

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
inéditas



TESIS DOCTORAL

**Dinámica intracelular de los receptores estrogénicos en
útero, adenohipófisis e hipotálamo de rata frente a dosis
bajas de estradiol**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Julia Gómez Benítez

Madrid, 2015



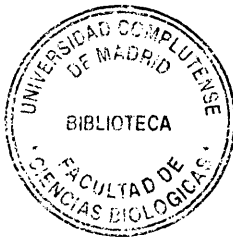
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5318223847

T 577.17
GOM
din

DINAMICA INTRACELULAR DE LOS RECEPTORES ESTROGENICOS
EN UTERO, ADENOHIPOFISIS E HIPOTALAMO DE RATA FRENTE
A DOSIS BAJAS DE ESTRADIOL.



R. 36595

Memoria para aspirar al Grado de
Doctor, presentada por la Lcda.
Julia Gómez Benitez.

A mis padres,

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Bonifacio Diaz Chico por su dirección y constante estímulo y apoyo en la consecución de este trabajo.

A D. Angel Sosa Gonzalez, Profesor Ayudante de Bioquímica y a D. Juan Rivero Baez, Técnico de Laboratorio, por la gran ayuda prestada en la realización práctica de este trabajo.

A Julia Suárez y Bravo de Laguna por su labor mecanográfica.

A todos mis compañeros de Departamento, que de una forma u otra han colaborado en su elaboración.

Mi especial agradecimiento a D. Antonio Gonzalez, Catedrático de Química Orgánica de la Facultad de Químicas de la Universidad de La Laguna, por su gentileza en aceptar la ponencia de esta Tesis Doctoral.

I N D I C E

I N D I C E

1.- INTRODUCCION	1
1.1.- Introducción histórica del concepto de receptor estrogénico.	2
1.2.- Principales acontecimientos en la acción de los estrógenos sobre las células diana	5
1.2.1.- El estradiol en el plasma	7
1.2.2.- Entrada del estradiol en la célula	9
1.2.3.- Receptores estrogénicos	11
1.2.3.1.- Naturaleza, propiedades y formas.	11
1.2.3.2.- Interacción receptor-estradiol : enlaces, especificidad, afinidad.	16
1.2.4.- Translocación de los complejos estrógeno- receptor al núcleo. Activación del receptor.	25
1.2.5.- Locus de captación intranuclear: el aceptor nuclear.	28
1.2.6.- Respuesta celular al estradiol. Utero, ade- nohipófisis e hipotálamo.	32
1.2.7.- Receptores tipo II.	37
1.2.8.- Respuesta de la población de receptores ce- lulares al estímulo del estradiol. Conoci- miento actual del ciclo del receptor.	40
1.3.- Objetivos y planteamiento del trabajo	45

2.- MATERIAL Y METODOS	47
2.1.- Animales y tratamiento	48
2.2.- Procesamiento del Tejido	49
2.2.1.- Extracción del Tejido	49
2.2.2.- Homogeneización	49
2.2.3.- Fraccionamiento celular	50
2.3.- Medida de la capacidad captadora de estradiol "in vitro"	51
2.3.1.- Medida de los receptores citosólicos	51
2.3.2.- Medida de los receptores nucleares	55
2.4.- Curvas de saturación	58
2.5.- Medida de la capacidad captadora de estradiol "in vivo"	59
2.6.- Medida de la concentración de proteínas	60
2.7.- Medida de la concentración de ADN	62
3.- RESULTADOS	64
3.1.- Verificación de los métodos empleados	65
3.1.1.- Análisis de proteínas	65
3.1.2.- Análisis de ADN	75
3.1.3.- Análisis de receptores	76
3.2.- Receptores en útero	84
3.2.1.- Evolución de los receptores citosólicos uterinos tras la administración de las diferentes dosis de estradiol.	84

3.2.2.- Evolución de los receptores nucleares uterinos tras la administración de las diferentes dosis de estradiol	101
3.2.3.- Evolución conjunta de los receptores de estradiol en útero	118
3.3.- Receptores en adenohipófisis	135
3.3.1.- Evolución de los receptores citosólicos adenohipofisarios tras la administración de las diferentes dosis de estradiol	135
3.3.2.- Evolución de los receptores nucleares adenohipofisarios tras la administración de las diferentes dosis de estradiol	152
3.3.3.- Evolución conjunta de los receptores de estradiol en adenohipófisis	169
3.4.- Receptores en hipotálamo	181
3.4.1.- Evolución de los receptores citosólicos hipotalámicos tras la administración de las diferentes dosis de estradiol	181
3.4.2.- Evolución de los receptores nucleares hipotalámicos tras la administración de las diferentes dosis de estradiol	198
3.4.3.- Evolución conjunta de los receptores de estradiol en hipotálamo	209
3.5.- Captación "in vivo" de estradiol por sus tejidos diana.	216
3.5.1.- Captación de $^3\text{H-E}_2$ por el útero	217
3.5.2.- Captación de $^3\text{H-E}_2$ por la adenohipófisis	217
3.5.3.- Captación de $^3\text{H-E}_2$ por el hipotálamo	220
3.5.4.- Niveles de $^3\text{H-E}_2$ en plasma y citosol de útero, adenohipófisis e hipotálamo	222

3.5.5.- Relaciones entre los niveles de receptores y de estradiol, y la acumulación de $^3\text{H-E}_2$ en los tejidos diana	226
3.6.- Estudio comparativo de las dinámicas de los receptores citosólicos en útero, adenohipófisis e hipotálamo	231
3.7.- Estudio comparativo de las dinámicas de los receptores nucleares en útero y adenohipófisis	236
4.- DISCUSION	241
5.- CONCLUSIONES	252
6.- BIBLIOGRAFIA	258

A B R E V I A T U R A S

- AHF = Adenohipófisis
C.A.= Carbón activo
DES = Dietilestilbestrol
E = Estradiol
E* = Estradiol radiactivo
Ec = Estradiol citosólico
En = Estradiol nuclear
ER = Complejo estradiol-receptor
ER* = Complejo estradiol-receptor activado
EDTA= Acido etilen-diamin-tetraacético
HT = Hipotálamo
POPOP = 1.4 Bis-(2-(4-metil 5-fenil-1.3-oxazolil)-benceno
PPO = 2.5 Difetil oxanol
R = Receptor
Rc = Receptor citosólico
RcE = Complejo estradiol-receptor citosólico
Rn = Receptor nuclear
RnE = Complejo estradiol-receptor nuclear
TCA = Acido tricloroacético
TE = Tampón Tris-EDTA
TRIS= Hidroximetil aminometano
UT = Utero

1.- INTRODUCCION

1.1.- INTRODUCCION HISTORICA DEL CONCEPTO DE RECEPTOR ESTROGENICO .-

Los efectos de la castración sobre los órganos sexuales accesorios de los animales son conocidos por la humanidad desde la antigüedad. No obstante el avance en el conocimiento íntimo de los efectos hormonales sobre dichos órganos es muy reciente.

Las respuestas celulares a la acción de los estrógenos empiezan a conocerse al comienzo de la década de los cincuenta. SZEGO y ROBERT (1953) observaron como efecto primario de la hormona alteraciones en la vascularización y en la permeabilidad uterina, así como la síntesis de proteínas específicas. MUELLER y Col. (1958) fueron los primeros en proponer que los estrógenos podían actuar como inductores o represores de la actividad del DNA de las células con capacidad de responder a estas hormonas, es decir las células diana.

La investigación se dirigió al estudio del transporte de la hormona al interior de las células y al estudio de su acción sobre la síntesis de RNA y proteínas, empleando los métodos puestos a punto en esta década de despegue de la biología molecular.

El problema de averiguar la acción primaria de la hormona al llegar a la célula no pudo ser abordado hasta algunos años después. Este campo de la investigación comenzó a desarrollarse con la introducción de las técnicas de marcaje de los estrógenos con tritio, adquiriendo gran interés los trabajos desarrollados por JENSEN y JACOBSON (1962) sobre el destino de los estrógenos tritiados en los órganos diana, que marcan el comienzo de una nueva fase en la comprensión de la interacción hormona-célula aún inconclusa.

El uso por estos autores de la hormona marcada radioactivamente, permitió establecer su afinidad por las células diana, demostrando que la hormona se acumulaba en mayor cantidad y era retenida durante mas tiempo en útero que en otros tejidos. Posteriormente, mediante la

autorradiografía se confirmó que el esteroide era retenido en las células diana a los pocos minutos de su administración, frente a la escasa retención que se observaba en las células no diana (KING y MAINWARING, 1974; GORSKI y Col., 1968).

Un nuevo avance se dió cuando STUMPF, (1968), demostró que en la célula diana el esteroide tiende a acumularse en el núcleo, lo que puso de manifiesto que el mecanismo de la acción de las hormonas esteroideas tiene lugar a nivel de la expresión genética. Observó además mediante la autorradiografía cómo la migración de la hormona al núcleo era extremadamente rápida y precedía a cualquier otro cambio observable en la célula. Por el contrario, en células no diana, la hormona = atraviesa en ambas direcciones la membrana plasmática y su concentración interna no supera a la presente en el plasma.

Ante estos hechos, se vió afianzada la hipótesis de que un receptor pudiera estar implicado en la respuesta celular a las hormonas esteroideas. De este modo además de justificarse la captación y retención de la hormona por los tejidos diana, se aportaba una explicación = al hecho de que una molécula tan sencilla fuera capaz de ejercer efectos tan diversos, asociándose a una molécula mucho mayor y mucho más = versátil como es una proteína.

Los receptores esteroideos se identificaron en 1966 por TOFT y == GORSKI, que lograron aislarlos centrifugando un extracto de tejido == uterino de ratas a las que se les había inyectado estradiol marcado, = mediante la técnica de separación en gradiente de densidad de sacaro = sa. Desde entonces y hasta la actualidad, se ha desarrollado una in = tensa investigación en este campo, lograndose grandes avances en el = conocimiento de las características físico-químicas del receptor y de la interacción con el esteroide, fundamentalmente gracias al empleo = de moléculas de síntesis con capacidad de unirse al receptor.

Se ha incidido también en el papel que juegan los receptores en la acción hormonal. En este sentido se ha abordado la relación que pudiera existir entre las fluctuaciones de su concentración celular tras la administración de estrógenos, y su significación con respecto a las respuestas celulares a la hormona.

Los estudios sobre los receptores estrogénicos marcaron la pauta para una nueva era de la investigación en endocrinología. Hoy se han identificado receptores para todas las hormonas esteroideas y para la mayoría de las hormonas no esteroideas, estableciéndose con toda claridad el principio de que cuando un tejido no reacciona ante una hormona determinada se debe a que éste carece de los correspondientes receptores.

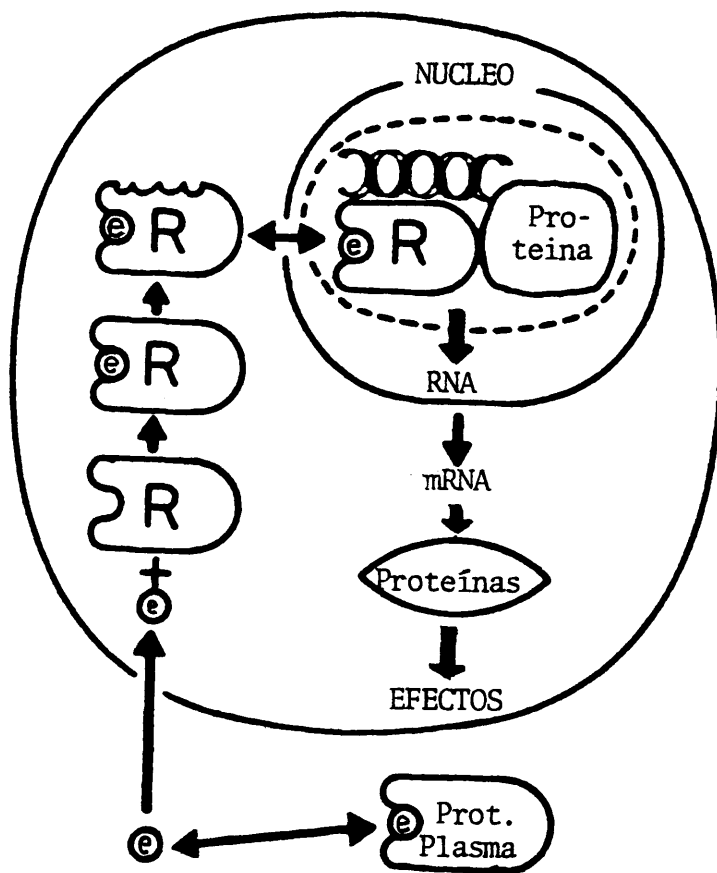
1.2.- PRINCIPALES ACONTECIMIENTOS EN LA ACCION DE LOS ESTROGENOS SOBRE LAS CELULAS DIANA .-

En la Fig. 1 se ilustra el modelo que actualmente se acepta sobre la acción de las hormonas esteroideas en sus células diana. Las líneas básicas de este esquema fueron trazadas por JENSEN desde 1962 y complementadas con posteriores investigaciones (DE SOMBRE, 1980; MILGROM, 1981).

El estradiol secretado fundamentalmente por los ovarios alcanza las células transportado principalmente por las proteínas plasmáticas. Después de entrar en las células, se une al receptor citosólico en una interacción que se caracteriza por su alta afinidad y especificidad que conduce a la formación del complejo esteroide-receptor. Este complejo adquiere nuevas características al sufrir un proceso de activación que se identifica con un cambio en el coeficiente de sedimentación y que implica probablemente un proceso de dimerización (NOTIDES, 1975; JUNGBLUT, 1979). La activación del complejo E-R, hace que se incremente su nucleofilia y se produzca por tanto, la migración al núcleo. Es en este compartimento celular donde tras unirse a lugares aceptores de la cromatina aún no identificados, induce la transcripción genética. Como resultado de la interacción a nivel nuclear, se manifiestan una serie de fenómenos que conforman la respuesta de la célula a la acción hormonal.

En los próximos apartados de este capítulo, se abundará en el conocimiento de cada una de las etapas de la acción del estradiol.

FIG. 1



MODO DE ACCION DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN SUS CELULAS DIANA.

R : Receptor
e : Esteroide

1.2.1.- EL ESTRADIOL EN EL PLASMA .-

El estradiol, debido a su escasa solubilidad en medio acuoso, alcanza los diferentes órganos diana circulando en el plasma asociado a la albúmina y a la proteína captadora de hormonas sexuales (SHBG).

La albúmina por su elevada concentración plasmática es la proteína a la que principalmente se asocia el estradiol, aunque su unión es débil ($K_d = 10^{-5}M$) e inespecífica. Una idea de la magnitud de esta captación la da el comparar la solubilidad del estradiol en agua a 37°C ($2 \times 10^{-5}M$) con la solubilidad en una solución de albúmina al 3% ($2 \times 10^{-4}M$).

En plasma humano se ha aislado la proteína SHBG (sex hormone binding globulin) que capta estradiol con menor capacidad que la albúmina pero con gran especificidad y afinidad (MERCIER y Col., 1970; ROSEBOUND y Col., 1966). Esta beta-globulina tiene como principal característica su capacidad de unión a los beta-hidroxiesteroides con una K_d del orden de $10^{-9}M$. Su concentración plasmática se mantiene constante durante el ciclo menstrual y a lo largo de la vida adulta, aumentando durante el embarazo, posiblemente para amortiguar la elevación de testosterona (SIITERI, 1979).

Cuando la concentración de estradiol circulante es baja, la mayoría se detecta unido a esta proteína específica. La unión a la albúmina se manifiesta más claramente a altas concentraciones de la hormona, cuando se ha saturado la capacidad de ligar hormona por la SHBG.

El plasma de ratas carece de SHBG, pero presenta otra proteína, la EBP (estradiol binding protein), que difiere de la SHBG en su especificidad. Se une específicamente al estradiol y a la estrona, y no reconoce a los andrógenos testosterona ni 5-alfa-dihidrotestosterona. Su presencia ha sido detectada en elevada concentración en ratas pre

ñadas y en fetos, disminuyendo con la edad hasta hacerse indetectable al alcanzar la madurez (KING y MAINWAIRING, 1974).

El papel que juegan estas proteínas plasmáticas no ha sido establecido con claridad. Se piensa que podría intervenir en la regulación de la secreción de hormonas desde las células glandulares, ó -- que pudieran servir como protección de la hormona ante la acción de las enzimas hepáticas. Otra posibilidad es que tuvieran capacidad = para reconocer algunos elementos de las células diana tras atrave-- sar las paredes vasculares, y facilitar de ese modo el intercambio = de hormonas entre plasma y célula. El papel funcional mas aceptado = es el que constituyen un reservorio para el estradiol que asegure = el abastecimiento hormonal a los tejidos en caso de verse incremen-- tada la demanda y/o el servir de amortiguadores que protejan a las células de un aporte excesivo de la hormona. (RAYNAUD, 1973; ALBERGA y BAULIEU, 1974).

El hecho que el estradiol y otros estrógenos sean muy debilmente metabolizados en los tejidos diana (FISHMAN, 1976) hace que la concentración plasmática de estos productos juegue el papel central en su aporte a las células. Así, la actividad hepática que metaboliza = a los estrógenos hasta productos inactivos, y la actividad renal, = que elimina continuamente estos productos inactivos junto con estrógenos activos libres en el plasma, contrarrestan la actividad secre = tora de ovarios y suprarrenales en cuanto a nivel plasmático de es = tos productos. El papel de los tejidos diana sobre los niveles de = estrógenos corporales, es pues, pasivo a excepción de un grado inde = terminado de aromatización de andrógenos de origen suprarrenal, de = mostrado en tejidos como el ovarico, adiposo, sistema límbico e hi = potálamo (NAFTOLIN y Col., 1976), y cuya importancia real no ha si = do evaluada con exactitud.

1.2.2.- ENTRADA DEL ESTRADIOL EN LA CELULA .-

El mecanismo íntimo del proceso de entrada del estradiol en las células diana no es bien conocido. Se acepta ampliamente que la membrana celular no ofrece ningún obstáculo para que las sustancias de naturaleza lipídica como el estradiol difundan a su interior.

Los primeros trabajos de JENSEN y JACOBSON (1962) apoyaron esta teoría demostrando que la mayor captación de los tejidos diana es debida a la presencia de receptores específicos más que a una posible diferencia en el mecanismo de entrada de la hormona en la célula.

Numerosas investigaciones posteriores, han aportado pruebas a favor de esta difusión pasiva (PECK y Col., 1973; MILGRON, 1973). DE HERTOGH, (1971) estudió la distribución de tritio en plasma y en útero de rata después de infundir estradiol marcado durante 4 horas a un flujo que varió entre 0.5 y 920 ng/hora. Tras el análisis comparativo de las constantes de equilibrio entre el estradiol libre y el ligado de forma específica o inespecífica, concluyó que el factor principal que gobierna la captación de estradiol por las células uterinas es la baja K_d del complejo estradiol-receptor ($K_d = 2.1 \times 10^{-10} M$), ya que el valor de la constante que incluye los posibles factores de permeabilidad entre el plasma y el citoplasma resultó ser del mismo orden ($K = 2.9 \times 10^{-10} M$) y por tanto no presentan obstáculo en la transferencia de la hormona.

No obstante, y a pesar de las evidencias aportadas en favor de un proceso de difusión pasiva, no se puede descartar la posibilidad de un transporte mediado por proteínas (MILGROM, 1973). La existencia de un gran número de locus de unión en el citoplasma, podría enmascarar la detección de una proteína transportadora a nivel de la membrana. Además, al utilizar para estos ensayos incubaciones de

tejido intacto, no se consigue medir la tasa real de captación del esteroide al no ser evaluadas una serie de determinantes de la captación como son: la penetración a través del espacio intercelular, la difusión del estradiol a través de las diferentes capas de células, o la adsorción del mismo a lugares de unión no específicos de la membrana celular.

Con la intención de salvar estas limitaciones MÜLLER y WOTIZ, (1979) trabajaron con suspensiones de células uterinas midiendo la concentración de complejos estradiol-receptor formados a 37°C, temperatura a la que la translocación nuclear no es limitante. En estas experiencias se descarta la posibilidad de un transporte activo o mediado por proteínas, siendo los resultados favorables a la difusión pasiva. Teniendo en cuenta que el procedimiento de obtención de la suspensión celular hubiese podido inactivar a los posibles transportadores de membranas, MULLER y Col. (1979), realizaron una serie de experimentos con membranas purificadas en los que midieron la captación específica del estradiol, sin encontrar pruebas de la existencia de tales transportadores.

1.2.3.- RECEPTORES ESTROGENICOS .-

Desde que se tuvo conocimiento que el estradiol se unía específicamente a un componente citoplasmático de elevado peso molecular, = la investigación se centró en su identificación, análisis de sus == propiedades, y en intentar dilucidar su significación funcional.

1.2.3.1.- Naturaleza, propiedades y formas .-

TOFT y GORSKI, (1966) introdujeron en este campo la técnica del análisis por gradiente de sacarosa, demostrando que en el citosol de ratas inmaduras existía una proteína que captaba específicamente estradiol tritiado, de coeficiente de sedimentación 8S, al que atribuyéndole una naturaleza globular le asignaron un peso molecular de 200.000. Este receptor estrogénico que se aislaba en un medio de baja fuerza iónica, fué estudiado posteriormente por otros= autores, estableciéndose sus características físicas que se reco-- gen en la Tabla 1.

El receptor 8S se disocia en un medio 0.15 M en KCl dando la = forma conocida como receptor 6S. Si se aumenta la concentración de KCl hasta 0.4 M, se aísla el receptor 4S, ocurriendo que ambas for= mas 4S y 6S se pueden agregar de nuevo al disminuir la fuerza ióni= ca del medio regenerando la forma 8S. Como el receptor 4S conserva la capacidad de unirse al estradiol y no se disocia al aumentar == aún más la salinidad, se le consideró como la unidad básica del re= ceptor (KING y MAINWARING, 1974).

Si en el medio de separación se añaden iones Ca^{++} , se obtienen= también unidades de coeficiente de sedimentación 4 ó 4.5S a las que se denominan 4S-Ca, que son incapaces de reagregarse por adición = de EDTA ni por disminución de la salinidad. PUCA, (1971) explica es= te hecho en base a la activación que los iones Ca^{++} producen sobre las proteasas, admitiendo que estos enzimas producen algún daño - irreversible al receptor.

La acción de la tripsina (PUCA, 1971) transforma al receptor 8S en un receptor tipo 4S similar al obtenido en presencia de iones Ca^{++} , = que tampoco vuelve a reagregarse al disminuir la fuerza iónica del me-
dio .

Además de las formas 4S obtenidas por la acción de enzimas o de sa-
les sobre el receptor 8S, se detectó la existencia de una nueva forma
4S en medio hipotónico que se denominó receptor 4S "nativo" (YAMAMOTO,
1972). Este se aisló como tal en condiciones de baja fuerza iónica y
se aceptó como la verdadera forma del receptor citosólico.

Por último, señalar la existencia del receptor 5S que se obtiene a
partir del receptor 4S por incubación con estradiol a 25 o 37°C, me--
diante un proceso aún no esclarecido. Este tipo de receptor había si-
do detectado en el núcleo y se pensaba que era la forma activa del re-
ceptor 4S capaz de inducir respuesta nuclear. JENSEN (1979); DE SOMBRE
(1980) y NOTIDES (1979).

Ante la variedad de formas obtenidas MULLER (1972) le atribuye al
receptor una composición heterogénea en la que participan diversas =
subunidades que se diferencian por sus parámetros físicos y por su ca-
pacidad de unirse específicamente al estradiol. Tabla 1 .

De los numerosos trabajos que se han desarrollado con el fin de --
identificar y relacionar los diferentes tipos de receptores citosóli-
cos, son las recientes investigaciones de MURAYAMA y Col. (1980a); ==
(1980b); (1980c) y (1980d) las que consiguen con mayor solidez esta--
blecer estas interdependencias.

Estos autores establecen las diferencias entre los receptores 4S =
obtenidos por la acción de los iones Ca^{++} y por la tripsina, a los ==
que denominan receptores 4S "modificados" con el receptor 4S "nativo"
al que consideran la unidad básica del receptor. Este receptor se pue-
de obtener con gran rendimiento siempre que en el medio esté presente
un inhibidor de las proteasas (antipapaina), no reagregándose ni en =
medio hipertónico ni hipotónico. Sin embargo, al incubarlo con cito--

TABLA 1

CARACTERISTICAS MOLECULARES DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO
ESTRADIOL-RECEPTOR CITOPLASMATICO.

	Coefficiente de Sediment. (S)	Radio Stokes (A)	Peso Molecular	Ref. Bibliog.
8S	8.6	67	236.000	PUCA (1971)
4S-Ca	4.5	33	61.000	PUCA (1971)
4S-Tripsina	3.9	36	60.000	ERDOS(1971)
8S	8.0	68	225.000	MURAYAMA (1980)
4S-Nativo	4.5	44	82.000	" "
4S-Modificado	4.5	35	65.000	" "
8S-FF	6.9	51	145.000	" "
Componente A	3.8	37	58.000	" "
Componente B	1.8	18.5	13.700	" "
5S	5.5	60	136.000	" "
6S	6.5	60	162.000	" "

sol se transforma en el receptor 8S lo que indica la existencia = de algún factor citoplasmático al que el receptor 4S se une para = rendir la forma 8S, y al que denominan "factor de formación del = receptor 8S" (8S FF).

Por el contrario en ausencia del inhibidor de las proteasas, y en presencia o no de iones Ca^{++} , la forma 4S que se obtiene pre--senta un radio de Stokes y un peso molecular menor (Tabla 1), perdiendo su capacidad de reagregarse tanto por disminución de la fuerza iónica como al incubarlo con nuevo citosol.

Ante estos hechos, estos autores consideran que las proteasas = degradan irreversiblemente al receptor, incapacitandolo para unir = se al factor 8S FF y formar el receptor 8S.

El factor 8S FF fué aislado por MURAYAMA y Col. y determinadas sus constantes físicas (Tabla 1). Como puede comprobarse, la = suma de los pesos moleculares del receptor 4S nativo y del factor 8S FF dan el peso molecular del receptor 8S. Características a == destacar de este factor son su incapacidad de enlazar específicamente al estradiol y la acción protectora que ejerce sobre el receptor 4S frente a la acción de las proteasas.

En cuanto a su composición, el 8S FF está constituido por dos subunidades A y B de naturaleza protéica en proporción 1:6. Ambas se unen al receptor 4S nativo para formar el receptor 8S en condi ciones hipotónicas, y al igual que el 8S FF ni la subunidad A ni la B se unen específicamente al estradiol.

Con la identificación de estos factores citoplasmáticos se ha = podido establecer como se relacionan entre sí las diferentes formas del receptor. Se considera que como constituyentes básicos -- existen en el citoplasma celular el receptor 4S nativo y los factores A y B antes citados. Estos factores A y B en relación 1:6 = constituyen el factor 8S FF que al unirse al receptor 4S nativo =

en condiciones de baja fuerza iónica rinde el receptor 8S.

Cuando el receptor 4S nativo se une a los factores A y B en diversas proporciones y en diferentes condiciones de salinidad se = obtienen las formas intermedias 6S y 7S del receptor. Tabla 1.

El receptor 5S se forma cuando el receptor 4S nativo se une -- únicamente al componente A, que por esta razón también se le denomina "factor formador del receptor 5S" ó 5S FF. El receptor 5S no libera a su componente 4S ni en condiciones de alta fuerza iónica (0.4 M KCl), al contrario de lo que se observa con las formas 6S, 7S y 8S que si se disocian.

A nivel nuclear predomina la forma 5S sobre la 4S, habiendose= detectado también en este compartimento celular la presencia de = los factores A y B (MURAYAMA y FUKAI, 1981).

En adenohipófisis e hipótalamo se han reconocido receptores -- 4S, 5S y 8S aunque no han sido sometidos a un estudio tan intenso como los receptores uterinos, dada su menor concentración y la mayor dificultad del proceso de su aislamiento. (TALLEY, 1975; --== LINKIE, 1977; FOX, 1977; MILGROM, 1980).

Por último, hay que señalar que todos los estudios que se han= hecho para investigar las distintas formas de los receptores, se= han realizado con el receptor aislado después que se haya unido a la hormona tritiada. Por ello a pesar de conocerse la composición de las distintas formas en que se puede aislar el receptor, no == hay pruebas definitivas sobre cual es la forma que existe en la = célula antes de la unión con el estradiol. Se desconoce si las variaciones que sufre su composición son inducidas por el estradiol o si son simplemente consecuencia de la manipulación de la mues-- tra.

1.2.3.2.- Interacción receptor-estradiol: Enlaces, especificidad y afinidad.

Naturaleza de la interacción receptor-esteroide .-

Los estudios cristalográficos realizados sobre las diferentes moléculas que interaccionan con el receptor y el conocimiento de la especificidad y afinidad con que el receptor las liga, han aportado una valiosa información para dilucidar la naturaleza de la interacción esteroide-receptor y las características del centro activo del receptor.

Numerosas son las pruebas que indican que el esteroide se une al receptor a través de dos puentes de hidrógeno distantes unos 15 Å situados a ambos extremos de la molécula, el C-3 y el C-17 para el estradiol y el C-3 y C-20 ó C-21 para otros esteroides, que son estabilizados por fuerzas atractivas adicionales del tipo Van der Walls.

La energía de la interacción es del orden de -12 Kcal/mol que se distribuye por igual entre los enlaces por puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Walls. Los enlaces de hidrógeno engendran tensión y las fuerzas de Van der Walls numerosas interacciones débiles, por ello el locus de unión del receptor debe caracterizarse por dos propiedades: rigidez y flexibilidad (DELETRE, 1980).

Para que un esteroide sintético compita con efectividad con la hormona natural, sus grupos polares han de ocupar posiciones equivalentes a los de la hormona, de forma que sus distancias y orientación permitan la formación de los enlaces de hidrógeno. La superposición de esqueletos de progestágenos sintéticos con el de la progesterona natural obtenidos por cristalografía por rayos X o por cálculo de geometría molecular arrojan unas diferencias entre dos carbonos homólogos que no exceden de 0.2 Å .

Hay que admitir que cuando se produce el enlace, tanto el esteroide como el receptor sufrirán distorsión y mutua adaptación. La flexibilidad del esteroide depende del grado de saturación, siendo muy baja para los anillos más saturados (progesterona, testosterona) y considerablemente alta para los derivados $\Delta 4, 9, 11$ trienos. Este tipo de compuesto se une a receptores de diversos tipos de hormonas y en general la especificidad disminuye con la flexibilidad de la molécula. (RAYNAUD, 1980).

Sobre las características estructurales de la proteína se tiene poco conocimiento, y aunque se dispone de la metodología que permite purificar los receptores, no está desarrollada en el grado que se requiere para su estudio detallado. Probablemente la unión con el esteroide introduzca algún cambio conformacional. La influencia que sobre la afinidad tiene la introducción de sustituyentes en diversos puntos del esqueleto esteroideo, sugiere que el esteroide está en estrecho contacto con la proteína en determinadas zonas como si ocupara un hueco hidrofóbico en la misma.

La naturaleza dual del esteroide, rigidez y flexibilidad, sugiere un tipo de interacción intermedia entre los conocidos como modelo "llave-cerradura" y modelo "cremallera". La unión podría iniciarse en un extremo del esteroide (por ejemplo el anillo A) a través de un enlace de hidrógeno y completarse posteriormente por amoldamiento mutuo entre el esteroide y la proteína. (BURGEN y Col. 1975; FACHENKO y Col., 1979).

Especificidad del receptor por el esteroide.-

El receptor capta al estradiol con gran afinidad ($K_d = 10^{-10}$ M), sin embargo su especificidad no es absoluta. Otras hormonas naturales como el estriol, la estrona o el 17-Alfa-estradiol también se =

unen al receptor aunque con una afinidad inferior.

