[R]_t}{K_d} - \frac{U}{K_d} \quad 6$$

de donde se podría deducir que

$$\frac{U}{N} K_d = [R]_t - U, \quad -U = \frac{U}{N} K_d - [R]_t$$

se divide por -1 y finalmente tenemos

$$U = [R]_t \left(\frac{U}{N} \right) K_d$$

Los datos por lo tanto también podrían ser graficados de acuerdo a esta ecuación. U y N dependen de la concentración total del ligando T y ni U ni N son variables independientes. Cuando los datos son perfectos su análisis por las dos ecuaciones, 6 y 7, dan valores idénticos de $[R]_t$ y K_d , sin embargo los resultados rara vez son perfectos y los medios aritméticos y geométricos de cuantificación de cada parámetro obtenido por medio de ambas ecuaciones puede dar resultados más confiables.

En casos de tejidos que tengan un sistema con dos tipos de sitios de unión a un cierto esteroide y los resultados de su análisis de saturación sean graficados de acuerdo al método de Scatchard (21), se obtendrá una pendiente curvilínea, que de hecho es una hipérbola cuyas asíntotas representan las actividades separadas de las dos clases de sitios, en donde los puntos de la rama superior izquierda corresponden a las concentraciones bajas del ligando libre y los puntos de la rama inferior derecha corresponden a los de alta concentración; de ahí se podría asumir que a muy baja concentración de ligando libre sólo los sitios de alta afinidad actuarían, por lo tanto la pendiente final obtenida a partir de los datos de la cola izquierda daría el primer valor aproximado de los parámetros de unión para los sitios de alta afinidad; por otro lado a muy altas concentraciones de ligando libre, ambas clases de sitios serían considerados para unirse al ligando, quedando saturados los sitios de alta afinidad, así, trazando una línea sobre la cola izquierda se obtiene el valor aproximado de unión máxima (intersección con X) y la media K_d aparente; de los puntos inferiores a la derecha se obtiene la segunda pendiente y por lo tanto las constantes de los sitios de unión de baja afinidad y gran capacidad de unión, Figuras 2 y 3.

Desde estos datos aproximados es posible obtener las constantes verdaderas,

para cada uno de los sitios de unión, por diversos procedimientos como el descrito por Rosenthal (36) o Guardabasso (37), entre otros; el primero es un método gráfico que básicamente consiste en trazar una serie de pendientes paralelas a las pendientes que unen los puntos originales de la gráfica de Scatchard hasta encontrar las dos pendientes finales que representarían a las dos poblaciones de sitios de unión, esas dos pendientes tendrían que satisfacer la ecuación

$$O P = O A + O B$$

en donde O es el origen, P es cualquier punto de la pendiente curvilinear, A y B cada una de las pendientes a encontrar, esto nos permitiría obtener las constantes de unión para cada población de proteínas que unen específicamente el esteroide; este procedimiento incluso es posible llevarlo a cabo manualmente, pero se simplifica en forma importante por medio de programas computarizados. El segundo procedimiento se apoya en los mismos elementos que el primero, es decir, los puntos originales sobre la gráfica de Scatchard y por medio de un programa computarizado se seleccionan primero los puntos a la derecha y los puntos a la izquierda para obtener las dos pendientes preliminares más adecuadas y sobre estas se lleva a cabo un método iterativo para aproximar etapa por etapa las dos pendientes que describen separadamente las propiedades de unión.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El conocimiento actual de la interacción receptor-esteroide en el control hormonal del endometrio y de otros tejidos blanco es escaso, particularmente en lo que se refiere a los factores que modulan esa interacción, a la distribución subcelular de receptores libres y a otros posibles componentes que participen en este proceso. Muy recientemente se han descrito las propiedades de un sitio de unión secundario para el estradiol, sitio de unión tipo II, cuyas constantes de unión parecen ser muy diferentes a las del receptor clásico, no se sabe si existe interacción entre esos dos sitios de unión. Ante todo esto pareciera que la acción de los esteroides se lleva a cabo a través de un proceso mucho más complejo de lo que se ha propuesto tradicionalmente e incluso se podría establecer que ni siquiera se conocen todos los factores que participan en él.

En este momento por lo tanto parece razonable la identificación de los elementos que forman parte de la respuesta celular a la presencia de los esteroides y la relación entre ellos en los diversos tejidos blanco y en diferentes condiciones fisiológicas; a este respecto, el endometrio de la rata en el embarazo temprano parece ideal.

OBJETIVO

Este trabajo tiene por objeto analizar las propiedades de los sitios de unión a estradiol en el citosol de endometrio en relación a la implantación del blastocisto, en el día cinco de preñez de la rata; determinar el contenido de estradiol tisular y correlacionar estos dos parámetros entre si con las características funcionales del tejido.

PROGRAMA DE TRABAJO

Material y Reactivos.- Equipo de laboratorio: Homogenizador Politrón, recipientes especiales para contener nitrógeno líquido, centrifuga refrigerada, ultracentrifuga y contador de centelleo líquido para emisiones beta.

Los reactivos especiales son: $[^3\text{H}]$ -estradiol de gran actividad específica, 150 Ci/mmol; $[^{14}\text{C}]$ -ovoalbumina y $[^{14}\text{C}]$ - γ -globulina; estradiol frío.

Animales.- Se usaron ratas Long-Evans adultas, vírgenes, con peso promedio de 240 g sometidas a periodos regulares de luz-obscuridad (14-10 h) a temperatura constante de 20 C y libre acceso a alimento y agua. Las ratas fueron ovariectomizadas unilateralmente y treinta días después se inició el control de su ciclo estral por estudio citológico de frotis vaginal; sólo se utilizaron aquellas hembras que mostraron por lo menos dos ciclos regulares. Para llevar a cabo el apareamiento se colocaron dos hembras en proestro con un macho en cada jaula, por la noche, a la mañana siguiente se observó el frotis vaginal de cada hembra y la que mostró espermatozoides se le ubicó en el día uno de preñez. En la mañana del día 6 (9 a.m.) de gestación se procedió a aplicar 0.5 ml de azul tripan por vía intravenosa en el dorso de la cola, 30 minutos después se sacrificó la rata por dislocación cervical, perfundiendo de inmediato con solución salina fría por la aorta torácica; se removió el útero; en este momento el cuerno uterino funcional ya mostraba zonas de color azul de 5 a 6 mm de largo, en número de 5 a 6 por rata, intercaladas con zonas no teñidas, de tamaño semejante. En seguida se procedió a cortar las zonas de color azul, así como las no teñidas, de donde se obtuvo ER y ENR respectivamente. Por otro lado, se obtuvo una tercera muestra de endometrio desde el cuerno uterino contralateral, al que se le habría extirpado el ovario, esta parte del útero no mostró tinción alguna; el endometrio de esta región tendría por lo tanto características diferentes (EOv) ya que no habría tenido contacto con blastocistos, aunque estaría bajo el mismo ambien

te esteroideo sistémico que el cuerno uterino funcional. Todas las muestras de endometrio fueron congeladas y conservadas en nitrógeno líquido hasta su uso; los fragmentos de útero se cortaron longitudinalmente y se les adicionó una solución (1:10 peso/volumen) conteniendo Tris-HCl 10 mM, EDTA 1.5 mM, glicerol 10 % y tioglicerol 10 mM, a pH 7.4 (medio de incubación para la reacción receptor-esteroide) y son agitados en el homogenizador politrón a baja velocidad durante 30 segundos, esto permitió desprender la mayor parte del endometrio dejando integra la capa muscular y serosa que resultan resistentes a este tratamiento, lo cual fué establecido por control histológico. Se descartan los fragmentos grandes de tejido (músculo-serosa) quedando una suspensión, parcialmente homogenizada, de tejido endometrial.

