



CIUDAD NACIONAL
ALFONSO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SECRETARIA ACADEMICA



000580

INGENIERO ALFONSO MIRELES HERNANDEZ
Unidad de Registro e Información
Consejo de Estudios de Posgrado.
Ciudad Universitaria.
Presente.

Me es muy grato informar a usted que el alumno VICTOR MANUEL SANCHEZ HIDALGO presentará próximamente su examen para obtener el grado de Maestría en el área de Bioquímica ante el siguiente jurado.

Presidente.
1er. vocal.
Secretario.
Suplente.
Suplente.

DRA. VICTORIA CHAGOYA
DR. HOMERO HERNANDEZ
DR. ADOLFO GARCIA-SAINZ
DR. VICTOR M. LOYOLA
DRA. GRACIELA MEZA

Muy Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria D.F., 16 de mayo de 1984.

EL DIRECTOR

DOCTOR JAVIER PADILLA

a.s.
C.c.p. Coordinador del Area. Dr. Victor M. Loyola.
Jefe de la Coordinación Escolar. M.C. Ma. Eugenia Costas.
Integrantes del Jurado.



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INFORME DEL TRABAJO EXPERIMENTAL DESARROLLADO COMO
PARTE DEL PROYECTO DE LA TESIS DE MAESTRIA



EFFECTO DE LAS HORMONAS GONADALES SOBRE LOS NIVELES
DE RECEPTORES ESTROGENOFILICOS HEPATICOS EN LA RATA
DURANTE LAS DIFERENTES ETAPAS DE SU DESARROLLO

Víctor Manuel Sánchez Hidalgo

ALUMNO ASPIRANTE AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
QUIMICAS. BIOQUIMICA

México, D. F.

1984

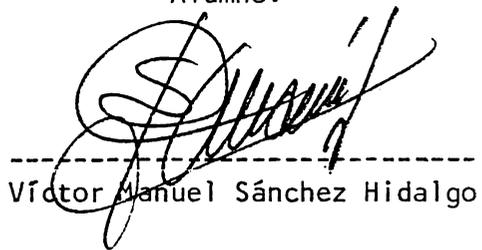
El trabajo experimental se realizó en la Sección de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del doctor Homero Hernández Montes.

Vo.Bo.
Director de Tesis:



Dr. Homero Hernández Montes

Alumno:



Víctor Manuel Sánchez Hidalgo

I N D I C E

	<u>PAGINAS</u>
Resumen	1
Introducción	3
1. Las hormonas gonadales.	5
1.1 Las características químicas y propiedades	5
1.2 Origen y biosíntesis	6
1.2.1 Estrógenos	
1.2.2 Andrógenos	
1.3 Transporte	9
1.4 Catabolismo	11
2. Los mecanismos de la acción hormonal	11
2.1 Los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas	12
2.2 Las características y el criterio del receptor	17
3. El efecto de las hormonas gonadogénicas	20
3.1 La acción "masculinizante" en el hígado de la rata	20
3.1.1 La demostración de un receptor estrogenofílico y su caracterización parcial	
3.2 La acción "masculinizante" en el hipotálamo de la rata	27
4. Objetivos del trabajo experimental	30

	<u>PAGINAS</u>
5. Material y Métodos	32
5.1 Hormonas esteroides	32
5.1.1 Estrógeno radiactivo	
5.1.2 Esteroides no radiactivos	
5.1.3 Purificación por cristalización del 17 β -estradiol	
5.2 Otros reactivos	34
5.3 Animales de experimentación	35
5.3.1 Apareamiento	
5.3.2 Selección para el estudio	
5.3.3 Ovariectomía y orquidectomía total de las ratas neonatas	
5.3.3.1 Anestesia por hipotermia	
5.3.3.2 Extirpación de las gónadas	
5.3.3.3 Integración a la camada	
5.4 Preparación del citosol	38
5.5 Preparación del plasma	39
5.6 Técnica de conjugación del estradiol con el citosol	39
5.6.1 Condiciones de incubación	
5.6.2 Separación del conjugado por absorción con hidroxapatita	
5.6.3 Medida de la radiactividad	

5.7 Técnicas para el estudio de la unión del estradiol a la fracción nuclear	41
5.7.1 La preparación y separación de núcleos purificados	
5.7.2 El proceso de extracción del ácido desoxirribo- nucleico	
5.7.3 La cuantificación colorimétrica del ácido deso- xirribonucleico	
5.7.4 La técnica de conjugación del estradiol	
5.7.4.1 Condiciones de incubación de la frac- ción nuclear	
5.8 La cuantificación de proteínas	47
6. Resultados	48
7. Discusión y conclusiones	52
8. Bibliografía	59
9. Figuras, esquemas y tablas	68
10. Adendum	86

Resumen.

En el presente trabajo, se determinó la capacidad de conjugar al 17β -estradiol-³H del citosol del hígado de las ratas hembras y machos en las diferentes etapas de su desarrollo.

La fracción citosólica hepática de las ratas muestra la presencia de una proteína con gran afinidad por el estrógeno que aparece durante los primeros días de su nacimiento, alcanzando la mayor capacidad para unir al estradiol (1.5 pmoles del estradiol radiactivo/mg de proteína) a los 7 días de edad; tanto en las hembras como los machos. Posteriormente hay una disminución en la conjugación del estradiol hasta el 23^{er} día, en que el citosol hepático muestra muy pequeña capacidad estrogénofílica (10 fmoles de estradiol tritiado/mg de proteína).

El citosol del hígado de las ratas hembras y machos gonadectomizados el día de su nacimiento comparado con el mostrado por las ratas intactas, en las mismas etapas de desarrollo, no mostraron diferencias significativas en la capacidad de unión del citosol del hígado con el estradiol.

Estas observaciones sugieren que la ontogenia de la proteína estrogénofílica hepática de la rata, no es dependiente de la secreción gonadal, sino probablemente sea una propiedad autónoma de los hepato-

citós en este animal.

La comparación de la capacidad de unión del citosol hepático por el estradiol con la capacidad de unión inespecífica del plasma sanguíneo por el mismo estrógeno, sugiere que las proteínas estrogénofílicas hepática y plasmática son diferentes.

La capacidad de conjugación del citosol del hígado de la rata por los estrógenos permanece en una relación constante durante la vida adulta.

INTRODUCCION

En los organismos superiores la regulación del metabolismo y la integridad morfológica y funcional de sus distintos tejidos se encuentran bajo el control de dos sistemas conocidos: el nervioso y el endócrino.

El sistema endócrino está integrado por unas diez glándulas de diverso origen embrionario y localizadas en diferentes partes del cuerpo de todos los mamíferos. Las células de las glándulas endócrinas, sintetizan y secretan las hormonas a la circulación corporal, donde son transportadas a los diversos órganos y tejidos del organismo.

Las hormonas son sustancias químicas que al interaccionar con su tejido "blanco" específico, inician una serie de eventos químicos que integran las respuestas del organismo frente a las fluctuaciones del medio ambiente.

Las hormonas pueden clasificarse en tres grupos, atendiendo a su estructura química: hormonas derivadas de aminoácidos (hormonas tiroideas y catecolaminas), hormonas de naturaleza peptídica y hormonas de naturaleza esteroide.

Según el tipo de órgano las hormonas ejercen diferentes acciones, se requieren en muy pequeñas cantidades y no son modificadas durante su acción.

La concentración de las hormonas en la circulación es variable; para las hormonas esteroideas y tiroideas van de 10^{-6} a 10^{-9} M, mientras que para las de naturaleza protéica van de 10^{-10} a 10^{-12} M.

Dentro de las glándulas endócrinas productoras de hormonas están la hipófisis, la tiroides, las adrenales y las gónadas.

Desde hace mucho tiempo se conoce la marcada influencia fisiológica de las gónadas, que en el macho están representadas por los testículos y en la hembra por los ovarios. En ambos sexos, las gónadas tienen una doble función: la gametogénesis o producción de células germinativas (óvulos y espermatozoides) y la secreción de hormonas sexuales o gonadales que controlan la maduración y funcionamiento del sistema reproductor y otros tejidos del cuerpo.

La fecundación se realiza con éxito debido a la contribución de las hormonas sexuales quienes regulan por un lado, la madurez de los conductos y glándulas auxiliares que aseguran el paso de las células sexuales; y por otro, estimulan el desarrollo de los llamados caracteres sexuales secundarios y contribuyen a las respuestas del comportamiento sexual.

Las gónadas y sus secreciones hormonales (hormonas gonadogénicas), no son indispensables para la vida del organismo, pero sí esenciales para la continuidad de las especies.

1. Las hormonas gonadales.

1.1 Las características químicas y propiedades.

Las hormonas gonadogénicas son compuestos químicos que pertenecen a la familia de los esteroides, los cuales contienen como estructura química fundamental el núcleo denominado ciclopentanoperhidrofenantreno. La numeración de los átomos de carbono del núcleo es convencional al igual que la nomenclatura de los cuatro anillos, ambos se muestran en la Figura 1.

Las hormonas gonadales forman dos de las cinco clases en que se agrupan a las hormonas esteroides en general.

En el Cuadro 1, se indican algunas hormonas representativas de cada clase.

El número de carbonos es variable en cada clase de hormonas, se han propuesto como derivados de tres estructuras hipotéticas: estrano, androstano y progestano, las cuales se representan en la Figura 2.

Los derivados del estrano, son esteroides de 18 carbonos, ya que contienen los 17 carbonos del núcleo fundamental, más un metilo

angular en el carbono 13.

Este grupo comprende a la clase de los estrógenos u hormonas sexuales gonadogénicas femeninas, secretadas por los ovarios. El estrógeno de mayor abundancia en la mujer no embarazada es el 17β -estradiol.

El grupo de esteroides derivados del androstano poseen 19 carbonos, dos de los cuales son metilos angulares, uno en el carbono 10 y otro en el 13.

Aquí se incluyen las hormonas gonadales masculinas o la clase de los andrógenos, como la testosterona, quien es sintetizada en los testículos y funciona como el precursor inmediato de el estrógeno:

En cuanto a la relación entre la estructura química y la función, se ha demostrado que las hormonas que son biológicamente activas poseen una doble ligadura en el anillo A entre los carbonos 4 y 5 y un grupo cetónico en el carbono 3.

1.2 Origen y biosíntesis.

De los diversos trabajos publicados sobre la producción de esteroides en las glándulas endócrinas se deduce que en estos tejidos existen sólo pequeñas cantidades de hormonas. Estos resultados sugieren que los esteroides no se almacenan, así que, de las cantidades de hormonas que se encuentren en un momento determinado en una glándu-

la endócrina no puede decirse nada acerca del verdadero volumen de su producción hormonal. Así como tampoco se puede considerar la presencia de un esteroide dentro de un tejido glandular, como producto de una síntesis de novo, ya que puede tratarse de un metabolito intermediario o de un producto de degradación.

La presencia de los estrógenos se ha demostrado en todas aquellas glándulas que producen esteroides. En particular, el estradiol es encontrado en los ovarios, la placenta y los testículos.

En el ovario, en las células de la teca y de la granulosa de los folículos y cuerpo amarillo se ha considerado como el lugar de la formación del estradiol (26).

La progesterona se sintetiza principalmente en el ovario, ya que se ha determinado en el folículo a punto de estallar y en las células de la granulosa del cuerpo lúteo. Otro sitio de síntesis de esta hormona es la placenta (56,90).

El testículo produce principalmente los andrógenos en tanto que, la corteza adrenal, la próstata, la piel y las glándulas salivales sintetizan estos compuestos en menor proporción (52,91).

En cuanto a la biosíntesis de los esteroides hormonales, el principal precursor es el colesterol. Este compuesto de 27 carbonos se sintetiza a partir del acetato como el compuesto inicial, en el hígado, las adrenales y el tejido muscular.

En los ovarios y en los testículos al igual que en las otras glándulas endócrinas, existe el equipo enzimático necesario que convierte al colesterol a progesterona, precursor intermediario a partir del cual se forman las hormonas sexuales testosterona y estradiol.

En forma esquemática en la Figura 3, se resumen las diferentes fases del metabolismo de los esteroides.

1.2.1 Estrógenos.

Se ha establecido que existen cinco fuentes principales formadoras de los estrógenos en el organismo humano que son: los ovarios, la unidad feto-placentaria, la corteza adrenal, los testículos y el tejido periférico.

En las mujeres con ciclos normales, los ovarios son los principales productores de estrógenos, los cuales derivan de la dehidroepiandrosterona como el compuesto inicial que se convierte a 4-androstendiona, este compuesto sigue dos vías: una primera vía en la que es hidroxilada a 19-hidroxi-4 androstendiona y por un sistema de "aromatización" es transformada a estrona. En la segunda vía, la 4-androstendiona es reducida en C-17 para producir testosterona, que es hidroxilada a 19-hidroxitestosterona, la que por la "aromatización" del anillo A, igual que en la primera vía, es convertida a 17 β -estradiol. Ambos estrógenos, estrona y estradiol son interconvertibles, o bien el estradiol transformarse a éstriol.

Hace más de una década se demostró que también los testículos poseen la capacidad de sintetizar estrógenos; inclusive pueden alcanzar cifras hasta del 30% de la producción total de estrógenos en algunos machos. En la gónada testicular, los precursores son para la estrona, 4-androstendiona y para el estradiol, la testosterona (58).

1.2.2 Andrógenos.

Los testículos y la corteza adrenal son las principales fuentes de la síntesis de los andrógenos. En el testículo adulto humano, son las células de Leydig localizadas en el tejido intersticial las responsables de la producción masiva de la testosterona; la vía más importante de síntesis para esta hormona se inicia con la progesterona, la cual es hidroxilada a 17α -hidroxiprogesterona y ésta transformada a 4-androstendiona y finalmente a testosterona (87) En la corteza adrenal, los sitios de biosíntesis de los andrógenos son la zona fasciculada y reticular.

En la mujer, probablemente el ovario y durante el embarazo la placenta, secreten pequeñas cantidades de testosterona; ya que en estos órganos los estrógenos, en forma indirecta, inhiben la conversión de la 4-androstendiona a la testosterona.

1.3 Transporte.

Puesto que las hormonas esteroideas ejercen su acción biológica sobre tejidos distantes a aquéllos donde son sintetizadas; deben ser transportadas por la sangre. Las hormonas gonadales se unen a dos grupos de proteínas plasmáticas, uno con proteínas inespecíficas que unen a los esteroideos con uniones de afinidad débil ($K_d \sim 10^{-3}$ M) y el otro de proteínas específicas con gran afinidad ($K_d \sim 10^{-10}$ a 10^{-8} M) y con una capacidad limitada. Un ejemplo del primer grupo es la albúmina, la proteína de mayor abundancia en el plasma que une esteroideos con afinidad y especificidad bajas pero con gran capacidad y que puede actuar como acarreador de esteroideos en el organismo (15).

En el segundo grupo de proteínas plasmáticas acarreadoras de gran especificidad y afinidad, se encuentra la globulina que une a los estrógenos y a la testosterona. (TEBG), llamada también α -fetoproteína que une a ambas hormonas con igual afinidad ($K_d \sim 10^{-10}$ M).

Raynaud (79), demostró que la TEBG circula en gran cantidad en la vida perinatal y prepuberal de la rata y disminuye a muy bajas concentraciones, justo antes del inicio de la pubertad del animal.

La mayoría de los investigadores en este campo admiten que sólo es activo el esteroide libre; se postula que únicamente bajo esta forma actúa sobre los tejidos "blanco", ya que el papel de las proteínas que acarrean a los esteroideos, aún no está bien definido.

1.4 Catabolismo.

El catabolismo de los esteroides pasa por diferentes fases intermedias, integradas por las transformaciones químicas de las hormonas esteroides principalmente en órganos como el hígado y el intestino.

En relación a los estrógenos, el 17β -estradiol por la hidroxilación del carbono 16, es convertido a estriol, éste es transformado a metabolitos más solubles ya sea por conjugación con el ácido glucurónico en el hígado, los riñones y el intestino o por la sulfoconjugación en el hígado, y eliminados en su mayor parte por la orina y por las heces en forma de glucosiduronatos.

El catabolismo de los andrógenos es bastante complejo a causa de su interconversión especialmente a nivel del hígado. Por procesos de óxido-reducción se forman metabolitos 5α ó 5β reducidos y derivados 3α ó 3β hidroxilados, los derivados son conjugados y excretados como glucosiduronatos.

2. Los mecanismos de la acción hormonal.

En las últimas dos décadas, uno de los problemas más significativos de la investigación, ha sido el estudio de los mecanismos moleculares por medio de los cuales las hormonas regulan los procesos bioquímicos en los tejidos de los animales superiores.

Los trabajos experimentales se han encaminado fundamentalmente a dilucidar el mecanismo mediante el cual la hormona al interaccionar con un tejido específico desencadena una serie de eventos bioquímicos que se traducen en una o varias respuestas fisiológicas del tejido hacia la acción estimulante de la hormona.

Los resultados obtenidos en estos estudios permiten clasificar a las hormonas en dos grupos:

- a) El grupo de hormonas que actúan en la superficie de la célula efectora a nivel de la membrana plasmática (hormonas de naturaleza peptídica, protéica y catecolaminas); en donde la unión hormona-receptor probablemente conduce ya sea a cambios conformacionales de los componentes de la membrana y/o a la activación de sistemas como la adenilato ciclasa o de los sistemas recién propuestos que incluyen componentes como el fosfatidilinositol (106-109).
- b) El grupo de las hormonas que en el interior de las células "blanco" (hormonas esteroideas y tiroideas), interactúan específicamente con una proteína acarreadora del citosol con la cual forma un complejo receptor-hormona que es transportado hasta el núcleo, donde inicia varios mecanismos que estimulan la síntesis de proteínas dependientes del ARN.

2.1 Los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas.

Los primeros estudios que trataron de aclarar los mecanismos de interacción molecular de las hormonas esteroideas con los componentes celulares fracasaron, debido a que estas moléculas se encuentran en niveles de concentración tan pequeñas, de menos de 1 nmol para los estrógenos y los mineralocorticoides y de 10 a 100 nmoles para los andrógenos, los glucocorticoides y los progestágenos (21), que

no pudieron ser detectados con las técnicas de que se disponía por entonces. Las contribuciones más espectaculares en este campo, fueron la preparación y la utilización de esteroides marcados con actividad radiaespecífica aumentada, por Jensen y Jacobson (45) quienes inyectaron estradiol -³H a ratas inmaduras y después de medir el contenido del estradiol marcado en diversos tejidos, demostraron que el útero, la vagina y la pituitaria anterior, incorporaron mayor cantidad de esa hormona y la retuvieron por tiempo más prolongado que los otros tejidos estudiados (46).

Ya que los tejidos que no servían de "blanco" incorporaban estas moléculas y las liberaban rápidamente, sugería que no existía ninguna barrera de permeabilidad que impidiera la entrada del estradiol a las células y que tal vez la penetración de los esteroides a la membrana plasmática sea por difusión; por otro lado, la retención del estradiol en el útero por seis horas, indicaba que debía quedar unido o que su salida de este tejido, se encontraba obstaculizada de alguna manera.

Cuando el útero de las ratas inmaduras y tratadas con estradiol -³H fue sometido al fraccionamiento subcelular, mostró que la hormona se incorporó tanto a la fracción sobrenadante de 105 000 x g (citósol), como a la fracción nuclear (48,66).

Los estudios autoradiográficos en el útero de la rata, permitieron

confirmar los resultados obtenidos por la centrifugación diferencial, ya que la fijación máxima de radiactividad se observó en el núcleo (80%), mientras que la radiactividad extranuclear varió del 15 al 20% (66, 94, 95).