Los estudios sobre la especificidad de la unión esteroide-receptor se realizan en base a experimentos "in vivo" e "in vitro". Así, se puede abordar el problema estudiando la retención uterina de diferentes compuestos estrogénicos marcados radiactivamente, y compararlos entre sí y con el estradiol.

Estos experimentos dan una medida del tiempo y de la magnitud de la retención por el tejido, requisito previo para que se produzca = respuesta a la hormona, que debe ser corroborado por sus efectos so bre el crecimiento uterino y otros parámetros de actividad estrogénica.

En estudios "in vitro" se ensayan los compuestos que compiten == con el $^3\text{H-E}_2$ por la unión al receptor y se compara su efectividad = con la del estradiol frío.

De este tipo de experiencias se ha obtenido abundante informa--- ción acerca del papel que juegan cada uno de los anillos de la molé cula del estradiol y de las influencias que pueden ejercer sus sus- tituyentes.

La naturaleza fenólica del anillo A es esencial para que el este roide se una al receptor. La testosterona no se une al receptor de estradiol. Por otra parte, la metilación del grupo hidroxilo en C-3 del estradiol origina una disminución en su capacidad de unión al = receptor. El 3-acetato tiene sin embargo, la misma potencia que el estradiol, probablemente por la naturaleza electrofílica del grupo= acetoxi.

Son escasos los compuestos que se han estudiado con sustituyen-- tes en los anillos B y C del esteroide. La hidroxilación en C-11 se sabe que hace disminuir la captación, probablemente a causa del efecto estérico que también se ha demostrado que interfiere con la acti-

vidad del enzima 17-alfa-hidroxireductasa de la placenta.

Sobre la influencia del anillo D se conoce que el paso de la configuración beta a alfa del hidroxilo en posición 17 decrece la captación por el receptor aunque no la elimina totalmente. El efecto = inhibitorio del 17-alfa-estradiol es despreciable a concentraciones del orden de mil veces superior a la del 17 beta-estradiol.

Del mismo modo que la isomería estructural influye sobre la formación del complejo hormona-receptor, también es importante el isomerismo óptico. La antípoda (+) del 17-beta-estradiol es cien veces más activa que el isómero (-).

Se ha sugerido que los sustituyentes sobre la cara alfa de la molécula impiden la estrecha yuxtaposición necesaria entre el esteroide y la macromolécula, aunque se conocen algunos casos que contradicen esta teoría, así, el 17-alfa-etinilestradiol es un ligando -- tan potente como el 17-beta-estradiol. El alto nivel de captación = absoluta de este compuesto por el útero quizá sea un reflejo de la alta concentración que se mantiene en plasma como consecuencia de = su lenta metabolización.

En lo que respecta al C-16, la hidroxilación en este carbono tambien reduce la captación, aunque no la anula. Es conocida la menor= afinidad del estriol por el receptor en comparación con la del es--tradiol. Sobre los efectos de los sustituyentes en esta posición, al no ser verdaderamente axiales ni ecuatoriales, sus efectos antagónicos deberían ser menos marcados que los esperados si se adopta el = modelo de unión a la proteína por la cara alfa del esteroide. El == isómero 16-beta es más efectivo en su unión al receptor que el 16-alfa en el caso del estriol, lo que apoya la teoría de la superfi--cie alfa.

El resto de los esteroides naturales como la testosterona, 5-alfa

dihidrotestosterona, la progesterona, la pregnenolona, el cortisol, la aldosterona ... etc., tienen una efectividad menor del 1% con respecto al estradiol en su unión con el receptor.

Compuestos no esteroideos .- El número de compuestos con actividad estrogénica y naturaleza no esteroidea crece sin cesar. La molécula debe reunir algunos de los requisitos descritos anteriormente en cuanto a la disposición de los grupos que se unan al receptor, y del resultado de esta unión dependerá su mayor o menor efectividad como estrógeno.

El dietilstilbestrol (DES) es un potente estrógeno, aunque se desconoce el modo en que ejerce su acción. En términos absolutos, a una concentración cien veces superior al estradiol, es capaz de inhibir en un 90-100% la unión de la hormona natural al receptor, y presenta una efectividad en desplazar al $^3\text{H-E}_2$ de los receptores comprendida entre el 150 y 290% superior a la del estradiol frío. Debido a esta propiedad se le usa en experimentación como competidor en las reacciones de desplazamiento del $^3\text{H-E}_2$ del receptor.

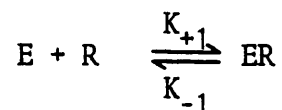
El hexoestrol fué uno de los primeros compuestos con actividad estrogénica que se sintetizaron, tiene una vida media similar a la del estradiol, y el nivel de captación por el útero después de una única inyección in vivo, es más alta que la que produce el estradiol.

Numerosos productos usados en clínica como antagonistas de la actividad estrogénica (antiestrógenos, tamoxifen, nafoxidina, etc.) también pueden unirse a los receptores con una afinidad de 100 a 1000 veces menor que el estradiol. Su actividad in vivo puede deberse a que se usan a concentraciones suficientemente altas como para lograr la saturación del receptor a pesar de su baja afinidad, si bien no se descarta que pueda actuar por otras vías en las células. (DIX, 1980; KORACH, 1979; BLACK, 1981; DE BOER, 1981; KATZENELLENBOGEN, 1979; MAIRESSE, 1979 y KING, 1980).

Afinidad del receptor por el esteroide .-

La afinidad se define experimentalmente como la concentración de hormona libre necesaria para mantener saturados a la mitad de los receptores disponibles. En este sentido, cuanto menor sea esta concentración, mayor será la afinidad de la unión hormona-receptor.

Considerando la reacción entre el esteroide y el receptor que conduce a la formación del complejo E-R:



en la que k_{+1} y k_{-1} son las constantes de velocidad de las reacciones de asociación y de disociación.

En el equilibrio, cuando las velocidades en ambos sentidos sean iguales:

$$k_{+1} |E| |R| = k_{-1} |ER|$$

$$\frac{|E| |R|}{|ER|} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_d \quad (1)$$

K_d , constante de disociación, representa la concentración de sustrato para la cual el 50% de los receptores están ocupados por la hormona.

Cuanto menor sea el valor de K_d , mayor afinidad tendrá el esteroide por su receptor. Los valores de esta constante para el estradiol y sus receptores en útero, adenohipófisis e hipotálamo oscilan entre 10^{-9} y $10^{-10}M$, mientras que la interacción estradiol albúmina arroja un valor de K_d del orden de $10^{-5}M$, lo que indica una baja afinidad en relación con la de la interacción con su receptor.

La determinación de la constante de disociación puede abordarse de un modo directo, mezclando los reactivos y valorando las concentraciones una vez alcanzado el equilibrio, o bien indirectamente, a partir del cálculo previo de las constantes de velocidad. Experimentalmente el primer método es más abordable y sencillo aunque su información es menor al no reflejar la contribución de las constantes de velocidad al valor definitivo de la K_d .

De la ecuación (1) y considerando a R_{max} como la concentración total de receptores:

$$R_{max} = |ER| + |R|$$

$$|R| = R_{max} - |ER|$$

sustituyendo en (1)

$$\frac{|E| (R_{max} - |ER|)}{|ER|} = K_d$$

de donde:

$$|ER| = \frac{|E| R_{max}}{|E| + K_d} \quad (2)$$

Ecuación que establece la relación entre el esteroide libre y la concentración del mismo ligado al receptor. Su presentación gráfica es = una rama de hipérbola (Fig. 2(a), Pag. 24) cuya asíntota corresponde a la saturación de los receptores presentes.

La relación (2) puede linearizarse de varias formas.

$$a) \quad \frac{1}{|ER|} = \frac{K_d}{R_{max}} \frac{1}{|E|} + \frac{1}{R_{max}} \quad (\text{Fig. 2(b)})$$

cuya representación es una recta de ordenada en el origen $1/R_{max}$ y la interacción con las abcisas $-1/K_d$.

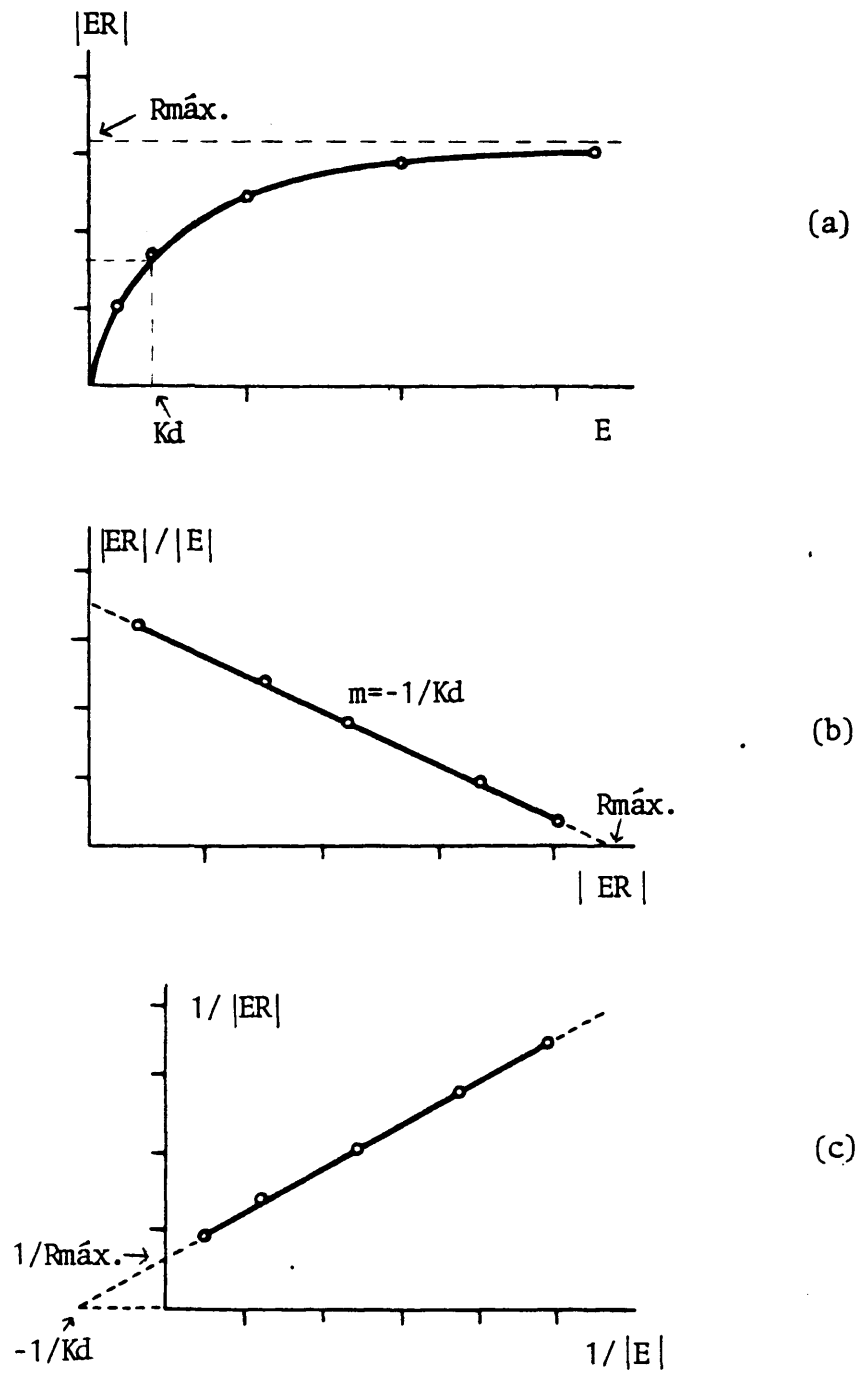
$$b) \quad \frac{|ER|}{|E|} = \frac{R_{max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} |ER| \quad (\text{Fig. 2(c)})$$

que es la ecuación de Scatchard, donde la interacción con las abcisas da el valor de $|ER| = R_{max}$, y la pendiente el de la constante de disociación ($-1/K_d$).

La representación gráfica de Scatchard es la más utilizada. Da mayor consistencia a los datos obtenidos a bajas concentraciones de ligando, y gráficamente muestra cualquier desviación perdiendo su linealidad cuando la proteína receptora posee más de un lugar de unión específico para la hormona, y a concentraciones de esteroide muy superiores a la de saturación al manifestarse la presencia de las captaciones de baja afinidad.

La representación gráfica recíproca tiene el inconveniente que a altas concentraciones de esteroide los valores de $|ER|$ tienden a amontonarse muy cerca de los ejes, pudiendo quedar enmascaradas las uniones de baja afinidad.

FIG. 2



(a) Curva de saturación; (b) Representación de Scatchard;
 (c) Representación recíproca.

1.2.4.- TRANSLOCACION DE LOS COMPLEJOS ESTROGENO-RECEPTOR AL NUCLEO. ACTIVACION DEL RECEPTOR.-

La diferencia de coeficiente de sedimentación entre el receptor citosólico y el nuclear (PUCA y BRESCIANI, 1968) proporcionó la primera evidencia a favor de la existencia de una transformación intracelular del receptor tras su unión al estradiol. A este fenómeno se le denomina actualmente activación del receptor, y guarda estrecha relación con su translocación al núcleo.

La forma nuclear 5S del receptor fué descrita por DE SOMBRE (1967) en el extracto nuclear de úteros con KCl 0.4 M, que previamente habían sido incubados con $^3\text{H-E}_2$. Por ello se admitió que el receptor nuclear era una forma alterada del receptor citosólico (GORSKI, 1968).

Esta hipótesis fué apoyada por varios hechos experimentales. Se comprobó que tras exponer úteros troceados al estradiol a 37° C, la mayoría de la hormona se localizaba en el compartimento nuclear, mientras que a 2°C el estradiol permanece en el citosol para ir apareciendo en los núcleos a medida que se aumenta gradualmente la temperatura. Paralelamente JENSEN y Col. (1968) demostraron que el receptor 5S nuclear, que también se aislaba en núcleos de rata que habían sido tratadas previamente con estradiol, puede obtenerse siempre que en el medio de incubación se incluya citosol que contenga receptores.

En base a estas observaciones se propuso el conocido modelo de translocación en dos pasos del receptor (JENSEN, 1972), en el que el receptor citoplasmático tras unirse al estradiol se transforma en 5S, forma activada que es translocada al núcleo. En la Fig. 3 se representa el esquema original completado con aportaciones posteriores (O'MALLEY y MEANS, 1974; GORSKI y GANNONG, 1976; JENSEN, 1979 y MULDOON, 1980).

El aspecto más debatido de este modelo es el referente al lugar celular donde se produce la activación del complejo ER. Algunos autores --

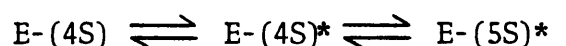
coinciden en afirmar que el proceso ocurre a nivel nuclear y no en el citosol como fué originariamente propuesto. En esta línea están los trabajos de LINKIE y SIITERI (1978) que han detectado en núcleos de ratas inmaduras la presencia de receptores 4S además de los 5S, observando que tras la administración de estradiol se produce un aumento progresivo de la forma 5S simultáneo con la disminución de los receptores 4S. Además, el que la presencia de DNA favorezca la activación de los complejos hormona-receptor (YAMAMOTO, 1972), y el que se haya detectado en núcleos la presencia del factor formador del receptor 5S (5S FF) (MURAYAMA y FUKAI, 1981), son hechos que favorecen esta hipótesis.

Por otra parte, se ha demostrado con estudios autorradiográficos (SHERIDAN, 1979; MARTIN y SHERIDAN, 1979) la presencia de receptores en el núcleo no ligados al estradiol. Estos y otros resultados (JUNGBLUT, 1979) sugieren que el receptor nativo en ausencia de estradiol pueda estar distribuido entre el citosol y el núcleo manteniéndose su concentración en equilibrio entre ambos compartimentos, y que la presencia de la hormona induce la formación del complejo y su posterior activación es la que produce su fijación en el núcleo al verse aumentada la nucleofilia del receptor.

El mecanismo a través del cual se produce la transformación del complejo E-R de su forma 4S a 5S, es hoy en día desconocido. NOTIDES y col (1975) estudiaron la cinética de la reacción encontrando que era de segundo orden, por lo que propusieron que la activación lleva implícita una dimerización entre dos unidades 4S del receptor o entre una unidad 4S y otra molécula de parecidas características y presente en el citosol a una concentración similar a la del receptor (NIELSEN y NOTIDES, 1975).

Estos resultados difieren de los encontrados por BAILLY (1980) cuyos estudios cinéticos del proceso de activación revelaron una cinética de primer orden favorable a la hipótesis del cambio conformacional.

Recientemente se ha publicado un detallado estudio sobre el fenómeno de la activación en el que se discute fundamentalmente la metodología en uso (MILGROM, 1981), y que reconcilia ambas posturas al considerar que posiblemente el proceso de activación ocurra en dos etapas:



donde la primera es una reacción de primer orden en la que se activa = el complejo E-R manteniendo su coeficiente de sedimentación 4S, y la = segunda etapa corresponde al proceso de dimerización con una cinética = de segundo orden, en la que el complejo 4S activado se une a otra molé = cula o a sí mismo para formar el complejo 5S activado.

La mayoría de la investigación dirigida a estudiar la activación y translocación de los receptores se ha realizado fundamentalmente en te = jido uterino, por su mayor contenido en receptores y por la menor difi = cultad de manipulación.

En adenohipófisis el proceso de activación del receptor citosólico = coincide con el observado en úteros (LINKIE, 1977).

En hipotálamo su estudio resulta una tarea más difícil, dados los = problemas asociados al trabajo bioquímico en esta área cerebral. Algun = as comunicaciones han manifestado diferencias con respecto a lo obser = vado en útero. FOX y JOHNSTON (1974) y FOX (1977) demostraron que la = transformación del receptor citosólico a la forma 5S al ser expuesto a = DNA-celulosa, es mas lenta que en útero. LINKIE (1977) corrobora esta = opinión al detectar en útero y adenohipófisis de ratas inmaduras la = = presencia de receptor 5S tan pronto como a los tres minutos de la in = yección de estradiol, mientras que a nivel hipotalámico el proceso de = activación requiere de 30 a 60 minutos. Se ha sugerido que estas dife = rencias podrían ser un reflejo de los distintos tipos de respuesta que = cada tejido da al estímulo de la hormona, el crecimiento uterino fren = te a la estimulación de la secreción gonadotrófica en HT y AHF.

1.2.5.- LOCUS DE CAPTACION INTRANUCLEAR: EL ACEPTOR NUCLEAR .-

El modelo actualmente aceptado sobre el modo de acción de los estrógenos, establece que el complejo estradiol-receptor una vez en el núcleo se une específicamente a algún componente de la cromatina. Esta interacción, se considera que es la responsable de la estimulación de la síntesis de RNA y proteínas que conducen al crecimiento del tejido.

El término "aceptor" se ha utilizado para designar aquellos lugares de la cromatina a los que se une el complejo E-R específicamente. Su origen viene del paralelismo establecido con la unión de alta afinidad del represor con un número limitado de locus del lac-operon, a través de la cual se modula la expresión genética (GORSKI y GANNONG, 1976).

La existencia del aceptor nuclear de los complejos estradiol-receptor, no ha sido demostrada experimentalmente. Su amplia aceptación se basa en hechos tales como el que la interacción ER-cromatina es resistente a altas concentraciones salinas (CLARK y PECK, 1976), y el que además estas uniones sean específicas para los tejidos diana de los estrógenos (KING y MAINWARING, 1974).

Son numerosas las investigaciones que se han desarrollado con el propósito de descubrir la identidad química de los aceptores. MAURER y CHALKEY (1967); TENG y HAMILTON (1968) y KING y Col. (1966) fueron los primeros en demostrar que los receptores se unían a la cromatina cruda. De los componentes de la cromatina que pudieran ser responsables de la unión con el complejo E-R, SPELBERG (1971) descartó la posibilidad de que fueran las histonas, al constatar que el complejo se unía con tanta afinidad a la cromatina íntegra como a la que se había desprovisto de dichas proteínas.

O'MALLEY (1976) demostró que la unión con el DNA no es específica. El complejo E-R se une al DNA desprovisto de sus componentes protéicos al margen de que proceda de una célula diana o no. Recientemente se ha

demostrado además, a través de clonar el gen de la ovoalbúmina de oviducto de pollo para incrementar el número de lugares del DNA susceptibles de reconocer a los complejos progesterona-receptor, que éstos se siguen uniendo a cualquier punto del gen, sin mostrar preferencia alguna por determinadas secuencias de bases (HUGUES y Col., 1981).

Las nucleoproteínas no histónicas de carácter ácido, son consideradas hoy día los candidatos más probables para desempeñar el papel de aceptores nucleares. Son mucho más heterogéneas que las histonas y su composición varía notablemente de un tejido a otro.

SPELBERG (1971) encontró que una determinada clase de nucleoproteínas acídicas, la fracción AP₃, proporcionaba a la cromatina la capacidad para captar al complejo E-R, de modo que la cromatina de una célula diana perdía su capacidad para retener al complejo cuando dicha fracción se extraía. También demostró que la cromatina de células no diana de estrógeno a las que se le añadía la fracción AP₃, adquirirían capacidad de retener el complejo estrógeno-receptor. Tras estas experiencias se ha aceptado que las proteínas ácidas proporcionan la especificidad de la interacción, aunque no prueban definitivamente que sean los lugares de interacción intranucleares.

En la actualidad, existen dos corrientes de opinión acerca de la naturaleza de esta interacción, los defensores de la "interacción activa", que piensan que los verdaderos aceptores son las proteínas y que la unión complejo-DNA es un artefacto, y los que propugnan la "interacción pasiva" que atribuyen al DNA la naturaleza de aceptor y a las proteínas no histónicas la responsabilidad de la especificidad, determinando la región del DNA accesible al receptor e induciendo la correcta conformación para la aceptación del complejo E-R. (YAMAMOTO y ALBERT, 1976; ROCHEFORT y Col. (1980).

Otro problema por resolver es conocer la proporción de las interac-

ciones de los complejos E-R con los componentes de la cromatina que producen respuesta. Se desconoce si todas las uniones del complejo a aceptores son activas, o si solamente son unas pocas las que tienen capacidad de inducir la respuesta a la hormona. En este sentido se distingue entre aceptores y efectores nucleares. Ambos captan específicamente al complejo, pero solamente las uniones a efectores son operativas.

En algunos casos, los estrógenos parecen afectar a la totalidad de la cromatina; se ha observado en útero (VIC y Col., 1978) que el estradiol dispersa rápidamente a la totalidad de la cromatina condensada de las células epiteliales. La captación de actinomicina D, resulta incrementada en las mismas condiciones (LEROY y Col., 1972; LECLERCQ y Col., 1973), siendo también muy alto el número de lugares de uniones de la RNA polimerasa que quedan desmascarados por la acción de los estrógenos (LEROY y Col., 1972). Estos y otros resultados revelan que el número de genes diferentes cuya transcripción se ve alterada es muy elevado, y son consistentes con la hipótesis que considera que todos los aceptores son operativos.

Son también numerosas las investigaciones que apoyan la posibilidad que el número de efectores sea menor que el de aceptores, tal como ocurre en células procariotas con el lac-represor del DNA.

Se ha demostrado que solamente un número limitado de uniones nucleares de larga duración y resistentes a la extracción con KCl 0.4 M están implicadas en la estimulación del crecimiento uterino (CLARK y PECK, -- 1976). En esta línea está también la observación hecha en células CMF-7 que el número de proteínas específicas cuya síntesis es inducida por el estradiol es muy limitado (WESTLEY y ROCHEFORT, 1979), aunque no puede excluirse la posibilidad de que la especificidad de la respuesta resida a nivel post-transcripcional.

Las situaciones que se observan en sistemas que no responden a los estrógenos, en los que la translocación y la acción nuclear están diso-

ciadas, sugieren que los locus aceptores y efectores son diferentes. = Este es el caso de los tumores mamarios inducidos por dimetilbenzantra ceno que han perdido su capacidad de responder a los estrógenos, al me nos en lo que respecta a parámetros como el crecimiento o la inducción de receptores de progesterona. En ellos, existen receptores citosóli- cos que son translocados al núcleo en la misma proporción que en las = células que responden a los estrógenos.

El hecho que los antiestrógenos tamoxifén y nafoxidina sean capaces de producir translocación de receptores citosólicos y captación nu- - - - clear, y sin embargo fracasen en estimular la respuesta, es explicable dentro de esta línea, si se considera que los complejos antiestrógenos- receptor no adquieren la correcta conformación para unirse a los efec- tores.

Una variante de estas dos situaciones es la propuesta por YAMAMOTO, (1976) que considera que los aceptores y efectores son diferentes y == que el complejo E-R captado principalmente por los aceptores ha de ser posteriormente transferidos a los efectores.

1.2.6.- RESPUESTA CELULAR AL ESTRADIOL. UTERO, HIPOFISIS E HIPOTALAMO .-

Los órganos diana del estradiol son numerosos, y el grado de control que el estradiol ejerce sobre ellos es bastante variable. La máxima respuesta es obtenida a nivel del útero, donde la administración de estradiol, desencadena en ratas castradas e inmaduras una secuencia de acontecimientos de tipo bioquímico y fisiológico que culminan en el crecimiento del tejido.

El desarrollo uterino inducido por el estradiol, se manifiesta en un período de unos días e incluye el aumento de todas las actividades metabólicas, así como el incremento en la captación de agua, de la vascularización y de la división celular, con el desarrollo del endometrio característico de la fase proliferativa del ciclo sexual y el engrosamiento del miometrio.

En la Tabla 2 se resume la secuencia temporal de los sucesos que se manifiestan en este tejido después de la administración de la hormona.

El primer fenómeno que se observa es la captación de la hormona por el citoplasma celular, seguido por la rápida aparición del estradiol en el núcleo. A los 10 minutos de la inyección puede detectarse síntesis de RNA específico para una proteína también específica, la IP (Induced Protein) (KATZENELLENBOGEN y GORSKI, 1975; MAIRESSE y GALAND, 1979). Entre los 15 y 30 minutos se detecta incremento en la actividad de la RNA polimerasa II.

Una hora después del tratamiento con estrógenos, se manifiestan aumentos de algunos parámetros metabólicos en el metabolismo de la glucosa (SMITH y GORSKI, 1968), síntesis de fosfolípidos (AIZAWA y MULLER, 1961; SPOORE y GORSKI, 1972), la actividad de la RNA polimerasa I que gobierna la síntesis de RNA ribosómico (COURVELIN, 1976), aumento en la actividad de la cromatina uterina para la síntesis de

TABLA 2

HORAS DESPUES DE INYECTAR ESTRADIOL	0.01	Captación de E ₂ por citoplasma Captación de E ₂ por núcleos
	0.05	
	0.1	RNA polimerasa II nucleoplásmica Síntesis de RNA para la IP
	0.5	Síntesis de IP
	1	RNA polimerasa I nucleolar Síntesis de fosfolípidos y metabolización de glucosa
		Edema
	5	Síntesis de proteínas
		Aumento neto de RNA
	10	Aumento neto de proteínas
		Síntesis de histonas y DNA
20		
30	División celular	

EFFECTOS DE LA INYECCION DE ESTRADIOL SOBRE EL UTERO DE RATAS PREPUBERES. (Modificado de Katznellenbogen y Col, 1979).

RNA (TENG y HAMILTON, 1968) y aumento en la actividad de la RNA polimerasa II que gobierna la síntesis de los RNAm.

A pesar de la temprana activación de las polimerasas, el aumento en el contenido de RNA no es significativo hasta una hora después de la administración de la hormona y se prolonga entre las 8 y 12 horas.

La síntesis protéica se presenta activada entre las 2 y 4 horas en ratas inmaduras, aunque su incremento neto no se detecta hasta las 24 horas.

El aumento del contenido de DNA y en la síntesis de histonas comienza a hacerse patente hacia las 18 horas, manifestaciones que preceden a la división celular, que se comienza a detectar después de las 24 horas (STORMSHAK, 1976).

En lo que respecta a la adenohipófisis, si bien son numerosas las comunicaciones sobre los efectos generales que los estrógenos ejercen sobre este tejido, como son la inhibición de la secreción de gonadotrofinas, aumento de peso, aumento de mitosis e hiperplasia (KAPP y FOX, 1981), son escasos los trabajos que cuantifican la respuesta de este tejido al tratamiento con estrógenos. CONVEY y REECE, (1969) encontraron fluctuaciones en el contenido de ácidos nucleicos durante el ciclo del estro. ROBINSON y LEAVITT, (1972) en ratas ovariectomizadas y DIAZ CHICO y Col. (1980) en ratas prepúberes registraron variaciones en los niveles de DNA, RNA y proteínas tras la administración de estradiol. SPONA y Col. (1980) han cuantificado la síntesis de RNA detectando su máxima concentración a los 90 minutos de la aplicación de los estrógenos.

En hipotálamo se conoce que los estrógenos pueden causar cambios de corta duración en la actividad neuronal, también resulta alterada la actividad tanto de enzimas metabólicas como neuronales (LUINE y Col., 1974, 1977a, 1977b; LUINE y McEWEN, 1977), sin embargo a tiem-

pos largos no sufre hipertrofia ni hiperplasia.

KELNER y Col. (1980) han sido los primeros en demostrar que la administración de estradiol produce la activación de la RNA polimerasa II, mientras que la RNA polimerasa I no se ve afectada, a diferencia de lo que ocurre en tejido uterino donde se produce la activación de ambas. La falta de actividad en hipotálamo de la RNA polimerasa I se relaciona con la ausencia de hipertrofia y de hiperplasia en este tejido tras la administración de estrógeno.

Mucho mejor conocidos son los efectos del estradiol sobre el control hipotalámico-hipofisario de su propia secreción, a través de la secreción de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotrofinas = (LH-RH) y de las propias gonadotrofinas, hormonas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH). En términos generales puede decirse que el estradiol segregado por el ovario durante la fase folicular del ciclo sexual, produce un efecto sensibilizante de la hipófisis a la LH-RH. El ascenso de los niveles plasmáticos de estradiol la tarde del diestro-noche del proestro es imprescindible para que se desencadene el pico ovulatorio de LH y FSH. Posteriormente el estradiol junto con la progesterona ejerce un efecto inhibitorio de la secreción de gonadotrofinas, actuando a nivel de hipotálamo y de hipófisis. Esta inhibición terminará provocando la disminución de la secreción de estradiol en la fase luteal y el inicio de un nuevo ciclo ovárico.

Las activaciones del estradiol a nivel hipotalámico y adenohipofisario se realizan a través de receptores estrogénicos, pero la secuencia de acontecimientos desde la llegada del estradiol y su unión al receptor, hasta la manifestación de sus efectos inductores o inhibidores de la liberación de hormonas no son bien conocidos.

La rata castrada se caracteriza por su elevado ritmo de secreción de gonadotrofinas, como consecuencia de la supresión del efecto feedback negativo que las hormonas ováricas ejercían sobre su secreción.

La inyección de dosis de 0.2 µg/kg de estradiol o mayores, restablecen el efecto feed-back y la secreción de gonadotrofinas disminuye drásticamente, mientras que dosis menores no producen efecto notable sobre la secreción de gonadotrofinas (KREY y Col, 1979). Como se verá más adelante ello no implica que los tejidos diana sean indiferentes a dosis bajas de estradiol.

Los detalles acerca de la evolución de las concentraciones plasmáticas de hormonas a lo largo del ciclo sexual y en la castración, así como su regulación recíproca excede de los límites de este trabajo.