Obtención del citosol

El endometrio así obtenido se sometió a una segunda homogenización en un homogenizador Potter-Elvehem, se centrifugó a 800 x g, 10 min. en una centrifuga refrigerada Modelo 1 EC FR-J, el residuo se lavó en dos ocasiones con 1 ml de medio de incubación, se juntaron los sobrenadantes 1,2 y 3 y se centrifugaron a 104,000 x g 1 h para obtener el citosol; el contenido de proteínas se ajustó entre 2 y 4 mg/ml con el medio de incubación para receptores.

Análisis de la interacción receptor-ligando por curva de saturación.

El citosol se trató con una suspensión de carbón activado-dextrán (5 % de no rit A lavada con HCl - 0.5 % dextrán C en 10 mM de Tris-HCl, pH 7.4 a 2 C, conteniendo 0.02 % de azida de sodio) (CAD), 9 partes de citosol por una de CAD, se incubó durante 3 minutos a 4 C seguida por centrifugación a 15,000 x g durante 5 minutos, eliminando así el contenido de estradiol endógeno, evitando de esta forma que participe en la reacción receptor-esteroide durante la incubación diluyendo el estradiol adicionado, sobre todo en los primeros puntos de la curva de saturación. Los receptores citoplásmicos no

ocupados por esteroides endógenos se determinaron incubando alicuotas de 200 μ l de citosol en presencia de concentraciones crecientes de [^3H]-estradiol, desde 0.1 hasta 60 nM, disuelto en etanol, el cual es evaporado con nitrógeno, la incubación se hizo durante 18 h a 4 C. Para la determinación de sitios de unión secundarios se establecieron previamente las condiciones óptimas de incubación (condiciones de intercambio), tiempo y temperatura; se incubó a diferentes temperaturas entre 18 y 37 C durante 6, 12 y 18 h utilizando una sola concentración del esteroide marcado, 25 nM. Una vez establecidas las condiciones óptimas (se indican en resultados) cada muestra fue analizada por curva de saturación con las concentraciones arriba indicadas del estradiol marcado. La unión inespecífica se determinó usando el mismo ligando marcado + 200 veces la concentración de estradiol frío, para cada concentración. Al final de la incubación se adicionaron 50 μ l de CAD, se dejó en reposo durante 5 minutos y se separó por centrifugación a 15,600 x g por 5 minutos; se contó la radiactividad en un contador de centelleo líquido Packard Tri-carb Modelo 3390. Es necesario mencionar que el método de intercambio nos permitió obtener parcialmente los datos de receptores totales y en su totalidad los sitios de unión secundarios; estos parámetros surgen del análisis de Scatchard (21) y de Rosenthal (36) de cada experimento. Las determinaciones se hicieron por duplicado para cada concentración del esteroide marcado.

El número total de experimentos fue de 7, en cada uno se utilizaron de 4 a 5 ratas.

La comparación estadística de los casos se hizo por medio del método de Kruskal-Wallis (38).

Análisis por gradiente continuo de sacarosa

Se determinó la distribución de sitios de unión a estradiol en un gradiente continuo de sacarosa, de 5 a 20 %, en cada una de las tres muestras de endo

metrio; dos alícuotas de citosol de cada una de las muestras de endometrio se incubaron a 4 y 25 C respectivamente, en el primer caso en presencia de 10 nM de [^3H]-estradiol y en el segundo caso con 25 nM del mismo ligando, para cada incubación se determinó la unión inespecífica como ya se indicó. Al final de la incubación se aplican 100 μl sobre el gradiente lineal de sacarosa (4.55 ml) preparado en un formador de gradientes Beckman (2.3 ml en cada recipiente) en todos los gradientes se incluyó [^{14}C]-ovoalbumina, 2000 dpm, como estándar de peso molecular, su coeficiente de sedimentación es de 4.15 S. En algunos casos se utilizó también [^{14}C]- γ -globulina, 8 S. La corrida se hizo a 195,000 x g durante 12 h en un rotor con sistema de columpio, Beckman SW 50.1 a 0 C, en seguida los tubos se perforaron por el fondo y se colectaron 44 fracciones (7 gotas en cada tubo, 105 μl) a los que se les adicionó 5 ml de instagel para contar su radiactividad.

Análisis del contenido de estradiol en el tejido por R I A

Del homogenizado total de cada una de las tres diferentes muestras de endometrio se separó una alícuota de 0.5 ml a las que se les adicionó 5 ml de éter, se agitaron por un minuto, se congelaron y se decantó la fracción etérea, se evaporó y resuspendió en 1.2 ml de amortiguador Tris 10 mM, pH 7.4.

Para llevar a cabo el radioinmuno análisis se corre una curva estándar de estradiol en tubos de 7.5 x 10 mm con 0.5 ml de extracto; se les adicionaron 10,000 cpm de la hormona a determinar y en seguida 100 μl del anticuerpo específico; se incubó 18 h a 4 C; se agregó 0.2 ml de carbón-dextrán el cual se separa centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos; al sobrenadante se le adicionó líquido de centelleo, se deja en reposo 18 h en la obscuridad y se cuenta la radiactividad.

El anticuerpo utilizado es altamente específico (producido por la O M S), da reacción cruzada con un valor máximo de 0.8 % para estriol y mínimo de 0.02 % con testosterona.

RESULTADOS

Condiciones óptimas en el análisis de sitios de unión secundarios.

Las diferentes muestras de endometrio estudiadas mostraron un máximo intercambio de $[^3\text{H}]$ -estradiol a una temperatura de 25 C incubadas durante 12 h (Figura 1), temperaturas y tiempos mayores de incubación parecen provocar una disociación más rápida del complejo, sitio de unión secundario-esteroide.

Es conveniente mencionar que estas condiciones de intercambio no son necesariamente las óptimas para analizar el contenido total de receptores.

Constantes de unión de los sitios tipo I y II.