Los estudios de Noteboom y Gorski (66) demostraron por otro lado, que la fijación del 17β -estradiol al útero era estereoespecífica, ya que podía ser desplazado por su isómero activo el 17α -estradiol. Esta capacidad de retención de las hormonas esteroideas por las proteínas presentes en el citoplasma y en el núcleo de los tejidos reproductores, indujeron en forma independiente a Jensen y a Gorski a postular un modelo (48, 86), que considera la existencia de una molécula de naturaleza protéica el receptor, con el cual la hormona interacciona directamente para iniciar una respuesta celular, por sus características de especificidad, gran afinidad y capacidad de unión limitada.

En la Figura 4, se ilustra el modelo propuesto basado en la interacción del estrógeno con el útero (29).

Los principios básicos que estructuran este modelo, parecen regir para todas las interacciones hormona esteroide-célula:

- 1) Las hormonas esteroideas entran en el citoplasma de la célula por difusión a través de la membrana plasmática (37, 46, 72, 73).
- 2) Si está presente un receptor, se forma un complejo hormona-

receptor citoplásmico. (28, 78)

- 3) El complejo hormona-receptor se desplaza del citoplasma y penetra por translocación al núcleo (92, 103).
- 4) El complejo hormona-receptor nuclear interacciona con el material cromosómico e induce la desrepresión de parte de la información genética cifrada en el ADN, activa la transcripción genética (síntesis de ARN y la síntesis proteínica a nivel ribosómico (13, 81).

Cuando el tejido uterino es expuesto previamente a la acción del estradiol in vivo o in vitro se observa una disminución de la forma citosoluble del mismo, mientras aparece una localización nuclear de la hormona e incremento de una entidad proteínica con una especificidad y afinidad semejantes a la proteína citosólica, lo que justifica la denominación de "receptor neonuclear" de este complejo; por provenir del precursor citoplásmico (11, 86).

Si en un sistema "reconstituido" in vitro, los núcleos aislados se incuban con la hormona, ésta difundirá a su interior, pero no encontrará los "receptores" para interaccionar; si los núcleos se incuban junto con la fracción citosoluble del homogeneizado del tejido correspondiente y los núcleos se aíslan nuevamente, tratando de demostrar la presencia del "receptor" no se encuentra. Sin embargo, cuando los núcleos se incuban en presencia del complejo receptor-hormona citosoluble, es posible posteriormente aislar las

formas complejas hormona-receptor neonuclear (53, 61); por los resultados de estas observaciones se demuestra que es necesario que el estrógeno se una a un receptor citoplásmico, para que la hormona sea transportada al núcleo de la célula, este proceso puede inhibirse in vitro por empleo de bajas temperaturas (2°C), o por agentes oxidantes con grupos sulfhidrilos (93).

Los estudios tanto in vitro como in vivo, muestran que la incubación o inyección de estradiol-³H de los tejidos uterinos, la mayor concentración del esteroide radiactivo que se localiza en el núcleo está asociado a la cromatina. Si la hormona se separa del ADN por extracción con 0.3 M de KCl a pH 7.5, se obtiene un complejo estradiol-neoreceptor con un coeficiente de 5 S (47, 49, 96).

Hoy día, varios grupos trabajan para elucidar los posibles mecanismos moleculares por los cuales los receptores citoplásmicos y/o neonucleares transmiten la información de la hormona esteroide; experimentos previos han demostrado la inducción de la síntesis de los ácidos ribonucleicos y las proteínas de novo, después de la translocación del complejo hormona-receptor citoplásmico al complejo hormona-receptor neonuclear (65, 69, 75). Los experimentos que dan apoyo a estas ideas han mostrado que se inhibe la síntesis de ARNm si al sistema de incubación útero-estrógeno se le agrega actinomicina D; por otro lado sólo ha sido posible medir incrementos de ARNm en núcleos de células uterinas provenientes de animales

inyectados previamente con estradiol, en cambio la incubación de los núcleos solos junto con estradiol no da incremento, pero sí se agrega estradiol en concentraciones fisiológicas junto con el correspondiente citosol uterino, se detectan incrementos en la síntesis de ARNm. Estos estudios in vitro sugieren por lo tanto, que es indispensable la presencia del receptor citoplásmico para la síntesis de ARNm en núcleos purificados de útero (50, 61).

2.2 Las características y el criterio del receptor.

Como ya se notificó, Jenssen y Jacobson al inyectar en la rata estradiol con actividad radiaespecífica incrementada, demostraron que algunos tejidos poseen la capacidad de retener la hormona marcada por un tiempo más prolongado a diferencia de otros, en los que permaneció por un periodo más corto (45, 46). Este hallazgo inicial dió lugar al concepto de tejido "blanco", como el tejido que muestra la capacidad de retención de hormona por tiempos prolongado.

La acumulación de estudios posteriores sobre las interacciones de las diversas hormonas esteroides con sus tejidos "blanco" indujo al concepto de receptor; término que se dió a la macromolécula citoplásmica de naturaleza protéica, responsable de unir específicamente hormonas en el interior de las células de los tejidos blanco y probablemente desencadenar la serie de respuestas celulares a los efectos de la hormona (66, 86, 97).

En 1971, Baulieu y colaboradores (6) describieron al receptor, como aquella entidad protéica que posee una gran afinidad por su ligando, (ligando: hormona con capacidad para unirse específicamente con su receptor), saturabilidad, especificidad esteroideal y especificidad del tejido; es decir, un grupo de características y funciones que todas aquellas macromoléculas protéicas que se califiquen como receptores deben poseer, y las cuales de acuerdo con el conocimiento actual corresponden con el esquema aceptado, de que a nivel de la célula "blanco" la interacción inicial de una hormona esteroide con su receptor citoplásmico, es seguida por una activación del complejo hormona-receptor y su translocación al núcleo, donde su interacción altera el patrón de la expresión genética (30, 104).

En el análisis de este esquema general se propone la existencia en los tejidos, de proteínas que unen específicamente esteroides. Estos por su naturaleza hidrofóbica se enlazan rápidamente a lípidos y proteínas; por ello, la demostración de que una macromolécula muestre capacidad de unir hormonas esteroides no es evidencia suficiente para asegurar la existencia de un receptor a esteroides; si no que debe cumplir con las características ya mencionadas y que se detallan a continuación:

Gran afinidad

La afinidad de los receptores por su hormona respectiva es grande. Esta característica se fundamenta en el conocimiento de que el nivel de concentración de esteroides circulantes oscilan entre 10^{-10}

a 10^{-8} M. Se entiende que si un tejido responde a la acción de una hormona a través de un receptor, entonces esta molécula deberá poseer una cierta afinidad por la hormona, cuyo valor se corresponda con la concentración fisiológica de las hormonas esteroideas en circulación (28).

Saturación o capacidad de unión limitada.

La respuesta biológica a la acción de una hormona esteroide, es un fenómeno saturable. Si es un requisito la formación del complejo esteroide-receptor para que se produzca la respuesta biológica, entonces la cantidad del receptor debe ser limitada; de aquí se infiere la existencia de un número limitado de sitios de unión. Este criterio deberá cumplirse al demostrar que la actividad de combinación que interesa es saturada por su hormona específica (15).

Especificidad por la hormona esteroide.

El receptor posee la capacidad de discriminar entre las diversas moléculas de esteroides presentes y sólo unirá a su hormona específica con gran afinidad o bien a compuestos cuya estructura molecular y estérica es semejante (15).

Especificidad de tejido.

Los tejidos y los órganos clásicamente calificados como "blanco", son aquéllos que dan respuestas biológicas bajo el efecto de la

hormona esteroide específica. Si los efectos de las hormonas esteroideas son el resultado de las interacciones esteroide-receptor, entonces la cantidad de los receptores debe ser mayor en los tejidos "blanco" que en los tejidos no "blancos".

3. El efecto de las hormonas gonadogénicas.

3.1 La acción "masculinizante" en el hígado de la rata.

Ha sido demostrado en roedores (cobayo, hamster, ratón, etc), sobre todo en mamíferos como la rata macho, que la castración o la administración de antagonistas androgénicos durante la vida fetal o perinatal, trae como consecuencia la manifestación de funciones de tipo "femenino" en el adulto (31, 51, 64).

De Moor y Deneef estudiando el patrón enzimático específico del metabolismo del cortisol en homogeneizados del hígado de rata macho, observaron el desarrollo de un patrón "masculino" predeterminado por la acción hormonal androgénica, diferenciación que se observa en los primeros días de vida de la rata macho (18, 19).

Tal parece que en este grupo de animales, el hígado es de tipo "femenino" en ambos sexos al nacer, hasta el inicio de la pubertad en que se hace aparente el sistema enzimático en los púberes machos, inducido por la acción "organizadora" de un factor testicular (andrógenos), en los primeros días de vida; mientras que el hígado de

la hembra púber mantiene sin modificaciones su sistema enzimático "femenino" presente desde el nacimiento.

Los estudios para dilucidar el efecto de los andrógenos en ratas hembras y machos, castradas (neonatales, pre y postpúberes y adultos), sugirieron que la testosterona es la hormona que durante la vida neonatal induce o bien "organiza", nuevos sistemas enzimáticos que se expresan durante la pubertad, disminuyendo o eliminando, las potencialidades básicas "femeninas" (18-20, 84).

Estudios posteriores (22,38,39,56,105), demostraron que el efecto de la acción testicular en la etapa perinatal y prepuberal de la rata, provoca la "masculinización" en el patrón de las enzimas del metabolismo de los esteroides, en el hígado de la rata macho, lo que indujo a Einarsson y Gustafsson (8, 22, 23) a proponer una posible clasificación de enzimas hepáticas en tres categorías, según la respuesta mostrada a la influencia de la acción androgénica perinatal: un primer grupo enzimático con actividades reguladas por factores no gonadales y reversiblemente inducidos por andrógenos; un segundo grupo de enzimas que son programadas irreversiblemente por los andrógenos durante la etapa prepuberal y estimulada reversiblemente por estas hormonas en la etapa postpuberal y un tercer grupo de enzimas cuyas actividades son reguladas primariamente por factores no gonadales y sólo ligeramente afectadas por acción androgénica.

Más tarde, Gustafsson y Stenberg (39) basados en las observaciones de algunos cuadros clínicos que surgen como consecuencia de un metabolismo alterado de andrógenos (5), postularon que a diferencia de la 5α -dihidrotestosterona la forma activa de la testosterona en sus tejidos "blanco" como la próstata, la vesícula seminal y la glándula prepucial; en el hígado de la rata la forma activa de este andrógeno responsable de la "programación" enzimática, es un metabolito diferente y diversos estudios parecen indicar que al igual que en el hígado, los efectos neonatales de los andrógenos influyen en la unión de los esteroides en algunos tejidos considerados como no "blanco", durante la vida adulta de la rata. (98, 101).

Salta a la vista, que el metabolismo de los esteroides en el hígado de la rata constituye un modelo bioquímico adecuado para estudiar los posibles mecanismos por los cuales diversos factores durante el desarrollo perinatal pueden determinar la respuesta a los efectos androgénicos por diversos tejidos en la vida adulta.

De acuerdo con el conocimiento actual sobre los mecanismos de acción hormonal y sus efectos, se plantean diversas incógnitas a resolver:

Aclarar si los mecanismos de las interacciones moleculares mediante los cuales las hormonas androgénicas actúan dentro de los hepatocitos (un órgano no "blanco"), son semejantes a aquellos mecanismos

de acción hormonal descritos para los tejidos clásicamente considerados como "blancos" para estas hormonas.

Establecer cuales son las semejanzas y las diferencias entre los receptores del citoplasma y del núcleo de las células "blanco" y no "blanco" de las hormonas androgénicas.

Identificar, cual o cuales son los metabolitos derivados de la testosterona que son biológicamente activos en el hígado.

Dilucidar los posibles mecanismos que activan los andrógenos hormonales en el hígado de la rata macho que lo modifican permanentemente y lo hacen diferente en diversas funciones con respecto al de la hembra.

Determinar cual o cuales son las funciones biológicas que desarrollan los receptores estrogénofílicos en el hígado.

3.1.1. La demostración de un receptor estrogénofílico y su caracterización parcial.

La demostración en una proteína, de los criterios que definen al receptor (Baulieu, 1971) constituye un reto para los especialistas en el campo, ya que no siempre ha sido posible determinarlos con resultados confiables.

Se considera clásico, que en la investigación de receptores para las hormonas esteroides en los tejidos, la mayoría de los estudios sigue un esquema general que comprende:

1. El estudio de la entrada y retención de una hormona con radiactividad específica.
2. La identificación posterior de la hormona en su forma activa.
3. La detección y el aislamiento de una proteína específica que une al esteroide activo, con gran afinidad, pero no al esteroide inactivo (metabolizado), junto con la demostración de que este receptor se encuentra en mayor cantidad en las células efectoras que en las células insensibles.
4. La demostración de que los esteroides antagonistas compiten y desplazan al esteroide activo del sitio de unión del receptor.

Las características de este esquema junto con los criterios que definen al "receptor" conduce a establecer que los tejidos u órganos "blanco" son aquéllos en los que se ha demostrado la presencia de proteínas receptoras para las diversas hormonas esteroides con actividad biológica específica para esos tejidos. Sin embargo, los estudios de Sandberg y colaboradores en 1973 fueron sorprendentes en sus resultados, al demostrar en un órgano considerado como no "blanco", el páncreas del perro, la presencia de proteínas receptoras a estradiol; hormona esteroide que se consideraba específica del sistema reproductor incluyendo el útero, la vagina y las glándulas mamarias clasificadas como sus órganos blancos. El estudio

de los receptores pancreáticos a estradiol, demostró que éstos son similares en sus características a los receptores de estradiol en sus tejidos "blanco" (82, 83). Otros grupos de investigadores demostraron, aunque en concentraciones más bajas, la presencia de receptores estrogénicos con gran afinidad para unir al estradiol en diversos tejidos considerados "no blancos" como el riñón (57), las glándulas adrenales (17,63) y el hígado (2,3,24,77,99).

La mayoría de estos tejidos mostraron cambios característicos en respuesta a las hormonas estrogénicas, por ejemplo Eisenfel y colaboradores (3, 24), encontraron en el hígado de la rata, que la administración de estradiol aumenta la producción de una α -2 globulina, sustrato de la renina plasmática. En estudios comparativos establecen que los estrógenos se unen un 6% menos al hígado que al útero. Estas macromoléculas no son específicas de especie ya que fueron encontradas en el hígado de otros mamíferos, como el ratón, el hamster, el conejo y el mono.

Los autores proponen que tal vez, la presencia de un receptor para los estrógenos en el hígado de mamíferos, participa en mecanismos de regulación de la síntesis selectiva de proteínas del plasma. Esta suposición se ve apoyada por la demostración de que la aplicación de hormonas estrogénicas aumenta la producción de algunos factores de la coagulación y de otras proteínas del suero, que por lo general sólo se incrementan durante el embarazo.

En otras especies como las aves, los estrógenos inducen la producción de vitelogenina, una proteína componente de la yema del huevo.

En el ovario, los estrógenos modulan la unión de la hormona estimulante del folículo (FSH), al igual que por vía ovárica parecen mediar el crecimiento folicular (54).

En trabajos preliminares no publicados, Hernández-Montes (43) y Olvera (68) determinaron la presencia del receptor estrogénico en el citosol del hígado y del páncreas durante el desarrollo de la rata macho y la hembra. Establecieron que el receptor hepático aparece en los primeros días del nacimiento, con la mayor capacidad para unir estradiol al séptimo día.

En cambio, el receptor estrogénico del páncreas, sólo fue evidente en las ratas adultas y no en los animales menores de 23 días de edad.

Las características de esta molécula son:

- 1) En ratas neonatas muestra una gran asociación con estradiol-³H saturándose a partir de 2×10^{-8} M de estradiol.
- 2) La estereoespecificidad de la molécula es: 17-β estradiol > estrona > dietilestilbestrol y con nula afinidad por estriol, progesterona, testosterona y dehidroepiandrosterona.
- 3) El estrogénico hepático mostró un coeficiente de sedimentación de 4.5 S y un radio molecular de 38 Å; con un peso molecular de 70 560 daltones y un coeficiente friccional F/F₀ de 1.39.

3.2 La acción "masculinizante" en el hipotálamo de la rata.

El estudio de los posibles efectos de la acción de las hormonas gonadales sobre la reproducción y la diferenciación sexual en los mamíferos, ha contribuido ampliamente al conocimiento de las interrelaciones que existen entre las funciones endócrinas, como la ovulación y la aparición de los caracteres sexuales secundarios con las funciones neurales referentes a la conducta sexual y los fenómenos del comportamiento relacionados con ella; es decir, la compleja interacción entre los sistemas nervioso y endócrino (sistema neuroendócrino), que mantienen y regulan la integridad de los organismos superiores (9).

Durante la etapa perinatal, se acepta que a nivel de algunas especies de mamíferos como la rata, el cerebro de la hembra y el macho son idénticos funcionalmente y que es inmediato a la etapa de la pubertad, que los animales muestran diferencias funcionales del cerebro; ya que la hembra presenta la secreción cíclica de las gonadotropinas LH y FSH, la conducta de lordosis y la ovulación, mientras que la rata macho exhibe la liberación tónica (continua), de LH, y la conducta de monta y de eyaculación (7, 36).

Los efectos producidos por la administración de las hormonas sexuales androgénicas y estrogénicas a las ratas macho y hembra castradas ya sea en la etapa perinatal, pre o postpuberal o adulta, de-

muestran que estas hormonas modifican el comportamiento sexual de estos animales, al actuar sobre el cerebro inmaduro por una acción "organizadora" a nivel del sustrato neural, sobre el cual actuarán las hormonas gonadales en la vida adulta; es decir, que las diferencias sexuales en las funciones del cerebro son establecidas en forma permanente o "programada" por el medio hormonal que predomina en la rata, durante los primeros días de nacida (36, 41, 74).

La administración de la testosterona, durante la etapa del desarrollo uterino en la etapa perinatal (consideradas como etapas críticas del desarrollo cerebral fetal o infantil) en varias especies, produce una "masculinización" hipotalámica, que se manifiesta por la secreción tónica de LH y que en el estado adulto exhibe una conducta sexual masculina independiente del sexo genético del animal. Estos estudios permiten proponer la hipótesis de que la acción androgénica de las hormonas testiculares, modifican el cerebro "femenino" que han heredado los machos genéticos recién nacidos (7, 35, 88, 89).

Por otra parte, la castración de las ratas machos o hembras perinatales, en ausencia de la administración de los andrógenos y los estrógenos exógenos; da lugar en la etapa adulta, a la presentación del patrón de secreción cíclica de las gonadotropinas y de la lordosis, características de la conducta sexual femenina (7, 32, 34, 88). Estos resultados indican, en cuanto a la ovariectomía en la etapa infantil de la rata, que esta glándula no participa

en forma importante en el proceso de la diferenciación sexual, mientras que la presencia de un testículo funcional en una etapa crítica del desarrollo cerebral va a determinar en gran medida, el comportamiento sexual masculino que el animal mostrará en el estado adulto, independientemente de su sexo genético.

4. Objetivos del trabajo experimental.

En los antecedentes del presente trabajo se describió que las hormonas gonadales son "mensajeros" químicos que sintetizadas en el ovario y el testículo son transportadas en la sangre y que al interactuar con sus tejidos específicos, efectúan cambios metabólicos, morfológicos y conductuales.

En un animal íntegro, la inyección del estradiol radiactivo mostró que en los órganos reproductores, la característica más notable fue la capacidad de retención de la hormona por más tiempo, que originó el concepto clásico de "tejido blanco"; sin embargo, la aparición de técnicas con sensibilidad incrementada, demostró que los órganos no reproductores o "no blancos" también tienen la propiedad de interactuar con gran afinidad con los estrógenos.

Los estudios acumulados sobre los mecanismos de acción de los estrógenos y la demostración de proteínas con características semejantes a los receptores estrogénofílicos en los tejidos "no blanco" de la rata, condujeron a postular la hipótesis de que durante la etapa perinatal, estas hormonas "masculinizan" a los órganos no reproductores, el hígado y el hipotálamo a través del efecto "organizador" el cual "programa" diversos patrones enzimáticos hepáticos y diversas funciones hipotalámicas, que en la etapa adulta manifiestan la marcada diferencia sexual entre el macho y la hembra, independientes de su sexo genético.