1.2.7.- OTROS RECEPTORES ESTROGENICOS: RECEPTORES TIPO II .-

Las características de la unión esteroide-receptor se han evaluado a través de los análisis de saturación en los que normalmente se cubre un rango de concentraciones comprendidas entre = 0.1 y 20 nM (1.2.3.2; 3.1.3). Estos valores constituyen unos límites adecuados para la medida de los receptores clásicos tipo I que tienen una constante de disociación en torno a 1 nM.

Al ampliar el margen de concentraciones en los análisis de == saturación de receptores en útero de ratas prepúberes, ERIKSSON y Col. (1978) detectaron un nuevo tipo de captación específica.- Para citosol se obtuvo una curva que no alcanzó la meseta de saturación y con la fracción nuclear se dió una curva de tipo sigmoideo. A este nuevo tipo de captación, que se demostró era espe cífica para el estradiol, se le denominó receptores tipo II == (ERIKSSON, 1978, 1980).

De estudios posteriores llevados a cabo por el mismo grupo de investigadores (CLARK, 1980) se han ido dilucidando sus características e intentado establecer su significación fisiológica.

El receptor citosólico tipo II se caracteriza por su baja afinidad por el estradiol ($K_d = 30$ nM) y su alta capacidad (2 pmol/útero). Sedimenta en la región 4S en gradiente de sacarosa en un medio de baja fuerza iónica, y no sufre translocación al núcleo= tras la administración de estradiol como lo hace el receptor tipo I.

Por haber sido detectado inicialmente en ratas prepúberes, se pensó que este tipo de captación era debida a las alfa-fetoproteinas. Posibilidad que hoy se ha descartado al demostrarse su = presencia en citosol de útero de ratas adultas castradas y al =

comprobarse su especificidad por el estradiol.

Su significación fisiológica se desconoce. En la actualidad se especula entre la posibilidad de que pudieran ser precursores de los receptores tipo I, o que fueran proteínas de origen extracelular que ayuden a la acumulación de estrógenos en los tejidos, actuando como agentes concentradores de la hormona.

A nivel nuclear, la constante de disociación de los receptores tipo II no ha podido ser calculada con exactitud dada la naturaleza sigmoidea de la curva de saturación y por la forma hiperbólica del correspondiente plot de Scatchard. Su valor aproximado se ha determinado a partir de la curva de saturación, calculando la concentración de $^3\text{H-E}_2$ que se precisa para saturar a la mitad de los receptores, y ha resultado comprendida entre 16 y 20 nM (MARKAVERICH, 1979).

Los receptores tipo II nucleares no parecen proceder de los tipo II citosólicos, ya que éstos no son translocados al núcleo. Sin embargo, tras la inyección de estradiol su concentración nuclear se ve aumentada, por lo que se ha sugerido que pudieran activarse por la presencia de los receptores tipo I en el compartimento nuclear. La retención nuclear de los receptores tipo II en útero de ratas prepúberes es mayor que la de los tipo I permaneciendo elevados durante 24 o más horas, por lo que se piensa pudieran estar relacionados con la respuesta uterotrónica a los estrógenos, (MARKAVERICH, 1979, 1980).

Recientemente se han hecho estudios dirigidos a investigar la presencia de este nuevo tipo de receptores en adenohipofisis y en hipotálamo (KELNER, 1981) utilizando ratas adultas ovariectomizadas e hiperestrogenizadas. Los resultados no fueron positivos en el sentido de detectar la existencia de recep

tores tipo II en estos tejidos diana de los estrógenos. Su ausencia en hipotálamo es consistente con la hipótesis anteriormente = señalada que sugiere que los receptores tipo II están relaciona- dos con el control estrogénico de la hipertrofia y de la hiperpla sia, respuestas que no se dan en este tejido. Sin embargo, en ade nohipófisis no puede justificarse la ausencia de receptores tipo= II con tal argumento, ya que, esta glándula responde a la acción= de los estrógenos con aumento de peso e hiperplasia. (KAPP y FOX, 1980).

1.2.8.- RESPUESTA DE LA POBLACION DE RECEPTORES AL ESTIMULO DEL ESTRADIOL.
CONOCIMIENTO ACTUAL DEL CICLO DEL RECEPTOR .-

El significado de la distribución intracelular de los receptores tras el estímulo hormonal y la regulación de su concentración, se consideran como requisitos fundamentales para comprender el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas. El estudio del ciclo del receptor en las fracciones citosólicas y nuclear de los tejidos diana al estradiol, han sido objeto de intensa investigación y revisado recientemente por GORSKI (1976), MULDOON (1980) y JENSEN (1982).

En las células de los tejidos diana existe una continua producción y degradación de receptores que mantiene su concentración equilibrada. La administración de estrógenos provoca una perturbación en este equilibrio de modo que inmediatamente después de inyectar estradiol se observa una brusca disminución en la concentración de receptores citosólicos (fase de depleción citosólica), como consecuencia de la translocación de los complejos E-R formados al núcleo. Después de un intervalo de tiempo de duración variable, y probablemente relacionado con la dosis de la hormona, se manifiesta el proceso de repleción en el que se observa un aumento progresivo en la concentración de Rc hasta recuperar la concentración basal e incluso llegar a superarla (fase de sobretiro).

A nivel nuclear, y como respuesta a la depleción citosólica, se produce un aumento en la concentración de receptores nucleares algunas horas después de la inyección, para regresar posteriormente a los niveles de concentración basales.

La evolución de la concentración de los receptores nucleares observada en los tejidos diana de los estrógenos, tras la administración de dosis de estradiol comprendidas entre 0.1 y 20 µg/kg, describe una trayectoria que es una imagen especular de la que presen-

tan los receptores citosólicos. Esto es, el aumento inicial se corresponde con la depleción citosólica, el máximo de Rn coincide con el mínimo de receptores citosólicos y el retorno a los valores control es simultáneo con la fase de repleción.

El aumento inicial en la concentración de los receptores nucleares se atribuye fundamentalmente a la presencia de los receptores citosólicos que han entrado complejados al estradiol, y su posterior disminución se piensa que es debida bien a su degradación tras la acción nuclear o a su salida al citosol.

En la repleción citosólica participa la síntesis de receptores inducida por el estradiol. KING y MAINWARING (1974) han sugerido que existen dos procesos de síntesis de receptores, uno inducido por la hormona y otro independiente de los estrógenos, apuntando además que los diferentes modos de repleción observados pudieran estar relacionados con la dosis de la hormona utilizada.

El papel que juega la síntesis proteica en la fase de repleción ha sido revisado por MAIRESSE (1979) condensando los resultados obtenidos por GORSKI y BAULIEU que utilizaron cicloheximida como inhibidor de la síntesis proteica. Este autor considera que en el proceso de repleción citosólica participan dos mecanismos diferentes: uno que depende de la síntesis continua de proteínas o proceso sintético, y otro que es independiente de tal síntesis y que denomina proceso de reactivación.

El proceso de reactivación ha sido observado en citosol de útero de ratas prepúberes (MESTER, 1974) cuando la depleción citosólica supera el 50%, situación que se da preferentemente con dosis de estradiol superiores a 1 µg/kg. Además cuando la repleción es debida únicamente a reactivación o reciclamiento de los receptores, no se ha conseguido restablecer totalmente la concentración basal, siendo

precisa la síntesis proteica inducida para recuperar totalmente su concentración. Ante esto, se ha establecido que la síntesis proteica es necesaria para lograr una completa recuperación, así como para que se produzca sobretiro.

La existencia de dos procesos independientes para la repleción = de los receptores citosólicos, también ha sido sugerida en base a = estudios hechos con progesterona como inhibidor de la repleción inducida por los estrógenos, (MAIRESSE, 1979).

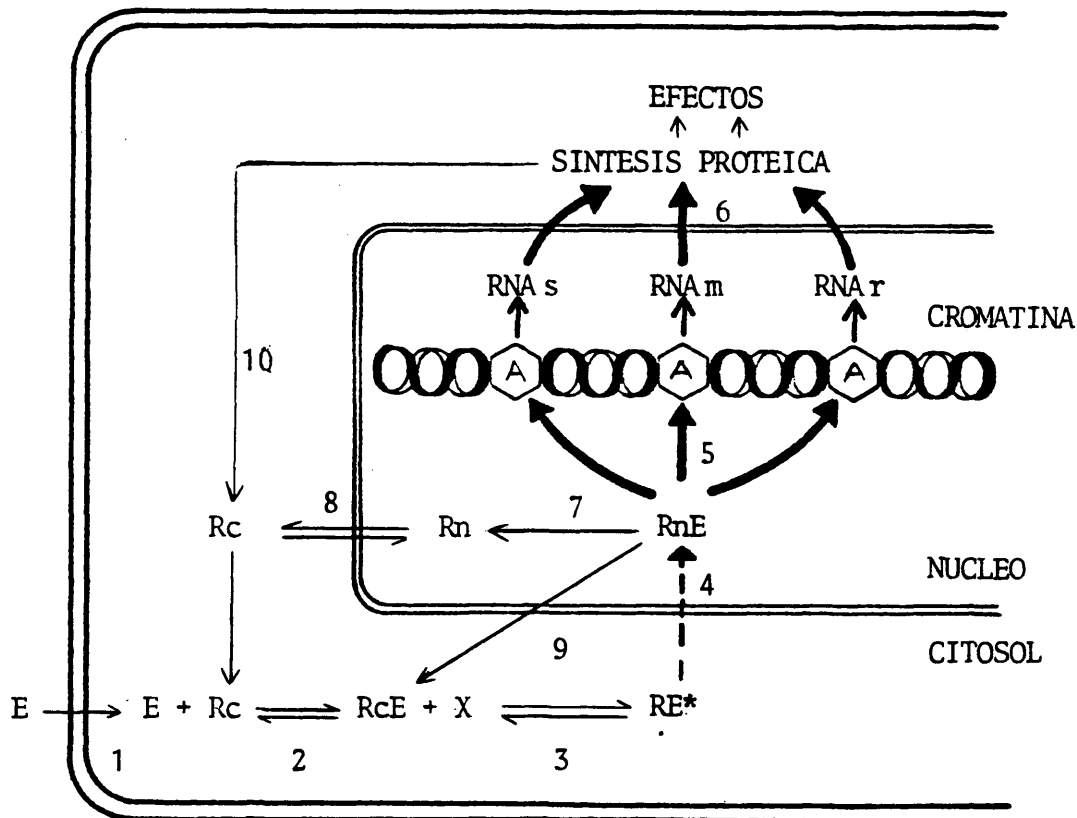
Los trabajos de CIDLOWSKI (1978) y MULDOON (1980) han introducido la participación de los microsomas en el mecanismo por el que se regula la concentración de los receptores citosólicos. Estos autores consideran que el proceso de regulación puede ser triple: a) Las células de los tejidos diana tienen la propiedad constitutiva de = sintetizar receptores, proceso que se activa por el estradiol y que da como resultado la aparición de receptores de nueva síntesis en = el citosol; b) A medida que la concentración de estradiol circulante aumenta parte de los complejos receptor-estradiol nucleares pueden abandonar el núcleo alojándose en los microsomas durante un == tiempo, tras el cual el complejo intacto es liberado al citoplasma = con capacidad de volver a ser translocado al núcleo (fenómeno de == reutilización del complejo). El tercer mecanismo posible (c) se produciría cuando la concentración de estradiol endógena sea elevada, = en este caso los complejos E-R nucleares se disociarían, permitiendo el retorno de receptores libres al citoplasma, con capacidad de volver a complejar al estradiol (regeneración del receptor). En este esquema los microsomas intervienen en el procesamiento de los receptores actuando como reservorio de complejos E-R y regulando su distribución entre el núcleo y el citoplasma, haciendo además que la = célula diana pueda responder con mayor efectividad ante un nivel de terminado de estrógenos.

A la vista de esta hipótesis se podría especular que con dosis = elevadas, el exceso de complejos E-R que alcanzan el núcleo en relación con la dotación de aceptores nucleares, pudiera ser reciclados directamente al citosol o tras sufrir un proceso de reactivación a nivel microsómico; y que para dosis bajas, el proceso de repleción= es unicamente debido a la síntesis proteica.

En la Fig. 3 se hace un esquema resumen de las posibles rutas a seguir por los receptores en las células diana tras recibir el estímulo del estradiol. Los aspectos de mayor confusión son los relacionados con el destino tanto del receptor como del esteroide tras consumar su acción biológica en el núcleo.

FIG. 3

ESQUEMA DEL CICLO DEL RECEPTOR EN LA CELULA DIANA TRAS EL ESTIMULO DEL ESTRADIOL.



- 1.- Entrada del estradiol en la célula.
- 2.- Formación del complejo estradiol-receptor citosólico.
- 3.- Activación del complejo estradiol-receptor por unión a un factor X.
- 4.- Translocación del complejo estradiol-receptor activado al núcleo.
- 5.- Fijación del complejo a los lugares aceptores cromatínicos.
- 6.- Producción de efectos a través de la activación del genoma.
- 7.- Posible procesamiento del complejo RnE en el núcleo con liberación del receptor.
- 8.- Posible equilibrio del receptor no ligado entre citosol y núcleo.
- 9.- Posible reciclamiento y reutilización del complejo ER nuclear con participación microsómica.
- 10.- Recuperación de los niveles de receptor citosólico por síntesis proteica estrógeno dependiente.

1.3.- OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS DEL TRABAJO .-

El modo en que evoluciona la concentración de los receptores de estradiol en las células de sus tejidos diana, fué establecido desde finales de la década de los sesenta por JENSEN Y GORSKI. Desde entonces hasta la actualidad se han realizado numerosas investigaciones sobre las relaciones hormona-receptor, a través de las cuales se ha ido abundando en el conocimiento del propio receptor, de la naturaleza de la interacción con el estradiol, de las respuestas celulares a la acción de la hormona como son, la inducción de la síntesis de proteínas específicas como la I.P. (proteína inducida), la síntesis del propio receptor, la activación de la RNA polimerasa (tipos I y II), etc., aportaciones éstas que han ido complementando el esquema original y si bien, algunas presentan datos -- que lo cuestionan, ninguna de ella ha aportado pruebas definitivas que lo invaliden.

Los puntos menos esclarecidos de la dinámica de los receptores celulares son los relacionados con su presencia y modo de acción a nivel nuclear. No hay un conocimiento claro de la naturaleza de los aceptores y efectores nucleares de la cromatina, y por consiguiente se desconoce el tipo y la intensidad de la interacción con los complejos estrogénico-receptor, así como el destino de los receptores tras su acción en el núcleo. En este sentido no se sabe si son simplemente reciclados al citosol y reutilizados, si han de ser reactivados, o si son totalmente degradados. También es relativamente mal conocido el modo en que se regula la población celular de los receptores estrogénicos en sus formas citosólica y nuclear.

En este trabajo se ha pretendido profundizar en el conocimiento de los receptores estrogénicos a través del estudio de las variaciones que sufre su concentración cuando se recibe el estímulo de dosis bajas de estradiol. Para ello se eligieron tres tejidos diana, útero, adenohipofi-

sis e hipotálamo, cuyas poblaciones de receptores son muy diferentes y sus apetencias por el estradiol radicalmente distintas.

Al abordar bajo esta óptica la evolución de los receptores en las células de estos tejidos diana, podrían manifestarse sucesos relacionados con su dinámica que posiblemente quedan enmascarados cuando la estimulación se hace con dosis que se alejan con mucho de las que existen en una situación fisiológica normal en la rata adulta ciclante.

Además de la utilización de dosis altas, la mayoría de los trabajos sobre este tema, se han realizado en animales prepúberes de 21 días de vida. A esta edad la mayoría de los parámetros endocrinos están sujetos a una rápida evolución y los animales presentan un amplio margen de variabilidad individual, en lo que a la concentración de receptores de estrógeno se refiere, por lo que son inadecuados para los fines de este trabajo. Por ello se eligió como modelo experimental la rata adulta a la que se le practicó la ovariectomía dos semanas antes de ser utilizada en la experimentación. A este tiempo los tejidos conservan su capacidad de respuesta al estradiol y presentan una concentración de receptores estrogénicos adecuada para estudio de tipo secuencial.

De las dosis utilizadas, 500, 10 y 1 ng E_2 /kg, la primera de ellas se eligió por producir unos niveles de estradiol plasmático que durante una hora son del orden de los existentes en la rata durante el ciclo sexual, mientras que las dosis de 10 y 1 ng E_2 /kg, incapaces de producir niveles plasmáticos de estradiol detectables, se consideran como pulsos hormonales subfisiológicos de diferente intensidad.

Con cada una de las dosis y en cada uno de los tejidos diana, útero, adenohipófisis e hipotálamo se hace un seguimiento de la evolución temporal de la concentración de receptores tanto a nivel citosólico como nuclear hasta que se restablezca la situación control.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.- MATERIAL Y METODOS .-

2.1.- ANIMALES Y TRATAMIENTO .-

Animales : Se utilizaron ratas hembras adultas, de la cepa Sprague Dawley, criadas en el bioterio del Departamento. Se alimentaron con dieta especial para ratas y se mantuvieron en unas condiciones controladas de 20 grados centígrados de temperatura, 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Castración : Ratas de dos meses de edad, pesando entre 200 y 250 gr., fueron anestesiadas con éter y ovariectomizadas bilateralmente por incisión dorsal. Se utilizaron para la experimentación quince días después.

Inyección de estradiol : Las diferentes dosis de estradiol utilizadas en este trabajo, se administraron intraperitonealmente disueltas en solución salina con un 5% de etanol, en un volumen de 1 ml/kg de peso.

A los animales utilizados como controles, se les inyectó únicamente vehículo: solución salina con un 5% de etanol.

Las dosis de $^3\text{H-E}_2$ empleadas en los experimentos destinados a medir la evolución plasmática del esteroide, se administraron del mismo modo que las de estradiol en frío.

2.2.- PROCESAMIENTO DEL TEJIDO .-

2.2.1.- Extracción del Tejido .-

Una vez tratados con las correspondientes dosis de estradiol, los animales se sacrificaron por decapitación en grupos de 8, procediéndose inmediatamente a la extracción de los tejidos objeto de este estudio.

De los úteros se utilizaron ambos cuernos limpios de grasa. La cervix se deshechó.

Como hipotálamo se tomó la región limitada lateralmente = por las fisuras hipotalámicas, posteriormente por los cuerpos mamilares y anteriormente uno o dos milímetros por delante del == quiasma óptico, con una profundidad de 3 mm.

La neurohipófisis se descartó, utilizándose únicamente el lóbulo anterior o adenohipófisis.

Los tejidos se pesaron inmediatamente, los úteros individualmente, las adenohipófisis en grupos de tres y los hipotálamos en grupos de cuatro, y se mantuvieron en tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.4) en baño de hielo hasta el momento de ser homogeneizados.

2.2.2.- Homogeneización .-

Se efectuó inmediatamente después de pesados los tejidos. Para ello se utilizó un homogeneizador tipo Potter-Eveljheim vidrio-vidrio de 2 ml. de capacidad sumergido en baño de hielo.

La operación se realizó a 500 r.p.m. durante 10 segundos, seguido de períodos de 20 segundos de reposo para evitar el calentamiento.

Los úteros, previamente troceados, se homogeneizaron en 1.5 ml de tampón Tris-EDTA El pool de adenohipófisis en 2 ml y los hipotálamos en 4 ml. Estos volúmenes fueron los elegidos como óptimos en el sentido de conseguir una concentración proteica adecuada para el ensayo de los receptores citosólicos (Apartado 3.1).

2.2.3.- Fraccionamiento Celular .-

Los homogeneizados de útero, adenohipófisis e hipotálamo se centrifugaron a 800 g. durante 15 minutos en centrífuga refrigerada a 4°C.

Del sobrenadante de esta primera centrifugación se obtuvo la fracción citosólica por posterior ultracentrifugación a 105000 g. durante 90 minutos en una centrífuga MSE Centriscan 75.

El precipitado de 800 g. que recoge la fracción nuclear, se purificó resuspendiéndolo en tampón, filtrándolo a través de triple gasa y sometiendo a dos lavados más con 5 ml. de tampón cada uno de ellos.

Finalmente los núcleos se resuspendieron en tampón Tris-EDTA a una concentración final de 0.4 úteros/ml., una adenohipófisis por ml. y 1 hipotálamo por ml.

El precipitado de 800 g. de útero contiene realmente núcleos contaminados con elementos celulares y subcelulares. Esta fracción, denominada por Gorski "fracción núcleo-miofibrilar", ha sido utilizada para este tipo de ensayo con el mismo rendimiento que una fracción de núcleos puros (MESTER y BAULIEU, 1974).

2.3.- MEDIDA DE LA CAPACIDAD CAPTADORA DE ESTRADIOL IN VITRO".-

El método que se empleó para medir la concentración de receptores en las fracciones citosólicas y nucleares fué el de intercambio de ^3H -estradiol.

El ensayo consiste en incubar las fracciones citosólicas o nucleares con concentraciones saturantes de estradiol tritiado, para medir la captación total de estradiol ($^3\text{H-E}_2$ unido a receptores más $^3\text{H-E}_2$ unido a proteínas no específicas). Paralelamente incuba citosol con la misma concentración de $^3\text{H-E}_2$ en presencia de dietilestilbestrol (DES) a una concentración cien veces superior en el medio de incubación, con el fin de medir la captación no específica ($^3\text{H-E}_2$ unido a proteínas no receptoras). (Esquema Pag. 53).

La medida de la captación específica: $^3\text{H-E}_2$ unido a receptores, se obtuvo por diferencia entre la captación total y la no específica.

2.3.1.- MEDIDA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS .-

Para la cuantificación de los receptores citosólicos se siguieron las pautas descritas por MESTER y BAULIEU (1975), HSUEH (1976) para tejido uterino, y por CIDLOWSKI (1974) y MENON y GUNAGA (1976) para tejido hipofisario e hipotalámico.

Los parámetros de experimentación seguidos en este trabajo fueron el resultado de la adaptación de las técnicas originales a nuestras condiciones experimentales. Se detallan en la Tabla 3, y se justifican en la primera sección de resultados.

- Ensayo de los receptores citosólicos uterinos .-

Alicuotas de 100 μl de sobrenadante que se obtuvo después de la centrifugación de 105.000 g, se incubaron por cuadruplicado a 30°C con

$^3\text{H-E}_2$ 10 nM sólo o en presencia de DES a una concentración de 1 μM en el medio de incubación.

Al cabo de 30 minutos se añadió a cada tubo 100 μl de una mezcla de carbón activo-dextrano (0,5% C.A.; 0,05% dextrano en tampón TED pH 7,4), con el fin de eliminar el estradiol radioactivo libre en el medio, dejando transcurrir la incubación durante 15 minutos más.

El carbón activo se separó por centrifugación en rotor horizontal a 5000 r.p.m. durante 15 min., tomándose a continuación la muestra de 200 μl del sobrenadante para el contaje de la radioactividad.

Como líquido de centelleo se utilizó una disolución de 0,125 g de dimetil POPOP y 0,5 g de PPO en 1 litro de tolueno, mezclándose vigorosamente en cada vial 5 ml del mismo con los 200 μl de la muestra. Después de una noche de reposo se procedió al contaje, que se realizó en un espectrómetro de centelleo líquido Packard 3390, con una eficiencia del 37%.

- Ensayo de los receptores citosólicos de adenohipófisis .-

De la fracción citosólica se tomaron 250 μl para incubar por triplicado con 50 μl de $^3\text{H-E}_2$ 20nM sólo o en presencia de DES a una concentración cien veces mayor que la del esteroide marcado.

La incubación se dejó transcurrir durante toda la noche a 0-4°C, el estradiol no unido se eliminó con carbón activo.

Para el contaje se tomaron muestras de 250 μl del sobrenadante. El resto del proceso fué el mismo que se siguió con los citosoles de útero.

- Ensayo de los receptores citosólicos de hipotálamo .-

En este caso la alicuota de citosol fué de 500 μl y la incubación se hizo por triplicado con 100 μl de $^3\text{H-E}_2$ 20nM en presencia o no de DES a una concentración cien veces superior..

ENSAYO DE LOS RECEPTORES DE ESTRADIOL

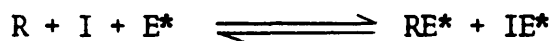
LAS FRACCIONES CITOSOLICA Y NUCLEAR
CONTIENEN:

R = Lugares de unión específica.

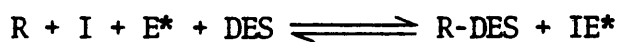
I = Lugares de unión inespecífica.

Incubación de las fracciones citosólica y nuclear en dos series de tubos paralelas, A y B.

Serie A: CAPTACION TOTAL



Serie B: CAPTACION INESPECIFICA



CAPTACION ESPECIFICA = CAPTACION TOTAL - CAPTACION INESPECIFICA

$$(RE^*) = (RE^* + IE^*) - (IE^*)$$

TABLA 3

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL PROCESO DE MEDIDA DE LOS
RECEPTORES CITOSOLICOS.

	UTERO	ADENOHIPOFISIS	HIPOTALAMO
Vol.de citosol (μ l)	100	250	500
Vol.de $^3\text{H-E}_2$ (20 nM) (μ l)	100	50	100
Conc. $^3\text{H-E}_2$ (nM)	10	3.33	3.33
Temp. incubac.($^{\circ}$ C)	30	4	4
Tiempo incub.(horas)	0.5	18	18
Vol.carb3n activo(μ l)	100	100	100
Tiempo incub. C.A.(')	15	15	15
Centrifugaci3n (rpm)	5.000	5.000	5.000
Alicuota contaje (μ l)	200	250	500

El resto del proceso coincide con el seguido para las adenohipofisis, salvo el volúmen de muestra tomado para el contaje que en este caso fué de 500 μ l.

2.3.2.- MEDIDA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES .-

La evaluación de la concentración de receptores nucleares se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por ANDERSON y CLARK(1972) con ligeras modificaciones.

En la Tabla 4 se presenta un resumen de las condiciones experimentales en que se realizaron los ensayos de receptores nucleares, diferentes para cada tipo de tejido.

- Ensayo de los receptores nucleares uterinos. -

Alicuotas de 250 μ l de suspensión nuclear de úteros se incubaron por cuadruplicado con 100 μ l de $^3\text{H-E}_2$ 20 nM resultando una concentración final saturante de 5.7 nM en presencia o no de DES 1 μ M.

La incubación se realizó a 37°C en un baño termostatzado, con agitación continua a lo largo de los 30 minutos de duración de la misma.

Finalizada la incubación se añadió a cada tubo 2 ml de tampón --frío (0-4°C) y se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante quince minutos.

Para asegurar la completa eliminación del estradiol tritiado libre en el medio, los precipitados nucleares se sometieron a dos lavados más con tampón.

Por último la radiactividad se extrajo en los mismos tubos de incubación con 3 ml de líquido de centelleo. Después de agitarlos vigorosamente se pasaron a los viales y se procedió al contaje de la radiactividad.

TABLA 4

CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL PROCESO DE MEDIDA DE LOS
RECEPTORES NUCLEARES.

	UTERO	ADENOHIPOFISIS	HIPOTALAMO
Vol.resuspensión (ml)	2.5	2	2
Vol. incubación (μ l)	250	250	500
Vol. $^3\text{H-E}_2$ (20 nM) (μ l)	100	100	100
Concentr. $^3\text{H-E}_2$ (nM)	5.7	5.7	3.33
Tiempo incubación (horas)	1	18	18
Temp. incubación ($^{\circ}\text{C}$)	30	4	4
Vol. lavados (ml)	2	2	2
Liquido centelleo (ml)	3	3	3

- Ensayo de los receptores nucleares de adenohipófisis.-

Se realizó siguiendo las mismas pautas que para el tejido uterino, salvo en lo que respecta a la incubación que se llevó a cabo por triplicado a 4°C durante toda la noche (18-20 horas). Tabla 4.

- Ensayo de los receptores nucleares de hipotálamo.-

El volúmen de suspensión nuclear utilizado fué de 500 µl, y al igual que el caso de adenohipófisis se incubó con 100 µl de $^3\text{H-E}_2$ 20 nM por triplicado y durante toda la noche a 4°C de temperatura. Tabla 4.

2.4. CURVAS DE SATURACION .-

Con el fin de determinar la concentración de $^3\text{H-E}_2$ necesaria para saturar a los receptores, y evaluar la constante de disociación K_d de la interacción esteroide-receptor para las fracciones citosólica y nuclear de cada uno de los tejidos estudiados, se llevaron a cabo los análisis de saturación.

Para ello se realizaron las incubaciones correspondientes a cada tejido, tal como se describen en los apartados anteriores con concentraciones crecientes de $^3\text{H-E}_2$ y en presencia o no de DES a una concentración cien veces superior a la del estradiol radiactivo.

Las curvas de saturación y los correspondientes plots de Scatchard = que se obtuvieron para las fracciones citosólicas y nucleares de útero y citosólicas de adenohipófisis, se representan en las Figs. 9, 10 y 11. en el apartado 3.1.3. de Resultados.

2.5.- MEDIDA DE LA CAPACIDAD CAPTADORA DE ESTRADIOL "IN VIVO" .-

Para la medida de la evolución de la concentración de estradiol tanto en plasma como en las fracciones citosólica y nuclear de útero, adenohipófisis e hipotálamo, tras la inyección de 500 ng E_2 /kg, se preparó una disolución de $^3H-E_2$ (3, 4, 6, 7, 17-beta-estradiol) a una concentración de = 500 ng E_2 /kg. en un volumen de 1 ml. por kilo de peso.

A los intervalos de tiempo deseados, entre 0.2 y 12 horas, los animales fueron anestesiados, se tomó una muestra de sangre por punción en la aorta, y se procedió a eliminar al resto del torrente circulatorio inyectando por la aorta unos 50 ml. de solución salina drenada por la aurícula derecha.

El útero, la adenohipófisis y el hipotálamo, fueron rápidamente disecados, pesados y homogeneizados en las cantidades adecuadas de TE buffer en un homogeneizador vidrio-vidrio, tipo Potter-Eveljem. El homogenizado se centrifugó a 850 g. a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se sometió a ultracentrifugación durante 90 minutos a 105.000 g.

Una alícuota de 250 μ l de sobrenadante se mezcló con el líquido de centelleo y se contó después de una agitación vigorosa durante 1 minuto.

El precipitado de 850 g., fracción nuclear cruda, se lavó tres veces con exceso de tampón. La radiactividad del último precipitado se extrajo con 1 ml. de tolueno del que a su vez se tomó una alícuota para el contaje.

2.6.- MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS .-

El análisis de la concentración de proteínas existentes en las --- fracciones citosólicas se hizo según el método de LOWRY (1951).

Reactivos :

Disolución A.- $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ al 2% en NaOH IN

Disolución B.- $\text{SO}_4 \text{Cu}$ al 0,5% en tartrato sódico potásico al 1%

Disolución C.- Obtenida de mezclar en el momento de su utilización 1 parte del reactivo A con 50 partes del B.

Reactivo de Folin-Ciocalteu.- (Preparado comercial 2N) diluido -- (1:1) con agua destilada en el momento de su utilización.

Patrones de Proteínas .- Las diferentes disoluciones para la ob-
tención de la curva de calibrado se prepararon a partir de una di-
solución de albumina sérica bovina cubriendo el rango de 0,5 a 4
mg. de proteína por ml.

Procedimiento Experimental .-

De cada fracción citosólica se tomaron alicuotas de 20 ul para la determinación de este parámetro.

Las proteínas se precipitaron por adición de 1 ml de TCA al 10%, - se dejó reposar durante 15 minutos y se centrifugó a 7.000 g. durante -- otros 15 minutos.

El sobrenadante se extrajo cuidadosamente con una pipeta Pasteur - conectada a una trompa de agua, y el precipitado proteico se disolvió en 1,5 ml. del reactivo C agitando vigorosamente durante 15 seg.cada tubo.

Finalmente se añadieron a cada tubo 0, 15 ml. de reactivo de Folin, se agitaron y se dejó desarrollar el color en la oscuridad durante 45 mi nutos.