En las curvas de saturación de los sitios de unión con 1×10^{-10} hasta 6×10^{-8} M de $[^3\text{H}]$ -estradiol e incubación a 4 o 25 C, se observó una doble fase de primer orden en todas las muestras estudiadas; en las figuras 2 y 3 se muestran dos curvas representativas de ER (únicamente), analizadas a 4 y 25 C respectivamente, en A se muestra la curva de saturación y en B el análisis por el método de Scatchard desde los datos de A; con este último procedimiento se obtiene una pendiente curvilínea lo que sugiere que esta formada de por lo menos dos componentes, esto se confirma mediante el uso del método gráfico de Rosenthal, el cual nos permite obtener la doble pendiente de cada curva de Scatchard y sus respectivas constantes de unión, en la Tabla I se indican los datos obtenidos de esta manera para el ER, ENR y EOv respectivamente.

De las constantes de unión obtenidas para cada muestra, se observa que una de las K_d tiene valores cercanos a 1 nM, que indica gran afinidad, esto coincide en todos los casos con poca capacidad de unión, estos valores corresponden por lo tanto al receptor clásico; la otra K_d muestra valores mucho más altos, lo que indica menor afinidad, posiblemente correspondan al sitio de unión tipo II.

En la tabla I se muestran los valores promedio \pm la desviación estandard de las constantes de unión, K_d y capacidad de unión (fentomoles/mg de proteína), de los sitios de unión tipo I y II; de aquí observamos que los valores de K_d son muy semejantes cuando el análisis se hace a 4 o 25 C tanto para el sitio de unión tipo I como para el sitio de unión tipo II en las diferentes muestras de endometrio. En cuanto a la capacidad de unir estradiol del tejido endometrial, se observan notables diferencias, la menor unión corresponde al sitio tipo I del endometrio receptivo, analizado ya sea a 4 C, 88 ± 25 fentomoles/mg de proteína o a 25 C, 42 ± 19 fentomoles/mg de proteína; el sitio de unión tipo I (receptor), de las tres muestras de endometrio parece mostrar mayor capacidad de unión cuando se analiza a 4 C, ER 88 ± 25 , ENR 158 ± 41 , EOv 199 ± 66 fentomoles/mg de proteína, que cuando se analiza a 25 C ER 42 ± 19 , ENR 86 ± 25 , EOv 97 ± 29 fentomoles/mg de proteína, respectivamente.

Con respecto al sitio de unión tipo II, la mayor capacidad corresponde a la muestra de EOv, se observa que el total es 703 ± 194 fentomoles/mg de proteína y de estos los que se encontraban libres de estradiol endógeno son 312 ± 153 fentomoles/mg de proteína, que corresponde al 44 % del primero. En el ER y ENR la capacidad de unión es menor, 259 ± 86 y 431 ± 89 respectivamente; los sitios no ocupados corresponden al 40 % en ER y 37 % en ENR de los sitios totales

Análisis de los sitios de unión a $[^3H]$ -estradiol por centrifugación en gradiente de sacarosa.

En todas las muestras de endometrio, el citosol fué premarcado con 2 y 25 nM de $[^3H]$ -estradiol e incubado durante 2 h a 4 y 25 C, esto nos permite identificar sitios de unión a estradiol de tipo I y II libres y unidos.

En las Figuras 4, 5 y 6 se muestran datos representativos de los tres tipos de endometrio estudiados y corresponden al perfil de radiactividad en ausencia y presencia de estradiol no marcado, a 200 veces la concentración del

marcado, en A se indica la incubación con 2 nM de [^3H]-estradiol incubado a 0-4 C, en B se indica la incubación con 25 nM del mismo ligando, a 25 C. En los dos sistemas de análisis se observan dos picos de radiactividad claramente definidos que se ubican alrededor de las áreas 4 y 8 S, determinado por la relación que guardan con los estándares internos, 4.1 y 8 S. Todos los casos estudiados en condiciones de intercambio muestran un pico mayor en la región 4 S.

Este análisis por centrifugación en gradiente de sacarosa nos sugiere la distribución y proporción entre los dos sitios de unión presentes en el endometrio.

Estradiol tisular

El contenido de estradiol tisular estudiado en 7 muestras de cada tipo de endometrio fue como sigue: ER 1.48 ± 0.19 , ENR 0.98 ± 0.17 y EOv 1.97 ± 0.24 pmoles/g de peso húmedo \pm la desviación estándar. Cuando los tres grupos de datos se analizan por medio de la prueba de Kruskal-Wallis (38) se encuentra que hay diferencia significativa cuando se compara el ER contra el ENR y EOv con valores de $p < 0.035$ y $p < 0.046$ respectivamente.

DISCUSION

Los estudios de Logeat (6) y Martel (7) muestran datos opuestos en el contenido de receptores a estradiol en el citosol del endometrio receptivo al blastocisto; atribuyen sus diferencias a la presencia del colorante que se utiliza para identificar esas zonas del endometrio, suponen que este tipo de sustancias (azul de tripán, azul de Evans, etc.) se unirán al estradiol. En nuestro caso hemos tomado una serie de precauciones tratando de evitar todos los posibles factores que interfirieran con la unión del receptor al esteroide marcado; la perfusión con solución salina, que hacemos inmediatamente después de sacrificar al animal, elimina todas las proteínas de suero que pudieran unirse al esteroide; por otro lado, al tratar el citosol con carbón-dextrán, antes de hacer los análisis de receptores eliminamos el contenido de estradiol endógeno y el colorante que se incorpora en el endometrio, principalmente en el ER y en mínima proporción en el ENR y EOv (por las razones ya explicadas).

En este trabajo hemos intentado analizar las propiedades del sitio de unión secundario, a estradiol, comparándolas con las del receptor clásico, en el ER y ENR, que se sabe tienen características bioquímicas y funcionales diferentes (2,4); además en tejido endometrial, de la misma rata embarazada, del cuerno uterino al que se le habría extirpado el ovario, EOv, que por lo tanto habría sido privado del estímulo del blastocisto y de su posible secreción local de estrógenos (4). Las diferencias funcionales entre los diferentes tipos de endometrio podrían sugerir que su control estrogénico, mediado por una o más poblaciones diferentes de sitios de unión, pudiera ser particular en cada caso; a este respecto hemos identificado un patrón característico, de los sitios de unión a ese ligando. En las figuras 2 y 3 se identifican dos poblaciones de sitios de unión que posiblemente correspondan a las descritas por Clark (16). La mayor capacidad de unión que muestran los sitios tipo II, Tabla I, en el endometrio de cuerno ovariectomizado, participan en igual proporción los que se encuentran libres y los que se encuentran unidos a su li

gando endógeno, es difícil de explicarla, sobre todo considerando que corresponde a un tejido en "reposo" (ausencia de blastocisto); en cierta forma pudiera correlacionarse con el mayor contenido de estradiol que hemos encontrado en el endometrio de esa región del útero.