Ya que la acción mostrada por los esteroides tanto en los estudios realizados por Gustafsson en el hígado de la rata (38-40) como en los realizados por Gorski en el hipotálamo de la misma especie (33-36), el efecto organizador de la hormona esteroide se debe efectuar en los primeros días de nacidos; parecería que la presencia de esta proteína receptora de estrógenos, estaría regulada por las mismas hormonas gonadales y que la disminución en su concentración podría verse afectada por la presencia o ausencia de los esteroides.

Por tanto el estudio de la gonadectomía en el primer día del nacimiento de las ratas hembra y macho, serviría para conocer si el aumento en la concentración del receptor, depende de la presencia de hormonas; o bien, si al aumentar la concentración de las hormonas circulantes ocupan los sitios receptores del citosol e impiden que el estrógeno radiactivo interaccione con él. En ambos casos el patrón de conjugación del receptor mostraría los mismos datos obtenidos por Olvera (68).

El propósito de este trabajo es estudiar en la rata recién nacida, el efecto de la gonadectomía sobre la presencia del receptor hepático al estrógeno y poder esclarecer cuál de los mecanismos mencionados está involucrado en el control de la concentración circulante lo que nos serviría como un primer paso para aclarar la presencia y la función de esta proteína en el citosol del hígado de la rata.

5. Material y Métodos

5.1 Hormonas esteroides

5.1.1 Estrógeno radiactivo

Se empleó al 2, 4, 6, 16, 17⁻³H estradiol con una actividad específica de 160 Ci/nmol (New England Nuclear). Ya que el radiocromatograma de este lote de reactivos mostró para esta molécula, una sola banda con una radiopureza del 99% reportada por los fabricantes, no fue necesario realizar algún proceso de purificación posterior.

5.1.2 Esteroides no radiactivos

El 17 β -estradiol, la estrona, el estriol y la testosterona fueron adquiridos de Syntex, S.A. Los métodos utilizados para establecer la pureza de estos reactivos fueron la cromatografía en capa fina y la determinación del punto de fusión.

Para la cromatografía en placa fina se emplearon cromatoplasmas de Silica-Gel F₂₅₄ (de 0.25 mm de espesor) y de 10 cm de ancho x 20 cm de largo, de los laboratorios Merck.

En la placa, el origen fue marcado a 1.5 cm del borde con respecto al largo; con una línea continua se marcó el frente a una distancia de 7.5 cm y paralelo al origen.

Para definir la pureza, cada esteroide (1 mg/ml) fue solubilizado en 3 ml de cloroformo-metanol 1:1 concentrado a 0.5 ml por evaporación en baño María bajo atmósfera de nitrógeno. En el origen de la placa se depositaron porciones de 10 μ l de cada concentrado, con una separación de 1.5 cm de distancia entre cada punto de aplicación e intercalados entre las sustancias patrón o estándares.

En las cámaras separadoras de 22 x 6.5 x 12.5 cm de altura se agregaron 50 ml de la mezcla de benceno-etanol 9:1. Las placas fueron introducidas con el lado del origen hacia el fondo de la cámara; al llegar el eluyente al frente (15 a 20 min aproximadamente), las placas fueron sacadas de las cámaras y secadas a temperatura ambiente durante 15 minutos. El revelado de las placas se realizó con vapores de yodo metálico en cámaras de vidrio.

En los casos en que los concentrados de esteroides mostraron impurezas, comparados con las sustancias patrón en las que se observó una sola mancha, fue necesario proceder a la purificación de estos reactivos.

5.1.3 Purificación por cristalización del 17 β -estradiol.

Un gramo de 17 β -estradiol se disolvió en 25 ml de etanol recién destilado y fue concentrado hasta el volumen de 1 ml, bajo atmósfera de nitrógeno en baño María; se agregó acetato de etilo lentamente (hasta que la solución se enturbió), se dejó en reposo hasta la

aparición de cristales a temperatura ambiente. El punto de fusión de los cristales secos se determinó en un aparato Carl Zeiss Mettler FP₂. El valor del punto de fusión obtenido se tomó como criterio de pureza; cuando este valor no coincidió con el reportado en la literatura, se repitió el procedimiento de cristalización. (Datos en la Tabla 1).

5.2 Otros reactivos.

El EDTA (ácido etilendiaminotetracético), el TCA (ácido tricloroacético), el MgCl₂, el KCl, el acetato de potasio, la sacarosa y el tris-HCl fueron obtenidos de los laboratorios Merck Darmstad (Alemania); los siguientes reactivos fueron obtenidos de Estados Unidos: la hidroxiapatita, la albúmina fracción V de Cohn y el estándar de ADN de timo de ternera de Sigma Chemical; la difenilamina y el ácido sulfúrico concentrado de Baker; el acetaldehído fue de Eastman y el ácido perclórico de Allied Chemical; el PPO (2,5-difeniloxazol), y el 1,4-bis-2-(5-feniloxazol) benceno fueron de Amersham/Searle; la acetona, el cloroformo, metanol y el acetato de etilo de Dade-Harleco; el éter de petróleo, el ácido acético glacial y el benceno fueron de Mallinckrodt Chemical. Todos los solventes fueron purificados por destilación.

En el presente trabajo se emplearon diversas soluciones amortiguadoras, que para propósitos de simplificación de los métodos, se abreviaron de la siguiente forma:

T E (tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.0015 M, pH 7.4)

T K (tris-HCl 0.05 M, KCl 0.1 M, pH 7.4)

T P (tris-HCl 0.05 M, KH_2PO_4 0.001 M, pH 7.2)

T S (tris-HCl 0.05 M, pH 7.5 KCl 0.025 M, MgCl_2 0.005 M,
sacarosa 0.25 M)

T S 2.3 (tris-HCl 0.05 M, pH 7.5, KCl 0.025 M, MgCl_2 0.005 M,
sacarosa 2.3 M)

SSF (Solución salina fisiológica, NaCl al 0.85%)

5.3 Animales de experimentación.

5.3.1 Apareamiento.

Para el trabajo experimental se emplearon las ratas de la cepa Wistar. Los animales fueron destetados a los 21 días, seleccionados de acuerdo a su sexo y separados en grupos, las hembras de 5 a 6 animales y los machos de 2 a 3 por jaula. La alimentación fue "ad libitum" con dieta de "purina".

Cuando los animales adultos jóvenes alcanzaron la capacidad de reproducción, se reunieron en una jaula 2 machos con 4 a 6 hembras vírgenes. A los 15 días, las hembras que resultaron embarazadas se aislaron en jaulas individuales. El momento del alumbramiento se registró como el día cero.

5.3.2 Selección para el estudio.

Con el propósito de determinar la variación de la capacidad para unir el estradiol con el citosol hepático, tanto de la rata intacta, como de la castrada, en los diferentes estadios de su desarrollo; se emplearon ratas de ambos sexos intactas o castradas de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23 días de edad. Los animales inmaduros fueron separados de su madre hasta el día en que fueron sacrificados. Cada madre sólo amamantó de 6 a 8 animales, a fin de garantizar una lactancia adecuada, las camadas fueron destetadas hasta los 21 días de nacidas.

Para cada uno de los experimentos se emplearon camadas de cuando menos 6 ratas de cada una de las edades y por cada sexo, las cuales a su vez fueron procesadas en grupos de 3 animales y así tener un mínimo de cuatro casos para cada edad y sexo. (O sea un mínimo de 12 animales por caso).

5.3.3 Ovariectomía y orquidectomía total de las ratas neonatas.

La eliminación de las gónadas se realizó por el procedimiento siguiente:

5.3.3.1 Anestesia por hipotermia.

Las ratas con 18 a 24 hs de nacidas fueron seleccionadas de acuerdo a su sexo y marcadas por perforaciones en las orejas para facilitar su identificación posterior; cada animal fue envuelto en una gasa

de 12 x 12 cm y colocado dentro de hielo frapé y cubierto con él a una profundidad de 15 cm, por un tiempo de 10 min.

5.3.3.2 Extirpación de las gónadas.

La rata fue sacada del hielo e inmediatamente colocada en la mesa de operaciones, bajo el microscopio estereoscópico de microcirugía. El vientre del animal se limpió asépticamente con solución de benzal-merthiolate.

Por una incisión quirúrgica en la parte media del vientre próxima a los órganos genitales y con ayuda de unas pinzas curvas de iris, se localizaron y expusieron los ovarios o los testículos y con tijeras se cortaron las trompas o los conductos deferentes, según el caso, para eliminar a las gónadas femeninas o masculinas respectivas. La suturación de la herida se hizo con hilo quirúrgico 3 cerros estéril y se cubrió la zona con merthiolate.

5.3.3.3 Integración a la camada.

El animal ya castrado, se envolvió en gasa y se colocó bajo lámparas con temperaturas controladas entre los 35 a 37°C, por intervalos de una a dos horas. El animal ya recuperado se impregnó en todo su cuerpo con aceite comestible de cártamo y se regresó a la jaula correspondiente; con esta medida se evita el canibalismo que la madre mostró con los críos operados en los primeros experimentos.

5.4 Preparación del citosol.

Los animales intactos ó castrados seleccionados de acuerdo con la edad a estudiar, fueron sacrificados por decapitación con tijeras. La sangre se recolectó en tubos con heparina. El animal fue abierto de inmediato en la parte media del vientre y extraído el hígado, el cual se colocó en solución de TK fría, cada órgano se lavó de 3 a 4 veces con la misma solución para eliminar la mayor cantidad de sangre. La grasa y el tejido conectivo fueron eliminados del hígado y éste fue cortado finamente con tijeras estériles, el macerado fue lavado tres veces más con solución TK fría. El tejido fue secado con gasas, pesado y resuspendido con TS en una relación de 3:1 vol/peso. Posteriormente el tejido fue homogenizado en homogenizadores tipo Potter-Elvehjem de vidrio esmerilado (Vitro USA) y émbolo de teflón, empleando un motor Caframo RZ-R1.

Al émbolo se le aplicó una presión manual durante 20 segundos con períodos de interrupción de 1 min y se repitió 3 veces. Todas las manipulaciones se llevaron entre los 2 a 3°. El homogenizado fue filtrado a través de doble tela de organdí y diluido con TS en una relación de 5:1 vol/peso. El filtrado fue centrifugado en un rotor de ángulo fijo tipo SS-4.34 a 1 110xg durante 20 min a 4° en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B. El sobrenadante se decantó y fue centrifugado con rotor de ángulo fijo tipo Ti-50 a 105 000 xg por dos horas a 4°, en una ultracentrífuga Beckman L2-65 B, para obtener el sobrenadante citoplásmico (citosol). Cada homogeneizado

fue preparado con los hígados de 3 animales de la misma camada.

5.5 Preparación del Plasma.

La sangre de los animales sacrificados por decapitación, se colectó en tubos heparinizados y fueron centrifugados en un rotor de ángulo fijo Sorvall tipo Sm-24 a 1 000 x g durante 10 min a 4°, para obtener el plasma en el sobrenadante, el cual se separó en alícuotas de 0.2 ml y se conservó congelado a -21°.

5.6 Técnica de conjugación del estradiol con el citosol.

La determinación de la unión del 17 β -estradiol-³H al citosol del hígado se realizó por el método utilizado por Olvera, M.A. (68) quien modificó el procedimiento de la hidroxapatita (HAP) descrito por Erdos y cols. (25). Estos autores diseñaron un método sencillo para medir la unión del "receptor uterino" con estradiol-³H, para ello emplearon columnas de 1 cm de ancho x 5 cm de altura con base de fibra de vidrio, las cuales fueron empacadas con 1.4 ml de HAP. De esta manera el complejo "esteroide-receptor" se absorbe al gel mientras que el estradiol no unido se eluye libremente. La modificación de Olvera, a esta técnica consistió en agregar la suspensión de HAP directamente al tubo de incubación del citosol y logró iguales resultados de la separación del estradiol conjugado y el estradiol libre.

5.6.1 Condiciones de incubación del citosol.

La unión total del estrógeno radiactivo fue obtenida al incubar

durante 18 hs a 4° y en un volumen final de 0.2 ml, los siguientes reactivos: 0.09 ml de TE, 0.01 ml de una solución 2×10^{-7} M de 17β -estradiol- ^3H , 0.05 ml de etanol destilado y 0.05 ml de citosol (18 a 24 mg proteína/ml); bajo estas condiciones la concentración final de 17β -estradiol- ^3H es de 1×10^{-8} M. Cada preparación citosólica fue determinada por triplicado.

La unión inespecífica fue obtenida adicionando a una mezcla de incubación igual a la descrita anteriormente, una concentración final de 1×10^{-6} M de estradiol no radiactivo (exceso de 100 veces sobre la radiactiva).

5.6.2 Separación del conjugado por adsorción con hidroxapatita.

Terminado el tiempo de incubación, a cada una de las mezclas se agregó 0.05 ml de la suspensión de HAP al 37.5% en TP, los tubos fueron agitados enérgicamente en un vortex por 10 segundos cada 3 minutos durante un periodo total de 21 min, a cada tubo se agregó 4 ml de TK frío, se agitaron y centrifugaron a $1\ 000 \times g$ durante 5 min a 4°. El sobrenadante fue descartado y la pastilla de hidroxapatita lavada 3 veces más, igual que en la forma arriba descrita, con 4 ml de la solución de TK fría. Después de separar la radiactividad no unida al estrogénofilo, por medio de los lavados, el estrógeno radiactivo unido a las proteínas fue extraído al adicionar a la pastilla de HAP lavada, 4 ml de etanol destilado, agitando enérgicamente en vortex, cada tubo, durante 10 seg cada 3 min, por un lapso de 15 min, después fueron centrifugados durante 10 min a $800 \times g$. El sobrenadante fue decantado en viales para medir la radiactividad.

5.6.3 Medida de la radiactividad.

A cada vial con el extracto etanólico del 17β -estradiol se le agregaron 10 ml de líquido de centelleo que es una mezcla de 4 g de 2,5-difeniloxazol y 0.126 g de 1,4-bis-2(5-difeniloxazol) benceno disueltos en un litro de benceno. La radiactividad de las muestras fue medida en un contador de centello líquido Marck II de Nuclear Chicago, con una eficiencia de conteo de 35-40%. Todas las muestras fueron corregidas a 100% de eficiencia empleando estándares externos.

La unión específica fue calculada restando a la radiactividad total, la unión inespecífica de acuerdo a la siguiente relación:

Unión total = Unión específica + Unión inespecífica.

5.7 Técnicas para el estudio de la unión del estradiol a la fracción nuclear.

Para estudiar la presencia de los receptores a estradiol en el hígado de la rata, era necesario determinar la capacidad de unión por el ^3H -estradiol en la fracción nuclear. Para este propósito se pusieron en práctica las siguientes técnicas:

5.7.1 La preparación y separación de núcleos purificados.

5.7.2 El proceso de extracción del ADN.

5.7.3 La cuantificación colorimétrica del ADN.

5.7.4 La técnica de conjugación del estradiol.

5.7.1 La preparación y separación de núcleos purificados.

Los procesos de aislamiento de los núcleos, deben garantizar su integridad estructural y sus actividades funcionales y encontrarse libre de la contaminación por material extracelular o citoplásmico, en la práctica, es difícil contar con un método que cumpla con todos estos requisitos. El método debe contener tres fases de operación técnica: 1) la efectiva ruptura celular de los tejidos, 2) el sistema solvente que establezca la estructura y la composición nuclear y 3) la separación física de los núcleos del material extranuclear solubilizado. Tomando en consideración estas características, se seleccionó el método propuesto por Blobel y Potter (10) el cual a su vez fue modificado por Mújica de H.A. (62).

Para la obtención de los núcleos, el hígado de la rata se sujeta a el procedimiento ya descrito para la preparación del citosol, hasta la filtración del homogeneizado; al filtrado se le agregó el amortiguador TS frío en una relación de 5:1 vol/peso y fue centrifugado en un rotor de ángulo fijo Sorvall tipo SM-24 a 1000 x g por 10 min a 4°, el residuo se resuspendió en un rotor en 15.4 ml de TS 2.3 M y se trasvasó a un homogenizador tipo Potter-Elvehjem de vidrio esmerilado (Konté Glass Co.), se homogenizó a velocidad moderada por

20 segundos, 2 veces por intervalo de 1 minuto a 2°; se agregó 4.6 ml de la solución de TS y se repitió la misma operación de homogeneización, la suspensión se estratificó sobre 10 ml de TS 2.3 M contenido en un tubo de nitrato de celulosa y fue centrifugado en el rotor de ángulo fijo tipo Ti-45 a 23 000 rpm por dos horas. Al término del tiempo, el sobrenadante se decantó y el tubo invertido se dejó sobre un papel absorbente, posteriormente se limpiaron las paredes internas y se regresó a la posición vertical. Una manera de verificar si la pastilla contenía los núcleos íntegros y sin detritus, fue preparar un frote de esta muestra, teñirlo con azul de metileno y observar la preparación al microscopio óptico con objetivos seco débil y fuerte.

5.7.2 El proceso de extracción del ADN.

Para establecer la capacidad de unión del estradiol al núcleo en función de la concentración del ADN fue necesario estandarizar el procedimiento de extracción del ADN propuesto por Setaro y Morley (85) que en el laboratorio fue modificado de la manera siguiente:

El hígado de la rata fue preparado para su homogeneización como ya fue indicado para la preparación del citosol. A partir del cual se separó la pastilla nuclear obtenida a 1 100 x g. Por cada gramo de tejido que inicialmente fue utilizado en la preparación del citosol, se agregó la solución SF fría en una relación de 4:1 vol/peso y se

homogeneizó por presión manual al émbolo por 8 veces en un minuto con períodos de interrupción de 0.5 min durante 5 minutos; este homogeneizado nuclear, tal como se describe en el esquema de la Figura 5, fue sujeto a centrifugación en el rotor de ángulo fijo tipo S.S-4.34 a 3 500 rpm por 20 min a 4° y el residuo resuspendido cada vez en las soluciones en una relación 4:1 vol/peso excepto para el PCA que se agregó en la relación 2:1 y 0.5:1 vol/peso respectivamente.

5.7.3 La cuantificación colorimétrica del ADN.

Aún cuando Giles y Meyer (27) desde hace varios años, reportaron un método colorimétrico para la determinación del ADN por reacción con la Difenilamina (DFA), en el laboratorio fue necesario estudiar cada una de las condiciones establecidas por los autores con el propósito de adaptar la técnica a las características propias del trabajo experimental.

Los reactivos se prepararon y conservaron en la forma siguiente:

- a) Solución patrón del ADN concentrada 10 mg del ADN se disolvieron en 8 ml de NaOH 5 mM por agitación durante 30 min y se aforó a 10 ml con la misma solución. Un ml de este patrón se le agregó 4 ml de NaOH 5 mM y 5 ml de PCA 2 M, se calentó a 70° por 25 min. Esta fue la solución de trabajo; ambas soluciones fueron estables por 30 días a 4°.

b) El reactivo de DFA se preparó por disolución de 4 g del reactivo en 100 ml de ac. acético glacial (ambos de los Laboratorios Merck). La solución se preparó al momento y se desechó el sobrante.

c) Solución de acetaldehído. 0.5 ml del reactivo se diluyó con 11.5 ml de agua desionizada, se distribuyó en alícuotas de 1 ml, se congeló y conservó a -21° . Al momento de utilizarse 1 ml de esta solución se diluye con 20 ml de agua desionizada. La preparación de este reactivo fue a 4° y sólo se conservó por una semana.

La curva de calibración consistió en:

	T U B O S						
REACTIVOS*	1	2	3	4	5	6	7
DFA	0.5 a todos los tubos						
Sol. patrón ó problema	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.0 a 0.5
PCA 2 M	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0	0.0
Acetaldehído	0.03 a todos los tubos						
Incubación	18 horas a 37°						
Lectura	600 nm						

*Volumen en ml

5.7.4 La técnica de conjugación del estradiol.

De acuerdo con el esquema de trabajo ya descrito para la purificación de los núcleos, una vez que se obtuvo la pastilla de éstos, se resuspendieron por agitación suave en el amortiguador TE en relación de 5:1 vol/peso.