Las lecturas de la absorbancia se hicieron a 660 nm. en un espec--trofotómetro Beckman Acta cIII.

Los patrones de albúmina para la elaboración de la recta de cali--brado se procesaron conjuntamente con los problemas.

2.7.- MEDIDAS DE CONCENTRACION DE ADN .-

El método utilizado para medir la concentración de ADN en las suspensiones nucleares se basó fundamentalmente en el ensayo descrito por BURTON (1956) y con las modificaciones descritas por SCHNEIDER (1957), y algunas otras que se introdujeron con el fin de adaptarlos a nuestras condiciones experimentales.

Reactivos :

Acetaldehído al 1,6%.- Preparado por dilución de 1 ml. de acetaldehído de grado analítico en 50 ml. de agua destilada.

Reactivo de Difenilamina.- Preparado en el momento de su utilización, se obtuvo disolviendo 0,5 gr. de difenilamina en 50 ml. de ácido sulfúrico concentrado y 0,25 ml. de la disolución de acetaldehído al 1,6%.

Patrones de ADN.- Las disoluciones patrón para la curva de calibrado se prepararon concentraciones comprendidas entre 50 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$. a partir de una disolución madre de ADN purificado de timo de ternera (BDH) en ácido tricloroacético al 5%.

Procedimiento Experimental .-

Con el fin de eliminar los componentes lipídicos y ácido-solubles como la ribosa y otros que interfieren en la reacción colorimétrica, la suspensión nuclear se procesó del siguiente modo: para eliminar los componentes ácido-solubles, 0,1 ml. de la suspensión nuclear de úteros y 0,25 ml. de las adenohipófisis e hipotálamo, se mezclaron con 1 ml. de

TCA al 10%, después de agitar y dejar reposar durante 15 minutos, se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante 20 minutos, deshechándose el sobrenadante.

Los componentes de naturaleza lipídica se eliminaron mediante dos extracciones sucesivas, una primera en baño Maria con 2 ml. de cloroformo-metanol (1:1) a 50°C durante 15 minutos con agitación continua, y la segunda con éter etílico a temperatura ambiente durante otros 15 minutos.

La extracción del ADN del precipitado se hizo con TCA al 5%, a 90° C durante 30 minutos. El volumen de TCA 5% utilizado fué de 1 ml. y los tubos durante la extracción se taparon con bolsas de vidrio para evitar pérdidas por evaporación.

Reacción colorimétrica .-

Se mezclaron a 0,25 ml. del extracto de ADN con 0,5 ml. del reactivo de difenilamina y se dejó transcurrir la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente.

Las lecturas de la absorbancia se hicieron a 600 nm. en un espectofotómetro Beckman Acta cIII.

3.- RESULTADOS

3.1.- VERIFICACION DE LOS METODOS EMPLEADOS .-

3.1.1.- ANALISIS DE PROTEINAS .-

La concentración de proteínas de los extractos citosólicos se analizó siguiendo el método de LOWRY (1951), con algunas modificaciones que a continuación se justifican.

Debido al pequeño volumen de citosol disponible para realizar esta determinación, se utilizaron los volúmenes de reactivos indicados por BENSADOUM y WEINSTEIN (1974) como óptimos para bajas cantidades de proteínas. Además se incorporó al método la precipitación previa con TCA al 10% para evitar las interferencias producidas por el tampón utilizado (10 mM Tris-1,5 M Edta) y por sustancias presentes en el propio material biológico.

Los efectos de interferencia producido por el Tris-HCl = descritos en la bibliografía son controvertidos. Mientras = algunos autores señalan que no se producen efectos significativos a concentraciones de 0.1 M, otros los encuentran para concentraciones del orden de 0.4 mM (REJ y RICHARDS, 1974).

En el caso del EDTA, BENSADOUM y WEINSTEIN(1974) señalan que se produce un aumento en la coloración que se evita precipitando previamente con TCA a una concentración comprendida entre el 6 y el 12%. Precipitación que es efectiva en un 98%.

En la puesta a punto de esta técnica, se comprobó la interferencia producida por el tampón y la ventaja de la precipitación. Repetidos ensayos con una disolución de albúmina de concentración conocida de 1 mg/ml pusieron de mani-

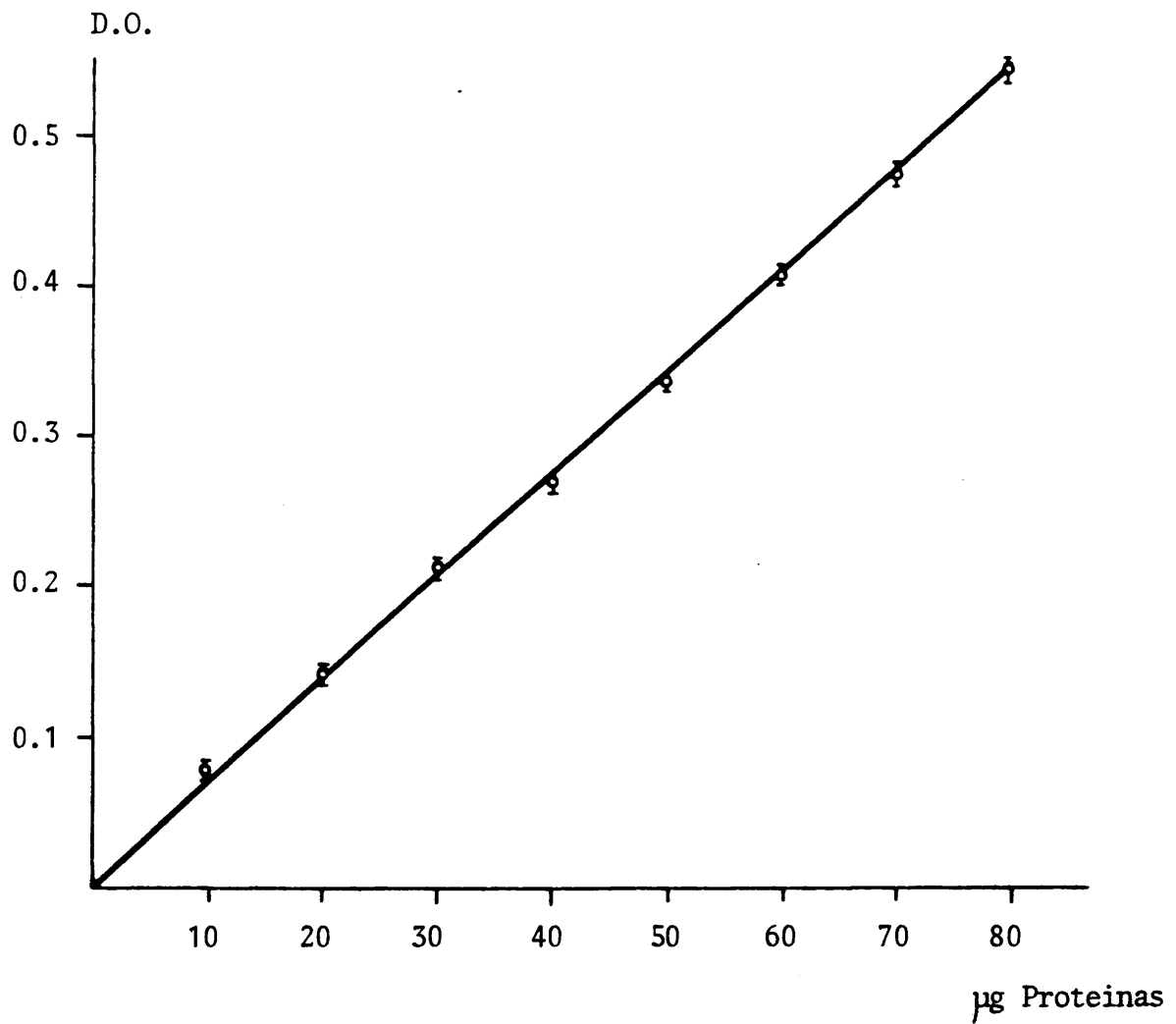
fiesto que, efectivamente, se sobrestimaba la concentración = real, obteniéndose un valor de 1.35 mg/ml (n=6), un 35% superior al valor teórico. La precipitación con TCA al 10% redujo esta diferencia, obteniéndose un valor de 1.012 mg/ml == (n=6), un 1.2% superior a la concentración patrón de 1 mg/ml.

Se comprobó también que el no precipitar la muestra de extracto citosólico conduce a valores superiores en un 25% con respecto al que se obtiene precipitando previamente con TCA.

En lo que a la muestra de citosol se refiere, no podemos = asegurar que la precipitación elimine completamente las in--terferencias, pero en cualquier caso, la pretensión de este= trabajo era disponer de una medida relativa de la concentra--ción de proteínas que nos permitiera detectar las posibles = variaciones en su concentración. No obstante, como se verá = más adelante en este apartado, los valores que se obtuvieron para los tejidos estudiados fueron del orden de los registra--dos por otros autores.

Incluida la precipitación con TCA al 10% tanto de la muestra como de los patrones, se eligieron las concentraciones = de patrones que cubrieran el rango de las concentraciones -- de las muestras y cuya relación absorbancia-concentración -- fuese lineal. Las concentraciones de proteínas de los extractos citosólicos estuvieron comprendidas entre 3 mg/ml para = hipotálamo y 0.5 mg/ml para adenohipófisis, a las que correspondieron unos valores de absorbancia comprendidos entre 0.1 y 0.45 que caen dentro del rango cubierto por los patrones = en el que se cumple la ley de Lamber-Beer.

En la Fig. 4 se representa una recta de calibrado resul-

FIG. 4

RECTA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS CITOSOLICAS

tante de reunir una serie de determinaciones que se realizaron a lo largo del desarrollo de esta investigación. La pequeña == dispersión de los datos refleja el grado de reproducibilidad - de este método.

Los valores medios de la concentración de proteínas expresadas en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido obtenidos a lo largo de esta experimentación para cada uno de los tejidos estudiados fueron los siguientes:

Utero : 23.85 ± 0.32 (n=174)

Adenohipófisis : 53.16 ± 0.75 (n=58)

Hipotálamo : 22.05 ± 0.58 (n=39)

valores que están dentro del rango de los obtenidos por otros=autores (GORSKI, 1968 y ROBINSON, 1972).

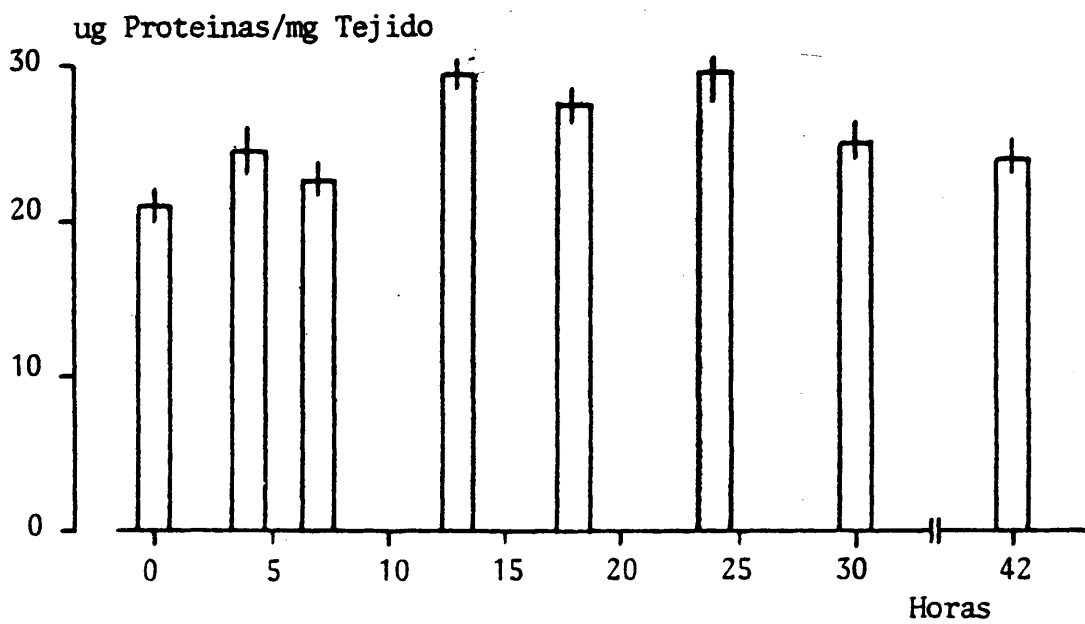
En el caso de tejido uterino los valores de la concentración de proteínas en la fracción citosólica obtenidos a los diferentes tiempos tras la inyección de estradiol, muestran un aumento significativo respecto de los controles entre las 14 y 24 horas postinyección para la dosis de 500 ng/kg. Fig. 5. El aumento del contenido de proteínas en útero es uno de los efectos que se manifiestan por la acción del estradiol y que tal = como se recoge en una reciente revisión (KATZENELLENBOGEN, 1979) se detecta a partir de las 10 horas de la administración de la hormona.

Para las dosis de 10 y 1 ng/kg. se detectaron aumentos significativos a las 5 horas postinyección Fig. 6 y 7. Sobre = este temprano aumento del contenido proteico no hemos encontrado ningún apoyo bibliográfico. Es sabido que la síntesis proteica está estimulada a los pocos minutos de la administración

del estradiol, pero el aumento neto de la concentración proteica, como se indicó anteriormente, sólo ha sido detectado = después de las diez horas.

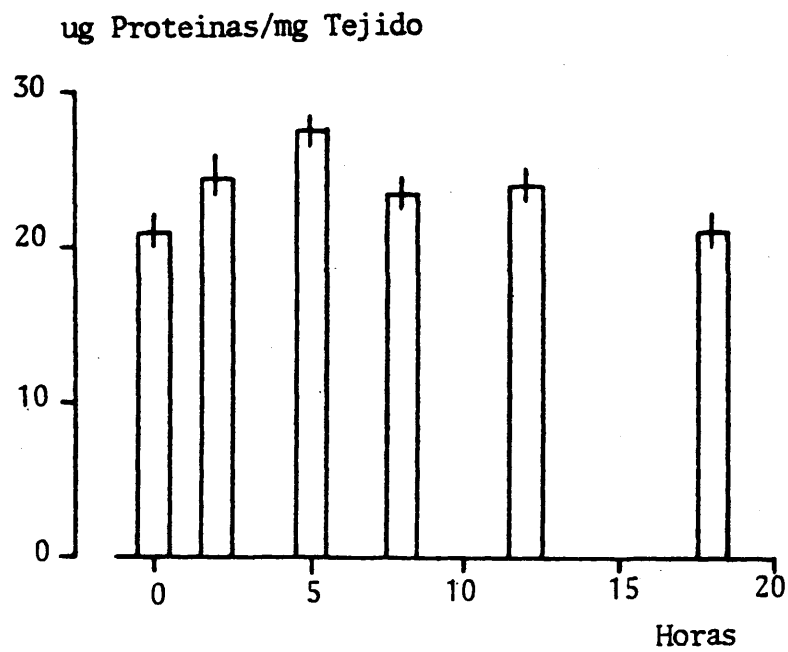
El posible significado de estos hechos será abordado posteriormente en el apartado de discusión. Por el momento señalar que estos aumentos del contenido proteico del extracto citosólico uterino coinciden temporalmente con los aumentos de la = concentración de receptores citosólicos sobre los valores control en las tres dosis ensayadas. (apartado 3.2).

FIG. 5

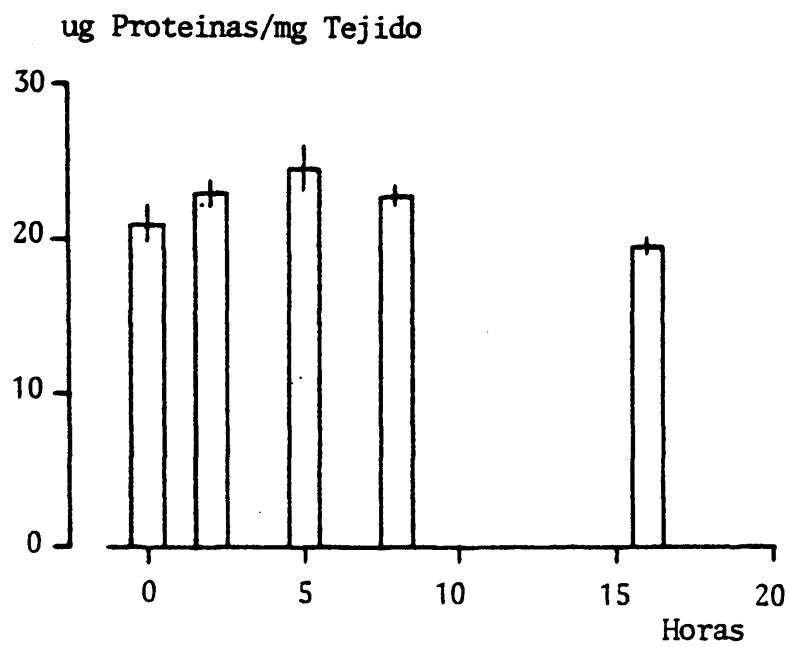


CONCENTRACION DE PROTEINAS EN CITOSOL DE UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E_2 /kg. LOS VALORES SE EXPRESAN EN μg PROTEINAS/MG TEJIDO \pm D.E.

FIG. 6



CONCENTRACION DE PROTEINAS EN CITOSOL DE UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS VALORES SE EXPRESAN EN μ g DE PROTEINAS/MG TEJIDO \pm D.E.

FIG. 7

CONCENTRACION DE PROTEINAS EN CITOSOL DE UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS VALORES SE EXPRESAN EN μ g DE PROTEINAS/MG TEJIDO \pm D.E.

3.1.2.- ANALISIS DE ADN .-

Tal como se indicó en Material y Métodos, se utilizó el método de BURTON (1956) de validez mundialmente reconocida, para la cuantificación del ADN nuclear. Se siguió la recomendación del autor de utilizar acetaldehído en el reactivo de difenilamina con el fin de aumentar la sensibilidad del mismo.

Tras una serie de pruebas se consideró oportuno ampliar el tiempo de reacción de 17 horas a 30°C a 24 horas a 20°C, con lo que se consiguió un ligero aumento de sensibilidad que favoreció a las muestras de adenohipófisis e hipotálamo con menor contenido de ADN.

El método resultó ser altamente reproducible. En la Fig. 8 se representa la recta de regresión obtenida de las diferentes lecturas de la curva de calibrado realizadas a lo largo del período de experimentación, en la que destaca la escasa dispersión de los datos obtenidos.

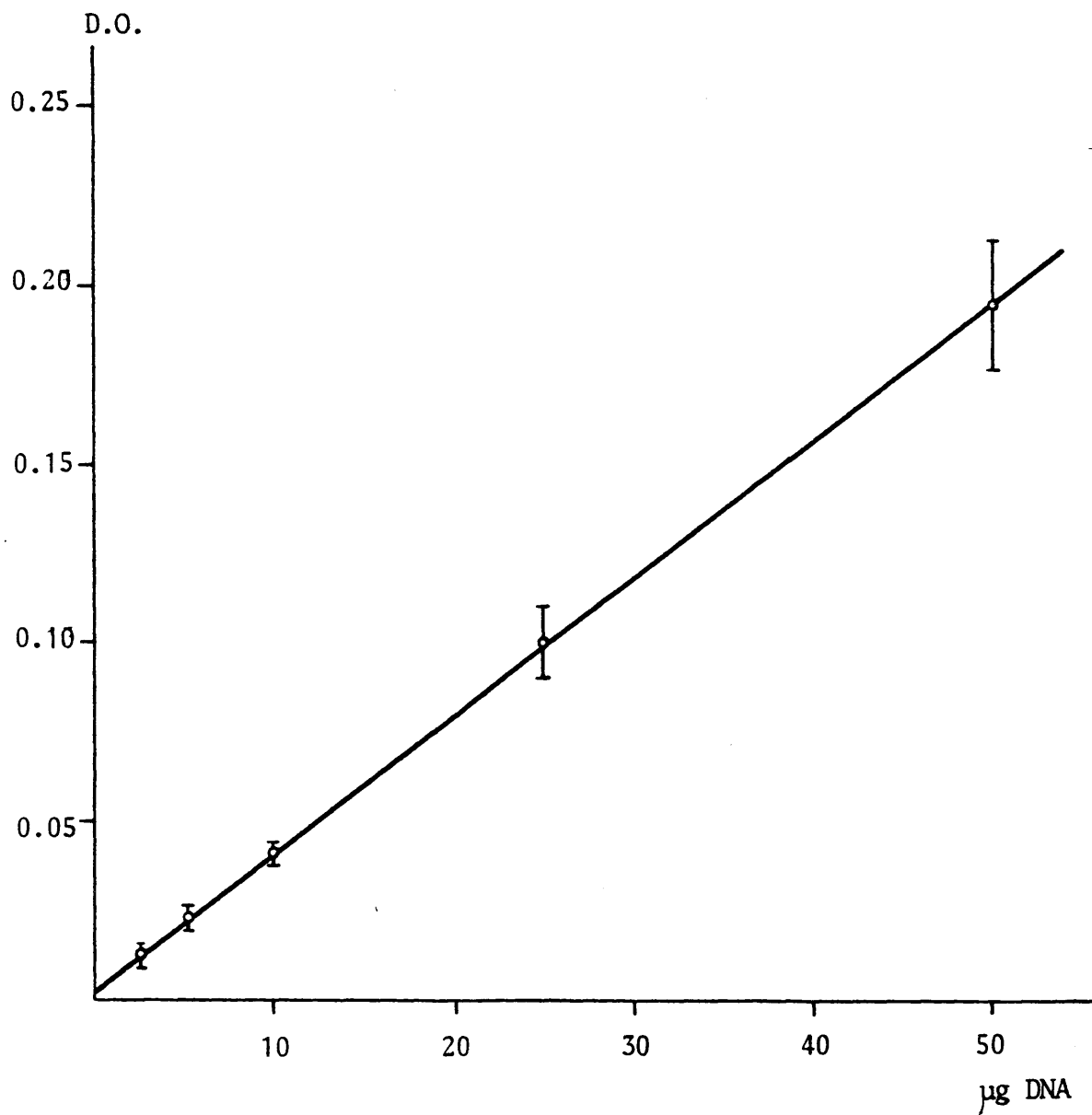
Los valores de la concentración de ADN de las distintas suspensiones nucleares oscilaron entre 0.4 mg/ml para úteros y 0.035 mg/ml para adenohipófisis, valores a los que correspondió una absorbancia de 0.02 y 0.18 respectivamente, que caen sobre la zona media de la recta de calibrado.

No se observaron variaciones significativas del contenido de ADN tras la administración de estradiol. Los valores medios de su concentración expresados en µg ADN/mg de tejido fueron los siguientes:

Utero : 4.39 ± 0.098 (n=102)

Adenohipófisis : 3.22 ± 0.15 (n=50)

Hipotálamo : 0.47 ± 0.11 (n=32)

FIG. 8

RECTA DE CALIBRADO PARA LA DETERMINACION DE ADN NUCLEAR.

valores que como consecuencia de la pérdida de material biológico que lleva consigo el procesamiento del tejido, (filtración por gasa y serie de tres lavados), son algo inferiores a los señalados por otros autores que hacen la medida de ADN directamente. DIX (1980); ROBINSON (1972); HAAR (1973); CONVEY (1969).

3.1.3.- ANALISIS DE RECEPTORES .-

La cuantificación de receptores citosólicos y nucleares se llevó a cabo mediante el ensayo de intercambio de estradiol basado en el desplazamiento de la hormona por estradiol tritiado. Los detalles del procedimiento ya han sido descritos en Material y Métodos.

La validez de este método para determinar la concentración de receptores nucleares fué establecida por ANDERSON y PECK (1972), y extendido posteriormente a la medida de receptores citosólicos.

Desde entonces, la reacción de desplazamiento sigue siendo la base de este tipo de ensayos, aunque han sido introducidas un gran número de variantes en relación con las condiciones en que ha de realizarse. Las modificaciones introducidas a las técnicas originales afectan fundamentalmente a la temperatura y tiempo de incubación, al tipo de tampón a utilizar, al tratamiento previo del tejido... etc. Condiciones que cada investigador fija dependiendo de la naturaleza y de los objetivos de su trabajo experimental.

Ante esto, los parámetros experimentales que hubieron de determinarse para conseguir una medida válida de la concentración de receptores, con la finalidad de obtener unos valores repetitivos y capaces de acusar las posibles variaciones en el contenido de receptores citosólicos y nucleares, fueron las relacionadas con el proceso de incubación, como son: la temperatura y tiempo de duración de la misma, la cantidad óptima de citosol o de suspensión nuclear y la concentración de estradiol tritiado precisa para saturar a los receptores presentes en el medio.

Ensayo de receptores citosólicos en utero .-

En los ensayos de los receptores citosólicos uterinos, se adopta

ron en principio, las condiciones de tiempo y temperatura descritos por MESTER y BAULIEU(1975) de 30 min. y 30°C, aunque tras los primeros ensayos se decidió ampliar el tiempo de incubación a una hora, con lo que se consiguieron unos valores ligeramente superiores con menores variaciones interensayo.

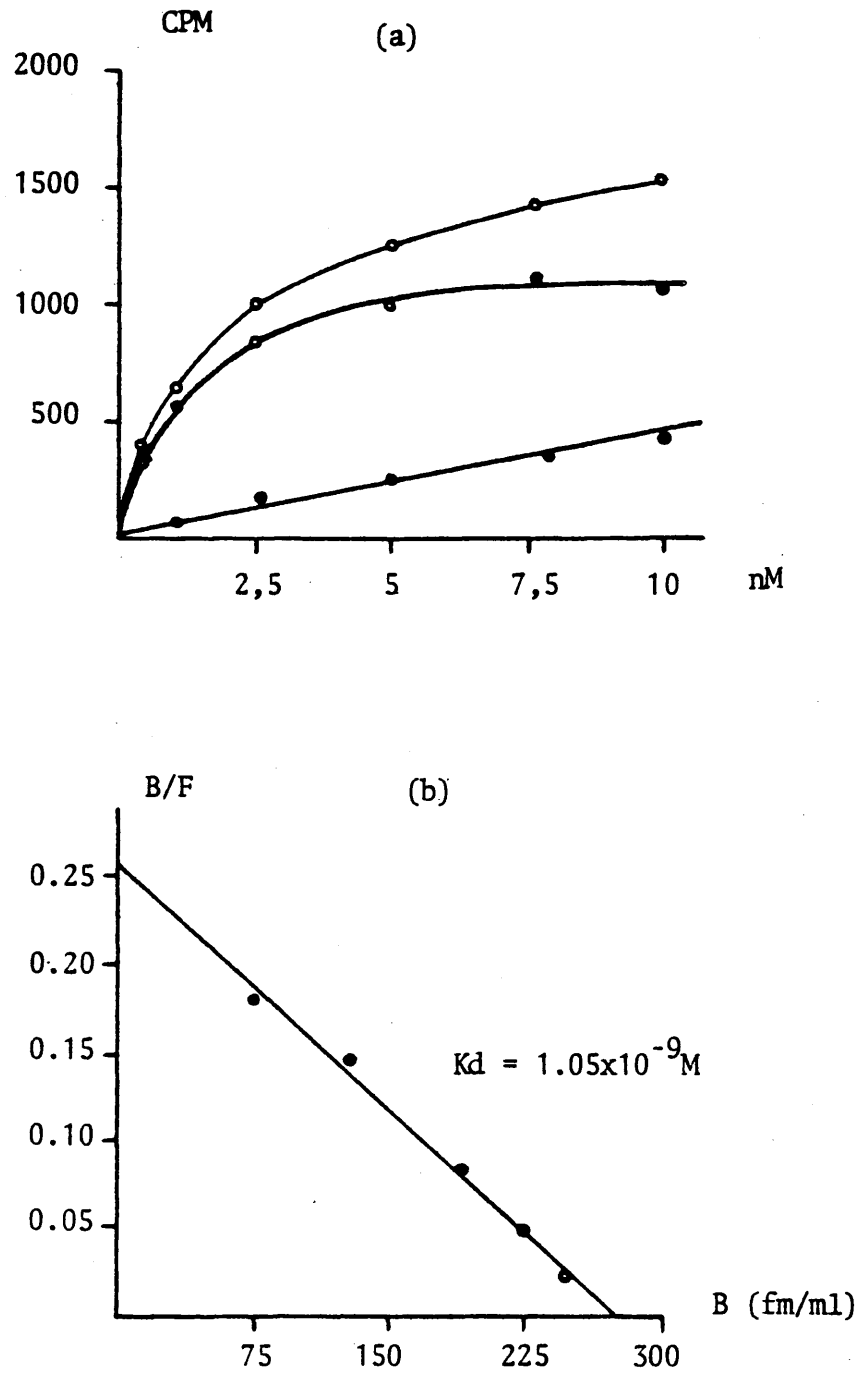
El volumen de citosol adecuado para el ensayo está estrechamente relacionado con su concentración proteica. KING y MAINWARING (1974) dan como óptima una concentración de proteínas en torno a 1 mg/ml, recomendando el evitar concentraciones altas que ocasionen una elevada captación inespecífica y que entorpezcan la cuantificación de la concentración de receptores fundamentalmente en aquellas situaciones en las que su concentración sea baja.

Homogeneizando un útero completo (aproximadamente 100 mg) en 1.5 ml de tampón, se consiguió una concentración proteica del orden de 2 mg/ml, que en el medio de incubación queda reducida a la mitad al diluirse los 100 µl de extracto citosólico con los 100 µl de la disolución de estradiol tritiado.

Para determinar la concentración de estradiol radioactivo saturante en el medio de incubación se realizaron los ensayos de saturación, consistentes en incubar una cantidad fija de citosol con concentraciones variables de $^3\text{H-E}_2$. La representación gráfica de la captación específica obtenida en cada caso, frente a la concentración correspondiente de estradiol, es una rama de hipérbola cuya asíntota corresponde a la máxima concentración de receptores e indica a partir de qué concentración se alcanza la saturación.

A la vista de la curva de saturación, Fig. 9(a), la concentración de $^3\text{H-E}_2$ elegida para los ensayos de incubación fué de 10 nM, superior a la mínima saturante para asegurar su efectividad en aquellas situaciones en que la concentración de receptores citosólicos fuera superior a la de los controles.

FIG. 9



CURVA DE SATURACION (a) Y PLOT DE SCATCHARD(b) DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO.

La linearización de estos datos se hizo según el plot de SCATCHARD Fig.9(b), en el que la pendiente de la recta da el valor de la constante de disociación del complejo hormona-receptor y el corte en el eje de abscisas, la concentración máxima de receptores.

En las condiciones de nuestros ensayos, el valor de K_d fué de $1,05 \times 10^{-9}$, Fig.9(b), que entra dentro del rango de los encontrados por otros autores, recogidos en varias revisiones. KING y MAINWARING (1974), GORSKI y GANNONG (1976).