En cuanto a la menor capacidad de unión (fentomoles/mg de proteínas) mostrada por el receptor (sitio de unión tipo I) en el ER, pudiera corresponder a una translocación más activa del complejo receptor-esteroide hacia el núcleo en un momento determinado, dadas las características funcionales de estas zonas del endometrio.

El menor número de receptores que se observa a 25 C, con respecto a 4 C, Tabla I, en las tres diferentes muestras de endometrio, posiblemente corresponda a la modificación que pudiera sufrir la proteína receptora durante la incubación (desnaturalización por acidificación del medio) que interfiriera en su unión con el esteroide; su estructura cuaternaria (dímero o tetrámero) posiblemente sería más lábil que la del sitio de unión secundario (monomero) (16). Por lo tanto en nuestras condiciones experimentales (óptimas para el sitio de unión secundario) no se puede establecer la proporción entre receptores libres y unidos al esteroide endógeno.

En la distribución de sitios de unión en el gradiente de sacarosa se observa que todas las muestras de endometrio tienen dos poblaciones de moléculas, 4 S y 8 S, sugeridas por los estándares de [^{14}C]-ovoalbumina (4 S) y [^{14}C] globulina (8 S) adicionados en el mismo gradiente, que unen [^3H] estradiol específicamente, analizadas ya sea con el procedimiento habitual para el estudio del receptor clásico, 2 nM de [^3H] estradiol e incubación a 0 - 4 C o bien con alta concentración del mismo ligando, 25 nM y a 25 C (condiciones de intercambio). Es conveniente mencionar que este tipo de análisis es básicamente cualitativo.

En cuanto al contenido de estradiol tisular resulta difícil de explicar la

diferencia de concentración en las tres áreas funcionales de endometrio de una misma rata, las cuales se encontrarían ante un mismo nivel circulante de la hormona y supuestamente ante una libre difusión a través de la membrana plasmática. El EOv es el que contiene más estradiol 1.97 ± 0.24 pmoles/g de peso húmedo y también es el que contiene la mayor densidad de sitios de unión secundarios; esto podría corresponder a lo propuesto por Panko y col. (24) en relación al posible papel de reservorio de estradiol por parte de los sitios de unión secundarios. Se podría pensar que esta acumulación se debe a una utilización mínima de estradiol por parte de una célula que se encontraría en relativo reposo con respecto de las zonas vecinas, ER y ENR.

CONCLUSIONES

En este trabajo hemos analizado algunos de los componentes del mecanismo de acción esteroidea que pudieran ser claves en determinar las funciones de los tejidos blanco; los tres tipos de endometrio analizados muestran un patrón característico en los diferentes parámetros analizados, sugiriendo que la función de cada tipo de endometrio pudiera estar relacionada, por lo menos parcialmente, con las propiedades de sus sitios de unión a estradiol.

Los datos mostrados aquí corresponden únicamente a uno de los dos principales compartimientos de la célula, el citoplasma.

BIBLIOGRAFIA

1. Yoshinaga K.: Hormonal interplay in the establishment of pregnancy. En *Reproductive Physiology II 1977*, Ed. Roy O Greep Vol 13 pages 201-223. University Park Press
2. Heald PJ.: Biochemical aspects of implantation. *J Reprod Fertil Suppl* 25:29-49;1976
3. Hewitt K, Beer AE and Grinnell F.: Disappearance of anionic sites from the surface of the rat endometrial epithelium at the time of blastocyst implantation. *Biol Reprod* 21:691-696;1979
4. Dickman Z, Sen Gupta J and Dey SK.: Does blastocyst estrogen initiate implantation? *Science* 195:687-688;1977
5. Perry JS, Heap RB and Amoroso EC.: Steroid hormone production by pig blastocysts. *Nature (Lond)* 245:45-47;1973
6. Logeat F, Sartor P, Tuwu Hai M and Milgrom S.: Local effect of the blastocyst on estrogen and progesterone receptors in the endometrium rat. *Science* 207:1083-1084;1980
7. Martel D and Psichoyos A.: Estrogen receptors in the nidatory sites of the rat endometrium. *Science* 211:1454-1455;1981
8. Clark JH, Peck EJ.: Steroid hormone receptors: basic principles and measurements. En *Laboratory Methods Manual for Hormone Action and Molecular Endocrinology*. Ed. Schared WT, O'Malley B. Department of Cell Biology. Baylor College of Medicine. Fourth Edition, 1980, pages 1-49
9. Seeley DH, Wen-Ting Wang and Salhanick HA.: Molecular interactions of progesterone analogues with rabbit uterine cytoplasmic receptor. *J Biol Chem* 257:13359-13365;1982
10. Mirecki DM, Jordan BS and Jordan VC.: Steroid hormone receptors and human breast cancer. *Laboratory Medicine* 16:287-294;1985
11. Barrack ER.: Steroid hormone receptor localization in the nuclear matrix: interaction with acceptor sites. *J Steroid Biochem* 27:115-121;1987
12. Edwards DP, Martin PM, Horwitz KB, Chamness GC and McGuire W.: Subcellular compartmentalization of estrogen receptors in human breast cancer cells. *Exp. Cell Res* 127:197-204;1980
13. Walters MR and Clark JH.: Cytosol and nuclear compartmentalization of progesterone receptors of the rat uterus. *Endocrinology* 103:601-609;1978
14. Welshons WW, Lieberman ME and Gorsky J.: Nuclear localization of unoccupied estrogen receptors. *Nature* 307:747-749;1984
15. Jackson V and Chalkley R.: The binding of estradiol-17 β to the bovine endometrial nuclear membrane. *J Biol Chem* 249:1615-1626;1974
16. Clark JH, Markaverich B, Upchurch S, Eriksson H, Hardin JW and Peck EJ.: Heterogeneity of estrogen binding site. Relationship to estrogen receptors and estrogen responses. *Recent Progress in Hormone Research* 36:89-134;1980
17. Lopes MTP, Liberato MH, Widman A and Brentani MM.: Occupied and unoccupied type II estrogen binding sites in human breast cancer. *J Steroid Biochem* 26:219-226;1987