5.7.4.1 Condiciones de incubación de la fracción nuclear.

En tubos de 10 x 13 mm se colocó 0.25 ml de la suspensión de núcleos 0.01 ml de la solución de 17β -estradiol- ^3H y 0.24 ml de la solución de TE.

El tubo control para la unión inespecífica contuvo una mezcla igual a la anterior con una concentración final de 1×10^{-6} M de estradiol no radioactivo (exceso de 100 veces sobre la radioactividad).

Para la medición de la unión total del estradiol a la fracción nuclear, los tubos fueron incubados a 4° por 18 - 20 horas; después del cual se agregó 2 ml de la solución de TE frío a cada tubo y fueron centrifugados a 1 100 xg a 4° por minuto. La pastilla nuclear se lavó por resuspensión en 1.5 ml de TE frío, con agitación en vortex por 1 minuto y centrifugación a 1 100 xg por 10 minutos a 4° , por cuatro veces. Un ml de etanol absoluto destilado fue agregado y la pastilla resuspendida por agitación en vortex, los tubos se incubaron en un baño a 30° por 20 minutos. Todos los tubos fueron agitados en vortex enérgicamente, durante 10 segundos cada

3 minutos, por un lapso de 12 minutos con reposo por 5 minutos y centrifugados a 1 000 x g por 10 minutos; el sobrenadante fue decantado en viales para medir la radiactividad.

5.8 La cuantificación de proteínas.

La cuantificación de las proteínas en las muestras del citosol del hígado y plasma de la rata fueron determinados por el método del Microbiuret (44) que fue estandarizado en el laboratorio; para las curvas de calibración se utilizó como la solución estándar a la albúmina bovina fracción V de Cohn, con un grado de pureza electroforética de 99.5%.

6. Resultados.

6.1 Patrón de la unión del 17β -estradiol- ^3H con el citosol del hígado de la rata en las diferentes etapas de su desarrollo.

6.1.1 Ratas recién nacidas y prepúberes intactas.

La fracción citoplásmica (citosol) del hígado de las ratas de 1 a 23 días de edad, mostró una capacidad variable de unir al 17β -estradiol- ^3H . En la Tabla 2 se exhibe la concentración de unión del estradiol radiactivo con el citosol hepático de los grupos de animales estudiados. La Figura 6 ilustra que en el citosol del hígado de las ratas hembra y macho, esta capacidad de unir estradiol se observa desde el primer día de nacidos, aunque las cantidades unidas son bajas*, menores de 100 fmoles de 17β -estradiol- ^3H /mg de proteína, pero que esta capacidad de asociación va en aumento hasta el séptimo día, que para ambos sexos, es la edad en la cual 1.5 pmol/mg de proteína fue la cantidad máxima de estradiol radiactivo unido por el citosol. En las ratas mayores de 7 días, el citosol hepático empezó a disminuir su capacidad de unión por el estradiol, hasta que ésta se pierde casi por completo en ratas de 23 días, menos de 20 fmoles de 17β -estradiol- ^3H .

*En este trabajo se adoptó la siguiente nomenclatura propuesta por Olvera, M.A. (68), para designar la intensidad de la capacidad

del citosol hepático para unir el estradiol radioactivo:

Unión	pmoles de 17β -estradiol- ^3H /mg proteína
Muy disminuída	menor de 0.02
Disminuída	entre 0.02 y 0.1
Grande	mayor de 0.1

Se determinó también la capacidad de unión de la fracción citoplásmica del hígado de las ratas de 35, 45 y 60 días de edad. Los valores obtenidos fueron de 7.8 a 10.5 fmoles de 17β -estradiol- ^3H /mg de proteína. Estos resultados sugieren que la baja capacidad de unión del estradiol por citosol hepático después de los 23 días de edad, parece mantenerse constante.

6.1.2 Ratas recién nacidas y prepúberes.

El citosol hepático de las ratas hembra y macho de diferentes edades, que fueron castradas en el primer día del nacimiento, presentó un patrón con características de asociación con el 17β -estradiol- ^3H semejantes al mostrado por las ratas intactas de la misma edad y sexo. La Tabla 3 muestra la concentración de unión del estrógeno radiactivo con la fracción citoplásmica hepática de las ratas de 1 a 23 días de edad, gonadectomizadas el día de su nacimiento. Los datos se muestran en la Figura 7 donde se observa que la fracción citoplásmica de estos animales presenta una capacidad disminuída

de unión del estradiol radiactivo en los primeros días de nacidos menor de 100 fmoles de 17β -estradiol-³H/mg proteína, hasta los siete días de edad en que la cantidad unida por el citosol se incrementó a 1.57 pmoles del 17β -estradiol-³H/mg proteína. Esta capacidad de unión del citosol hepático por el estradiol radiactivo disminuye rápidamente, igual que en el de las ratas intactas, ya que la capacidad de unión fue menor de 20 fmoles de 17β -estradiol-³H/mg de proteína, a los 23 días.

6.2 Patrón de unión del 17β -estradiol-³H con el plasma de las ratas intactas y castradas.

Tanto en las ratas intactas como en las castradas, desde el primer día de nacidas, el plasma mostró la capacidad de unir el estradiol radiactivo. En la Tabla 4 se muestran los pmoles/mg del estrógeno radiactivo unido por el plasma de ambos grupos con edades de 1 a 23 días. La Figura 8 muestra gráficas las cuales ilustran que la unión del estradiol radiactivo fue cercana a 1.0 pmoles/mg de proteína plasmática en las ratas con edades de 1 a 11 días y que a partir del día 13 esta capacidad disminuyó progresivamente.

Como se observa en esta figura, no hubo diferencias entre el patrón de unión del 17β -estradiol radiactivo con el plasma de las ratas castradas comparado con el patrón de unión del plasma de las ratas intactas, a la misma edad.

6.3 Patrones de la unión del 17β -estradiol- ^3H con el citosol del hígado y con el plasma de la rata intacta en las diferentes etapas de su desarrollo.

En el análisis del patrón de conjugación del estradiol radiactivo unido por el citosol hepático, se consideró conveniente presentar en forma conjunta estos resultados con aquéllos obtenidos en la conjugación de la hormona con el plasma de las ratas intactas recién nacidas y prepúberes de la misma edad y sexo. La Figura 9 muestra en paralelo las gráficas de las figuras 6 y 8. La Figura 9 ilustra que los valores de conjugación del citosol hepático y del plasma por el estradiol tritiado no muestran entre sí ninguna correlación, en las diferentes etapas del desarrollo de la rata.

7. Discusión y conclusiones.

Diversos autores han demostrado en varias especies animales, la presencia de receptores estrogénofílicos en los tejidos de órganos no relacionados con la reproducción (2,3,17,24,57,77,83,99).

En el presente estudio, se demostró que desde las primeras etapas del desarrollo de la rata la fracción sobrenadante del hígado muestra una importante capacidad de unir el estradiol.

En la revisión de la literatura no se encontraron reportes sobre el estudio de la ontogenia de estos receptores estrogénofílicos hepáticos durante las etapas del desarrollo de la rata. Solo se tiene una información limitada y en ocasiones contradictoria en cuanto al conocimiento de las propiedades de interacción de los estrógenos con el citosol hepático en las ratas adultas.

A este respecto, los primeros reportes de la presencia de receptores a hormonas estrogénicas en hígado fue en el pollo, realizado por Arias y Warren, aunque otros autores fueron incapaces de demostrar la presencia de estas proteínas en la misma especie (2, 71).

En 1974, van Beurden (99) describió en la rata la presencia de receptores a estrógenos en tejidos de diversos órganos, entre ellos el hígado; sin embargo, fue hasta dos años más tarde, que Eisenfeld presentó un estudio más completo sobre las características del receptor hepático como la gran afinidad y especificidad por el

17 β -estradiol en la rata adulta (24).

En el examen del citosol del hígado de las ratas hembra y macho recién nacidas, los resultados indican que esta fracción celular contiene una molécula con gran capacidad para asociarse al estradiol.

En cuanto a la cantidad unida del estradiol por mg de proteína del sobrenadante hepático, existe un aumento a partir del primer día (0.082 pmol) hasta alcanzar una unión máxima al séptimo día del nacimiento (1.5 pmol), estos valores disminuyen en el vigésimo tercer día, después del cual la relación de la unión citosólica permanece casi constante igual que en las ratas adultas (0.010 pmol).

En estudios con ratas prepúberes de una sola edad (27 días), Eisenfeld reportó que el citosol hepático unió al estradiol con una capacidad cinco veces menor que la encontrada en los receptores del hígado de la rata adulta (24).

Estas observaciones son contradictorias a los resultados aquí reportados y a los obtenidos por Olvera (68), ya que no observamos diferencias significativas en la capacidad de conjugarse al estradiol del citosol de las ratas inmaduras de 23 días con respecto a las ratas adultas (entre 10 y 20 fmoles de estradiol radiactivo/mg proteína), en ambos grupos. Aún más, los autores reportan sus valores más bajos de la unión del citosol en ratas adultas (8.7 fmol

de estrógenos/mg proteína).

Nuestros resultados son comparables a los mostrados por Clark y Gorski, quienes investigaron la ontogenia del receptor estrogénico del útero de la rata. Los autores encuentran que la capacidad de conjugación del citosol uterino por el estradiol radiactivo alcanzó la máxima unión al décimo día de edad, tanto en las ratas íntegras como castradas; esta capacidad de unión disminuyó y permaneció en una relación constante después del día 23, concluyendo estos autores que la molécula estrogénica no es dependiente de la secreción estrogénica del ovario (14).

Por los resultados de nuestros estudios en el hígado de la rata neonata, el incremento en la unión del estrógeno parece ser una síntesis; inducida por la presencia in situ de pequeñas concentraciones del estrógeno; aumenta la concentración hasta el séptimo día y después ocurre una disminución que podría ser explicada si en el plasma circulante se aumentara la concentración del estrógeno, el que se uniría al receptor y dejaría un número menor de moléculas del receptor libre para unirse al estradiol radiactivo.

Sin embargo, el hecho de que en los animales gonadectomizados se haya observado un patrón ontogénico igual al de los animales íntegros, elimina la posibilidad de que un aumento en la concentración circulante del estradiol ocupe los sitios libres del receptor hepá-

tico, lo que sugiere que este no es el mecanismo involucrado.

Ya que Gorski y col. (14) muestran que en el plasma de la rata no existen estrógenos presentes en los primeros días de nacida, parecería que debe ser un metabolito diferente el que ocasionara la acción inductora sobre el receptor.

Los datos sugieren que la presencia del receptor facilitaría la acción de una molécula de estrógeno sintetizada intracelularmente y que esa molécula podría ser sintetizada a partir de un andrógeno producido por las gónadas (80, 100), que al llegar al hígado será metabolizado in situ en un estrógeno (55, 70); el cual no podría ejercer su acción de diferenciación celular en ausencia de la proteína receptora (48, 86).

Durante la caracterización de los receptores uterinos en las ratas recién nacidas, el grupo de Baulieu (6) demostró que la fracción citosólica se encontró contaminada con una proteína fetal con gran afinidad por las hormonas estrogénicas. Además existen evidencias en la literatura (6, 60), de que la fracción citosólica de un tejido debe considerarse como una "fracción operacional" formada por varios componentes de distintos tejidos (la sangre, por ejemplo).

Por estas razones, otro propósito del trabajo experimental fue realizar estudios en paralelo, midiendo al mismo tiempo la capacidad

para asociar al estradiol en el plasma y en el citosol hepático del mismo animal, íntegro o castrado en las diferentes etapas de su desarrollo. Al comparar la capacidad de conjugación del 17β -estradiol- ^3H en las dos muestras, los resultados indicaron que existen diferencias acentuadas entre ambas proteínas: primero, que los períodos de aparición son distintos, ya que en el plasma la capacidad de conjugación con el estrógeno es muy grande desde el primer día; mientras que en la fracción citosólica la unión es bastante pequeña; segundo, en el hígado, la unión máxima se presenta al séptimo día, en cambio en el plasma del mismo animal, la capacidad de conjugación por el estradiol se mantuvo con valores incrementados, similares a los mostrados por las ratas de un día de nacidas.

Estos resultados sugieren que las proteínas estrogénofílicas hepática y plasmática de la rata son de origen distinto, además que el estrogénófilo hepático probablemente se sintetiza en el hígado, mientras que el estrogénófilo plasmático será una proteína de exportación de algún otro tejido o bien la alfa-fetoproteína sintetizada en la etapa intrauterina de la rata que desaparece del plasma por el 30º día de edad (4, 67, 78) y que muestra una gran afinidad de unión estrogénofílica (60, 76).

Otra posibilidad de contaminación de la fracción citosólica del hígado podría ser la albúmina plasmática que ha mostrado una importante capacidad de unión inespecífica estrogénofílica (1, 15), sin

embargo, esta posibilidad fue descartada por Olvera (68) quien por análisis de saturación de esta proteína, demostró que aún con 20 nmoles del estradiol marcado, la unión específica fue insignificante comparada con la gran unión del receptor estrogénico hepático que se saturó con 10 nmoles de la hormona tritiada.

Al comparar los resultados de la literatura con los observados en este trabajo y los obtenidos por Olvera (68) sobre el patrón ontogénico del receptor citosólico en el hígado de la rata, otra conclusión importante que se pudo obtener, fue que ambos estudios mostraron la baja capacidad de asociación de la molécula estrogénica en varias etapas del desarrollo de este animal; por lo que estas evidencias sugieren que el conocimiento limitado que se tiene sobre los "receptores estrogénicos" en los órganos clasificados como "no reproductores", tal vez se deba a que la presencia de estos receptores a estrógenos en los tejidos no "blanco", sólo aparezcan en períodos cortos durante el desarrollo del animal (7º día), razón por la cual su caracterización se ha dificultado, mientras que el conocimiento de los "receptores estrogénicos" en los órganos de los tejidos "blanco" se ha facilitado, debido a que estas proteínas receptoras aparecen desde el primer día del nacimiento y permanecen durante la etapa adulta de la rata.

Tomando en cuenta las evidencias de De Moore y Deneff (18-20) y

aquéllas de Gustafsson (38-40), que apoyan la hipótesis de la "masculinización" en el hígado de las ratas recién nacidas (señalados ya en la parte introductoria); y de que en este trabajo, los datos muestran la presencia de una proteína estrogénofílica en la fracción microsomal hepática del mismo animal en el 7º día de edad y aunque debe considerarse que estos últimos resultados aún requieren de futuras investigaciones que den luz a estas evidencias; se puede especular, que en la rata, durante el primer estadio de su desarrollo, la presencia de este estrogénófilo en un órgano no reproductor como el hígado, pueda desempeñar el papel de acarreador citoplásmico de las hormonas estrogénicas al núcleo del hepatocito y que tal vez este complejo hormona-receptor module la información a nivel genético, que de como resultado la diferenciación del patrón enzimático a temprana edad y por lo tanto, el animal adulto muestre un metabolismo de esteroides hepático con características ya sea masculinas o femeninas.

8. Bibliografía

1. Anderson, J.N., Peck, E.J., JRZ. y Clark, J.H. (1974): J. Steroid Biochem., 5: 103-107.
2. Arias, F. y Warren, J.C. (1970): An estrophilic macromolecule in chicken liver cytosol. Biochim. Biophys. Acta. 230: 550-559.
3. Aten, F.R., Weinberger, J.M. y Eisenfeld; J.A. (1978): Estrogen receptor in rat liver: translocation to the nucleus in vivo. Endocrinology. 102: 433-442.
4. Aussel, C., Uriel, J., Michel, G. y Baulieu, E.E. (1974): Biochimie, 56: 567.
5. Bardin, C.W., Bullock, L.P., Sherins, R.J., Mowszowicz, I. y Blackburn, W.R. (1973): Parte II. Androgen metabolism and mechanism of action in male pseudohermaphroditism: A study of testicular feminization. Recent Progr. Hormone, Res. 29: 65-109.
6. Baulieu, E.E., Alberga, A., Jung, I., Lebeau, M.C., Mercier-Bodard, C., Milarom, E., Raynaud, J.P., Raynaud-Jammet, C., Rochefort, H., Truong, H. y Robel, P. (1971): Metabolism and protein-binding of sex steroids in target organs: An approach to the mechanism of hormone action. Recent Progr. Horm. Res. 27: 351-419.
7. Beach, F.A. (1975): Hormonal modification of sexually dimorphic behavior. Psyconeuroendocrinol. 1: 3-23.
8. Berg, A. y Gustafsson, J.A. (1973): Regulation of hydroxylation of 5 α -androstane, 3 α , 17 β -diol in liver microsomes from male and female rats. J. Biol. Chem. 248:6559-6567.
9. Bermant, G. y Davidson, J. M. (1974): Biological bases of sexual behavior. New York, ed. Harper y Row, 306 p.
10. Blobel, G. y Potter, V.R. (1966): Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. Science, 154: 1662-1665.
11. Brecher, P.I., Numata, M., De Sombre, E.R. y Jensen, E.V. (1970): Conversion of uterine 4S estradiol-receptor complex to 5S complex in a soluble system. Fed. Proc., 29: 249 Abs.

12. Burton, K. (1968): Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods in Enzymology*, 12B, 163-166.
13. Chan, L., Means, A.R., y O'Malley, B.W. (1973): Rates of induction of specific translatable messenger RNAs for ovalbumin and avidin by steroid hormones. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 70: 1870-1874.
14. Clark, H.J. y Gorski, J. (1970): Ontogeny of the estrogen receptor during early uterine development. *Science*, 169: 76-78.
15. Clark, J.H., Peck, E.J., Scharedr, W.I. y O'Malley, W.B. (1976): Estrogen and progesterone receptors: Methods for characterization, quantification and purification. en *Methods in cancer research*, ed. por Busch Harris. Vol. XII, Academic Press, 367-417.
16. Clark, J.H. y Peck, E.J. Jr. (1978): Steroid hormone receptors: Basic principles and measurement, en: *Laboratory Methods Manual for hormone action and molecular endocrinology*. Schrader, T.W. y O'Malley, W.O. eds. Houston, Texas.
17. Cutler, G.B.Jr., Barnes, K.M., Saver, M.A. y Loriaux, D.L. (1978): Estrogen receptor in rat adrenal gland. *Endocrinology*. 102:252-257.
18. De Moor, P. y Deneff, C. (1968): The "puberty" of the rat liver. Feminine pattern of cortisol. *Metabolism in rats castrated at birth*. *Endocrinology*, 82: 480-492.
19. Deneff, C. y De Moor, P. (1966): *Europ. J. Steroids* 1: 217.
20. Deneff, C. y De Moor, P. (1968): The "puberty" of the rat liver. II. Permanent changes in steroid metabolizing enzymes after treatment with a single injection of testosterone propionato at birth. *Endocrinology*, 83: (4), 791-798.
21. Diczfalusy, E., ed. (1970): 2nd Symposium: Steroid assay by protein binding. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. 147, 366 p.
22. Einarsson, K., Gustafsson, J.A. y Goldman, A.S. (1972): Metabolism of steroid hormones, sterols, and bile acids in liver microsomes from male, female, and male-pseudo-hermaphroditic rats. *Eur. J. Biochem.* 31: 345-353.
22. Einarsson, K., Gustafsson, J.A. y Stenberg, A. (1973): Neonatal imprinting of liver microsomal hydroxylation and reduction of steroids. *J. Biol. Chem.* 248: (14), 4987-4997.