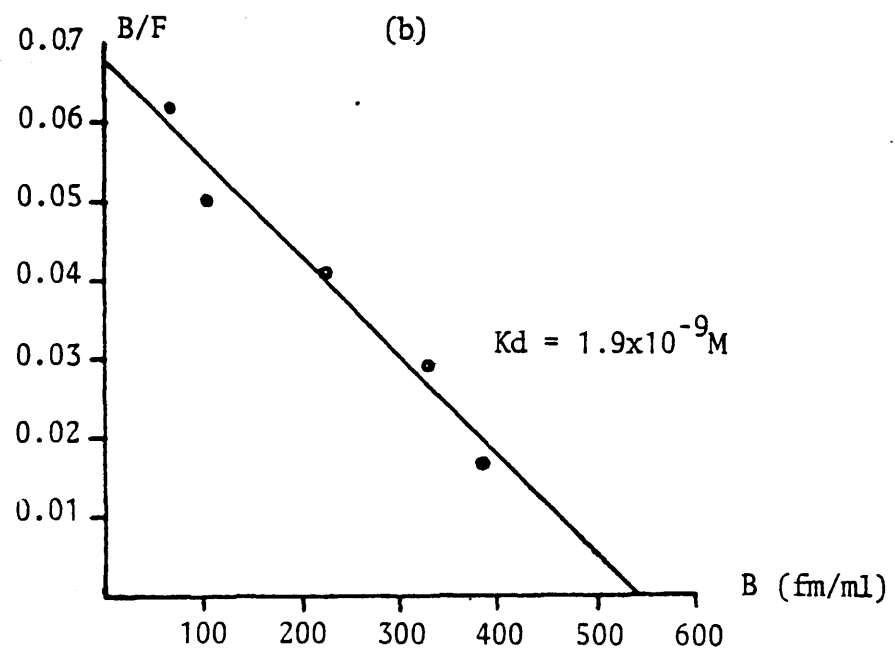
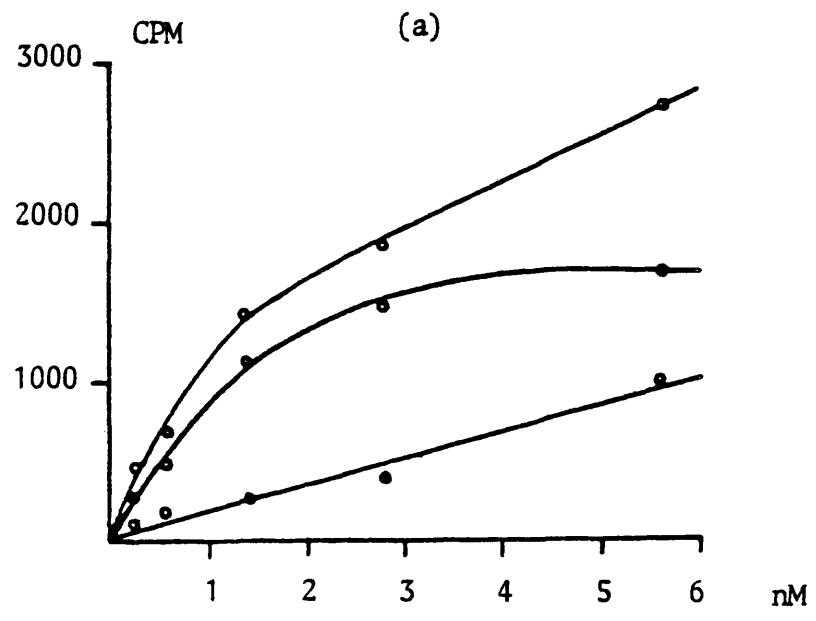
Ensayo de receptores nucleares en útero .-

Para la incubación se utilizaron 250 μ l de suspensión nuclear para lo cual el precipitado nuclear, filtrado y lavado, se resuspendió en 2,5 ml de tampón tras una agitación vigorosa hasta lograr una suspensión perfectamente homogénea.

Las condiciones de temperatura y tiempo de la incubación (37°C, 30 min.) que en un principio se adoptaron, que son las utilizadas por autores como ANDERSON (1972) y MESTER Y BAULIEU (1975) fueron sustituidas tras los primeros ensayos por las de 30°C de temperatura y 60 min. de duración. Estas nuevas condiciones se adoptaron a la vista de algunos trabajos de publicación más reciente que señalan que a 37°C puede verse afectada la estabilidad del receptor. (YUH y KEYES (1979), CARLSON y GORSKI (1980). Esta variación no modificó significativamente la captación específica medida, pero al igual que se observó en las incubaciones de las fracciones citosólicas, los resultados intraensayo obtenidos fueron más regulares al conseguirse una mayor uniformidad en las cuentas.

Con respecto al procesado de los nucleos, puede afirmarse que no existiendo autores que empleen exactamente la misma técnica. La ruta experimental es larga y laboriosa, la serie de lavados a los que se somete la suspensión nuclear después de la incubación, y la ex--

FIG. 10



CURVA DE SATURACION (a) Y PLOT DE SCATCHARD (b) DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE UTERO.

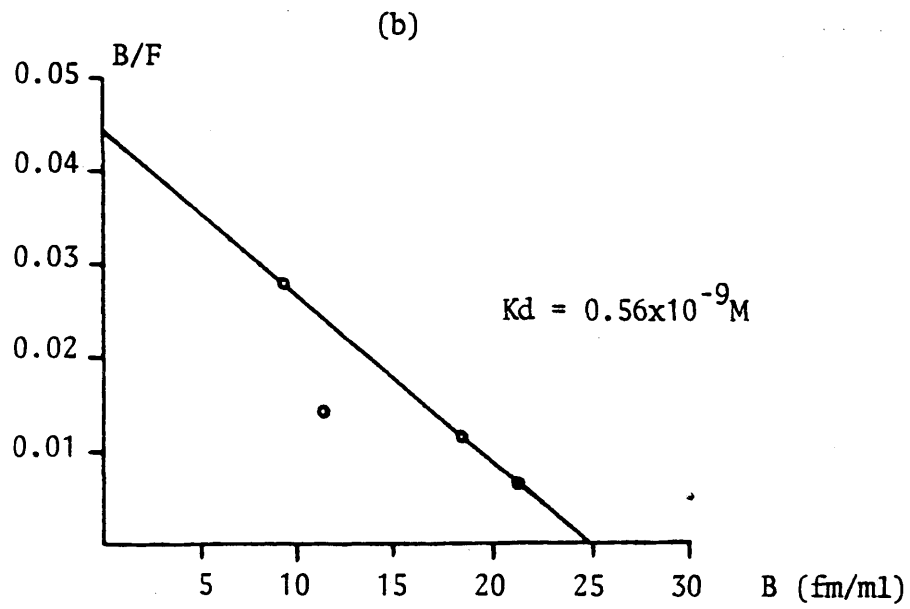
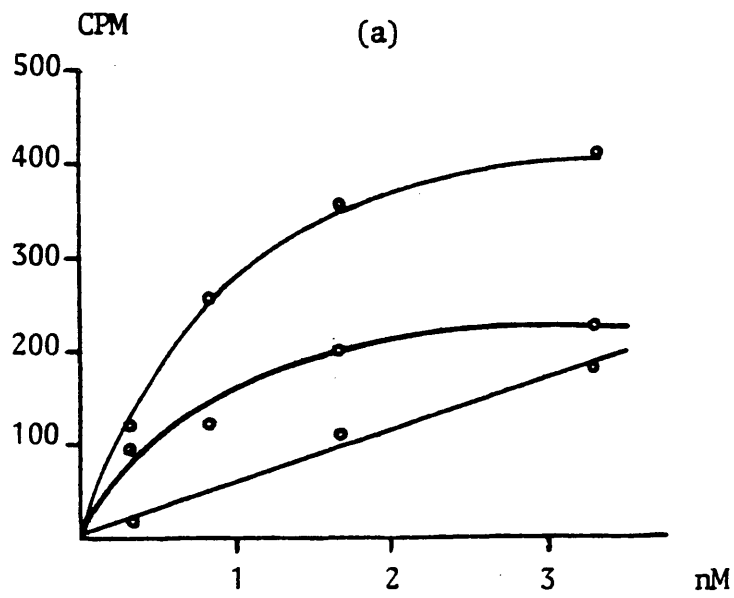
tracción final de radiactividad para el contaje, son a nuestro juicio las etapas con mayor fuente de errores, principalmente por pérdida de material nuclear. Esto nos llevó a utilizar exclusivamente un rotor basculante que fijara los precipitados en el fondo del tubo de ensayo y a realizar las extracciones finales y el contaje en el mismo tubo de propileno, al que se le añadía directamente el líquido de centelleo. Con estas precauciones y haciendo las determinaciones por cuadruplicado, se consiguió un aumento considerable del rendimiento de los ensayos de receptores nucleares en todos los tejidos.

La concentración de $^3\text{H-E}_2$ saturante para las incubaciones de los Rn uterinos, se determinó a partir de la curva de saturación. Fig. 10. La constante de disociación K_d medida en el plot de SCATCHARD fué de $1,9 \times 10^{-9}$ M, del orden de las calculadas por otros autores. KING y MAINWARING (1974), GORSKI y GANNONG (1976), JENSEN y col. (1979).

Ensayos de receptores en Adenohipófisis e Hipotálamo.-

Para los ensayos de receptores citosólicos en adenohipófisis, se siguieron las líneas generales de las técnicas utilizadas por MENON y GUNAGA (1976) y CIDLOWSKI y MULDOON (1974), (1978). Para conseguir un valor aceptable de la captación específica, fué preciso hacer pool de al menos tres adenohipófisis que, homogeneizadas en 2 ml de tampón daban una concentración protéica en el extracto citosólico algo inferior a 1 mg/ml. La incubación se efectuó mezclando 250 μl de citosol con 50 μl de la disolución de estradiol radiactivo 20 nM resultando una concentración en el medio de 3,3 nM, saturante, según puede comprobarse en la curva de saturación. Fig. 11(a), La incubación llevada a cabo a 4°C durante 18 horas recomendada por los autores anteriormente citados, resultó efectiva, siendo el valor de $K_d = 0.56 \times 10^{-9}$ M, valor que entra dentro del rango de los =

FIG. 11



CURVA DE SATURACION (a) Y PLOT DE SCATCHARD (b) DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE ADENOHIPOFISIS.

obtenidos por dichos autores.

Para el ensayo de los receptores citosólicos hipotalámicos, dada su baja concentración en este tejido, hubo de hacerse un pool de varias unidades para conseguir una buena medida de su concentración. El problema principal surge de la gran cantidad de cuentas inespecíficas que se acumulan como consecuencia de la elevada concentración proteica del extracto citosólico, que puede llegar incluso a enmascarar la captación específica. A pesar de estas limitaciones se consiguió estandarizar el ensayo utilizando al menos cuatro hipotálamos por determinación, que homogeneizados en 4 ml de tampón, dieron un extracto citosólico de aproximadamente 3 mg/ml de proteínas.

El hacer curvas de saturación en núcleos de adenohipófisis e hipotálamo, resulta una empresa muy costosa dado el alto número de animales que requiere. Por ello se decidió ajustar al máximo el proceso al descrito por ANDERSON y Col. (1973) para estas áreas en animales prepúberes, y hacer pruebas puntuales en torno a las concentraciones saturantes por ellos establecidas. Tras diversos ensayos los mejores resultados se obtuvieron con un volumen de suspensión nuclear de 500 μ l y una concentración de $^3\text{H-E}_2$ 3,3 nM para hipotálamo, y con 250 μ l de suspensión y 5,7 nM de $^3\text{H-E}_2$ para adenohipófisis. La incubación se llevó a cabo a 4°C durante 18 horas.

La alta captación inespecífica de la suspensión nuclear de hipotálamo fué un problema que no conseguimos desterrar totalmente y que invalidó parte de los ensayos. No obstante, y con las reservas propias de no disponer de un número suficiente de determinaciones positivas que afiancen los resultados, hemos creído oportuno recoger los resultados obtenidos con las dosis de 500 y 10 ng E_2 /kg dado que para la primera de ellas se encontró una evolución similar a las presentadas por otros autores, y la segunda, por su semejanza con las aquí encontradas en útero y adenohipófisis para esta misma dosis.

3.2.- RECEPTORES EN UTERO .-

3.2.1.- EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS UTERINOS TRAS LA ADMINISTRACION DE LAS DIFERENTES DOSIS DE ESTRADIOL.-

Evolución tras la dosis de 500 ng E₂/kg .-

Los valores de la concentración de Rc medida diversos tiempos después de la inyección de 500 ng/kg se recogen en las tablas 12A y 12B y se representa su evolución en la Fig. 12 .

Inmediatamente después de la administración de esta dosis, se observa una rápida disminución de la concentración de Rc desde el valor control de 217.2 fm/mg prot. hasta alcanzar un valor mínimo de 87.1 fm/mg prot. a las dos horas post-inyección. Este descenso representa el 40% del control y es estadísticamente significativo: $p < 0.001$.

A partir de la tercera hora la concentración de receptores citosólicos comienza a recuperarse de un modo gradual y constante, a una velocidad de 10 fm/mg prot. por hora, alcanzando de nuevo los niveles basales a las 12 horas aproximadamente.

En las seis horas siguientes el nivel de Rc es superior a los controles, registrándose un máximo no significativo a las 18 horas con una concentración de 254.2 fm/mg prot., para retornar de nuevo a ellos a las 24 horas y mantenerse a este nivel al menos hasta las 42 horas.

Evolución tras la dosis de 10 ng E₂/kg .-

Los datos en sus diferentes formas de expresión se recogen en las tablas 13A y 13B y se representan en la Fig. 13 .

En las cinco horas que siguen a la inyección de estradiol, se observa un descenso de la concentración de receptores, -- 198.7 fm/mg prot. a las dos horas y 199.5 fm/mg prot. a las 5 horas, que no llega a ser significativo respecto al con--- trol. A partir de este tiempo es cuando se detecta un aumen- to de los mismos, sobrepasándose los niveles del control de modo que a las 8 horas se detecta un valor de 299.4 fm/mg -- prot. estadísticamente significativo. ($p < 0.001$).

La máxima concentración de Rc para esta dosis se detectó a las 12 horas con un valor de 346.1 fm/mg prot., que supo- ne un 59% sobre el nivel basal.

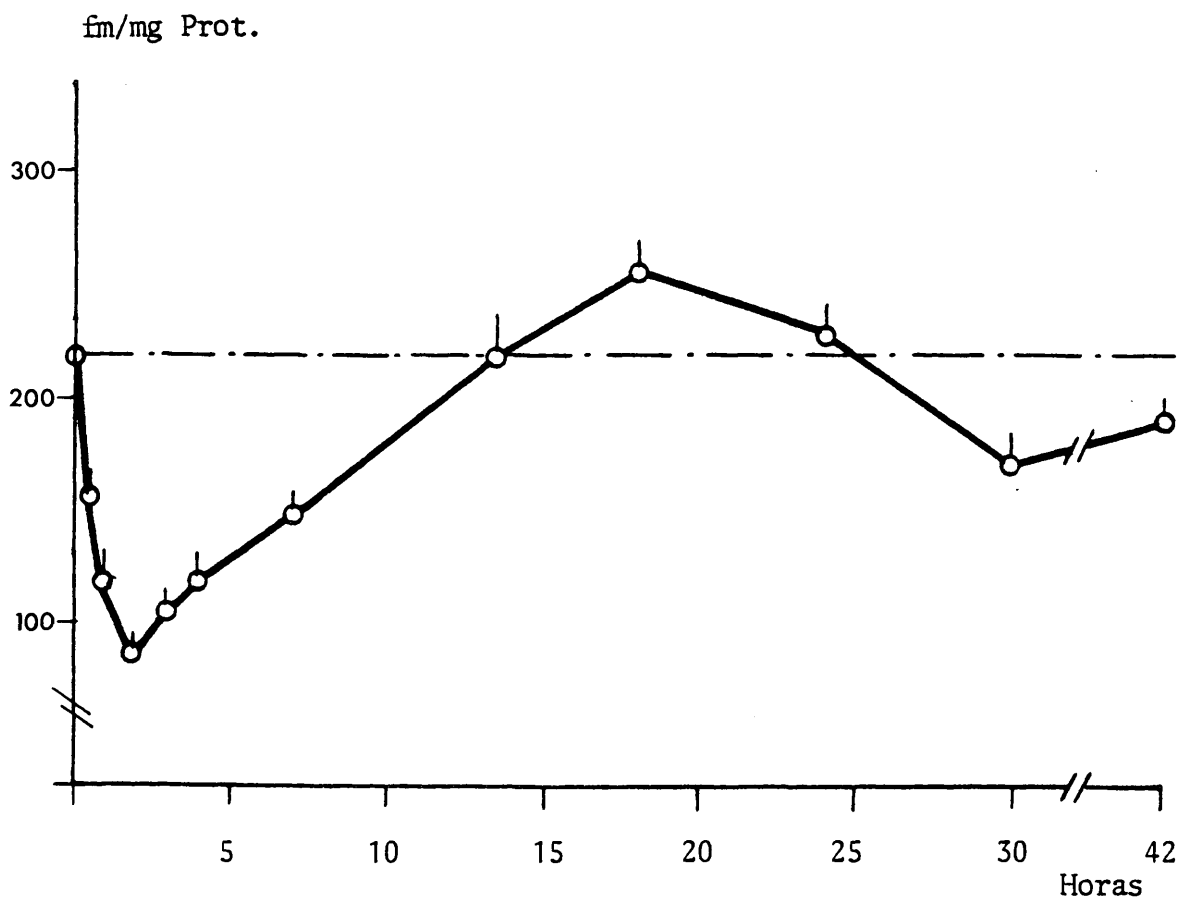
En las horas siguientes, los Rc descienden al nivel de - los controles. A las 18 horas el valor de la concentración= fué de 191.8 fm/mg prot. (no significativo).

Evolución tras la dosis de 1 ng E_2 /kg .-

No se detecta disminución significativa de los Rc en las primeras dos horas (198.7 fm/mg prot.), y es durante las -- tres horas siguientes cuando se registra un aumento signifi- cativo ($p < 0.0001$), hasta alcanzar el valor de 421.4 fm/mg prot. a las 5 horas, lo que supone un 90% sobre el valor de los controles.

A las 8 horas post-inyecciónla concentración de Rc ha re gresado al nivel basal en el que permanece hasta las 16 ho- ras. FIG. 14 , Tablas 14A y 14B .

FIG. 12



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂ Kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLAS/MG DE PROTEINAS ± D.E.

T A B L A 12A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE UTERO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

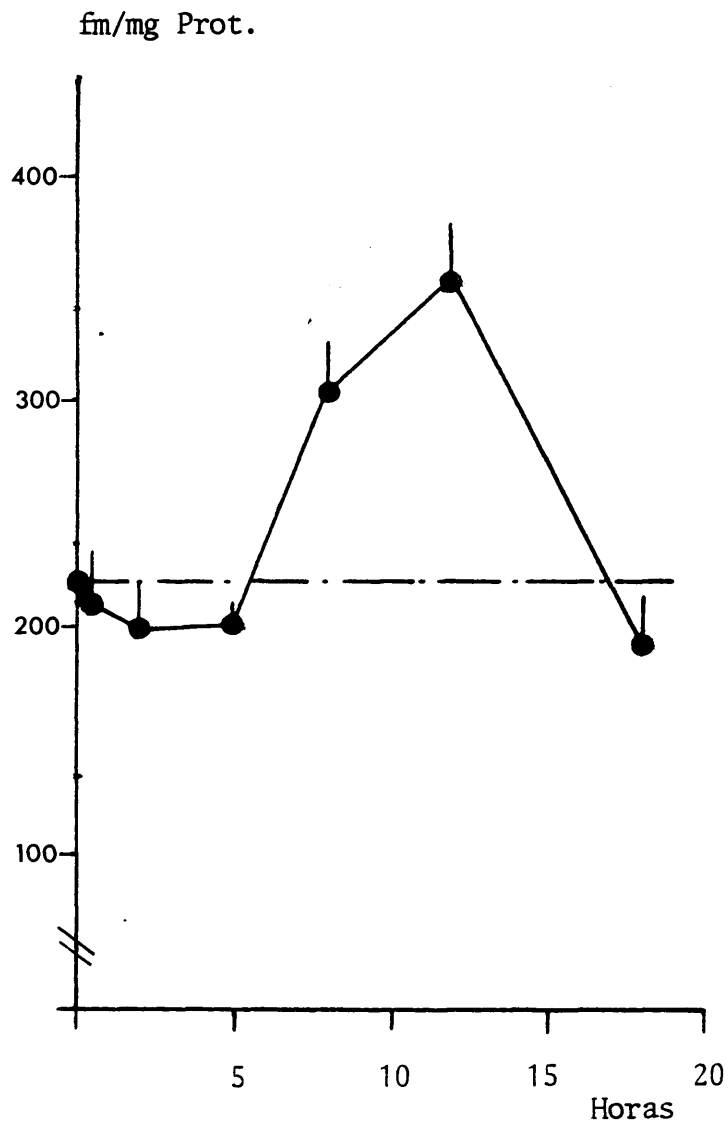
TIEMPO Horas	N	RECEPTORES fmol/mg prot.	VARIACION % Control
0.5	6	157.9 ± 9.9	71.7
1	6	120.4 ± 13.5	55.4
2	18	87.1 ± 2.26	40.1
3	7	107.6 ± 7.8	49.5
4	5	120.6 ± 11.6	55.5
7	5	146.9 ± 10.2	67.7
14	5	217.7 ± 17.1	100.2
18	5	254.2 ± 14.7	117.3
24	11	227.8 ± 13.4	104.9
30	5	172.6 ± 13.7	79.5
42	11	187.5 ± 10.7	86.3
CONTROL	28	217.2 ± 10.9	100

T A B L A 12B

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE UTERO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
1	4	4.12 \pm 0.43	97.6
2	18	2.36 \pm 0.07	55.9
4	5	3.23 \pm 0.42	76.5
7	5	3.46 \pm 0.25	82.1
14	5	6.51 \pm 0.71	154.3
18	5	6.84 \pm 0.54	162.1
24	11	6.74 \pm 0.10	159.72
30	6	3.97 \pm 0.37	94.1
42	11	4.17 \pm 0.26	98.8
CONTROL	26	4.22 \pm 0.05	100

FIG. 13



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/mg PROTEINAS \pm D.E.

T A B L A 13A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE UTERO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg prot.	% Control
0.5	5	209.4 ± 21.10	96.4
2	5	198.7 ± 18.9	91.5
5	5	199.4 ± 10.2	91.8
8	5	299.4 ± 20.03	137.8
12	4	345.1 ± 22.7	158.8
18	6	191.8 ± 18.03	88.3
CONTROL	28	217.2 ± 10.9	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg Prot. OBTENIDAS EN CITOSOL DE UTERO PARA LAS DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		0.5	2	5	8	12	18
CONTROL	t	0.27	0.66	0.66	2.92	4.13	0.98
	p<	N.S.	N.S.	N.S.	0.005	0.001	N.S.
0.5	t		0.33	0.37	27.3	3.85	0.57
	p<		N.S.	N.S.	0.001	0.005	N.S.
2	t			0.03	3.24	4.43	0.23
	p<			N.S.	0.01	0.005	N.S.
5	t				3.82	5.38	0.30
	p<				0.005	0.001	N.S.
8	t					1.35	3.55
	p<					N.S.	0.005
12	t						4.73
	p<						0.001

T A B L A 13B

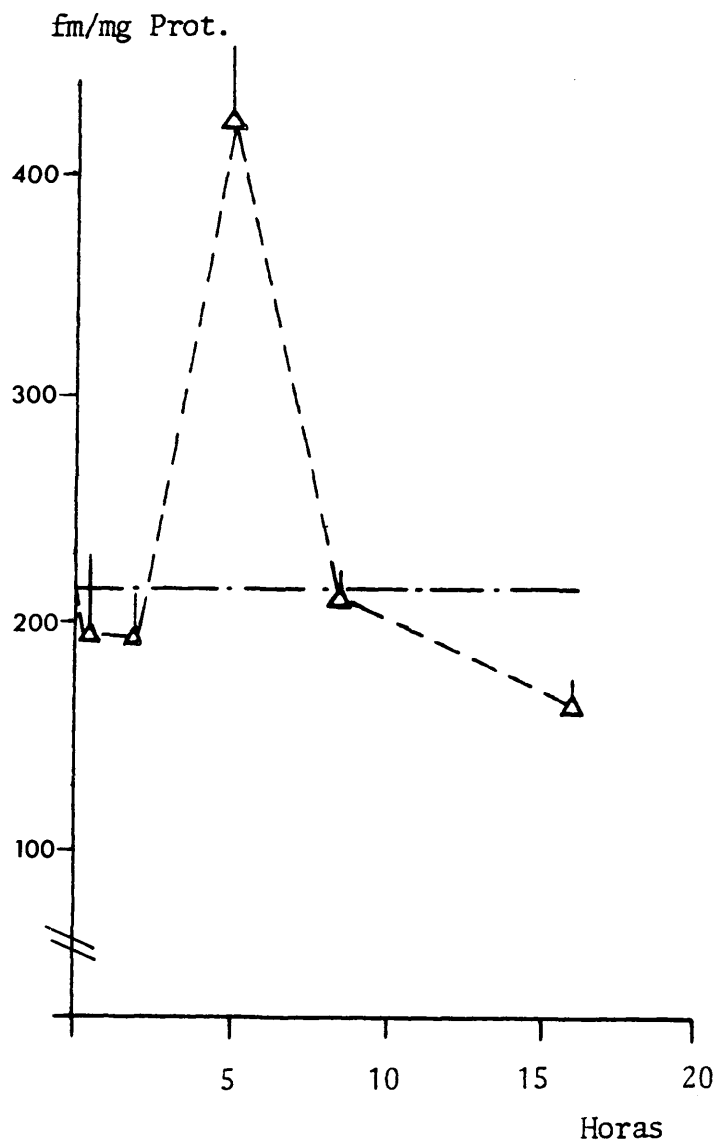
EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE UTERO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
0.5	3	4.55 ± 0.59	107.8
2	5	4.79 ± 0.42	113.5
5	6	5.24 ± 0.43	124.2
8	5	6.95 ± 0.47	164.7
12	8	7.49 ± 0.38	177.5
18	5	3.94 ± 0.27	93.4
CONTROL	26	4.22 ± 0.05	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN CITOSOL DE UTERO PARA LAS DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		0.5	2	5	8	12	18
CONTROL	t	1.29	2.56	4.29	11.2	10.8	1.67
	p <	N.S.	0.01	0.001	0.001	0.001	N.S.
0.5	t		0.29	0.82	2.72	2.95	0.92
	p <		N.S.	N.S.	0.025	0.01	N.S.
2	t			0.67	3.05	3.45	1.32
	p <			N.S.	0.01	0.005	N.S.
5	t				2.42	3.01	2.22
	p <				0.05	0.01	0.05
8	t					0.67	4.9
	p <					N.S.	0.001
12	t						4.84
	p <						0.001

FIG. 14



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLAS/MG PROTEINAS \pm D.E.

T A B L A 14A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE UTERO PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg prot.	% Control
0.5	5	199.4 ± 16.4	91.8
2	4	198.7 ± 7.03	91.5
5	7	421.4 ± 33.8	194.2
8.5	4	214.9 ± 5.8	99'2
16	3	184.5 ± 1.22	84.9
CONTROL	28	217.2 ± 10.9	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg Prot. OBTENIDAS EN CITOSOL DE UTERO PARA LAS DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		0.5	2	5	8.5	16
CONTROL	t	0.65	0.62	7.19	0.08	0.95
	p <	N.S.	N.S.	0.001	N.S.	N.S.
0.5	t		0.03	4.84	0.79	0.68
	p <		N.S.	0.001	N.S.	N.S.
2	t			4.46	1.53	1.47
	p <			0.005	N.S.	N.S.
5	t				4.15	4.09
	p <				0.005	0.005
8.5	t					3.75
	p <					0.01

T A B L A 14B

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE UTERO PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
0.5	5	3.79 \pm 0.54	89.8
2	13	5.28 \pm 0.42	125.1
5	7	10.89 \pm 0.97	258.1
8.5	4	5.35 \pm 0.33	126.8
16	6	3.13 \pm 0.24	74.2
CONTROL	26	4.22 \pm 0.05	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN CITOSOL DE UTERO PARA LAS DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		0.5	2	5	8	12
CONTROL	t	1.57	3.39	12.6	6.02	5.8
	p<	N.S.	0.001	0.001	0.001	0.005
0.5	t		1.85	10.23	2.02	1.05
	p<		N.S.	0.001	N.S.	N.S.
2	t			8.43	0.08	3.18
	p<			0.001	N.S.	0.005
5	t				9.16	15.64
	p<				N.S.	0.001
8	t					4.89
	p<					0.001

3.2.2.- EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES UTERINOS TRAS LA ADMINISTRACION DE LAS DIFERENTES DOSIS DE ESTRADIOL .-

Evolución de los Rn tras la dosis de 500 ng E/kg.---

Los resultados expresados en fm/mg DNA y en fm/mg tejido se recogen en las Tablas 15A y 15B. La Fig.15 representa su evolución en función del tiempo.

Tras la inyección de estradiol, se observa un aumento progresivo del contenido nuclear de receptores, que a las 4 horas da un valor de 362.7 fm/mg DNA significativamente ----- ($p < 0.005$) superior al de los controles (283 fm/mg DNA).

El contenido de Rn continúa aumentando hasta alcanzar a las 18 horas su máximo valor con una concentración de 472.2 fm/mg DNA ($p < 0.001$). A partir de este tiempo la cantidad de receptores comienza a disminuir hasta los niveles basales, que se alcanzan a las 24 horas post-inyección, permaneciendo a este nivel por lo menos hasta las 42 horas, tiempo máximo estudiado en este trabajo.

Evolución de los Rn tras la dosis de 10 ng E/Kg .-

Las concentraciones de Rn tras la inyección de esta dosis intermedia, Fig. 16 Tabla 16A aumenta a una velocidad mayor que en la dosis de 500 ng E₂/kg. El valor máximo se alcanza a las 8 horas con 490,3 fm/mg DNA significativo con respecto al control, ($p < 0.001$).

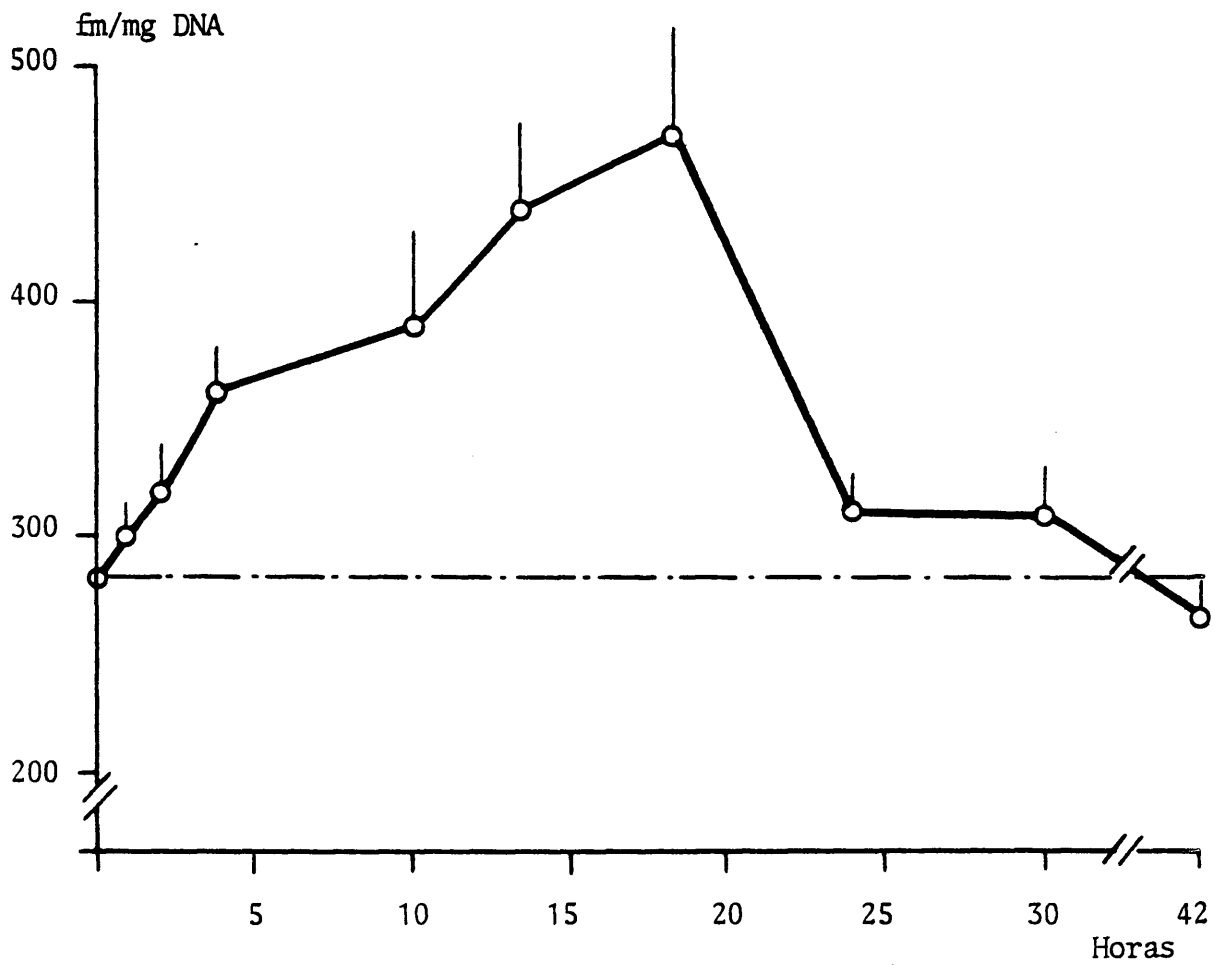
En las horas siguientes la concentración de receptores nucleares desciende hasta el nivel basal que se alcanza a las 18 horas, tiempo al que se registró un valor de 307,2 fm/mg DNA, no significativo respecto al control.