18. Markaverich BM, Williams M, Upchurch S and Calrk JH.: Heterogeneity of nuclear estrogen-binding sites in the rat uterus: A simple method for the quantitation of type I and type II sites by [³H]-estradiol exchange
Endocrinology 109:62-69;1981
19. Sanborn BM, Rao BR and Korenman SG.: Interaction of 17b estradiol and its specific uterine receptor. Evidence for complex kinetics and equilibrium behavior. Biochemistry 10:4955-4961;1971
20. Mortel R, Levy C, Wolff JP, Nicolas JC, Robel P and Baulieu EE.: Female sex steroid receptors in postmenopausal endometrial carcinoma and biochemical response to an antiestrogen. Cancer Research 41:1140-1147;1981
21. Scatchard G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann N Y Acad Science 51:600-609;1949
22. Markaverich BM, Upchurch S and Clark JH.: Two binding sites for estradiol in rat uterine nuclei: relationship to stimulation and antagonism of uterine growth. In Perspectives in Steroid Receptors Research. Ed. F Bresciani. Raven Press. New York 1980 pags 143-146
23. Healy DL and Hodgen GS.: The endocrinology of human endometrium. Obstetrical and Gynecological Survey (Suppl) 38:509-530;1983
24. Panko WB, Watson CS and Clark JH.: The presence of a second specific estrogen binding site in human breast cancer.
J Steroid Biochem 14:1311-1316;1981
25. Markaverich BM, Roberts RR, Alejandro MA and Clark JH.: An endogenous inhibitor of [³H]estradiol binding to nuclear type II estrogen binding sites in normal and malignant tissue.
Cancer Research 44:1575-1579;1984
26. Clark JH, Hardin JW, Upchurch S and Eriksson H.: Heterogeneity of estrogen binding sites in the cytosol of the rat uterus
J Biol Chem 253:7630-7636;1978
27. Bayard F, Damilano S, Robel P, Baulieu EE.: Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium.
J Clin Endocr and Metab 46:635-648;1978
28. Janne O, Kauppila A, Kokko E, Lantto T Ronnberg L and Viiko R.: Estrogen and progestin receptors in endometriosis lesions: comparison with endometrial tissue. Am J Obstet Gynecol 141:562-566;1981
29. McGuire WL.: Steroid hormone receptor in breast cancer treatment strategy. Recent Progress in Hormone Research 36:135-156;1980
30. Koenders A and Berraad Tj.: Standarization of steroid receptor analysis in breast cancer biopsies: EORTC Receptor Group.
Recent Results in Cancer Research 91:129-135;1984
31. Raam S and Gelman R.: Estrogen Receptor Assay: Interlaboratory and intralaboratory variation in the measurement of receptors using dextran-coated charcoal technique: A Study Sponsored By EOCG
Europ J Cancer 17:643-649;1981

32. Nankung PC and Petra P.: Measurement of progesterone receptors in human breast tumors: comparison of various methods of analysis. J Steroid Biochem 14:851-854;1981
33. Braunsberg H.: Mathematical analysis of data from receptor assays Recent Results in Cancer Research 91:18-31;1984
34. Lineaweaver H and Burk D.: The determination of enzyme dissociation constants. J Am Chem Soc 56:658-666;1934
35. Feldman HA.: Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium: some methods for parameter fitting. Analyt Biochem 48:317-338;1972
36. Rosenthal HE.: A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. Analytical Biochemistry 20:525-532;1967
37. Guardabasso V and Benfenati F.: A simplified method to determine binding parameters in a two-site case using linear regression. Computer Programs in Biomedicine 17:235-242;1983
38. Mosteller F and Rourke RE.: The Kruskal-Wallis statistic. In: Sturdy Statistics. Addison-Wesley Publishing Company 1973, pages 210-219

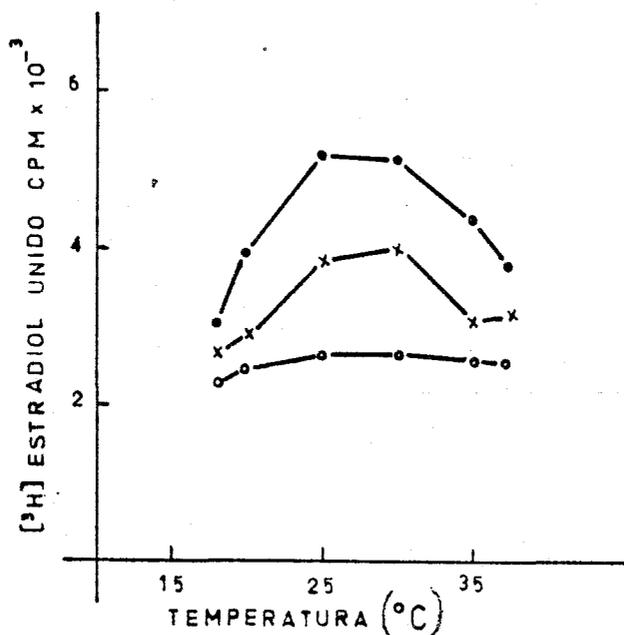


FIGURA 1

Efecto del tiempo y la temperatura de incubación sobre la unión específica del $[^3\text{H}]$ -estradiol a los sitios de unión totales del citosol de endometrio receptivo al blastocisto.

El tejido se homogenizó en amortiguador Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1.5 mM) pH 7.4, glicerol 10% y tioglicerol 10 mM, en una primera fase en el politrón, se elimina el tejido fibroso y finalmente en homogenizador vidrio-vidrio.

Se centrifuga a $800 \times g$, 10 minutos y a $104,000 \times g$ 60 minutos. El citosol (200 ul) se incubó con 25 nM de $[^3\text{H}]$ -estradiol o $[^3\text{H}]$ -estradiol + 200 veces exceso de estradiol 6 h (○), 12 h (●) y 18 h (X), al final de la incubación se adicionan 50 ul de una mezcla de carbón-dextrán (Norit A 5% lavada con HCl-Dextrán C 0.5% (en 10 mM Tris HCl)) y se centrifuga a $15,600 \times g$ 5 minutos. La radiactividad se determina en 200 ul de sobrenadante.