23. Einarsson, K., Gustafsson, J.A. y Stenberg, A. (1973): Neonatal imprinting of liver microsomal hydroxylation and reduction of steroids. *J. Biol. Chem.* 248: (14), 4987-4997.
24. Eisenfeld, J.A., Weinberger, M.A. y Haselbacher, G. (1976): Estrogen receptor in the mammalian liver. *Science*, 191: (4229), 862-864.
25. Erdos, T., Best-Belpomme, M., y Bessada, R. (1970): A rapid assay for binding of estradiol to uterine receptor(s). *Anal. Biochem.* 37: 244-252.
26. Falck, B. (1959): Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiol. Scand.* 47: Suppl. 163, 5-100.
27. Giles, K.W. y Myers, A. (1965): An improved diphenyl amine methods for the estimation of DNA. *Nature*, 206:93.
28. Gorski, J., Toft, D., Shymala, G., Smith, D. y Notides, A. (1968): *Recent Progr. Hormn. Res.* 24: 45-80.
29. Gorski, J., Williams, D., Giannopoulos, G. y Stancel, G. (1973), en: *Receptors for reproductive hormones*, Ed. B.W. O'Malley y A. R. Means, P.I., Plenum Press, N.Y.
30. Gorski, J. y Gannon, F. (1976): Current models of steroid hormone action: A critique. *Ann. Rev. Physiol.* 38: 425-450.
31. Gorski, R.A. y Wagner, J.W. (1964). Program. of 46th Meeting of The Endocrine Society.
32. Gorski, R.A. y Wagner, J.W. (1965): Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinology*, 76: 226-239.
33. Gorski, R.A. y Shryne, J. (1972): Intracerebral antibiotics and androgenization of the neonatal female rats. *Neuroendocrinology* 10: 109-114.
34. Gorski, R.A. (1974). The neuroendocrine regulation of sexual behavior, en: *Advances in Psychobiology*, Vol. II, G. Newton y Riesen A.H., eds. N.Y., ed. John Wiley and Sons, p. 1-58.
35. Gorski, R.A., Harlan, R.E. y Christensen, L.W. (1977): Perinatal hormonal exposure and the development of neuroendocrine processes. *J. Toxicol. Environm. Health.* 3:97-121.
36. Gorski, R.A. (1979): The neuroendocrinology of reproduction: An overview. *Biology of reproduction*, 20: 111-127.
37. Gurrpide, E. y Welch, M. (1969): Dynamics of uptake of estrogens

- and androgens by human endometrium. Application of a double isotope perfusion technique. *J. Biol. Chem.* 244: 5159-5169.
38. Gustafsson, J.A. y Lisboa, B.P. (1970). *Acta Endocrinol.* 65: 84-94.
 39. Gustafsson, J.A. y Stenberg A. (1974): Neonatal programming of androgen responsiveness of liver of adult rats. *J. Biol. Chem.* 249: 719-723.
 40. Gustafsson, J.A., Ingelman-Sundberg, M. y Stenberg, A. (1975): Neonatal androgenic programming of hepatic steroid metabolism in rats. *J. Steroid Biochem.*, 6: 643-649.
 41. Harlan, R.E. y Gorski, R.A. (1977): Steroid regulation of luteinizing hormone secretion in normal and androgenized rats at different ages. *Endocrinology*, 101: 741-749.
 42. Hartree, E.F. (1972): Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
 43. Hernández-Montes, H. y Olvera, M.A. Receptores estrogénicos en el citosol del hígado y del páncreas durante la ontogenia de la rata. (En preparación).
 44. Itzhaki, R.F. y Gill, D.M. (1964). A micro-Biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.* 9: 401-410.
 45. Jensen, E.V. y Jacobson, H.I. (1960): en: *Biological activities of steroids in relation to cancer.* (G. Pincus y E.P. Vollmer, eds.) p. 161. Academic Press, N.Y.
 46. Jensen, E.V. y Jacobson, H.I. (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec. Prog. Horm. Res.* 18: 387-414.
 47. Jensen, E.V., DeSombre, E.R., Hurst, D.J., Kawashima, T. y Jungblut, P.W. (1967): Estrogen-receptor interactions in target tissues. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 56 (Suppl. 3-4): 547-569.
 48. Jensen, E.V., Hurst, D.J., DeSombre, E.R. y Jungblut, P.W. (1967): Sulfhydryl groups and estradiol-receptor interaction. *Science*, 158: 385-387.
 49. Jensen, E.V., Numata, M., Smith, S., Suzuki, T., Brecher, P.I., y DeSombre, E.R. (1969): Estrogen-receptor interaction in target tissues. *Develop. Biol. suppl.* 3: 151-171.

50. Jensen, E.V. y DeSombre, E.R. (1973): Estrogen-receptor interaction. *Science*, 182: 126-134.
51. Jost, A. (1953): Problems of fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Progr. Hormone Res.* 8: 379-418.
52. Julez, M., Faredin, I. y Toth, J. (1971). Steroids in Human skin. *Akademiai Kiado, Budapest*, 473 p.
53. Katzenellenbogen, B.S., Gorski, J. (1975). Estrogen actions on syntheses of macromolecules in target cell. p. 187-243, en: *Biochemical actions of hormones*, ed. G. Litwack, N.Y. Academic, 415 p.
54. Katzenellenbogen, S.B. (1980): Dynamics of steroid hormone receptor action. *Ann. Rev. Physiol.* 42: 17-35.
55. Kenneth, W. Mc Kerns (1969). *The gonads*. Appleton-Century-Crofts, ed., E.U.A., 792 p.
56. Le Maire, W.J., Conly, P.W., Moffelt, A. y Cleveland, W.W. (1970): Plasma progesterone secretion by the corpus luteum of term pregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 108: 132-134.
57. Li, J.J., Talley, D.J., Li, S.A. y Villee, C.A. (1974): An estrogen binding protein in the renal cytosol of the intact, castrated, and estrogenized golden hamster. *Endocrinology*, 95: 1134-1141.
58. Longscope, C., Wildrich, W. y Sawin, T.C. (1972): The secretion of estrone and estradiol-17 β by human testis. *Steroids* 20: 439-448.
59. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
60. Michael, G., Jung, I., Baulieu, E., Aussel, C. y Uriel, J. (1974): Two high affinity estrogen binding proteins of different specificity in the immature rat uterus cytosol. *Steroids*, 24: (4), 437-449.
61. Mohla, S., DeSombre, E.R., Jensen, E.V. (1972): Tissue-specific stimulation of RNA synthesis by transformed estradiol-receptor complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46: 661-667.
62. Mújica de Hernández, A. (1969). Estudio de las alteraciones iniciales en hígado de rata producidas por la intoxicación con hidrazina. Tesis de Maestría en Ciencias, espec. Bioquímica. CIEA, IPN. p. 12-14.

63. Muller, R.E. y Wotiz, H.H. (1978): Estrogen-binding protein in mouse and rat adrenal glands. *J. Biol. Chem.* 253: 740-745.
64. Neumann, F., y Elger, W. (1966): The effect of the anti-androgen 1, 2 α -methylene-6-chloro- $\Delta^{4,6}$ -pregnadiene-17 α -ol-3,20-dione-17 α -acetate (Cyproterone acetate) on the development of the mammary glands of male foetal rats. *J. Endocr.* 36: 347-352.
65. Niu, N.C. y Segal, S.J., eds. (1974). The role of RNA in reproduction. North-Holland Publ., Amsterdam, 810 p.
66. Noteboom, W.D. y Gorski, J. (1965): Stereospecific binding of estrogen in the rat uterus. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 559-568.
67. Núñez, E., Engelmann, F., Benassyag, C. y Jayle, M.F. (1971): Origine embryonnaire de la protéine sérique fixant l'oestrone et l'oestradiol chez la Ratte impubère. *C.R. Acad.Sci., (París)*, 273: 831.
68. Olvera, M.A. (1978): Receptores estrogénicos en el citosol del hígado y del páncreas durante la ontogenia de la rata. Tesis de Maestría en Ciencias, especialidad Bioquímica. CIEA, IPN, 102 p.
69. O'Malley, B.W. y Means, A.R. (1974): Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science*, 183: 610-620.
70. Osawa, Y. (1973). Mechanism of aromatization. en: R.O. Scow, ed., *Endocrinology Excerpta Med. Int. Congress Serie No. 273*, p. 814.
71. Ozon, R. y Bellé, R. (1973): Récepteurs de L'oestradiol-17 β dans le foie de poule et de l'amphibien Discoglossus pictus. *Biochim. Biophys. Acta*, 297: 155-163.
72. Peck, E.J.Jr., Burgner, J. y Clark, J.H. (1973): Estrophilic binding sites of the uterus. Relation to uptake and retention of estradiol in vitro. *Biochemistry*, 12: 4596-4603.
73. Peck, E.J., Jr., DeLibero, J., Richards, R., y Clark, J.H. (1973): Instability of the uterine estrogen receptor under in vitro conditions. *Biochemistry*, 12: 4603-4608.
74. Phoenix, C.H., Goy, R.W., Gerall, A.A. y Young, C.C. (1959): Organizing action of prenatalley administred TP on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65: 369-382.

75. Pitot, H.G. y Yatvin, M.B. (1973): Interrelationships of mammalian hormones and enzyme levels in vivo. *Physiol. Rev.*, 53: 228-325.
76. Plapinger, L. y Mc Ewen, B.S. (1978). Gonadal steroid-brain interactions in sexual differentiation. En: Hutchison, J., eds., *Biological determinants of sexual behavior*. New York, Wiley 1. ed. 340 p.
77. Powell-Jones, W., Davies, P. y Griffiths, K. (1976): Specific binding of (³H) oestradiol by cytoplasmic protein components of female rat liver. *J. Endocr.* 69: (1), 167-168.
78. Raynaud, J.P., Mercier-Bodard, C. y Baulieu, E.E. (1971): Rat estradiol binding plasma protein (EBP). *Steroids*; 18: 767.
79. Raynaud, J.P. (1973): Influence of estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotropic activity. *Steroids* 21: 249-258.
80. Resko, J.A., Feder, H.H. y Goy, R.W. (1968): Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats. *J. Endocr.* 40: 485-491.
81. Rhoads, R.E., McKnight, G.S., y Schimke, R.T. (1971): Synthesis of ovalbumin in a rabbit reticulocyte cell-free system programmed with hen oviduct ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 246: 7 407-7 410.
82. Sandberg, A.A., Kirdani, V.R., Varkarakis, J.M. y Murphy, P.G. (1973): Estrogen receptor protein of pancreas. *Steroids* 22: 259-271.
83. Sandberg, A.A. y Rosenthal, E.H. (1974): Estrogens receptors in the pancreas. *J. Steroid Biochem.* 5: 969-975.
84. Schriefers, H. (1967): Factors regulating the metabolism of steroids. *Vitam. Horm. (New York)*. 25: 271-314.
85. Setaro, F. y Morley D.G.C. (1977): A rapid colorimetric assay for DNA. *Anal. Biochem.* 81: 467-471.
86. Shyamala, G. y Gorski, J. (1967): Interrelationship of estrogen receptors in the nucleus and cytosol. Abstracts Seventh Annual Meeting. *J. Cell. Biol.* 35: 125 A.
87. Slaunwhite, W.R. Jr. y Samuels, L.T. (1956): Progesterone as a precursor of testicular androgens. *J. Biol. Chem.*, 220: 341-352.
88. Sodersten, P. (1978): Effects of anti-oestrogen treatment of neonatal male rats on lordosis behavior and mounting behavior in the adult. *J. Endocr.* 76: (2), 241-249.

89. Sodersten, P., Hansen, S., Eneroth, P., Wilson, C.A. y Gustafsson, J.A. (1980): Testosterone in the control of rat sexual behavior. *J. Steroid, Biochem.* 12: 337-346.
90. Solomon, S., Watanabe, M., Domínguez, V.O., Gray, M.J., Meeker, C.I. y Sims, E.A.H. (1962). Biological and clinical aspects of placental steroidogenesis. Meeting Milan, p. 32-42.
91. Sommerville, I.F. y Collins, W.P. (1970). En: *Advances in steroids biochemistry and pharmacology* (eds. Briggs, M.H.). Vol. 2 p. 266, Academic Press, N.Y.
92. Stancel, G.M., Leung, K.M.T. y Gorski, J. (1973): Estrogen receptors in the rat uterus. Relationship between cytoplasmic and nuclear forms of the estrogen binding protein. *Biochemistry*, 12: 2137-2141.
93. Steggle, A.W. y King, R.J.B. (1970): The use of protamine to study {6,7-³H} oestradiol-17 β binding in rat uterus. *Biochem. J.* 118: 695-701.
94. Stumpf, W.E. (1969): Nuclear concentration of ³H-estradiol in target tissues. Dry mount autoradiography of vagina, oviduct, ovary, testis, mammary tumor, liver and adrenal. *Endocrinology*, 85: 31-37.
95. Talwar, G.P., Segal, S.J., Evans, A. y Davidson, O.W. (1964). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 52: 1059.
96. Teng, C.S. y Hamilton, T.S. (1968): The role of chromatin in estrogen action in the uterus, I. The control of template capacity and chemical composition and the binding of H³-estradiol-17 β . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60: 1410-1417.
97. Toft, D. y Gorski, J. (1966). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 55: 1574.
98. Tuohimaa, P. y Niemi, M. (1972): In vitro uptake of tritiated sex steroids by the hypothalamus of adult male rats treated neonatally with and antiandrogen (cyproterone). *Acta Endocrinol.* 71: 45-54.
99. van Beurden-Lameus, W.M.O. Brinkmann, O.A., Mulder, E. y van Der Molen, J.H. (1974): High-affinity binding of oestradiol-17 β by cytosols from testis interstitial tissue, pituitary, adrenal, liver and accessory sex glands of the male rat. *Biochem. J.* 140: (3), 495-502.
100. Vreeburg, J.T.M., van der Vaart, D.M.P. y van der Schoot, P. (1977): Prevention of central determination but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. *J. Endocr.* 74: (3), 375-382.

101. Vertes, M. y King, R.J.B. (1971): The mechanism of oestradiol binding in rat hypothalamus: effect of androgenization. *J. Endocrinol.* 51: 271-282.
102. White, A., Handler, P. y Smith, E.L. (1968). *Principles of Biochemistry*, Mc Graw-Hill, N.Y. 1430 p.
103. Williams, D. y Gorski, J. (1974): Equilibrium binding of estradiol by uterine cell suspension and whole uteri in vitro. *Biochemistry*, 13: 5537-5542.
104. Yamamoto, K.R. y Alberts, B.M. (1976): Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 721-746.
105. Yates, F.E., Herbst, A.L. y Urquhart, J. (1958): Sex difference in rate of ring a reduction of Δ^4 -3 keto-steroids in vitro by rat liver. *Endocrinology* 63: 887-902.
106. Billah, M.M. y Michell, R.H. (1979): Phosphatidylinositol metabolism in rat hepatocytes stimulated by glycogenolytic hormones. Effects of angiotensin, vasopresin, adrenaline, ionophore A23187 and calcium-ion deprivation. *Biochem. J.* 182: (3), 661-668.
107. Eisen, V. (1983). How vasopressin produces antidiuresis. *Trends. Pharmacol. Sci.* 4: (4), 152-153.
108. Michell, H.R. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta.* 415: (1), 81-147.
109. Tolbert, E.M.M., White, C.A., Aspry, K., Cutts, J. y Fain, N.J. (1980). Stimulation by vasopressin and α -catecholamines of phosphatidylinositol formation in isolated rat liver parenchymal. *J. Biol. Chem.* 255: (5), 1938-1944.

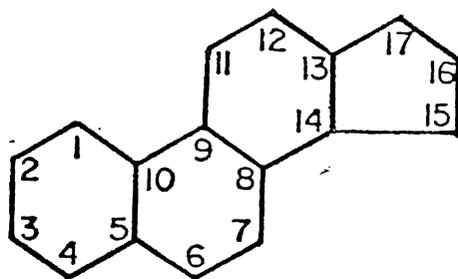
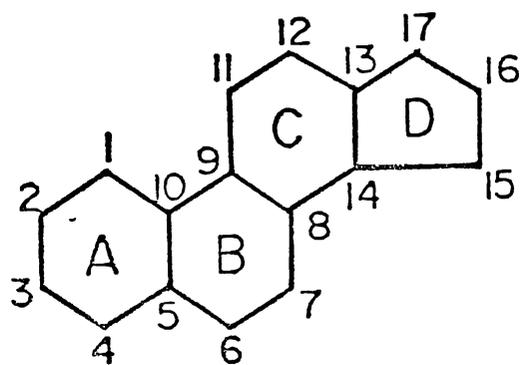
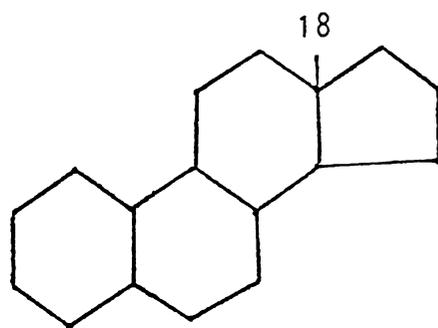
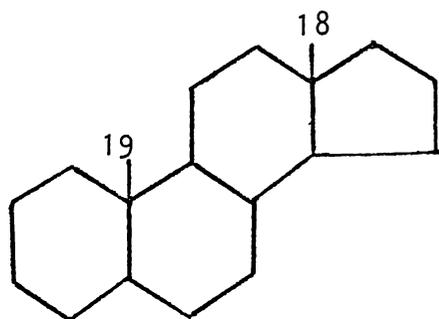


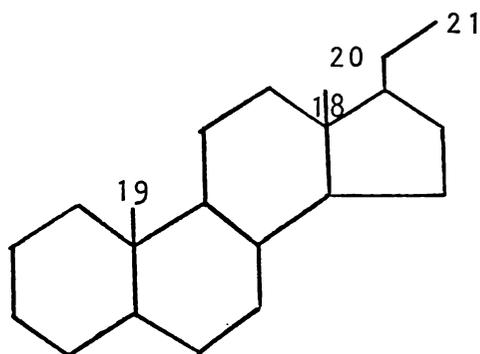
Figura 1. Núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno



Estrano (C 18)



Androstano (C 19)



Pregnano (C 21)

Figura 2. Clasificación de los esteroides de acuerdo al número de átomos de carbono.