Evolución de los Rn tras la dosis de 1 ng E/Kg .-

El tipo de dinámica que presentan los Rn resultó ser muy semejante a la que se registró para los receptores citosólicos tras la administración de esta dosis. Fig. 17, Tabla 17A.

A las dos horas se detectó un ligero aumento del contenido de Rn (320,9 fm/mg DNA) que no fué significativo, igual que los presentados por las dosis mayores. Sin embargo, en las tres horas siguientes se produce un significativo aumento de Rn que culmina a las 5 horas, con un máximo de 530,8 fm/mg DNA ($p < 0.0001$). En las 5 horas siguientes se observa la vuelta a los niveles control en el que se mantiene -- hasta las 18 horas.

FIG. 15



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/MG DNA \pm D.E.

T A B L A 15A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
NUCLEOS DE UTERO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg DNA	% Control
1	4	298.7 ± 15.4	105.5
2	15	321.3 ± 24.9	113.5
4	4	362.7 ± 2.7	128.2
10	6	390.3 ± 43.4	137.9
14	5	440.9 ± 41.2	155.8
18	6	473.2 ± 50.9	167.2
24	4	311.9 ± 13.8	110.2
30	5	312.4 ± 16.7	110.3
42	4	264.2 ± 10.9	93.3
CONTROL	15	283.0 ± 11.3	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg DNA OBTENIDAS EN NUCLEOS DE UTERO PARA LAS DOSIS DE 500 ug E₂/kg.

		2	4	14	18	24	42
CONTROL	t	1.35	3.09	4.86	4.91	1.18	0.79
	p <	N.S.	0.005	0.001	0.001	N.S.	N.S.
2	t		0.79	2.3	2.8	0.18	1.11
	p <		N.S.	0.025	0.005	N.S.	N.S.
4	t			1.39	1.53	1.77	3.6
	p <			N.S.	N.S.	N.S.	0.01
14	t				0.43	2.38	3.3
	p <				N.S.	0.025	0.01
18	t					2.27	2.96
	p <					0.05	0.025
24	t						2.34
	p <						0.05

T A B L A 15B

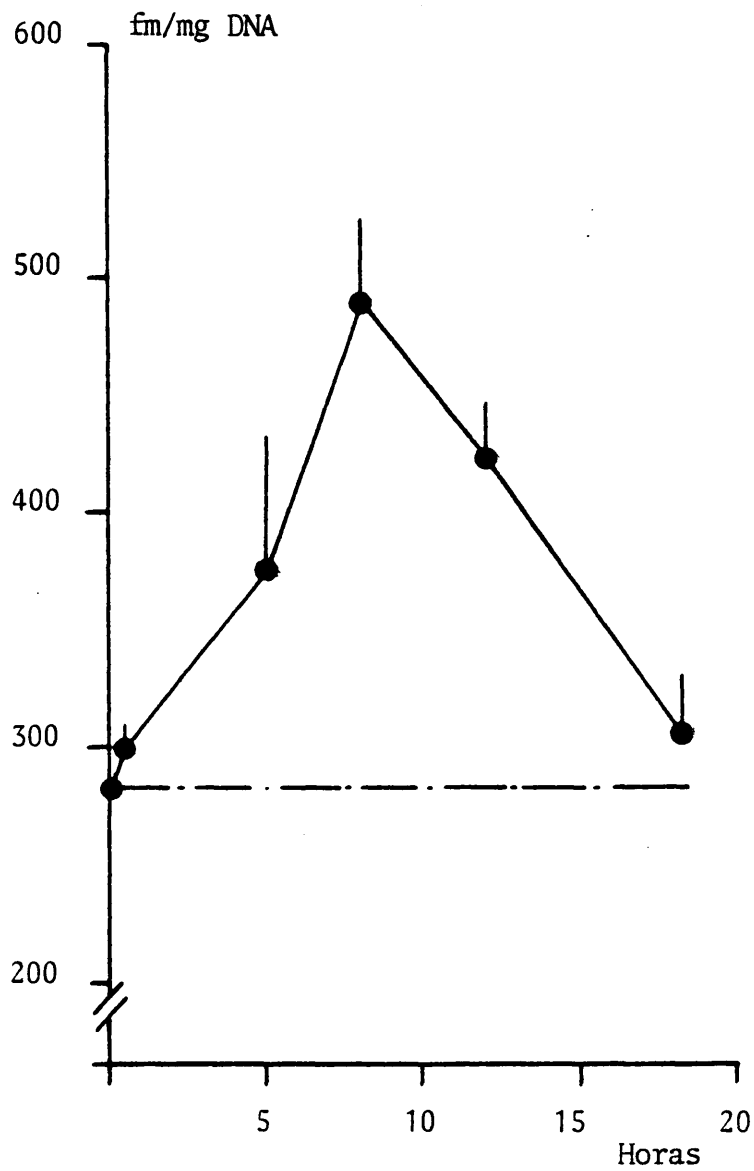
EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
NUCLEOS DE UTERO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	18	1.44 ± 0.11	105.1
4	6	1.67 ± 0.18	121.9
10	6	1.95 ± 0.13	142.3
14	5	2.13 ± 0.21	155.5
18	5	2.17 ± 0.25	158.4
30	5	1.53 ± 0.08	111.7
42	4	1.04 ± 0.07	75.9
CONTROL	29	1.37 ± 0.08	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN NUCLEOS DE UTERO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

		2	4	14	18	30	42
CONTROL	t	0.51	1.5	3.49	3.55	0.79	1.47
	p<	N.S.	N.S.	0.005	0.001	N.S.	N.S.
2	t		1.0	2.78	2.81	0.4	1.61
	p<		N.S.	0.01	0.01	N.S.	N.S.
4	t			1.51	1.49	0.6	2.42
	p<			N.S.	N.S.	N.S.	0.025
14	t				0.10	2.38	3.55
	p<				N.S.	0.025	0.005
18	t					2.17	3.42
	p<					0.05	0.01
30	t						3.94
	p<						0.005

FIG. 16



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/Kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLE/MG DNA ± D.E.

T A B L A 16A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
NUCLEOS DE UTERO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg DNA	% Control
0.5	4	298.14 ± 29.2	105.3
5	4	373.7 ± 56.6	132.1
8	4	490.26 ± 36.6	173.2
12	10	421.26 ± 26.3	148.8
18	4	307.18 ± 23.6	108.5
CONTROL	15	283.0 ± 11.3	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg DNA OBTENIDAS EN NUCLEOS DE UTERO PARA LAS DOSIS= DE 10 ng E₂/kg.

		0.5	5	8	12	18
CONTROL	t	0.53	2.35	6.78	5.58	0.91
	p <	N.S.	0.025	0.001	0.001	N.S.
0.5	t		1.02	3.55	2.74	0.21
	p <		N.S.	0.01	0.01	N.S.
5	t			1.49	0.85	0.93
	p <			N.S.	N.S.	N.S.
8	t				1.45	3.63
	p <				N.S.	0.01
12	t					2.62
	p <					0.025

T A B L A 16B

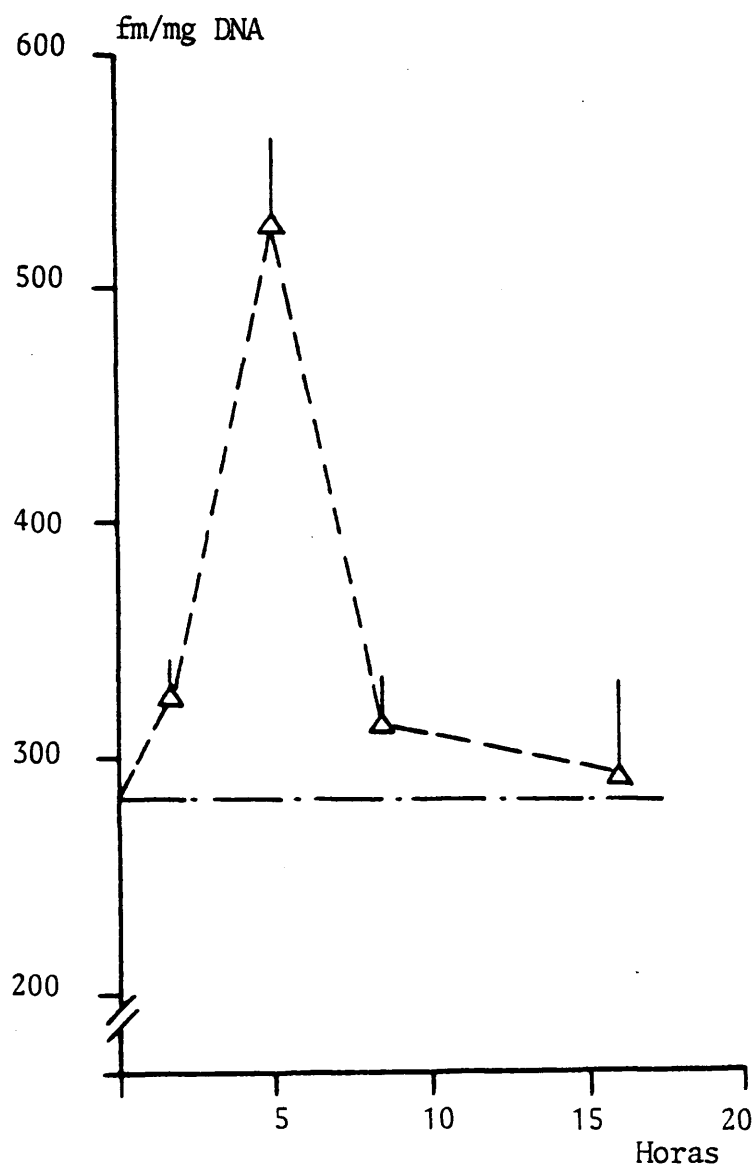
EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
NUCLEOS DE UTERO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
0.5	4	1.45 \pm 0.14	105.8
5	4	1.86 \pm 0.26	135.8
8	5	2.22 \pm 0.31	162.1
12	9	2.06 \pm 0.19	150.4
18	4	1.28 \pm 0.14	93.4
CONTROL	29	1.37 \pm 0.08	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN NUCLEOS DE UTERO PARA LAS DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		0.5	5	8	12	18
CONTROL	t	0.35	2.01	3.56	3.76	0.39
	p <	N.S.	0.05	0.001	0.001	N.S.
0.5	t		1.2	1.85	1.87	0.74
	p <		N.S.	N.S.	0.05	N.S.
5	t			0.76	0.55	1.7
	p <			N.S.	N.S.	N.S.
8	t				0.43	2.25
	p <				N.S.	0.05
12	t					2.39
	p <					0.01

FIG. 17



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/MG DNA \pm D.E.

T A B L A 17A

EVOLUCION TEMPORAL DE RECEPTORES DE ESTROGENO EN
 NUCLEO DE UTERO PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg DNA	% Control
2	6	320.9 ± 20.2	113.7
5	6	530.8 ± 39.1	187.6
8.5	5	314.9 ± 23.8	113.3
16	4	296.9 ± 43.3	104.9
CONTROL	15	283.0 ± 11.3	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg DNA OBTENIDAS EN EL NUCLEO DE UTERO PARA LAS DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		2	5	8.5	16
CONTROL	t	1.64	7.72	1.26	0.42
	p<	N.S.	0.001	N.S.	N.S.
2	t		4.39	0.17	0.5
	p<		0.001	N.S.	N.S.
5	t			4.08	3.5
	p<			0.005	0.005
8.5	t				0.33
	p<				N.S.

T A B L A 17B

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
 NUCLEO DE UTERO PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	4	1.59 ± 0.13	116.1
5	7	2.44 ± 0.1	178.1
8.5	5	1.54 ± 0.20	112.4
16	4	1.56 ± 0.26	113.8
CONTROL	29	1.37 ± 0.08	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN EL NUCLEO DE UTERO PARA LAS - DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		2	5	8	16
CONTROL	t	0.97	5.38	0.79	0.83
	p<	N.S.	0.001	N.S.	N.S.
2	t		2.59	0.17	0.14
	p<		0.025	N.S.	N.S.
5	t			2.7	2.7
	p<			0.025	0.025
8	t				0.07
	p<				N.S.

3.2.3.- EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES DE ESTRADIOL EN UTERO.-

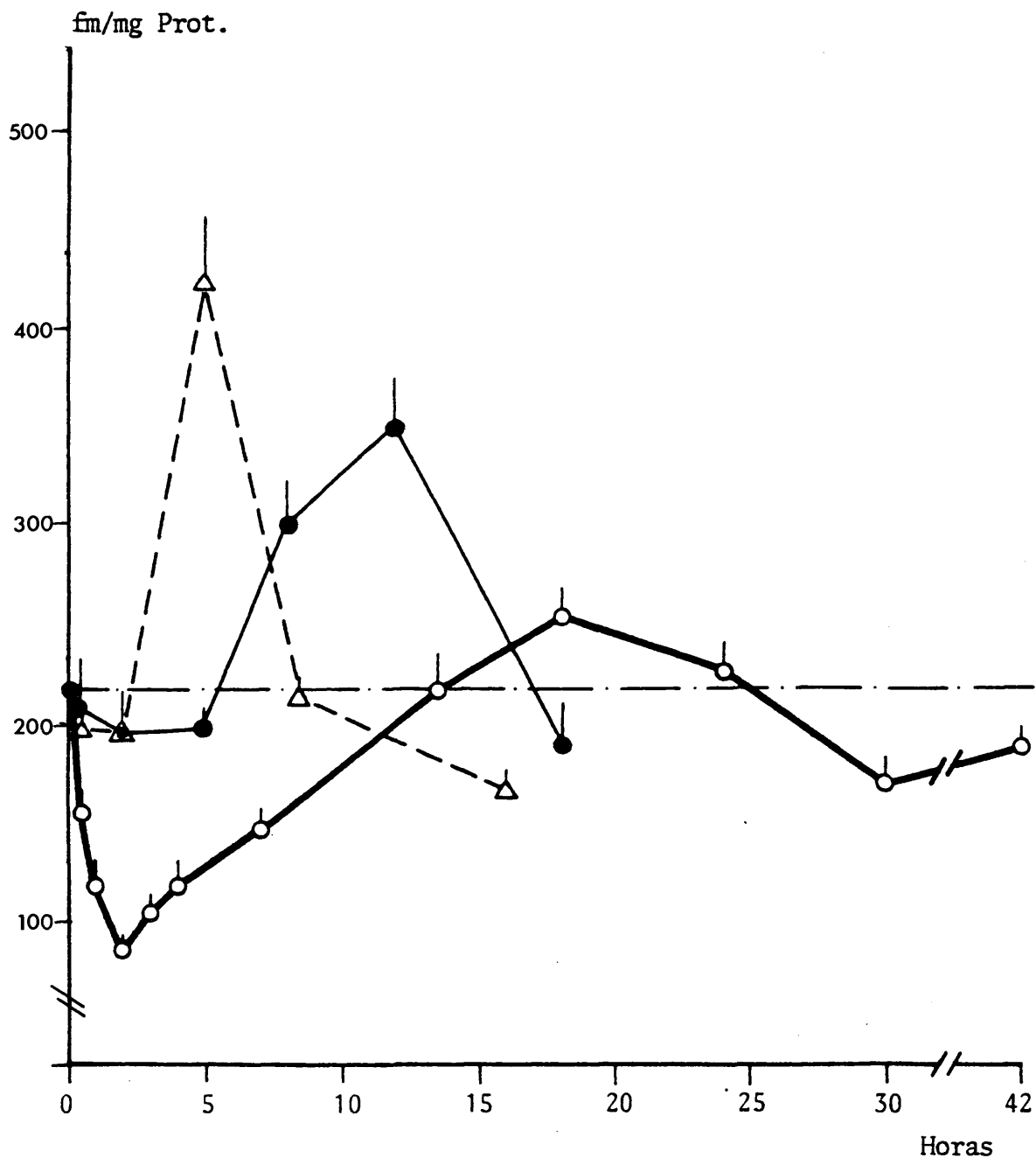
CONSIDERACIONES SOBRE LA EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN LAS TRES DOSIS ENSAYADAS .-

La Fig. 18 en la que se representa las evoluciones de la concentración de los receptores citosólicos tras la administración de las tres dosis estudiadas en este trabajo, nos == permitirá analizar comparativamente las dinámicas que tras = cada estímulo de estradiol presenta la población de receptores citosólicos, así como establecer relaciones con los resultados de otros autores consultados en la bibliografía.

En la Fig. 18 destaca cómo únicamente la dosis de 500 ng E_2 /kg. produjo depleción significativa de los receptores citosólicos. Ni la dosis de 10 ng E_2 /kg. ni la de 1 ng E_2 /kg., produjeron disminución significativa de los Rc, si bien los valores medidos durante las 5 y 2 horas post-inyección respectivamente, se mantuvieron inferiores al control. Por otra parte, las tres dosis ensayadas, 500, 10 y 1 ng E_2 /kg., provocaron la aparición de la fase de sobretiro, o fase en la = que la concentración de receptores supera a la de los controles. Posteriormente el ciclo se cierra con el retorno a los niveles basales a unos tiempos directamente relacionados con la dosis administrada.

De las fases de que consta el ciclo del receptor, las dos primeras, la depleción y la recuperación de la capacidad captadora de estradiol por el citosol, han sido ampliamente descritas, principalmente en ratas prepúberes. J. MESTER y BAULIEU (1974); RUH y COL. (1977).

FIG. 18



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 (Δ), 10 (●) y 500 (○) ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN = FEMTOMOL/MG PROTEINAS ± D.E.

GALAND (1978) revisó las evoluciones de las concentraciones de receptores citosólicos uterinos en relación con la dosis de hormona administrada, encontrando que la magnitud de la depleción guarda relación con la dosis de estradiol ensayada.

En ratas prepúberes, MESTER y BAULIEU (1974) registraron una depleción del 50% para una dosis de 0.1 μg /rata, lo que equivale aproximadamente a unos 2 μg E_2 /kg. en adultos, y de más de 90% para 1 μg E_2 /rata, dosis del orden de los 20 μg E_2 /kg. en adultos. HAYES (1981) ha presentado recientemente valores de este orden también en ratas prepúberes con esa misma dosis.

En estos resultados con la dosis de 500 ng E_2 /kg. se presenta al cabo de dos horas, una depleción citosólica de un 60% frente al 90% que para una dosis de 1 μg /rata obtiene -- CIDLOWSKI y MULDOON (1974) también en animales castrados, == mientras que, con las dosis menores de 10 y 1 μg E_2 /kg. aquí utilizadas, la depleción resulta indetectable.

Después de la depleción se observa un aumento de la concentración de receptores hasta los niveles del control. Para la dosis de 500 ng E_2 /kg., se encuentra que esta recuperación es más rápida que la observada por otros autores. CIDLOWSKI y MULDOON (1974) a las 15 horas post-inyección, detectaron una repleción del 85% para una dosis de 4 mg/kg.

En ratas prepúberes, BAULIEU (1974) y HAYES y COL. (1981) registraron la recuperación total de la concentración de Rc entre las 12-15 horas para la dosis de 1 μg /rata. Con una dosis cinco veces mayor GORSKI (1972) y RUH y BAUDENDISTEL == (1977) la detectaron a las 22 horas post-inyección, de donde

se puede deducir que en las ratas prepúberes parece existir una relación directa entre la dosis inyectada y la duración de la fase de recuperación. No obstante, los resultados que otros autores obtienen con ratas intactas o prepúberes no son enteramente comparables con éstos, y sólo debe usarse a título orientativo.

A la vista de las evoluciones de la concentración de Rc para cada una de las dosis estudiadas en estos experimentos, se observa también una correlación directa entre el tiempo al que culmina la recuperación citosólica (cuando la concentración de Rc alcanza la concentración de los controles), o lo que es lo mismo, el momento en que comienza el sobretiro (fase en la que la concentración de Rc supera a la de los controles), y la magnitud de la dosis administrada. Cuanto mayor es la dosis, más se retrasa la aparición del sobretiro, registrándose el aumento de concentración sobre el control a las 2, 6 y 13 horas para las dosis de 1, 10 y 500 ng E₂/kg. respectivamente; dándose además una relación directa entre el logaritmo de las dosis y el tiempo a que se empieza a producir el sobretiro. Fig. 20(a).

HAYES y COL. (1981) en ratas prepúberes y con una dosis de 1 µg/rata encontraron un sobretiro con un máximo a las 24 horas y un retorno a los niveles control que culminó a las 72 horas.

MORRIS (1976) usando ratas adultas ovariectomizadas y con dosis de 4 y 20 µg E₂/kg., al ensayar la concentración de receptores a las 24 horas post-inyección, encontró valores en la concentración de receptores superiores al control en el 75% y 30% respectivamente.

Probablemente la relación directa aquí observada entre la dosis y el tiempo invertido en culminar la recuperación citosólica aporte una explicación a la ausencia de sobretiro dentro de las primeras 24 horas post-inyección, cuando se inyectan dosis elevadas de estradiol.

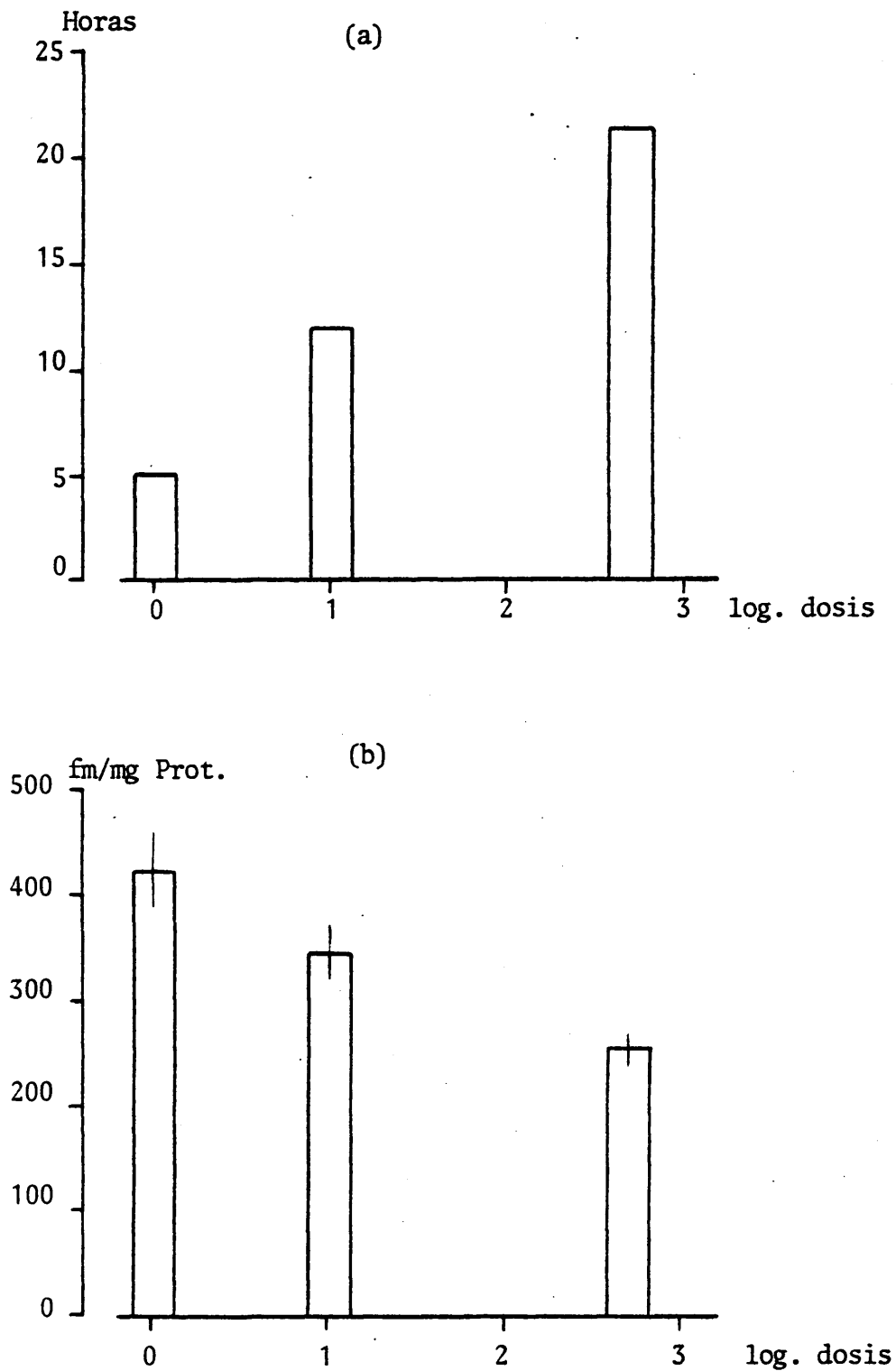
De la revisión bibliográfica realizada puede deducirse que el ciclo completo del receptor no ha sido estudiado previamente con tanto detalle como en este trabajo. Por otra parte, la observación del ciclo completo para cada dosis ensayada permite extraer algunas relaciones dosis-tiempo de interés.

Como puede observarse en la Fig. 19(b) las máximas concentraciones de receptores citosólicos se detectan para las dosis más bajas, mientras que el tiempo al que tales concentraciones se alcanzan guarda relación directa con el logaritmo de la dosis ensayada. Fig. 19(a).

En la Fig. 20(a) se puede ver que los tiempos a los que las concentraciones de receptores empiezan a detectarse superiores al control, están directamente relacionados con el logaritmo de la dosis.

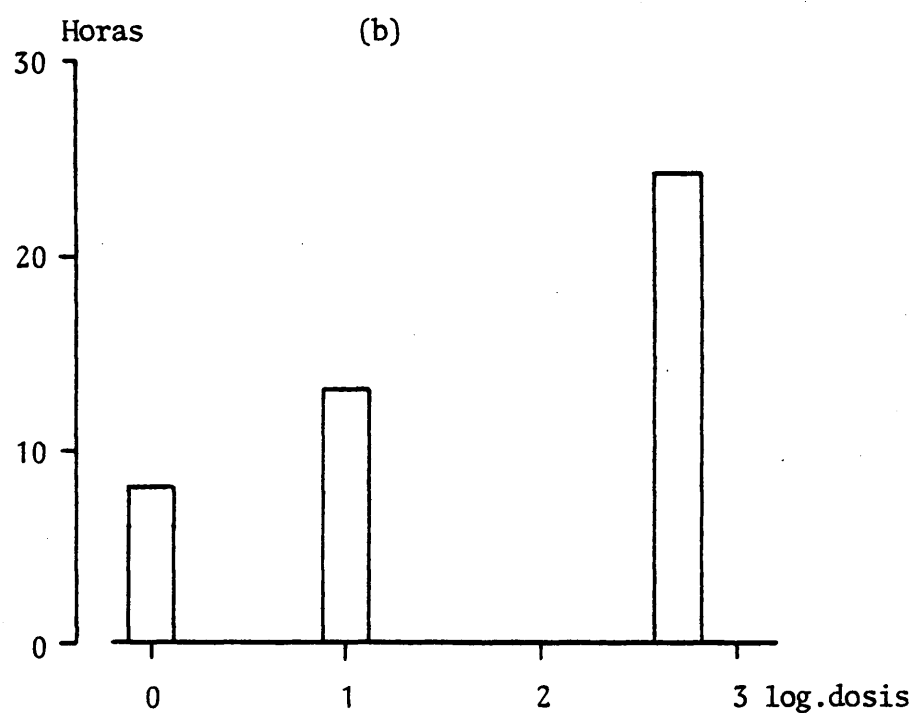
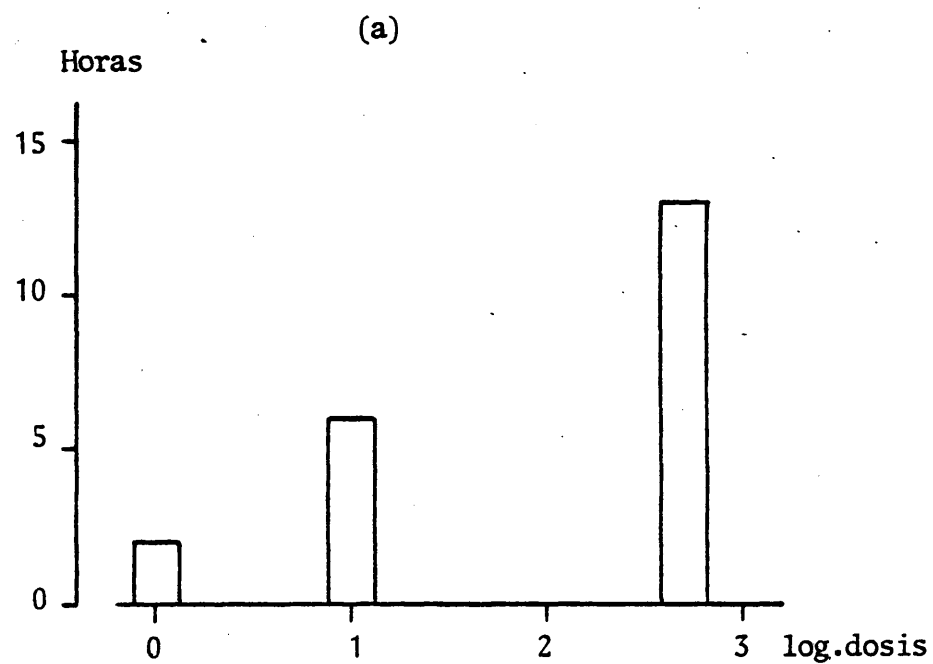
Por último, en la Fig. 20(b) se observa que la duración del ciclo también guarda relación directa con el logaritmo de la dosis ensayada. El posible significado de tales hechos será extensamente estudiado en la discusión.

FIG. 19



RELACIONES ENTRE LOS TIEMPOS A LOS QUE SE DETECTAN LOS MAXIMOS DE R_c (a) Y LOS VALORES DE SUS MAXIMAS CONCENTRACIONES ALCANZADAS (b) CON EL LOGARITMO DE LA DOSIS INYECTADA.

FIG. 20



RELACION ENTRE EL TIEMPO AL QUE COMIENZA EL SOBRETIRO DE R_c (a) Y EL TIEMPO DE DURACION DEL CICLO DE R_c (b) CON = EL LOGARITMO DE LA DOSIS INYECTADA.