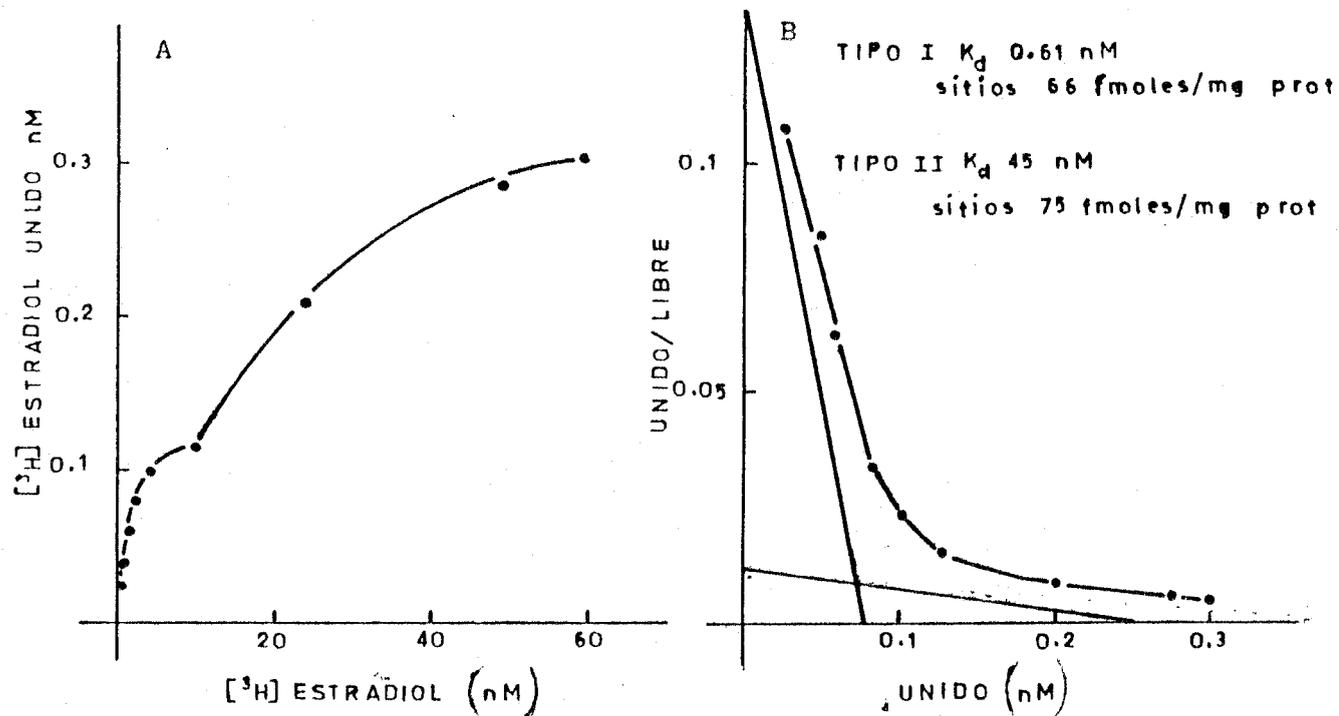


FIGURA 2. Análisis de saturación representativa de los sitios de unión a estradiol en el citosol de endometrio receptivo al blastocisto incubado a 4 C. El rango de concentración de $[^3\text{H}]$ -estradiol fue de 0.25 a 60 nM, en presencia y ausencia de 200 veces la concentración de estradiol, el análisis se hizo básicamente como se describe en la fig. 1. En A se describe la curva de saturación ya restada la unión inespecífica, en B se muestran las gráficas obtenidas por análisis de Scatchard y Rosenthal de los datos de A.

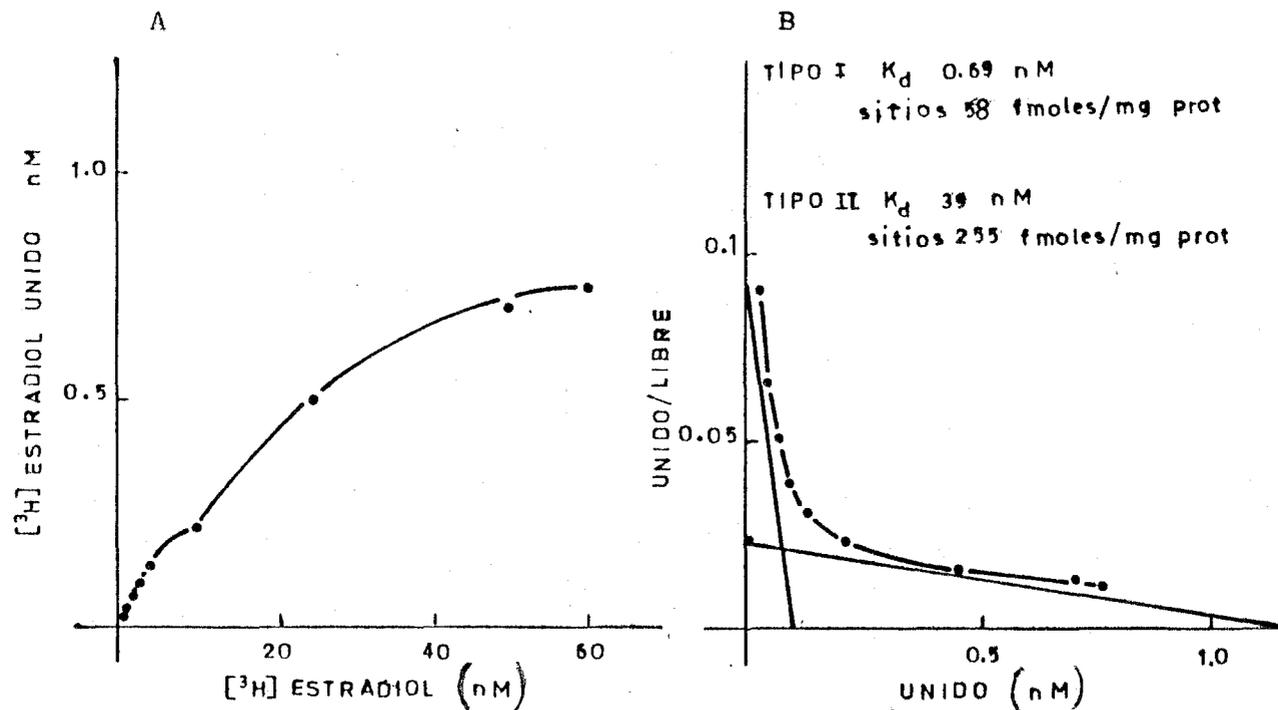


FIGURA 3. Análisis de saturación representativo de los sitios de unión a estradiol en el citosol de endometri receptivo al blastocisto, incubado a 25 C. El rango de concentración de $[^3\text{H}]$ -estradiol fue de 0.25 a 60 nM en presencia y ausencia de 200 veces la concentración de estradiol, el análisis se hizo básicamente como se describe en la fig. 1. En A se describe la curva de saturación ya restada la unión inespecífica, en B se muestran las gráficas obtenidas por análisis de Scatchard y Rosenthal de los datos de A