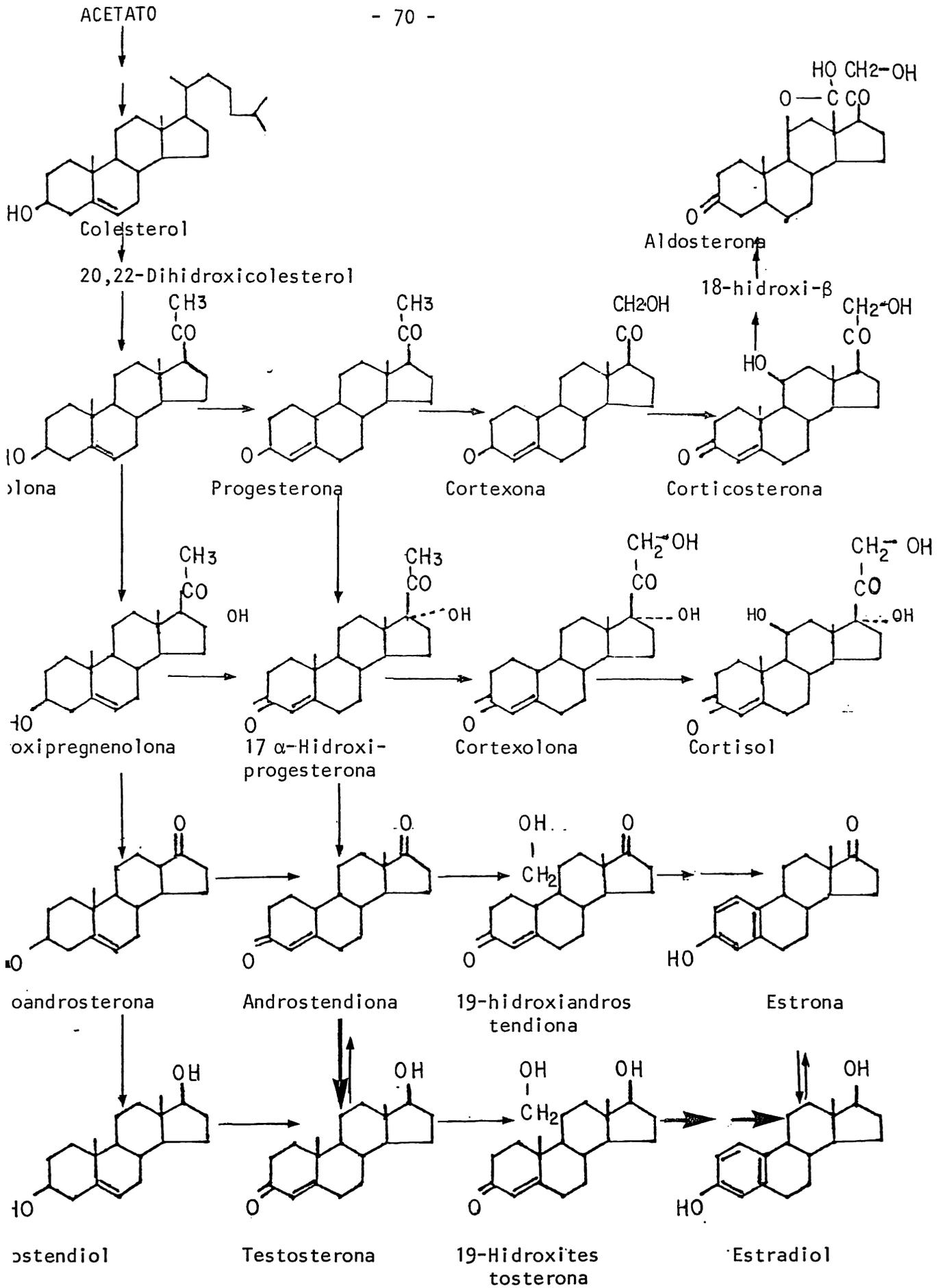


Figura 3. Principales vías de biosíntesis de las hormonas esteroideas.

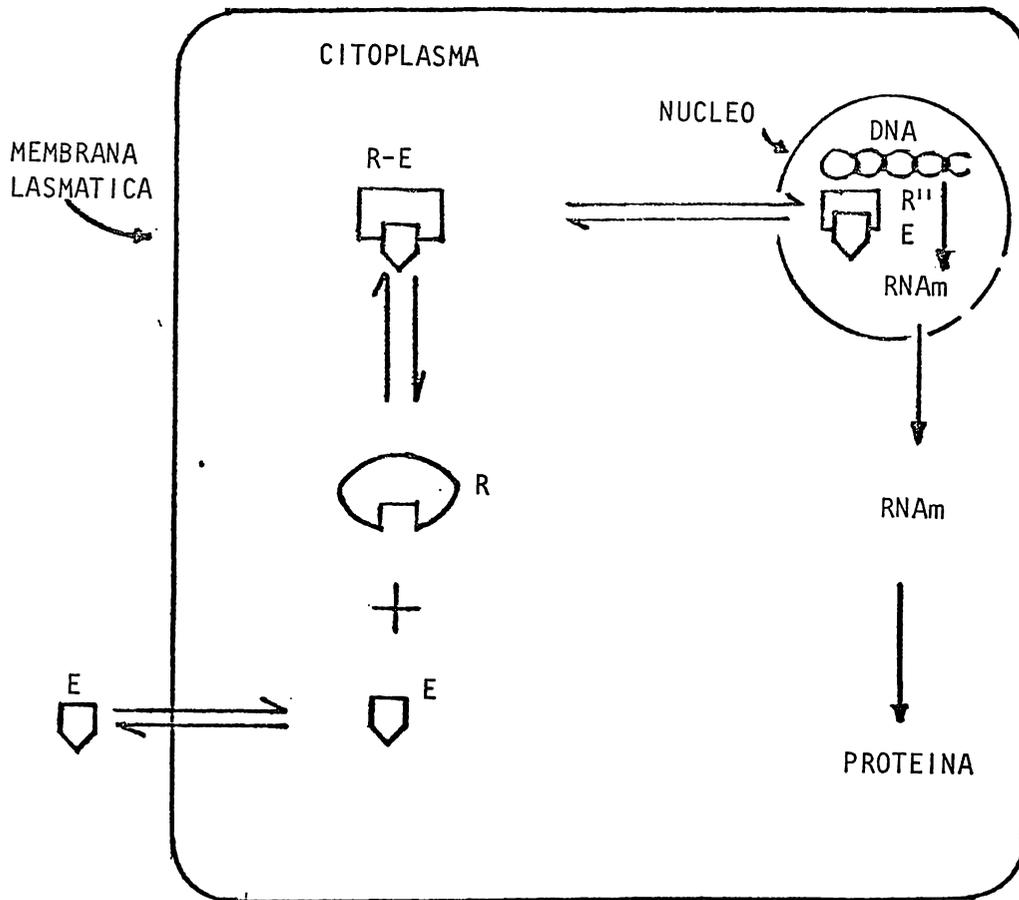
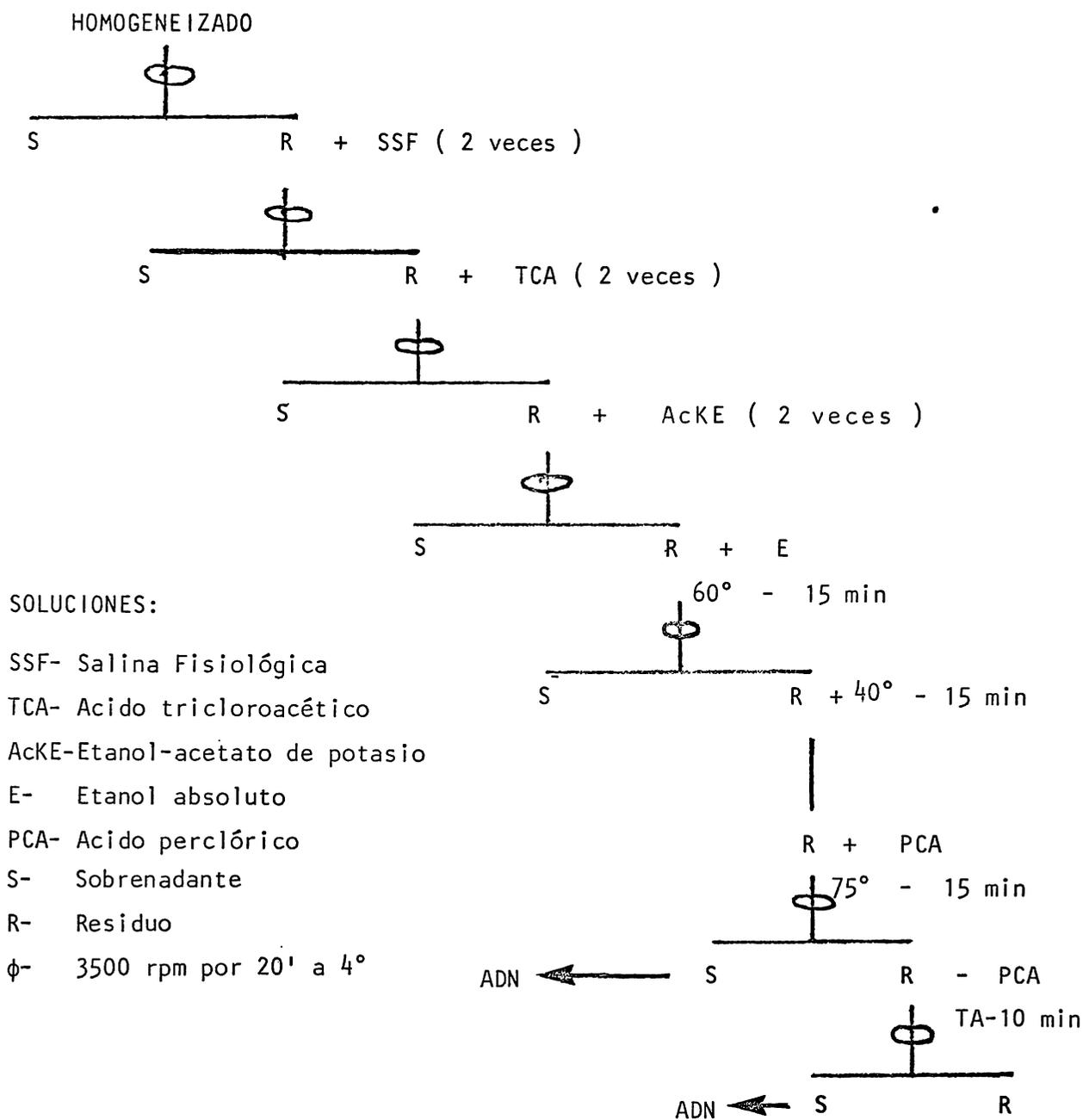


Figura 4. Esquema del modelo teórico de la interacción del estradiol en las células uterinas. En donde E representa al 17β -estradiol, R indica al "receptor" citoplásmico 4S, R'' se refiere al "receptor" nuclear 5S.



SOLUCIONES:

SSF- Salina Fisiológica

TCA- Acido tricloroacético

AcKE-Etanol-acetato de potasio

E- Etanol absoluto

PCA- Acido perclórico

S- Sobrenadante

R- Residuo

φ- 3500 rpm por 20' a 4°

Figura 5. Procedimiento de extracción del ADN de hígado de la rata

Cuadro 1. Las clases de hormonas esteroides y sus tejidos "blanco" (102).

CLASE	HORMONAS	NUMERO DE CARBONOS	GLANDULA ENDOCRINA	TEJIDO "BLANCO"
Estrógenos	Estradiol, estrona	18	Ovario (folículos)	Glándula mamaria útero, vagina
Andrógenos	Testosterona, dihidrotestosterona	19	Testículos, corteza adrenal	Glándula prostática, vesículas seminales
Progestágenos	Progesterona	21	Ovario (cuerpo lúteo)	Hueso, cerebro, bulbos pilosos, endometrio-uterino
Glucocorticoides	Cortisol	21	Corteza adrenal	General
Mineralocorticoides	Aldosterona, desoxicorticosterona	21	Corteza adrenal	Riñón, glándulas parótidas, glándulas salivales y sudoríparas, conducto gastrointestinal

TABLA 1

ESTEROIDES	Rf	PUNTO DE FUSION
Estrona	0.48	253-254
17 β -estradiol	0.35	174-178
Estriol	0.12	280
Testosterona	0.33	154

La cristalización fue en diferentes sistemas de solventes.

La determinación del valor de Rf fue en el sistema: benceno-metanol (9:1); la localización con luz ultravioleta (254 nm) y el revelado con los vapores de yodo metálico sublimado.

T A B L A 2

CONCENTRACION DE LA UNION DEL 17 β -ESTRADIOL-³H CON EL CITOSOL DEL HIGADO DE LAS RATAS
PERINATALES E INMADURAS HEMBRA Y MACHO INTACTOS

Edad (días)	Número de hembras*	17 β -estradiol- ³ H pmoles/mg proteína**	Número de machos*	17 β -estradiol- ³ H pmoles/mg proteína**
1	12	0.095	15	0.082
3	15	0.173	12	0.120
5	18	0.360	18	0.297
7	18	1.500	18	1.380
9	18	0.481	18	0.432
11	15	0.340	15	0.270
13	18	0.124	18	0.190
15	15	0.042	18	0.076
17	18	0.095	18	0.045
19	18	0.020	18	0.020
21	12	0.033	12	0.038
23	15	0.015	18	0.010

Total de hembras = 192 animales

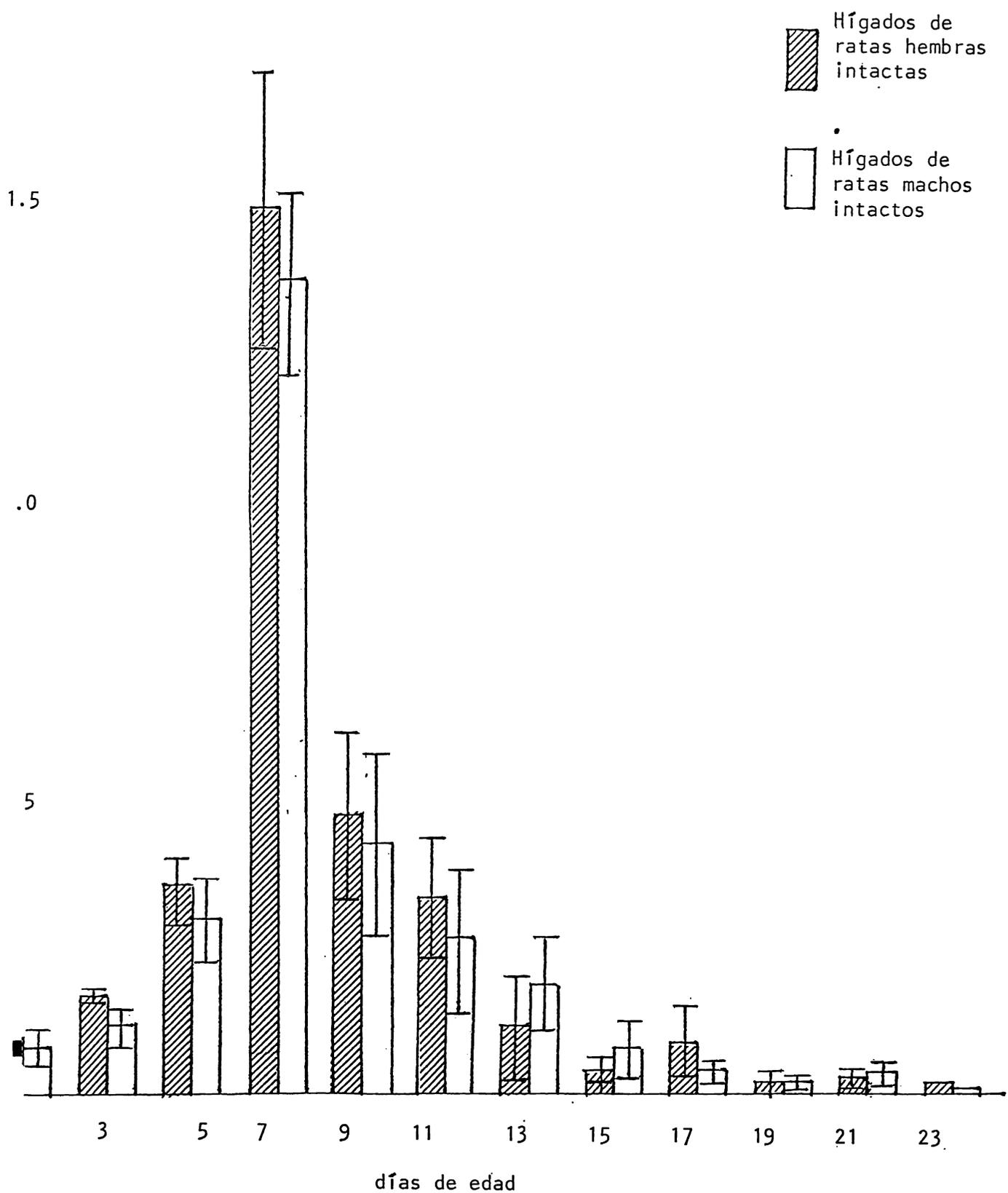
Total de machos = 198 animales

4 a 6 experimentos con mínimo de tres animales cada uno y con mediciones por triplicado en cada estudio.

** Valor promedio por 4 ó 6 experimentos.

Figura 6. Patrón de unión del 17β -estradiol- ^3H con el citosol del hígado de la rata intacta en las diferentes etapas de su desarrollo.

Las ratas perinatales e inmaduras de ambos sexos, de 1 a 23 días de edad, para cada experimento se agruparon en número de tres: los animales fueron decapitados, los hígados se extrajeron y la preparación de la fracción citoplasmática así como las condiciones de incubación con el estradiol tritiado, se describen en Material y Métodos. La capacidad de conjugación por el 17β -estradiol se determinó por triplicado en cada fracción citosólica obtenida del homogeneizado de tres hígados. Cada una de las barras representa la unión del estrógeno radiactivo con el citosol del hígado del grupo de animales estudiados. En esta figura, la ordenada representa la unión específica de el citosol hepático, valor que se obtuvo por la sustracción entre la unión total menos la unión inespecífica (por la adición en exceso de 100 veces del 17β -estradiol no radiactivo sobre el radiactivo). En la abcisa se indica la edad que corresponde a cada grupo de animales. La raya intermedia en cada una de las barras indica la desviación estándar para un número de 4 a 6 experimentos para cada edad y sexo.



PERINATALES E INMADURAS HEMBRA Y MACHO CASTRADOS

Edad (días)	Número de hembras*	17β-estradiol- ³ H pmoles/mg proteína**	Número de machos*	17β-estradiol- ³ H pmoles/mg proteína**
1	18	0.075	15	0.046
3	15	0.100	18	0.140
5	18	0.515	18	0.603
7	18	1.570	18	1.230
9	15	0.802	15	0.864
11	18	0.400	18	0.371
13	12	0.250	18	0.242
15	18	0.283	15	0.311
17	18	0.170	18	0.162
19	18	0.133	12	0.097
21	15	0.041	18	0.032
23	18	0.018	12	0.009

Total de hembras = 201 animales

Total de machos = 195 animales

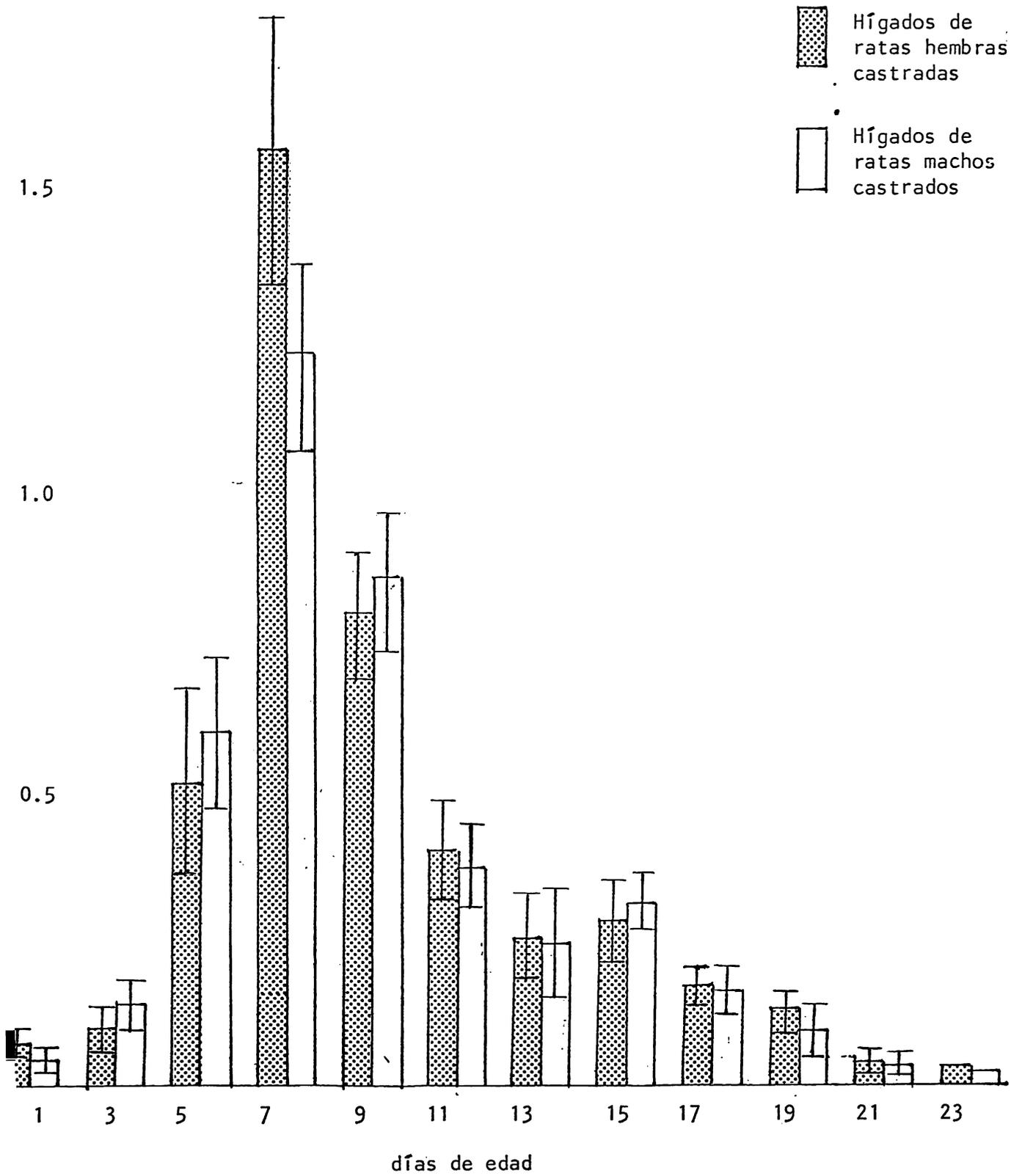
* 4 a 6 experimentos con mínimo de 3 animales cada uno y con mediciones por triplicado en cada estudio.