CONSIDERACIONES SOBRE LA EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN LAS TRES DOSIS ENSAYADAS .-

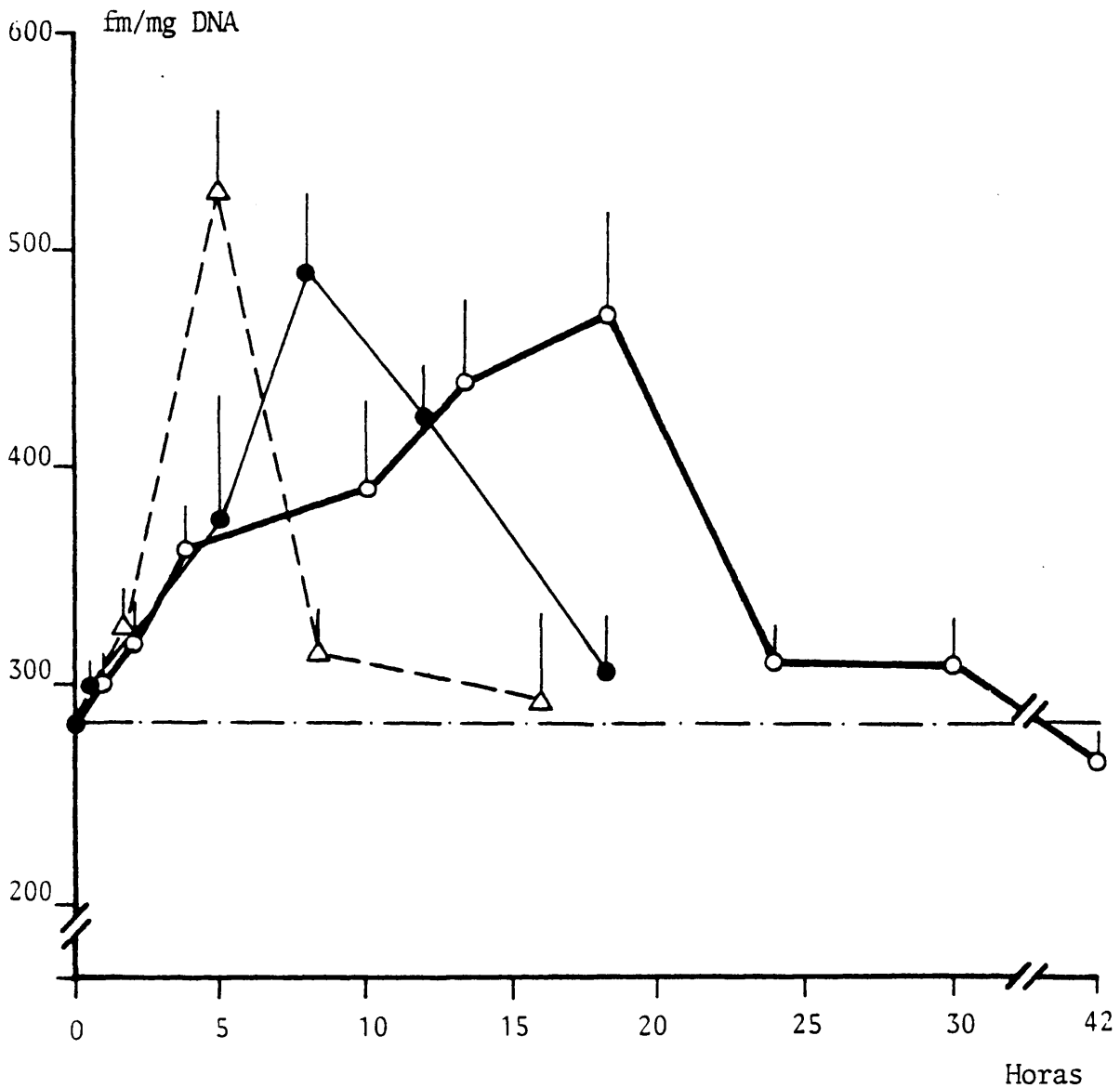
Las variaciones registradas en la concentración de los receptores nucleares uterinos tras la administración de las dosis de 500, 10 y 1 ng E_2 /kg. se han representado conjuntamente en la Fig. 21, con el fin de facilitar su estudio comparativo.

Se observa como las tres dosis han sido efectivas en el = sentido de producir aumentos en la concentración de los receptores nucleares sobre los valores de concentración de los controles, apreciándose una clara relación directa entre el tiempo que los receptores son retenidos en el núcleo y la = magnitud de la dosis ensayada; de modo que a mayor dosis se = produce una mayor permanencia de la concentración de Rn so = bre los niveles control. Concretamente se da una dependencia = lineal entre el logaritmo de la dosis y el tiempo de reten = ción del receptor por los núcleos. Fig. 22(a). En este senti = do, para la dosis de 500 ng E_2 /kg. los núcleos presentan una capacidad de captación de estradiol superior a la de los controles al menos durante 24 horas, frente a las 18 y 8 horas = de duración del ciclo de los Rn para la dosis de 10 y 1 ng = E_2 /kg. respectivamente. (Fig. 21).

La duración del ciclo de los receptores nucleares tras la inyección de la dosis de 500 ng E_2 /kg., es del orden de las encontradas por otros autores con dosis muy superiores.

CLARK y PECK (1976) que estudiaron la evolución de los receptores nucleares tras la administración de diferentes dosis de estradiol en ratas prepúberes, encontraron para dosis

FIG. 21



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 (Δ), 10 (\bullet) y 500 (\circ) ng DE ESTRADIOL POR KG. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/MG DNA \pm D.E.

Rn se produce un brusco descenso de las concentraciones que se suaviza a partir de las seis horas siguientes, para alcanzar lentamente los niveles del control, sobre las 24 horas = como ya se indicó anteriormente.

Otro hecho de destacar que tampoco ha sido observado por ninguno de los autores consultados, es que los valores de == las máximas concentraciones de receptores nucleares detectados para cada una de las dosis ensayadas, no presentan diferencias significativas entre ellas.

CLARK y PECK (1976), que en animales prepúberes compararon los efectos de las dosis de 2 y 50 $\mu\text{g E}_2/\text{kg}$. sobre la evolución de los Rn, encontraron que los máximos de concentración que se alcanzaron simultáneamente a las tres horas en ambas = dosis están en relación directa con la dosis inyectada, mien = tras que su evolución se hace coincidente a partir de la == sexta hora post-inyección.

En general, con las dosis normalmente utilizadas y en ratas prepúberes, los valores de concentración de Rn en los máximos son superiores a los aquí registrados. En animales ovariectomizados no se han hecho trabajos de este tipo para poder establecer comparaciones con nuestros resultados. El animal prepúber es un modelo experimental distinto, que junto = con la gran diferencia entre las dosis empleadas no permite = establecer relaciones definitivas entre los resultados que = aquí se presentan y los descritos en la bibliografía consultada.

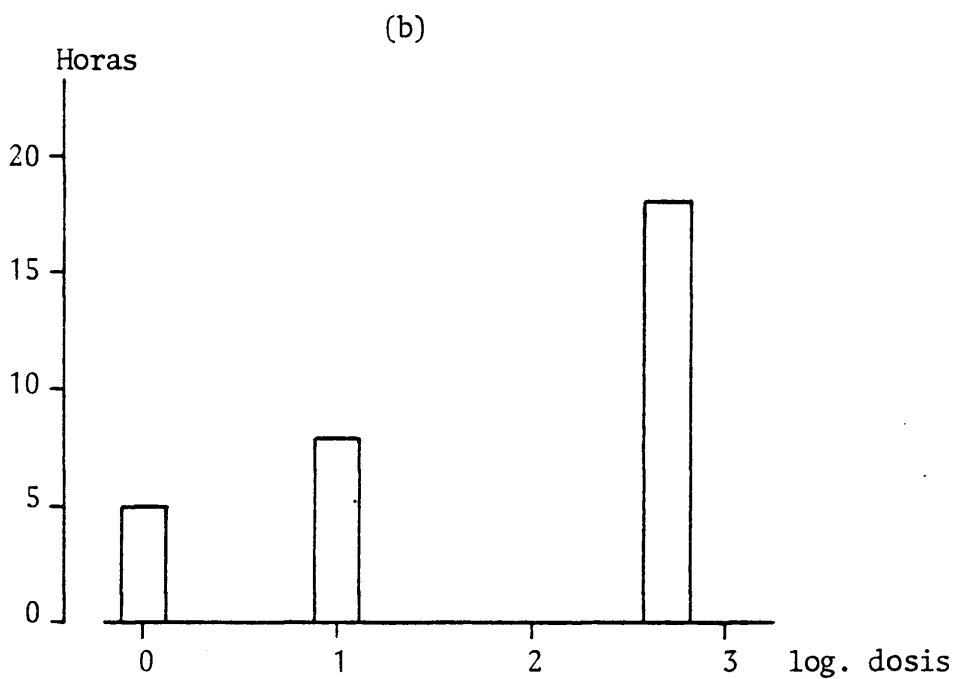
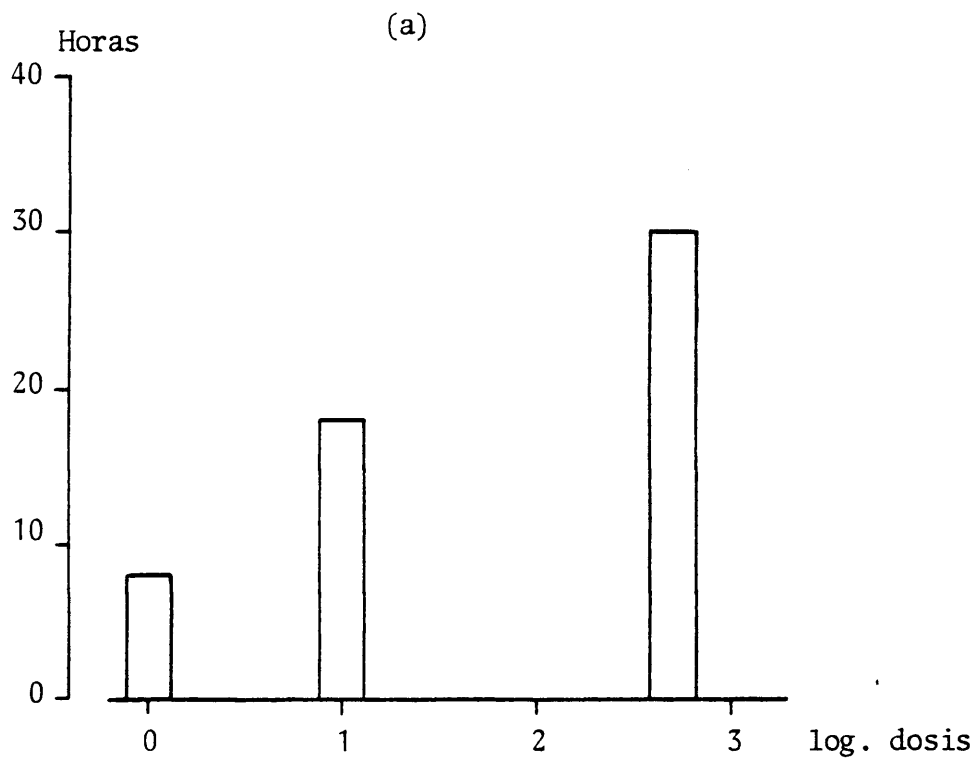
de 2 y 50 ug/kg. retención nuclear de receptores hasta las = 24 horas de la inyección de estradiol en ambas dosis.

HAYES (1981), también en prepúberes y con una dosis de 20 ug E₂/kg. encuentra un aumento de los Rn durante 24 horas. = En el mismo trabajo ensaya dosis relativamente bajas (10, 1 y 0.1 µg E₂/kg) pero solamente estudia su evolución hasta == las 6 horas, tiempo al que aún las concentraciones detecta-- das son superiores al control, y por tanto no puede apreciar se la duración del ciclo.

En ratas ovariectomizadas de tres semanas DAVIES y COL. = (1979), y en un trabajo orientado a investigar los efectos = tamoxifén en comparación con el estradiol sobre la actividad de las RNA polimerasa, obtiene una evolución en la que man-- tienen durante 24 horas una concentración de Rn superior a = la basal. Este tiempo de retención nuclear coincide con el aquí obtenido para la dosis de 500 ng E₂/kg, cuatro veces me-- nor que la administrada por los autores anteriormente cita-- dos.

De la comparación de las tres dinámicas observadas (Fig. 21), también se aprecia como la detección de los máximos de concentración de receptores nucleares, es tanto más tardía = cuanto mayor es la dosis que se ha administrado, registrando se a unos tiempos que guardan relación directa con el loga-- ritmo de la dosis (Fig. 22(b)). En la bibliografía consulta-- da, las máximas concentraciones de Rn se han detectado en == torno a las tres horas post-inyección en trabajos realizados en ratas prepúberes (DAVIES, 1979; MESTER y BAULIEU, 1975; - CLARK y PECK, 1976; HAYES y COL., 1981; MARKAVERICH y CLARK, 1979), y utilizando dosis mucho mayores (entre 1 y 50 µg E₂/ kg). En ellos, tras alcanzarse el máximo de concentración de

FIG. 22



RELACIONES ENTRE LA DURACION DEL CICLO DE LOS RECEPTORES NUCLEARES (a) Y EL TIEMPO AL QUE SE MIDEN SUS MAXIMAS DE CONCENTRACION (b) CON EL LOGARITMO DE LA DOSIS INYECTADA.

CONSIDERACIONES SOBRE LA EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES
CITOSOLICOS Y NUCLEARES PARA CADA DOSIS ENSAYADA .-

En las representaciones gráficas de las Figuras 23, 24, y 25 se ha recogido para cada una de las dosis ensayadas - las evoluciones conjuntas de los receptores citosólicos y nucleares. Las concentraciones de Rc y Rn se han expresado como porcentaje de variación respecto de sus controles.

En la Fig. 23 donde se representa el ciclo del receptor= para la dosis de 500 ng E₂/kg., se observa como la depleción inicial de los Rc va acompañada de un aumento de los Rn, que no llega a ser significativo respecto de su control. En la etapa correspondiente a la repleción citosólica hay un aumento paralelo de ambos tipos de receptores. Durante la fase de sobretiro de los Rc se sigue observando acumulación de receptores en el núcleo, para, después de alcanzar ambos sus máximos respectivos, regresar a los niveles control.

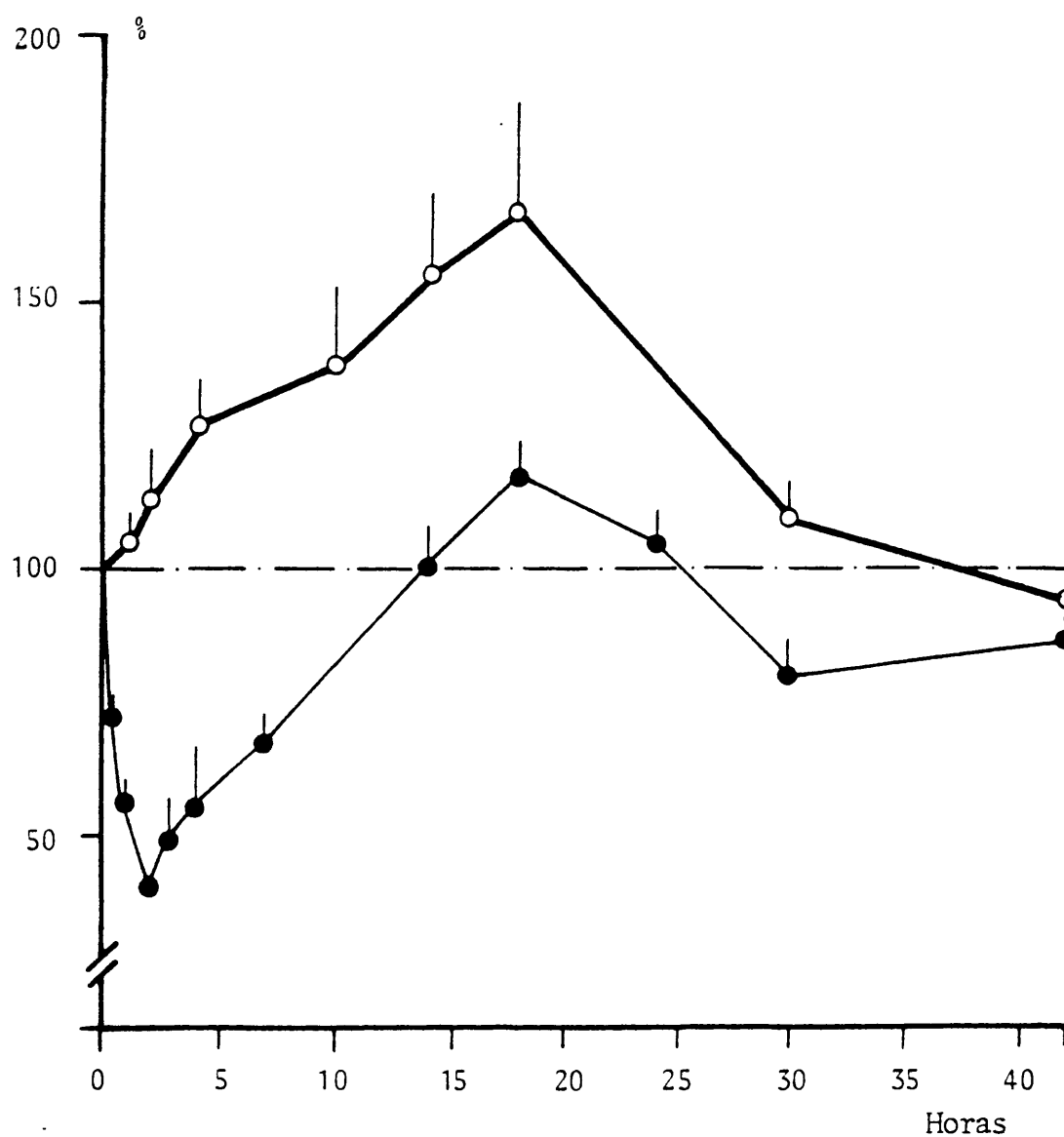
En la dosis de 10 ng E₂/kg., Fig. 24, y durante las primeras horas en que la concentración de Rc se mantiene ligeramente inferior al control se produce un aumento significativo de la concentración de Rn. Aumento que continúa durante la fase de sobretiro de los receptores citosólicos. Después de registrarse los máximos valores de concentración de ambos receptores se produce el regreso a los niveles control, al igual que ocurre en la dosis de 500 ng de E₂/kg.

En la Fig. 25 donde se representa el movimiento de receptores producido por el estímulo de 1 ng E₂/kg., es de destacar el perfecto sincronismo de las evoluciones de los receptores citosólicos y nucleares. Ambas concentraciones de modo simultáneo aumentan, alcanzan sus máximos respectivos y regresan a los valores control.

Al comparar las Fig. 23, 24, y 25 se observa la relación entre la evolución de los receptores citosólicos y nucleares en cada dosis utilizada. En este sentido, la dosis mínima de 1 ng E₂/kg. provoca una evolución sincrónica de ambos receptores. Con la dosis de 10 ng E₂/kg. se produce un desfase de las dinámicas Rc-Rn de modo que el aumento de Rn precede al sobretiro de los Rc. En la dosis de 500 ng E₂/kg. el desfase es aún más acusado, detectándose acúmulo de Rn durante las fases de repleción y sobretiro de Rc.

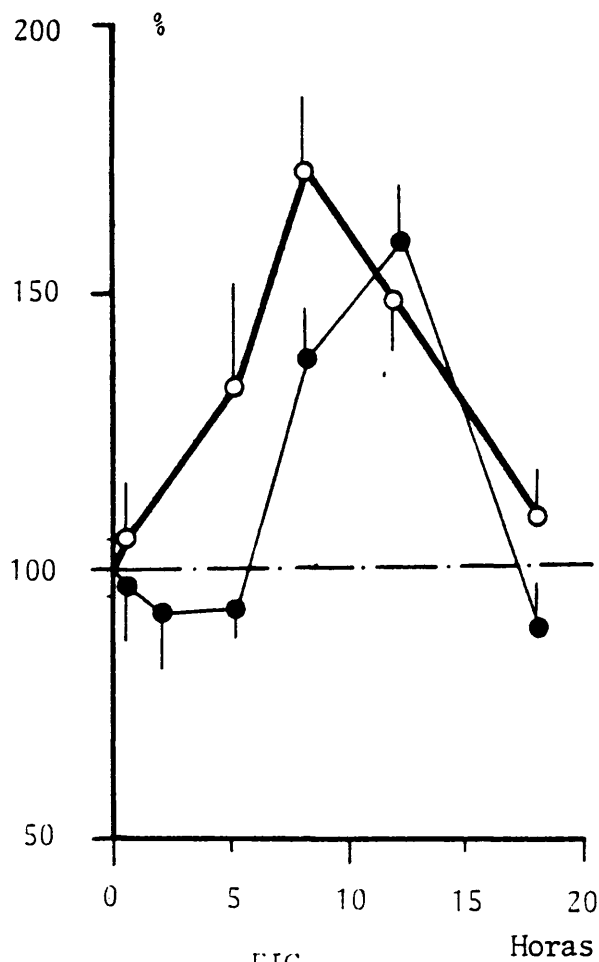
Por último destacar en este apartado un hecho que es común a las tres dosis: el regreso simultáneo de Rc y Rn a los niveles del control después de haber alcanzado sus valores de máxima concentración. Esta observación y la coincidencia en las evoluciones de los receptores citosólicos y nucleares con la dosis de 1 ng E₂/kg. anteriormente comentada, no han sido descritas.

FIG. 23



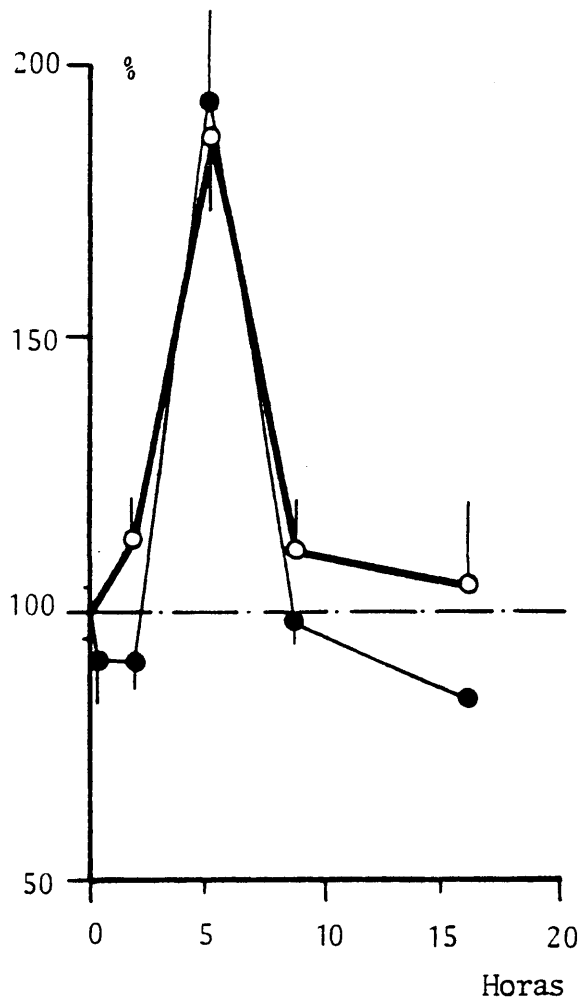
EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (●) Y NUCLEARES (○) EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng DE ESTRADIOL POR KG. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE DE VARIACION = RESPECTO DEL CONTROL (217.2 ± 10.9 fm/mg prot. ó 283 ± 11.3 fm/mg DNA).

FIG. 24



EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (●) Y NUCLEARES (○) EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng/Kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE DE VARIACION RESPECTO DEL CONTROL (217.2 ± 10.9 fm/mg prot. ó 283.0 ± 11.3 fm/mg DNA).

FIG. 25



EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (●) Y NUCLEARES (○) EN UTERO TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE DE VARIACION RESPECTO DEL CONTROL (217.2 ± 10.9 fm/mg prot. ó 283.0 ± 11.3 fm/mg DNA).

3.3.- RECEPTORES EN ADENOHIPOFISIS .-

3.3.1.- EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE ADENOHIPOFISIS -- TRAS LA ADMINISTRACION DE LAS DIFERENTES DOSIS DE ESTRADIOL.-

Evolución tras la administración de 500 ng E₂/Kg .-

Los datos se recogen en las Tablas 26A , 26B y están representados graficamente en la Fig. 26 .

La forma en que evolucionó la concentración de receptores fué muy semejante a la observada para los úteros con esta -- misma dosis. De este modo, a las dos horas de la inyección - de estradiol, la cantidad de receptores descendió bruscamente desde 113,4 fm/mg prot., nivel control, hasta 24,9 fm/mg prot., lo que representa una disminución del 78% con una alta significatividad estadística ($p < 0.0005$).

En las 8 horas siguientes se produjo la recuperación de la concentración de receptores en el citosol. A las 10 horas se alcanzó el nivel de los controles, superandose significativamente a partir de las 12 horas. A las 24 horas se - registró el máximo valor de Rc con 147,5 fm/mg prot. ($p < 0.005$)

A partir de las 24 horas se observó el regreso a los niveles basales, de forma que a las 42 horas el valor de --- 111,8 fm/mg prot. estaba en el rango de los controles.

Evolución tras la administración de 10 ng de E₂/Kg .-

Los datos correspondientes a esta dosis se recogen en la Fig. 27 y en las Tablas 27A y 27B.

En lo que respecta al comportamiento inicial, se presenta una depleción del mismo orden de magnitud que la observada para la dosis de 500 ng/kg. El mínimo es registrado a las 0.5 horas con 22.4 fm/mg prot. ($p < 0.001$) significativo con respecto al control.

La recuperación de la concentración de Rc culmina sobre las cinco horas, iniciándose el sobretiro que ya, a las 8 horas, presenta un valor superior al control, y que alcanza el máximo a las 12 horas con 189.4 fm/mg prot. ($p < 0.0005$).

El ciclo del receptor concluye con el regreso a los niveles de los controles en las seis horas siguientes. A las 18 horas siguientes se obtuvo una concentración de 89.4 fm/mg prot. (N.S.).

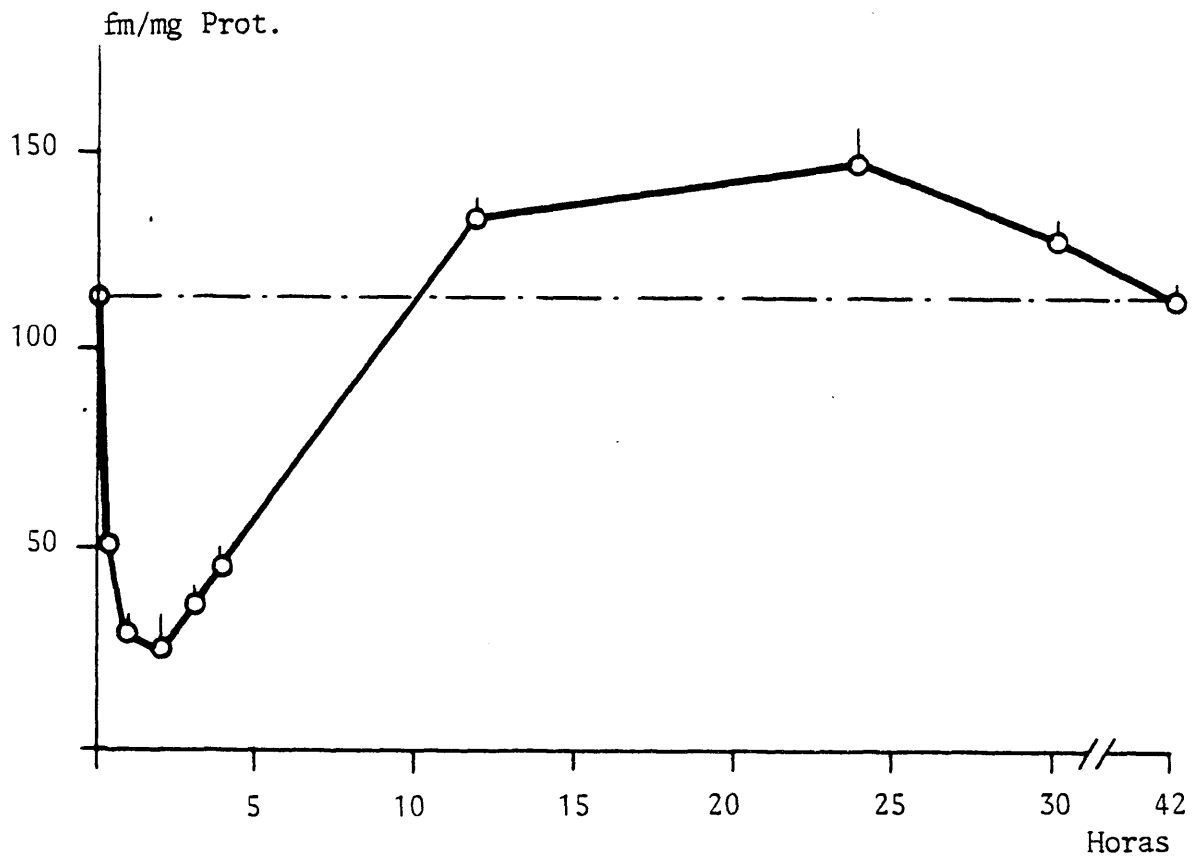
Evolución tras la administración de 1 ng E_2 /kg .-

Los resultados se recogen en las Tablas 27A y 27B y se representa en la Fig. 27 .

Esta dosis mínima, al igual que ocurría en el útero, no fué capaz de provocar una depleción significativa en la concentración de los receptores citosólicos, en las primeras dos horas. Cinco horas después de la inyección que indujo la aparición de concentraciones de receptor significativamente más altas que los controles ($p < 0.05$), alcanzándose en este tiempo el valor de 182,4 fm/mg prot. que representa un 60,8% de aumento. Este valor es del orden de los detectados a las 8 y 12 horas en la dosis de 10 ng/kg, con los cuales no presenta diferencias significativas.

Siguiendo la misma pauta de comportamiento que en las dosis anteriores, la concentración de Rc después de alcanzar el máximo regresó a los valores control finalizando el ciclo a las 8 horas de la administración del estradiol, con un valor de 97,6 fm/mg prot. (no significativo con el control).

FIG. 26



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLAS/MG PROTEINAS ± D.E.

T A B L A 26A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg prot.	% Control
0.5	6	51.7 \pm 2.0	45.6
1	6	28.6 \pm 2.4	25.2
2	9	24.9 \pm 3.2	22.0
3	6	28.1 \pm 5.2	24.7
4	9	46.1 \pm 1.2	40.6
12	12	134.5 \pm 4.7	118.6
24	18	147.5 \pm 9.4	130.1
30	6	127.9 \pm 3.6	112.8
42	12	111.8 \pm 1.4	98.6
CONTROL	30	113.4 \pm 3.9	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg Prot., OBTENIDAS EN CITOSOL DE ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

		0.5	2	4	12	24	30
CONTROL	t	4.2	7.36	5.65	1.97	3.01	0.58
	p <	0.001	0.001	0.001	0.05	0.005	N.S.
0.5	t		4.8	1.62	9.96	5.11	13.06
	p <		0.01	N.S.	0.001	0.005	0.005
2	t			4.72	15.19	8.06	16.2
	p <			0.005	0.001	0.001	0.001
4	t				13.3	6.73	17.5
	p <				0.001	0.001	0.001
12	t					0.96	0.76
	p <					N.S.	N.S.
24	t						1.04
	p <						N.S.