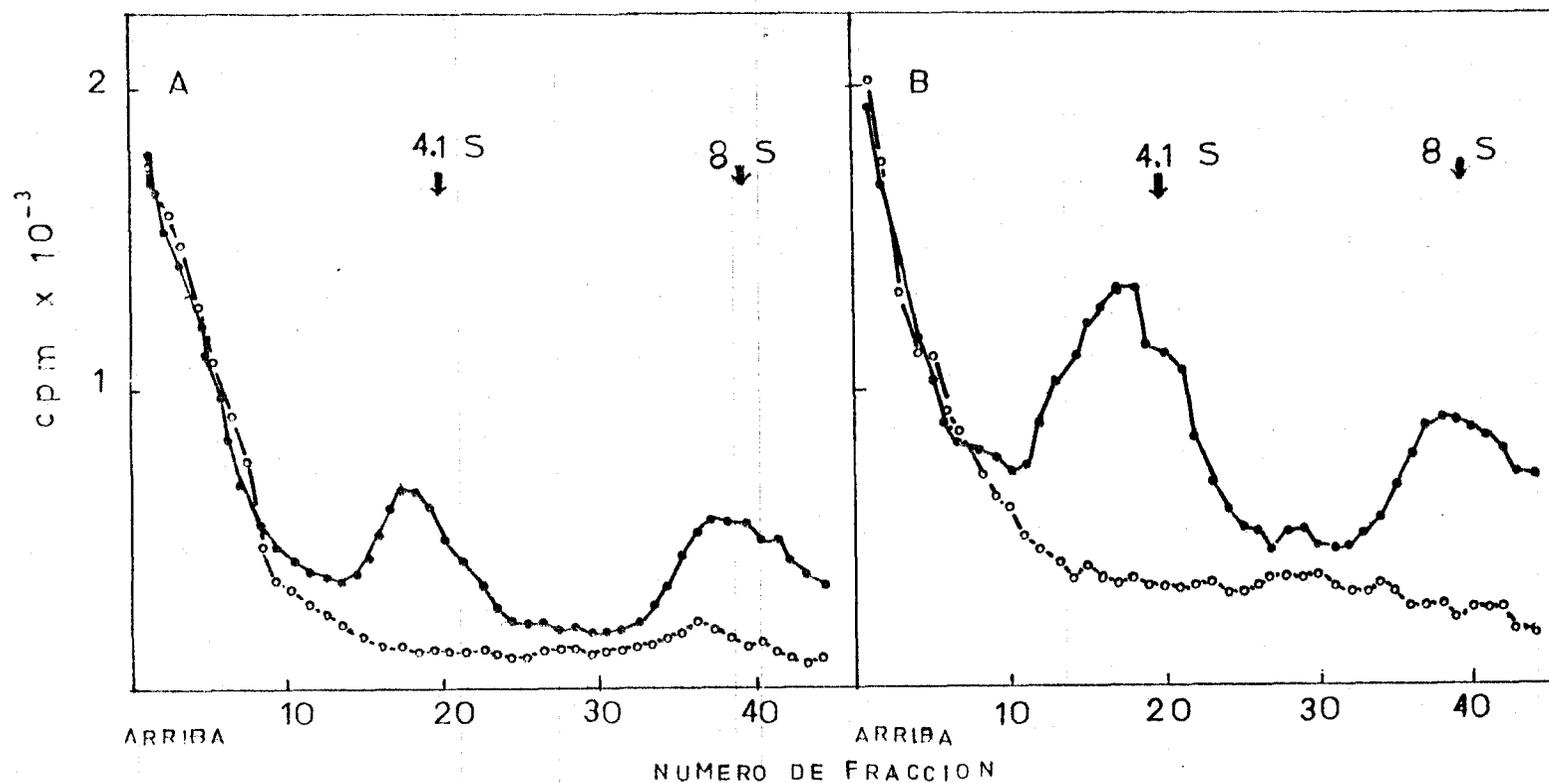


FIGURA 4. Análisis por gradiente de densidad de sacarosa de sitios de unión de Tipo I y II en endometrio receptivo al blastocisto. El citosol (200 ul) fué premarcado incubando con 2 (A) y 25 nM (B) de $[^3\text{H}]$ -estradiol (●—●) o la misma concentración de $[^3\text{H}]$ estradiol más 200 veces la concentración de estradiol frío (o—o), se incubó a 4 y 25 C respectivamente durante 2 h. Se aplican 100 ul de citosol marcado sobre un gradiente de sacarosa, 5-20 %, preparado en un formador de gradiente de densidad, Beckman; se centrifuga durante 12 h a 195,000 x g para finalmente obtener 44 fracciones de 105 ul cuya radiactividad se muestra en las figuras