** Valor promedio por 4 ó 6 experimentos.

Figura 7. Patrón de unión del 17β -estradiol con el citosol del hígado de la rata castrada en las diferentes etapas de su desarrollo.

Las ratas ovariectomizadas y orquidectomizadas al primer día del nacimiento por edad y sexo se agruparon en número de tres, para cada experimento que se realizó bajo las mismas condiciones ya descritas para el grupo de animales intactos. En cada experimento, la conjugación de la fracción citosólica por el 17β -estradiol, se midió por triplicado. La unión del estrógeno tritiado con el citosol hepático está representado por cada una de las barras para cada grupo.

En la misma forma que en la Figura 6, en esta figura se representa en la ordenada la unión específica del citosol hepático y en la abscisa se indica la edad de cada grupo estudiado. La raya intermedia en cada una de las barras indica la desviación estándar para un número de 4 a 6 experimentos para cada grupo.



ra 7.

CONCENTRACION DE LA UNION DEL 17 β -ESTRADIOL-³H CON EL PLASMA DE LAS RATAS PERINATALES
E INMADURAS INTACTAS Y CASTRADAS

Edad (días)	Número de animales intactos*	17 β -estradiol- ³ H pmoles/mg proteína**	Número de animales castrados*	17 β -estradiol- ³ H pmoles/mg proteína**
1	12	0.976	12	0.960
3	9	0.949	12	0.968
5	12	0.960	9	0.975
7	12	1.000	12	0.980
9	12	0.902	9	1.010
11	12	0.858	9	0.900
13	12	0.750	12	0.768
15	12	0.662	12	0.641
17	9	0.551	9	0.532
19	12	0.408	12	0.420
21	12	0.353	12	0.365
23	12	0.221	12	0.214

Total de animales = 138

Total de animales = 132

* 3 a 4 experimentos con mínimo de 3 animales cada uno y con mediciones por triplicado en cada estudio.

**Valor promedio por 3 ó 4 experimentos.

Figura 8. Comparación entre los patrones de unión del 17β -estradiol $-^3\text{H}$ con el plasma de las ratas intactas con el de las ratas castradas en diferentes etapas de su desarrollo.

Las ratas con edades de 1 a 23 días tanto intactas como castradas para cada experimento se agruparon en número de tres animales, los plasmas se obtuvieron por decapitación del animal y se incubaron bajo las condiciones ya señaladas en Material y Métodos. La capacidad de asociación del plasma por la hormona estrogénica radiactiva se determinó por triplicado. En esta figura la línea continua con los círculos negros ●—●—● representa la unión del estradiol tritiado con el plasma de las ratas intactas mientras que la línea discontinua con triángulos negros ▲— — —▲ representa la unión del estrógeno radiactivo con el plasma de los animales castrados (expresado en ambos casos en pmoles/mg de proteína). Cada uno de los puntos representa el valor promedio de la unión específica del estrógeno radiactivo con el plasma, que fue obtenido al restar a la unión total, la unión inespecífica que se obtuvo al agregar a la mezcla de incubación una concentración de 1×10^{-6} M del estradiol no radiactivo. La línea intermedia de cada punto representa la desviación estándar para un número de 3 a 4 experimentos de cada edad.

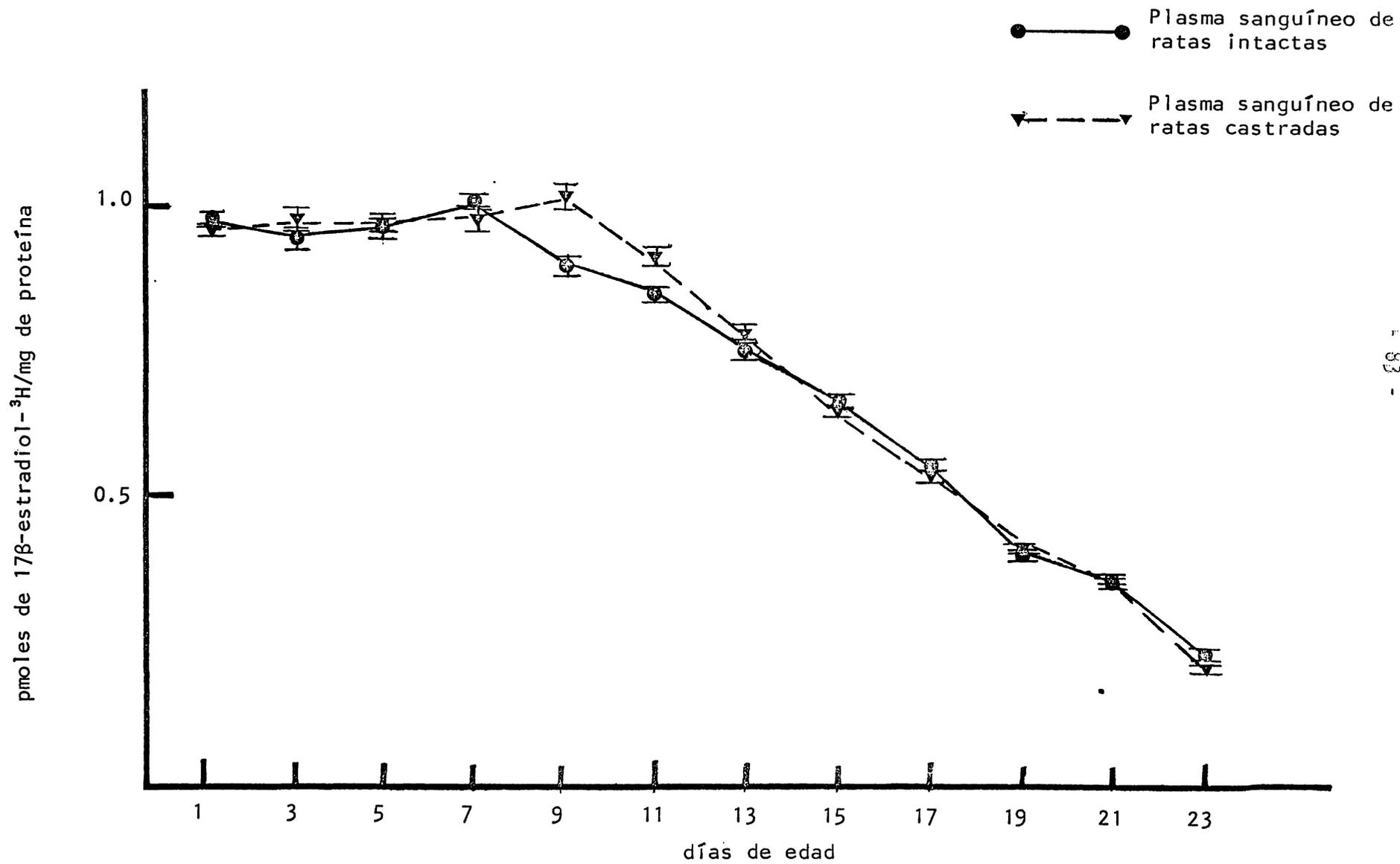
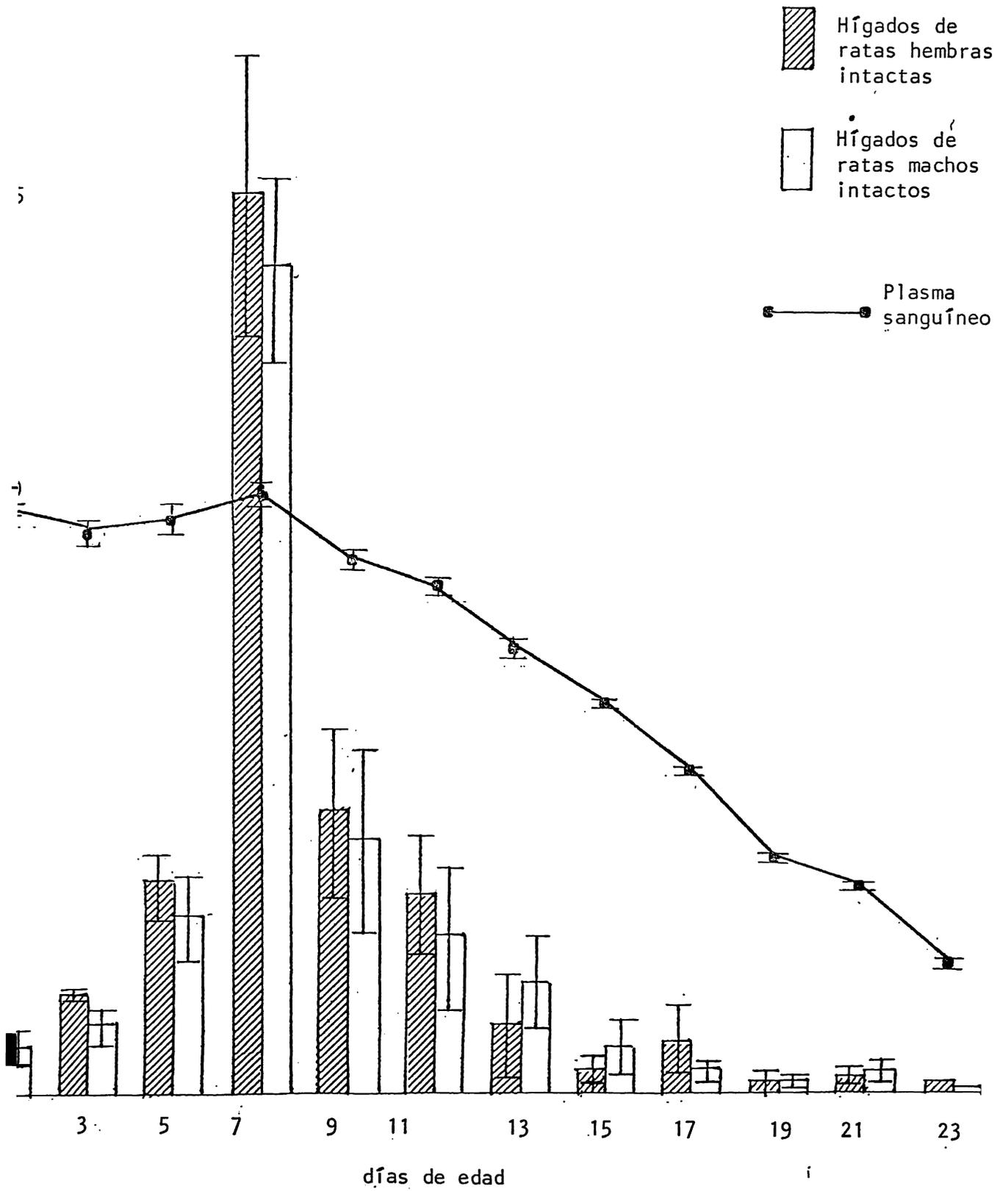


Figura 9. Patrones de la unión del 17β -estradiol- ^3H con el citosol del hígado y del plasma de la rata intacta en las diferentes etapas de su desarrollo.

Esta figura muestra el patrón de unión del estradiol tritiado con el citosol del hígado, representado por la gráfica de las barras de la Figura 6. De la Figura 8 se presenta la gráfica con la línea continua con los círculos negros, que muestra la unión del estradiol radioactivo con el plasma. En Resultados se describe el propósito de presentar ambas gráficas en la misma figura.



12. Adendum.

Considero conveniente exponer en forma abreviada las actividades que fue necesario desarrollar para obtener un progreso adecuado del proyecto de tesis de maestría.

El proyecto de tesis se registró con el tema:

"Efecto de las hormonas gonadales sobre los niveles de los receptores de estrógenos y andrógenos presentes en el hígado de la rata".

El trabajo experimental comprendía las siguientes etapas:

1. Estudios en las diferentes etapas del desarrollo de la rata (Edad de 1 a 23 días).

1.1 Animales hembra y macho intactos y castrados.

1.1.1 Determinación de los niveles de receptores a hormonas estrogénicas en el citosol del hígado.

1.1.2 Determinación de la capacidad de conjugación de la fracción nuclear (núcleos purificados) con los complejos hormona-receptor.

1.2.1 Demostración de la "aromatización" de los andrógenos a estrógenos.

2. Desarrollo y estandarización de los siguientes procedimientos:
 - 2.1 Determinación de las proteínas por técnicas colorimétricas y por absorción en la región ultravioleta.
 - 2.2 Determinación del ADN por técnicas colorimétricas (y por absorción en el ultravioleta).
 - 2.3 Técnicas de extracción del ADN.
 - 2.4 Técnicas de purificación de la fracción nuclear.
 - 2.5 Purificación e identificación de las hormonas esteroides por cristalización, cromatografía de filtración en columna y cromatografía en placa.
 - 2.6 Técnicas microquirúrgicas para la castración de los animales.
 - 2.7 Determinación de la capacidad de unión de los receptores citosólicos a hormonas radiactivas empleando la técnica de absorción con hidroxapatita.
3. Breve exposición de algunos problemas técnicos y su resolución durante el trabajo experimental.
 - 3.1 Estandarización de la técnica colorimétrica para la determinación del ADN.

Para la determinación cuantitativa del ADN, se seleccionó el método de Giles K.W. y Myers, A. (27), el cual se desarrolló bajo las condiciones señaladas por los autores; sin embargo, las recuperaciones del ADN/mg extraído del tejido eran mayores del 100% y el "blanco" de reactivos mostró absorbancias elevadas (de 0.080 ó mayores).

Por estas razones, fue necesario estudiar y estandarizar las condiciones de trabajo en el desarrollo de la técnica. En los siguientes incisos, se denominará la mejor curva, aquella que, al restar las absorbancias de los blancos a las absorbancias de las mediciones en las diversas pruebas, su intercepto en las abscisas y en las ordenadas corresponda a un valor de cero.

3.1.1 Efecto de la concentración de la difenilamina (DFA) en el desarrollo de la coloración.

Con el propósito de encontrar la concentración adecuada de DFA, que diera "blancos de reactivos" menores de 0.030 se estudiaron concentraciones entre 2 y 24 mg de DFA en la mezcla de reacción:

Los reactivos componentes de la mezcla de la reacción colorimétrica conservaron las concentraciones originales; se agregaron 20 µg de ADN/200 µl a cada uno de los tubos. Los resultados se ilustran en la Figura 10, la cual muestra un blanco de reactivos con absorbancia

de 0.028 y una reacción colorida de ADN con absorbancia de 0.306, con 20 mg de DFA; esta concentración fue seleccionada para la técnica, debido a la diferencia entre la mínima y máxima absorbancia determinadas.

3.1.2 Solubilización del ADN para la preparación de la solución patrón de trabajo.

La solubilización del ADN se realizó en ácido perclórico (PCA) 2 M, (según datos del trabajo original), por agitación durante 30 min; la solución de trabajo contuvo 1 ml de esta primera solución más 9 ml de PCA 2 M.

Un segundo proceso estudiado de solubilización del ADN fue por agitación por 30 min en 10 ml de NaOH 5mM, a un ml de esta solución se agregó 4 ml de NaOH 5 mM y se diluyó hasta 10 ml con PCA 2 M.

Los resultados se muestran en la Figura 11, como se observa, la mezcla NaOH-PCA produjo una muestra soluble de ADN que al ser desarrollado el color mostró linealidad y tuvo su origen en cero; a diferencia de la muestra solubilizada solamente en PCA, la cual mostró un intercepto negativo en la ordenada.

3.1.3 Efecto de la concentración del ácido perclórico en la reacción colorimétrica.

Los resultados se ilustran en la Figura 12; observándose que la concentración de PCA 1 M en la mezcla de reacción fue insuficiente para

producir una coloración intensa y además mostró dispersión. La concentración de PCA 2 M muestra mejor relación entre la absorbancia a 600 nm y la concentración de ADN con una curva lineal que parte de cero. La concentración 3 M de PCA dió una mayor intensidad en el color y aunque con curva paralela a la de PCA 2 M, el intercepto en la primera curva se localiza en 0.15.

3.1.4 Efecto de la concentración del acetaldehído.

En el trabajo original se utilizó 100 μ l de la solución de acetaldehído (1.6 mg/ml), en este estudio se probó de 40 a 160 μ g de esta solución (0.4 a 1.6 mg/ml).

Los resultados se muestran en la Figura 13, la curva con 40 μ g de la solución de acetaldehído dió una curva lineal y con origen en cero; en cambio a concentraciones mayores de este reactivo, aunque las curvas mostraron linealidad, sus interceptos son mayores de cero. Como no hubo diferencia entre 40 y 48 μ g de la solución, esta última concentración que corresponde a la originalmente propuesta, fue seleccionada.

3.1.5 Influencia de la temperatura de incubación en la reacción colorimétrica del ADN.

Para este estudio se seleccionó dos temperaturas de incubación a 30 y 37°. Los resultados se dan en la Figura 14, puesto que no hubo

diferencias entre las curvas de calibración a las dos temperaturas, quedó la temperatura de 30° propuesta en la técnica original.

3.2 Técnicas de extracción del ADN.

La técnica propuesta por Metcoff, J. (comunicación personal) fue modificada para obtener recuperaciones del 100% de extracción del ADN. Por este tiempo Setaro, F. (85) publicó otra técnica de extracción, la cual fue ensayada. Este proceso resultó ser más eficiente en las recuperaciones de la extracción del ADN del hígado de la rata. Por este motivo, se adoptó la técnica y en Material y Métodos se detallan las modificaciones que permitieron obtener recuperaciones adecuadas.

3.3 Procesos de purificación de la fracción nuclear.

La técnica empleada (62) mostró núcleos sin contaminaciones importantes, comprobado tanto por técnicas colorimétricas como por fotografías al microscopio electrónico (no mostradas en este informe).

3.4 Estudio de las técnicas colorimétricas para la determinación de proteínas.

Las técnicas estudiadas para la cuantificación de proteínas por colorimetría, fueron: Método propuesto por Lowry, O.H. (59), este método modificado por Hartree, E.F. (42) y la técnica del Microbiuret, propuesta por Itzhaki, R.F. (44). Esta última técnica resultó adecuada a los propósitos del trabajo experimental.

3.5 Técnicas microquirúrgicas.

La técnica de microcirugía para la castración de las ratas de un día de nacidas requirió de un tiempo de adiestramiento importante, en el manejo de los animales y el instrumental quirúrgico y equipo, entre ellos el uso del microscopio estereoscópico para microcirugía. Un problema serio, fue que en los primeros lotes de animales castrados, al ser devueltos a sus jaulas después de la cirugía, fueron devorados por la madre, lo cual impidió tener el número adecuado de animales, para cada experimento. Este problema se solucionó cuando las crías fueron impregnadas con aceite comestible de cártamo; con este simple proceso se evitó el canibalismo.

En cuanto a las demás técnicas en Material y Métodos se describen en forma detallada y se indican los resultados obtenidos en su aplicación.

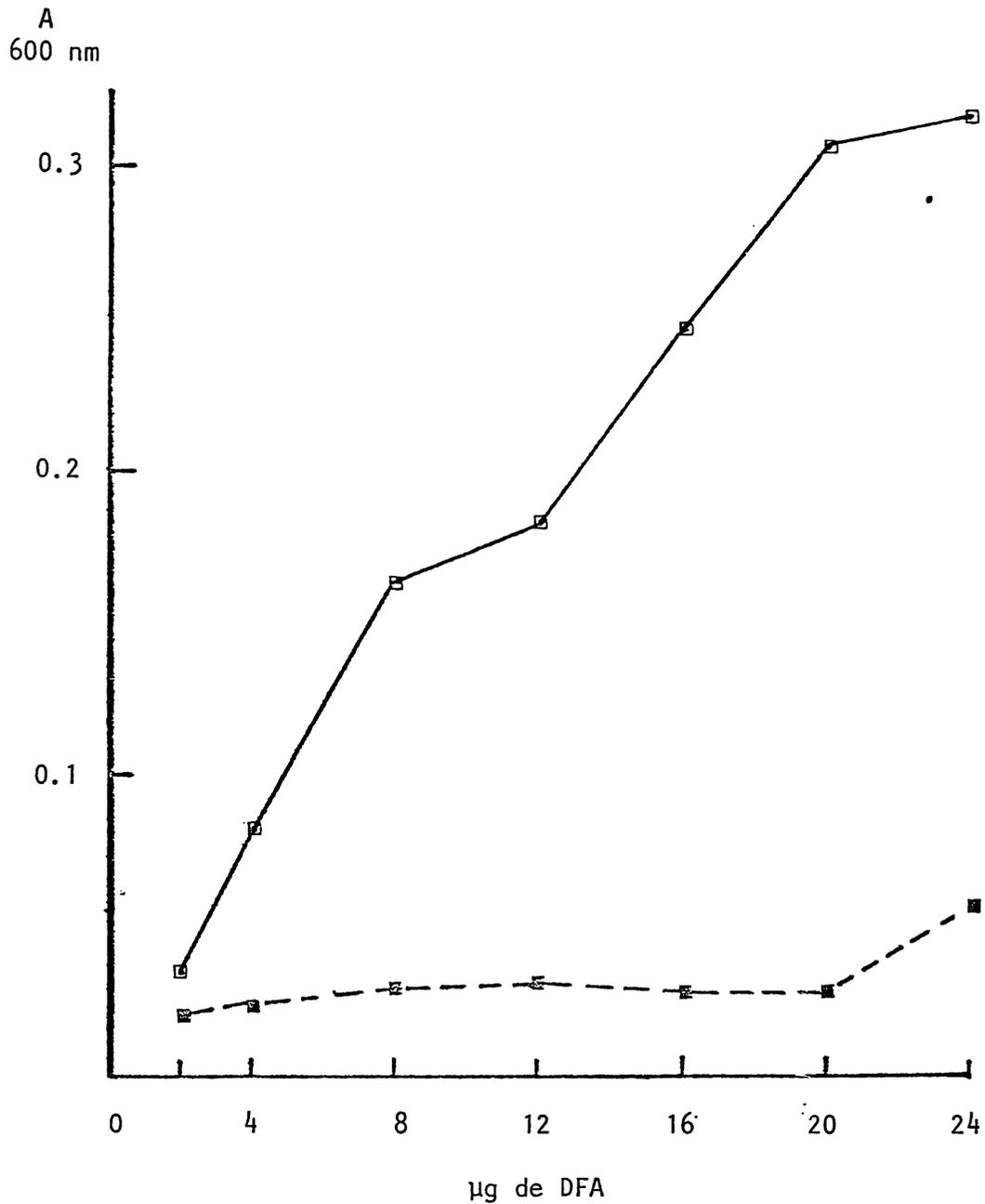


Figura 10. Efecto de la concentración de la difenilamina (DFA) en la reacción colorimétrica.

En la gráfica, la línea continua muestra la absorbancia de 20 µg de ADN y la línea discontinua indica la absorbancia de cada blanco de reactivos, a las diferentes concentraciones de la DFA.

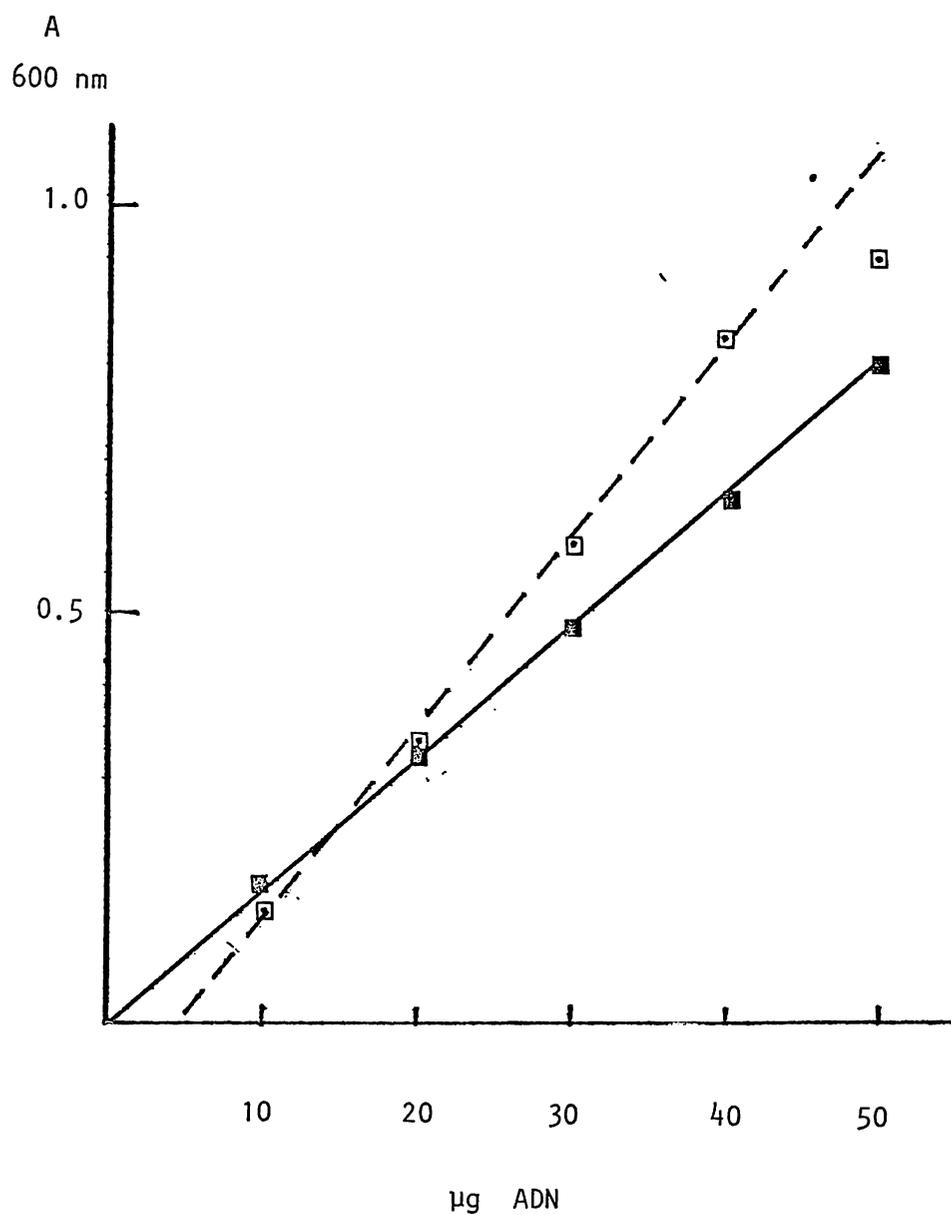


Figura 11. Solubilización del ADN en PCA 2 M y en PCA 2 M más NaOH 5 mM.

La línea continua representa la absorbancia por las diferentes concentraciones del ADN solubilizado en PCA-NaOH, la línea discontinua corresponde a la absorbancia del ADN solubilizado en el PCA.

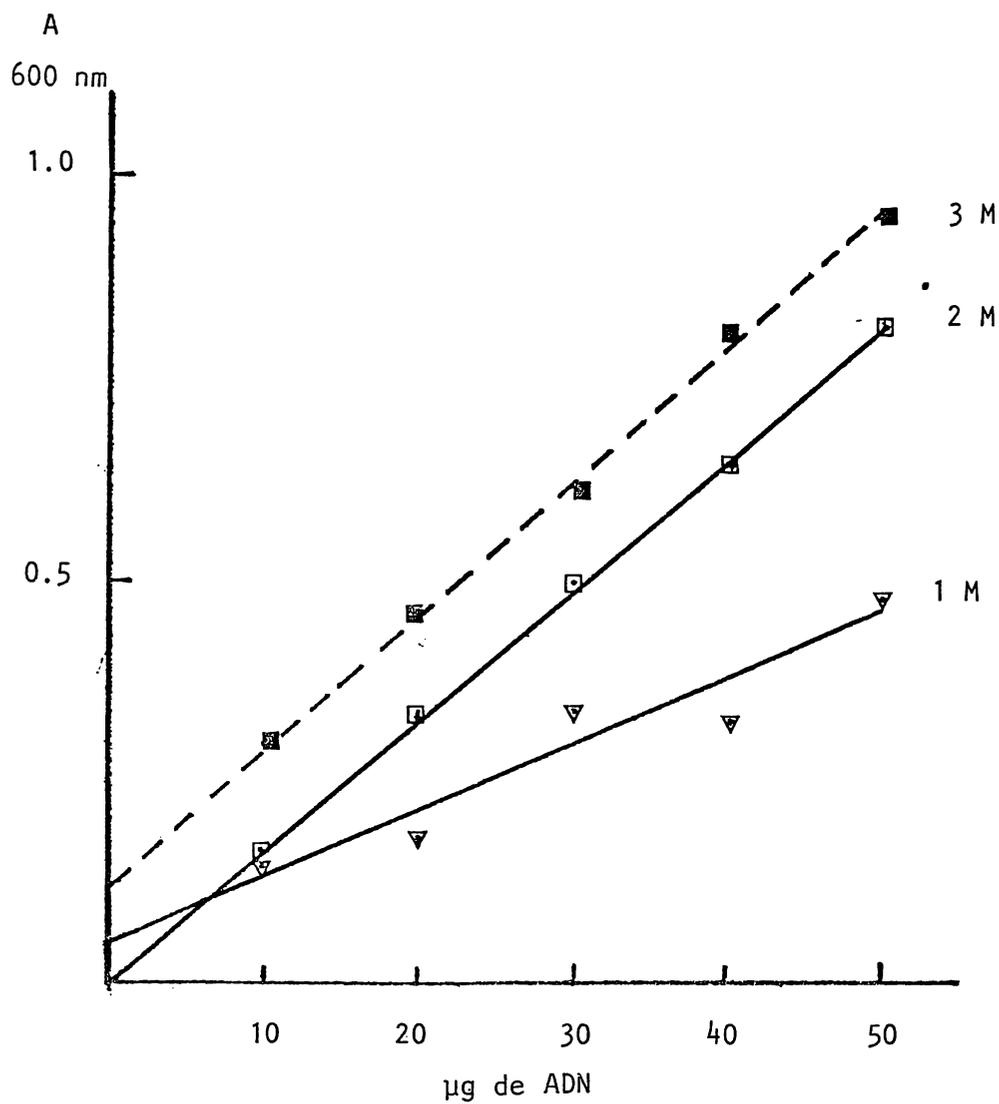


Figura 12. Efecto de la concentración del ácido perclórico (PCA) en la reacción colorimétrica.

Cada línea muestra la absorbancia del ADN a las concentraciones indicadas de 1 a 3 M del PCA.

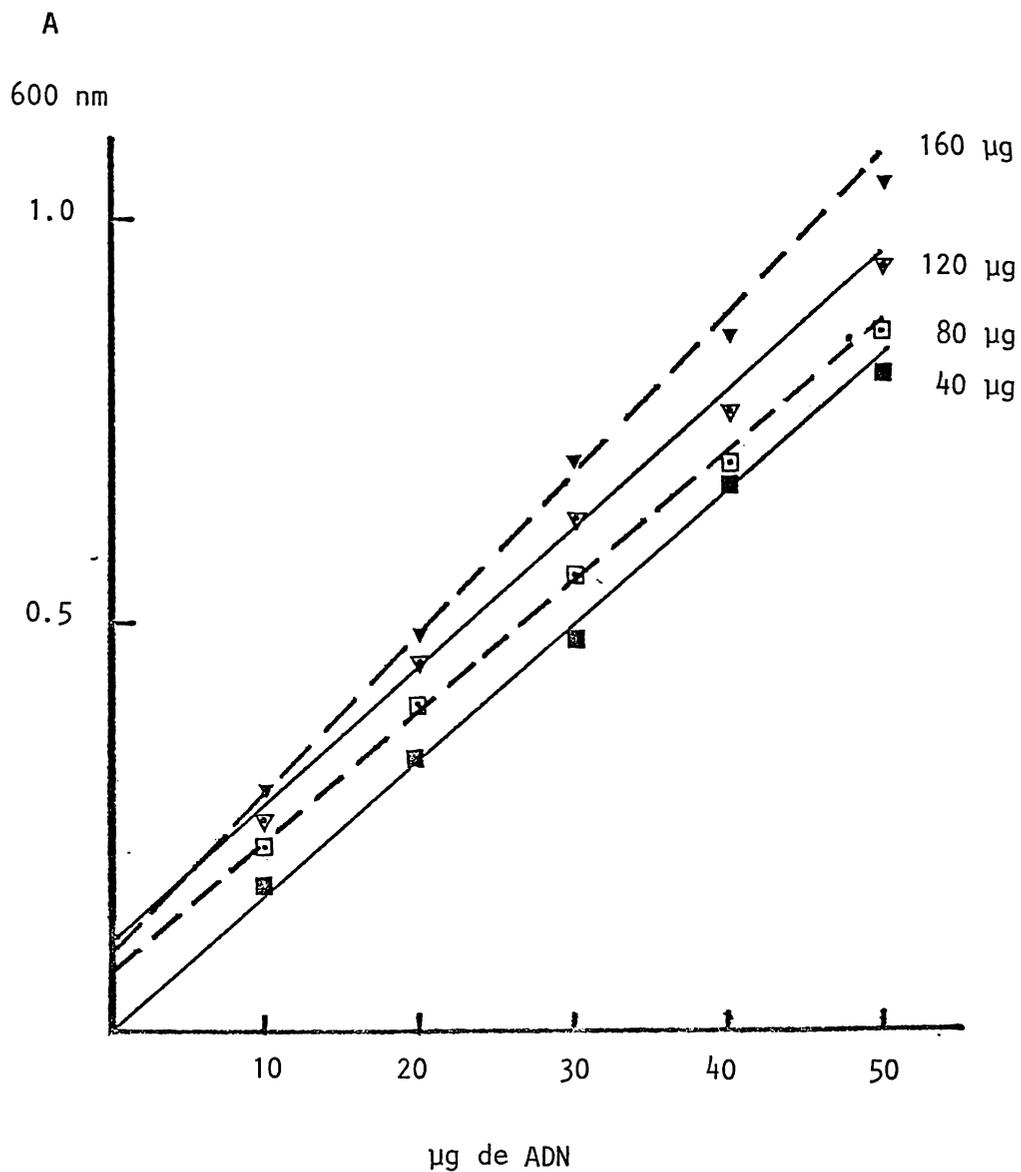


Figura 13. Efecto de la concentración del acetaldehído en la reacción colorimétrica.

Cada línea indica las absorbancias del ADN con cada una de las diferentes concentraciones señaladas del acetaldehído.

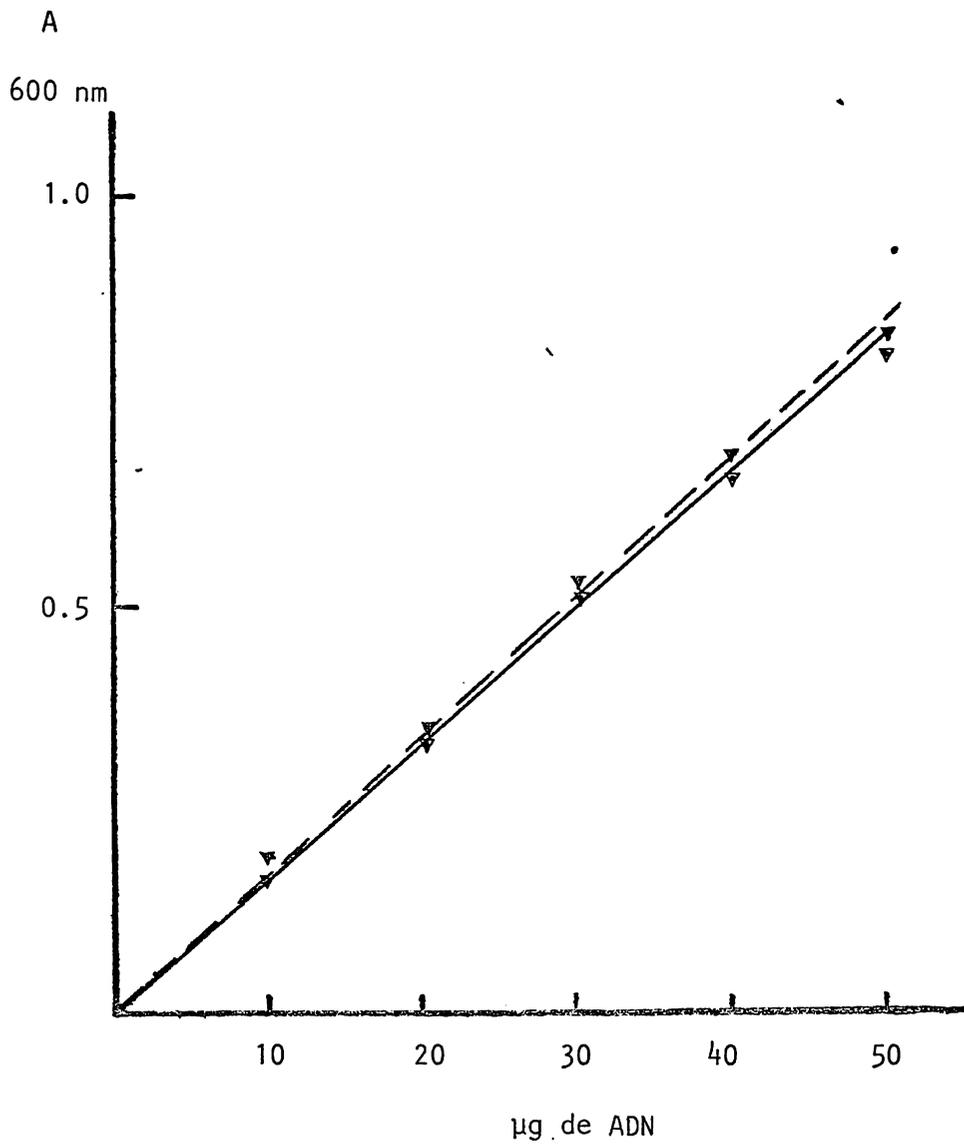


Figura 14. Influencia de la temperatura de incubación (18 hs) en la reacción colorimétrica.

La línea continua representa la absorbancia del ADN incubado a 30° y la línea discontinua muestra la absorbancia del ADN incubado a 37°.

CAMBIOS EN LAS PROTEINAS DEL MAIZ DURANTE LA

NIXTAMALIZACION

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA

MARIA DIANA SANCHEZ MEJORADA MARTINEZ DEL SOBRAL

OCTUBRE 1982