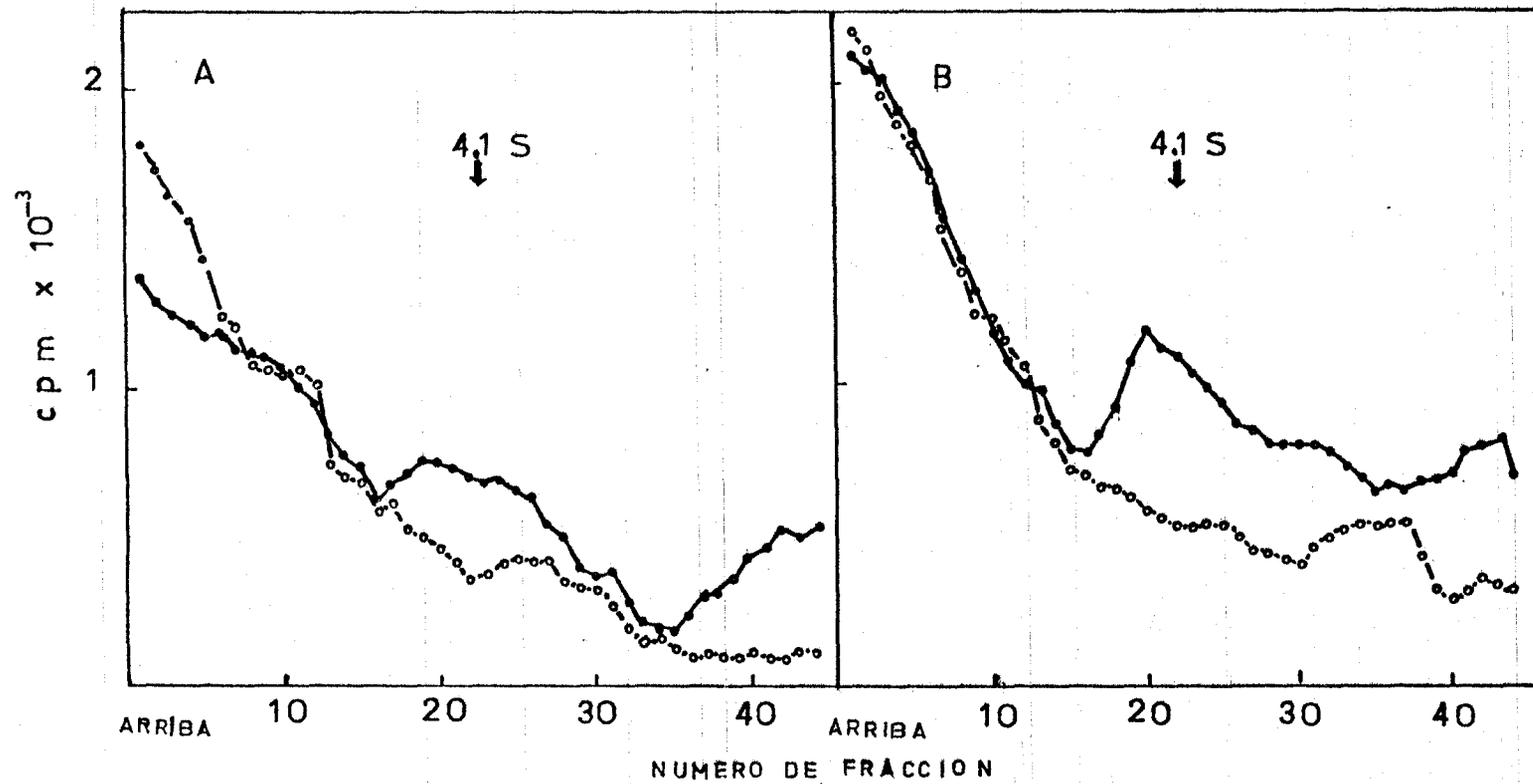


FIGURA 5. Análisis por gradiente de densidad de sacarosa de sitios de unión de Tipo I y II a estradiol en endometrio no receptivo al blastocisto. Todos los datos de la incubación y los datos de la figura son iguales a los que se describen para la figura 1.

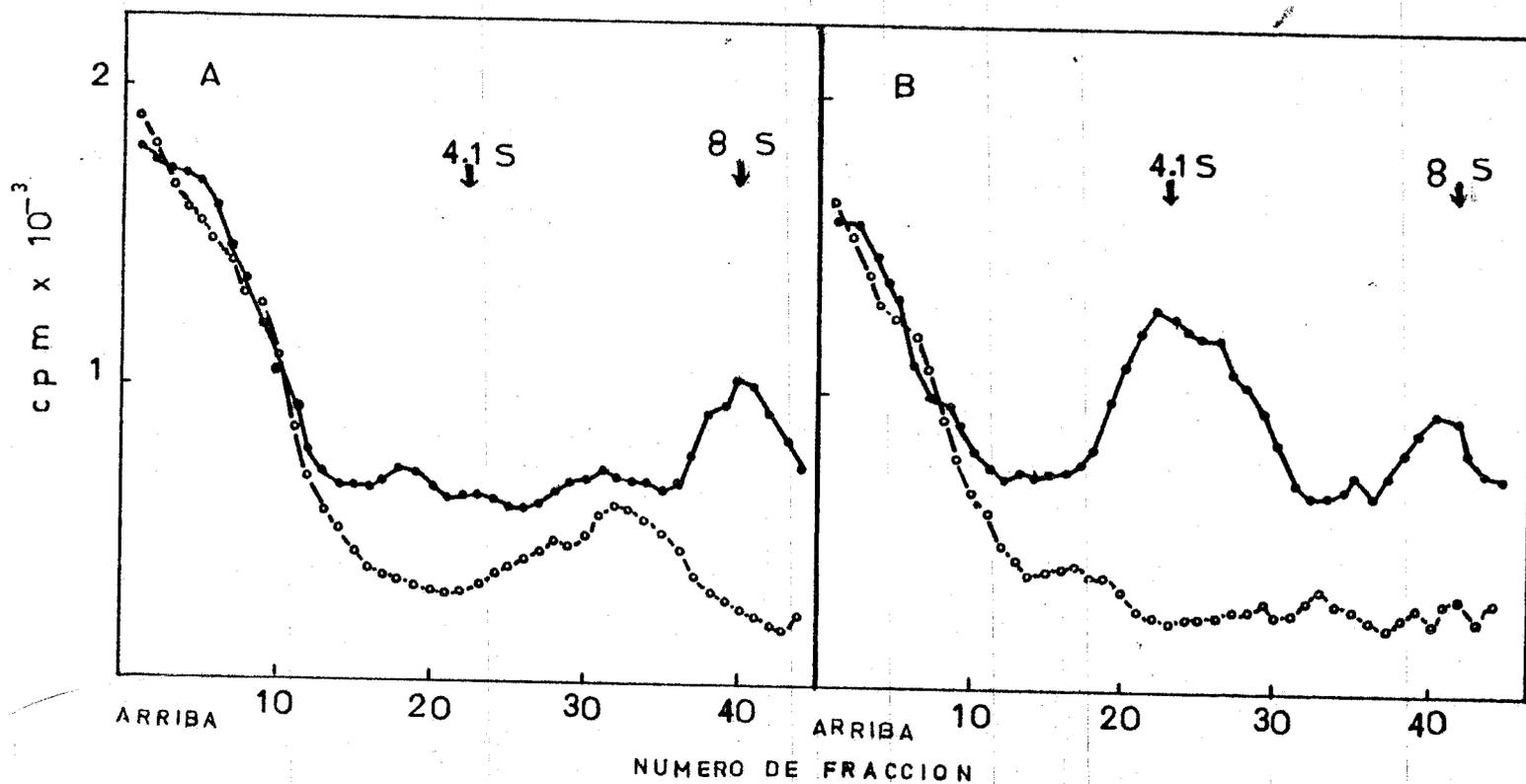


FIGURA 6. Análisis por gradiente de densidad de sacarosa de sitios de unión de Tipo I y II a estradiol en endometrio de cuerno uterino que ha sido sometido a ovariectomía 30 días antes del experimento. Todos los datos de la incubación y los datos de la figura son iguales a los que se describen para la figura 1.

TABLA I. K_d (nM) Y CAPACIDAD DE UNION (fmoles/mg de proteína) A $[^3H]$ -ESTRADIOL, DE SITIOS TIPO I Y II EN ENDOMETRIO DE RATA GESTANTE

			K_d	CAPACIDAD DE UNION	
4 C	ER	I	0.69 \pm 0.15	88 \pm 25	a
		II	36 \pm 18	95 \pm 33	
	ENR	I	0.78 \pm 0.22	156 \pm 41	b
		II	33 \pm 21	172 \pm 47	
	EOv	I	1.01 \pm 0.38	199 \pm 66	c
		II	39 \pm 18	312 \pm 153	
25 C	ER	I	0.85 \pm 0.19	42 \pm 19	
		II	34 \pm 18	259 \pm 86	a'
	ENR	I	0.99 \pm 0.27	86 \pm 25	
		II	38 \pm 16	431 \pm 89	b'
	EOv	I	1.08 \pm 0.29	97 \pm 29	
		II	41 \pm 19	703 \pm 194	c'

El análisis fué hecho de acuerdo al método descrito en la figura 1, incubando el tejido a las temperaturas indicadas, los datos se obtuvieron a partir de los métodos de Scatchard y Rosenthal y representan la media \pm la desviación estandar de 5 casos.

a $p < 0.05$ cuando se compara con b y c (prueba de Kruskal-Wallis)

Sitios Tipo I a 4 C $p < 0.05$ cuando se compara con los mismos, pero a 25 C en todos los casos

a' $p < 0.05$ cuando se compara con b'

a' $p < 0.01$ cuando se compara con c'