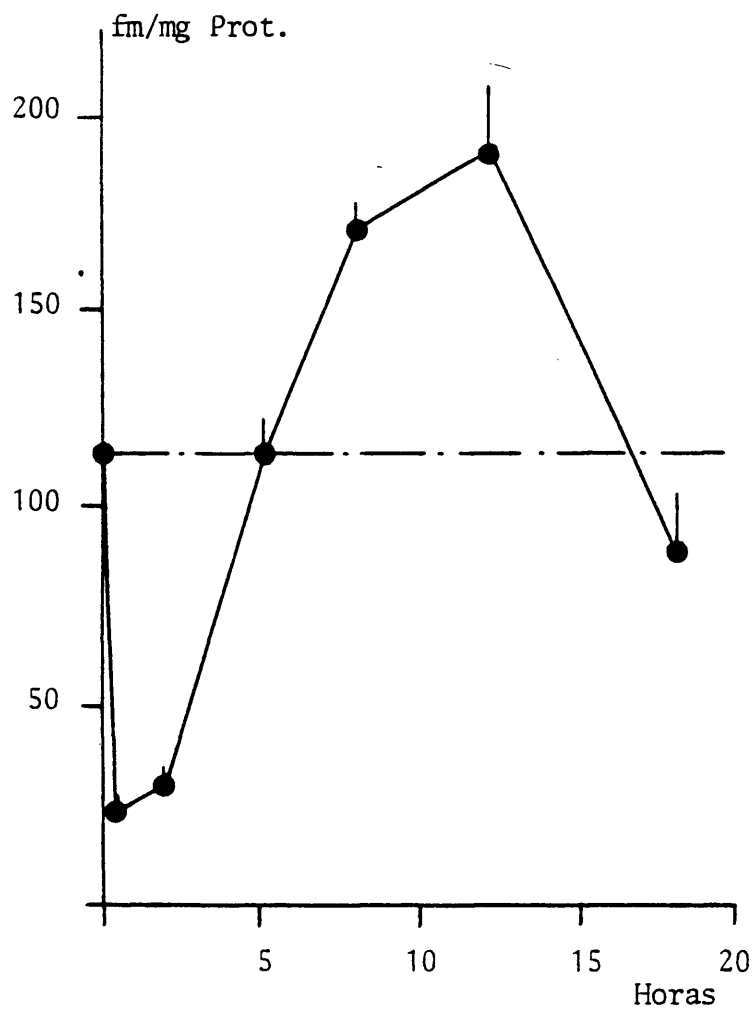
T A B L A 26B

EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE ADENOHI-
POFISIS PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
3	9	1.43 \pm 0.32	26.2
4	9	2.37 \pm 0.2	43.4
12	12	58.6 \pm 0.2	107.3
24	18	7.61 \pm 0.5	139.4
30	6	5.67 \pm 0.29	103.8
42	15	5.29 \pm 0.26	96.9
CONTROL	30	5.46 \pm 0.20	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO, OBTENIDAS EN CITOSOL DE ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/Kg.

		3	4	12	24	30	42
CONTROL	t	8.9	7.3	1.06	3.16	0.41	0.46
	p <	0.001	0.001	N.S.	0.005	N.S.	N.S.
3	t		2.03	10.31	5.04	8.04	8.08
	p <		N.S.	0.001	0.001	0.05	0.001
4	t			1.03	4.33	9.8	6.97
	p <			0.001	0.005	0.05	0.001
12	t				1.68	0.52	1.49
	p <				N.S.	N.S.	N.S.
24	t					1.29	2.42
	p <					N.S.	0.025
30	t						0.78
	p <						N.S.

FIG. 27

EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E_2 /kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN = EN FEMTOMOLES/MG PROTEINAS \pm D.E.

T A B L A 27A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg prot.	% Control
0.5	6	22.4 ± 0.03	19.7
2	6	29.8 ± 0.81	28.6
5	6	111.7 ± 9.4	98.5
8	6	169.7 ± 0.6	149.7
12	15	189.4 ± 17.9	167.1
18	6	89.4 ± 14.1	78.8
CONTROL	30	113.4 ± 5.9	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg Prot., OBTENIDAS EN CITOSOL DE ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		0.5	2	5	8	12	18
CONTROL	t	6.2	5.7	0.11	3.84	4.64	1.48
	p <	0.001	0.001	N.S.	0.005	0.001	N.S.
0.5	t		6.42	6.71	177.2	4.98	3.36
	p <		0.025	0.025	0.001	0.005	0.05
2	t			6.13	98.6	4.76	2.99
	p <			0.025	0.001	0.001	0.05
5	t				4.35	2.27	0.93
	p <				0.025	N.S.	N.S.
8	t					0.59	4.03
	p <					N.S.	0.05
12	t						2.8
	p <						0.025

T A B L A 27B

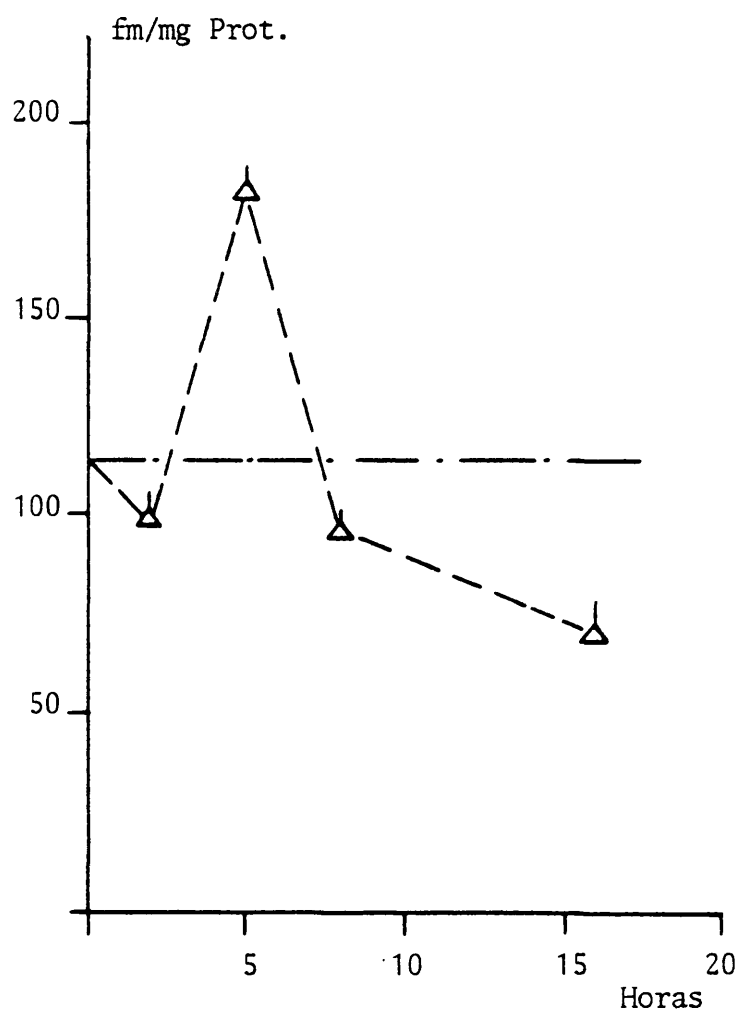
EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE ADENOHI-
POFISIS PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
0.5	6	1.16 ± 0.002	21.2
2	6	1.64 ± 0.063	30.1
5	6	5.33 ± 0.45	97.6
8	6	8.58 ± 0.52	157.1
12	15	9.6 ± 1.3	175.8
18	6	4.02 ± 0.33	73.6
CONTROL	30	5.46 ± 0.20	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO, OBTENIDAS EN CITOSOL DE ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		0.5	2	5	8	12	18
CONTROL	t	8.54	7.57	0.24	5.52	3.88	2.72
	p <	0.001	0.001	N.S.	0.001	0.001	0.025
0.5	t		5.33	6.51	10.0	3.36	6.58
	p <		0.025	0.025	0.01	0.01	0.025
2	t			5.71	9.3	3.17	4.93
	p <			0.025	0.01	0.025	0.025
5	t				3.32	1.68	1.62
	p <				N.S.	N.S.	N.S.
8	t					0.4	5.22
	p <					N.S.	N.S.
12	t						2.22
	p <						0.05

FIG. 28



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E_2 /kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/MG PROTEINAS \pm D.E.

T A B L A 28A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg prot.	% Control
2	6	99.8 ± 8.4	88.1
5	12	182.4 ± 4.9	160.8
8	6	97.6 ± 1.6	86.1
16	6	70.3 ± 6.1	62.1
CONTROL	30	113.4 ± 5.9	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg Prot. OBTENIDAS EN CITOSOL DE ADENOHIPOFISIS PARA LAS DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		2	5	8	16
CONTROL	t	0.89	6.49	1.08	2.88
	p <	N.S.	0.001	N.S.	0.01
2	t		7.96	0.18	2.03
	p <		0.001	N.S.	N.S.
5	t			11.2	12.2
	p <			0.001	0.001
8	t				3.1
	p <				N.S.

T A B L A 28B

EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE ADENOHI-
POFISIS PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	6	5.14 [±] 0.43	94.1
5	9	9.4 [±] 0.26	172.2
8	6	5.02 [±] 0.08	91.9
16	6	3.64 [±] 0.32	66.7
CONTROL	30	5.46 [±] 0.20	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN CITOSOL DE ADENOHIPOFISIS PARA LAS DOSIS DE 1 ng E₂/kg

		2	5	8	16
CONTROL	t	0.59	9.03	0.87	3.45
	p <	N.S.	0.001	N.S.	0.005
2	t		6.95	0.19	1.98
	p <		0.005	N.S.	N.S.
5	t			10.4	10.7
	p <			0.001	0.001
8	t				2.96
	p <				0.05

3.3.2.- EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE LAS DIFERENTES DOSIS DE ESTRADIOL .-

Evolución tras la administración de 500 ng E₂/kg. .-

Esta dosis, Fig. 29 Tabla 29A, provoca en las cuatro primeras horas postinyección un aumento de los receptores nucleares desde 413,8 fm/mg DNA (valor control) hasta una concentración de 776,8 fm/mg DNA, significativa respecto al control ($p < 0,001$).

En las horas siguientes se aprecia como su concentración va descendiendo gradualmente hasta alcanzar los niveles del control (410,4 fm/mg DNA a las 24 horas), concentración que se mantiene estabilizada hasta las 42 horas.

Evolución tras la administración de 10 ng E₂/kg .-

Ante el estímulo de esta dosis Fig. 30 Tabla 30A los receptores nucleares aumentan su concentración de modo similar al presentado por la dosis mayor. A las cinco horas el valor registrado de 782,3 fm/mg DNA es significativo respecto del control ($p < 0.001$) e indiferenciable del valor obtenido a este tiempo para la dosis de 500 ng E₂/kg.

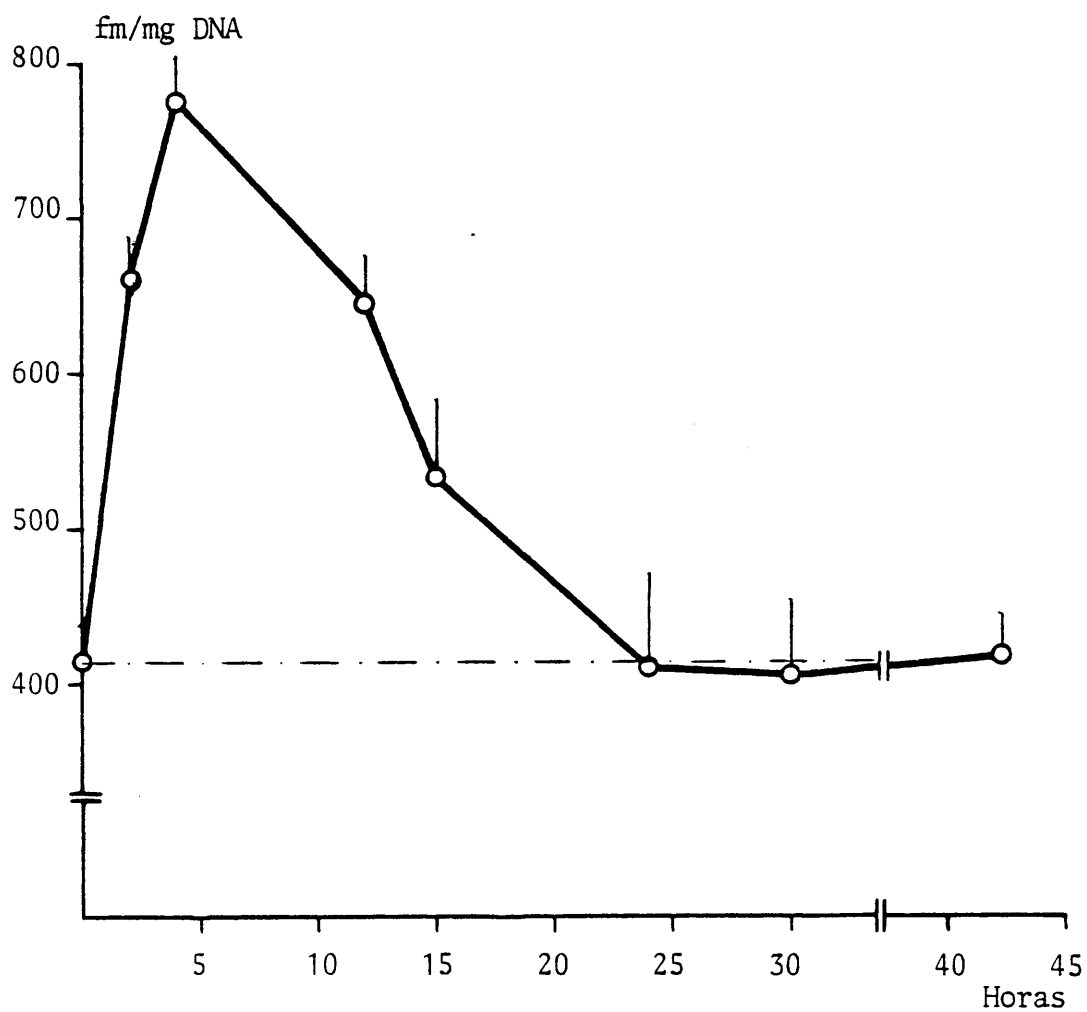
Después de alcanzado el máximo, la concentración nuclear de receptores desciende, de modo que el valor detectado a las 12 horas, 481,6 fm/mg DNA, no presenta diferencia significativa con los controles.

Evolución tras la administración de 1 ng E₂/kg .-

La administración de esta dosis, Fig. 31 Tabla 31A produjo a las cinco horas una concentración de 656,1 fm/mg DNA ---

($p < 0.001$) respecto al control e inferior aunque no significativo respecto a las detectadas a este tiempo para las dosis mayores. Transcurridas 16 horas de la inyección, la concentración de receptores nucleares se registró al nivel de los controles con un valor de 44.3 fm/mg DNA (n.s.).

FIG. 29



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN = FEMTOMOLES/MG DNA ± D.E.

T A B L A 29A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg DNA	% Control
2	12	663.6 ± 28.2	160.1
4	6	776.8 ± 29.3	188.1
12	12	644.6 ± 31.0	156.1
15	6	533.8 ± 49.0	129.1
24	12	410.4 ± 61.1	99.1
30	6	404 ± 47.7	97.1
42	15	418.5 ± 24.5	101.3
CONTROL	27	413.8 ± 24.5	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg DNA, OBTENIDAS EN NUCLEOS DE ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

		2	4	12	15	24	30
CONTROL	t	5.57	6.11	5.03	1.91	0.06	0.16
	p <	0.001	0.001	0.001	0.05	N.S.	N.S.
2	t		2.06	0.39	2.0	3.26	4.05
	p <		N.S.	N.S.	N.S.	0.01	0.01
4	t			2.23	3.01	3.36	4.71
	p <			0.05	N.S.	0.025	0.025
12	t				1.61	2.96	3.55
	p <				N.S.	0.025	0.025
15	t					1.08	1.34
	p <					N.S.	N.S.
24	t						0.056
	p <						N.S.

T A B L A 29B

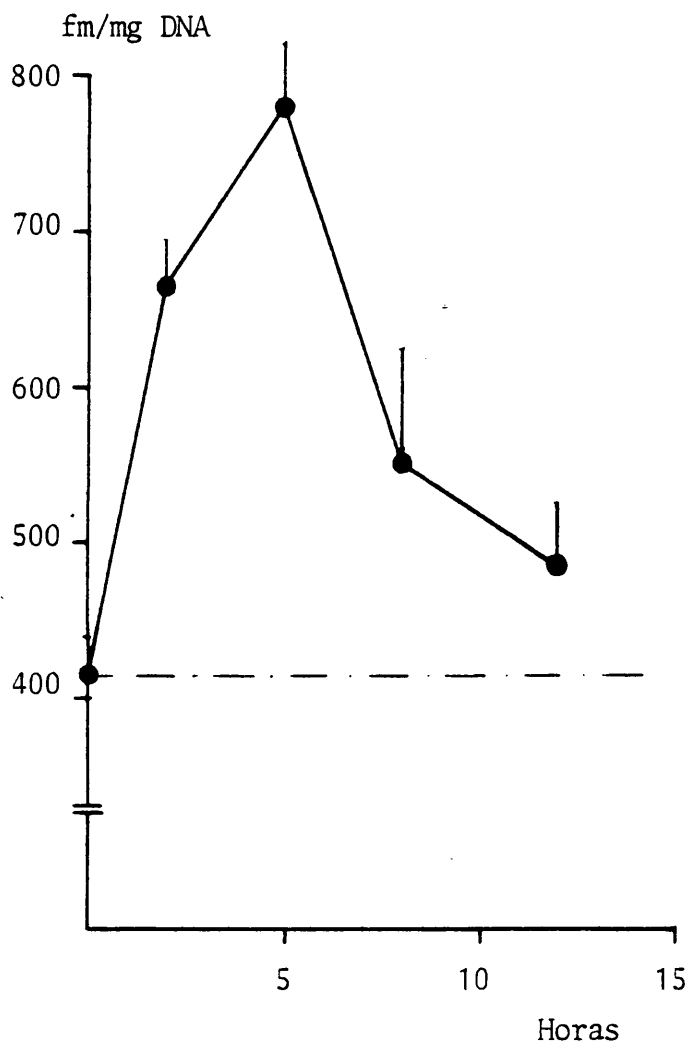
EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	12	3.38 [±] 0.33	207.4
4	6	2.77 [±] 0.19	170.1
12	15	2.00 [±] 0.77	122.2
24	12	2.21 [±] 0.35	135.6
30	6	2.18 [±] 0.40	133.7
42	12	1.86 [±] 0.04	114.1
CONTROL	27	1.63 [±] 0.07	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN NUCLEOS DE ADENOHIPOFISIS PARA LAS DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

		2	4	12	24	30	42
CONTROL	t	6.6	5.94	1.97	2.08	2.08	1.95
	p <	0.001	0.001	0.05	0.05	0.05	0.05
2	t		1.02	3.31	2.1	1.8	3.9
	p <		N.S.	0.01	0.05	N.S.	0.005
4	t			1.95	0.89	0.94	5.07
	p <			N.S.	N.S.	N.S.	0.005
12	t				0.48	0.38	0.55
	p <				N.S.	N.S.	N.S.
24	t					0.04	0.86
	p <					N.S.	N.S.
30	t						0.91
	p <						N.S.

FIG. 30



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/MG DNA \pm D.E.

T A B L A 30A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg-

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg DNA	% Control
2	6	668.9 ± 27.6	161.6
5	6	782.3 ± 41.8	189.1
8	6	552.6 ± 98.3	133.5
12	6	481.6 ± 31.8	116.3
CONTROL	27	413.8 ± 24.5	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg DNA OBTENIDAS EN NUCLEOS DE ADENOHIPOFISIS PARA LAS DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		2	5	8	12
CONTROL	t	4.3	5.99	2.34	1.13
	p <	0.001	0.001	0.025	N.S.
2	t		1.6	2.10	3.14
	p <		N.S.	N.S.	0.05
5	t			3.24	4.05
	p <			0.05	0.05
8	t				1.19
	p <				N.S.

T A B L A 30B

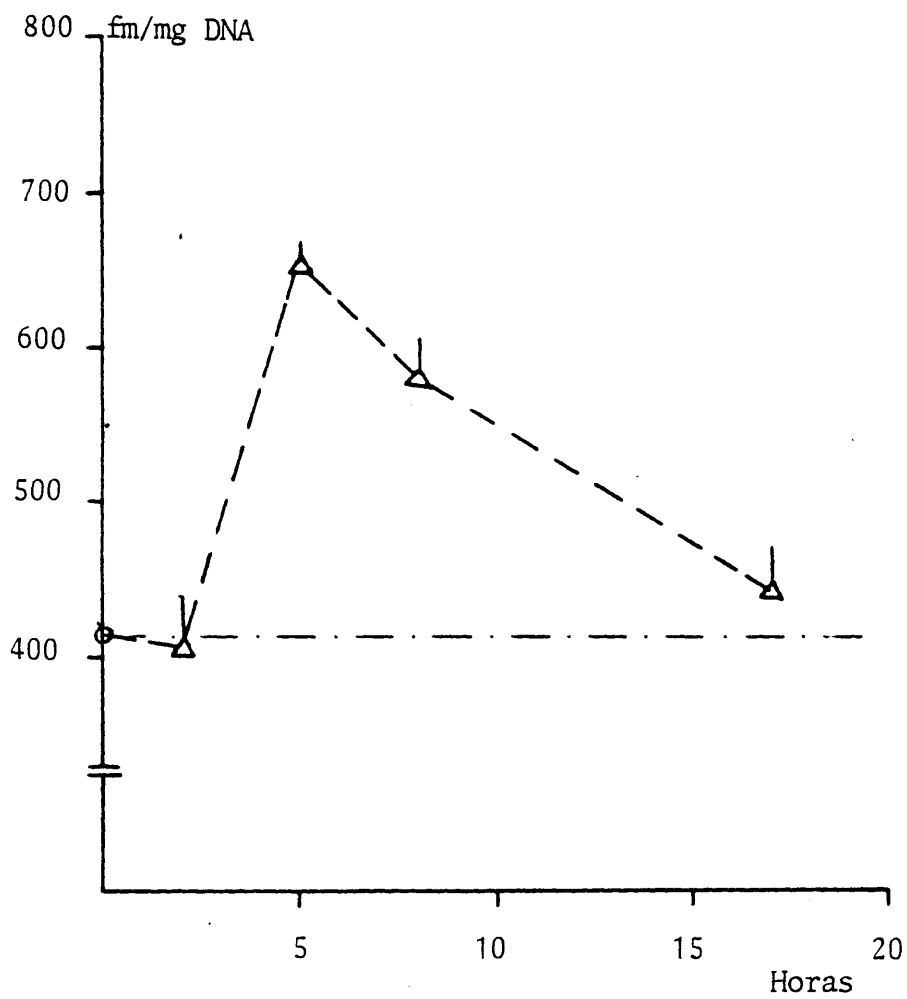
EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	12	1.67 ± 0.3	102.5
5	6	2.81 ± 0.15	172.4
8	6	1.98 ± 0.36	121.5
12	6	1.72 ± 0.08	105.5
CONTROL	27	1.63 ± 0.07	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN NUCLEOS DE ADENOHIPOFISIS PARA LAS DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		2	5	8	16
CONTROL	t	0.16	6.5	1.40	0.53
	p<	N.S.	0.001	N.S.	N.S.
2	t		2.12	0.51	0.09
	p<		N.S.	N.S.	N.S.
5	t			1.5	4.59
	p<			N.S.	0.005
8	t				0.49
	p<				N.S.

FIG. 31



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/MG DNA ⁺ D.E.

T A B L A 31A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg DNA	% Control
2	3	407.3 ± 30.2	98.4
5	6	656.1 ± 9.4	158.6
8	6	581.3 ± 22.0	140.5
16	3	445.5 ± 24.3	107.1
CONTROL	27	413.8 ± 24.3	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg DNA OBTENIDAS EN NUCLEO DE ADENOHIPOFISIS PARA -- LAS DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		2	5	8	16
CONTROL	t	0.11	4.2	2.91	0.54
	p <	N.S.	0.005	0.01	N.S.
2	t		7.53	5.78	0.98
	p <		0.01	0.025	N.S.
5	t			5.47	7.6
	p <			0.025	0.01
8	t				5.54
	p <				0.025

T A B L A 31B

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	6	2.29 ± 0.07	140.1
5	6	3.54 ± 0.79	217.1
16	6	1.77 ± 0.28	108.1
CONTROL	27	1.63 ± 0.07	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN NUCLEOS DE ADENOHIPOFISIS PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		2	5	16
CONTROL	t	3.93	4.30	0.64
	p <	0.005	0.005	N.S.
2	t		1.11	1.29
	p <		N.S.	N.S.
5	t			1.49
	p <			N.S.

3.3.3.- EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES DE ESTRADIOL EN ADENO- HIPOFISIS .-

CONSIDERACION SOBRE LA EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLI- COS EN LAS TRES DOSIS ENSAYADAS .-

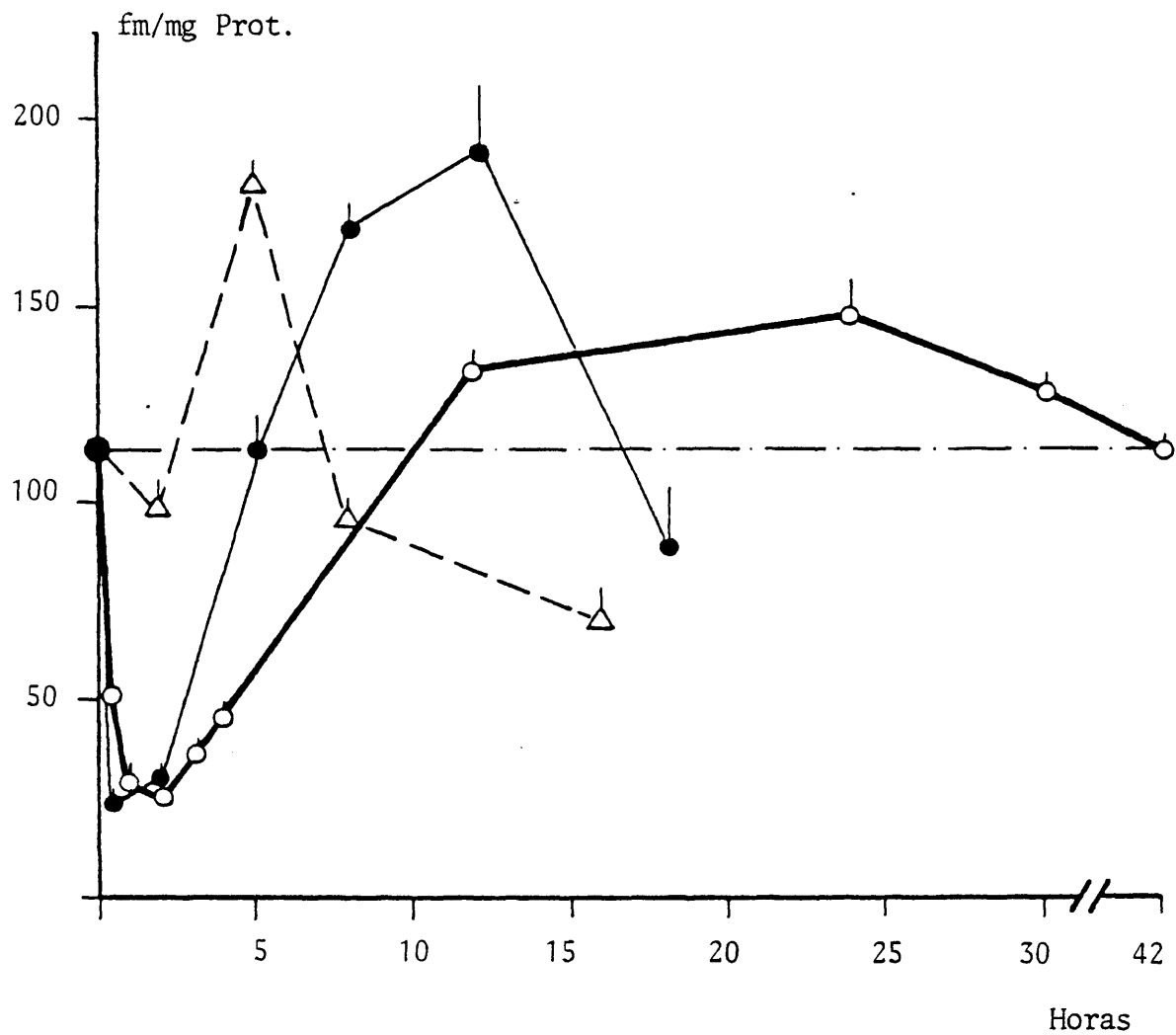
La Fig. 32, donde se han representado las dinámicas de la población de receptores para las tres dosis ensayadas, nos permite hacer un análisis comparativo de los respectivos ciclos del receptor en cada situación experimental.

Las dos dosis mayores (500 y 10 ng/kg) producen una depleción inicial del mismo orden de magnitud (78% y 80% del control) frente a la ausencia de ésta en la dosis de un ng/kg.

CIDLOWSKI y MULDOON (1974) en ratas ovariectomizadas al ensayar varias dosis de 40, 20 y 4 μg E_2/kg , encuentran para todas ellas una hora después de administrar la hormona, unos valores para la concentración de Rc del orden del 94%, 70% y 50% respecto del control, datos que parecen indicar que la intensidad de la depleción citosólica guarda una relación directa con la dosis ensayada.

Esta relación se manifiesta también en los resultados de MORRIS (1976) que, para una dosis de 4 y 20 μg E_2/kg encuentra unas depleciones del 70% y 80% respectivamente. Intensidades similares de depleción han sido descritas también por SPONA y COL. (1980a) (1980b) en citosol de adenohipófisis de ratas avariectomizadas y adrenalectomizadas para una dosis de 40 μg E_2/kg , y por MENON Y GUNAGA (1976), 9 horas después de implantar capsula silastic que producen una concentración plasmática de estradiol de 90 pg/ml.

FIG. 32



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 (Δ), 10 (\bullet) y 500 (\circ) ng E₂/Kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLAS/MG PROT \pm D.E.

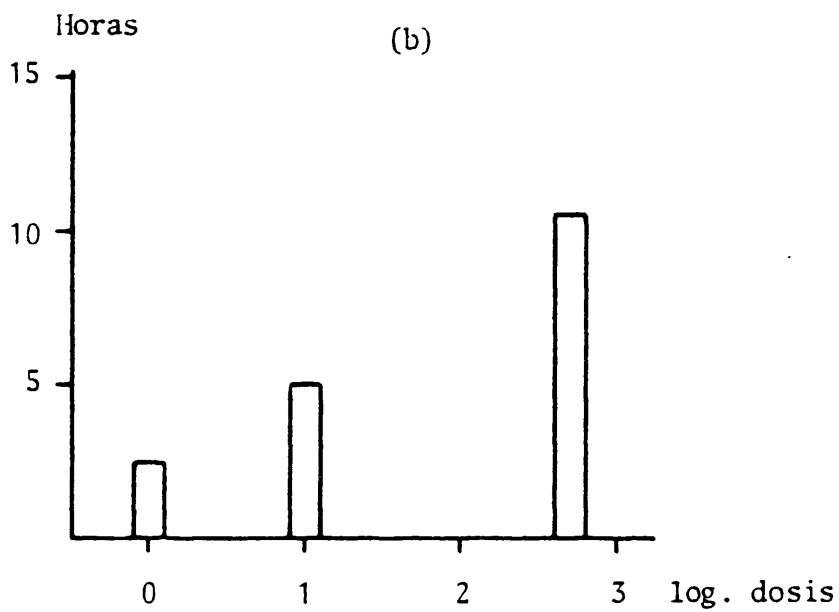
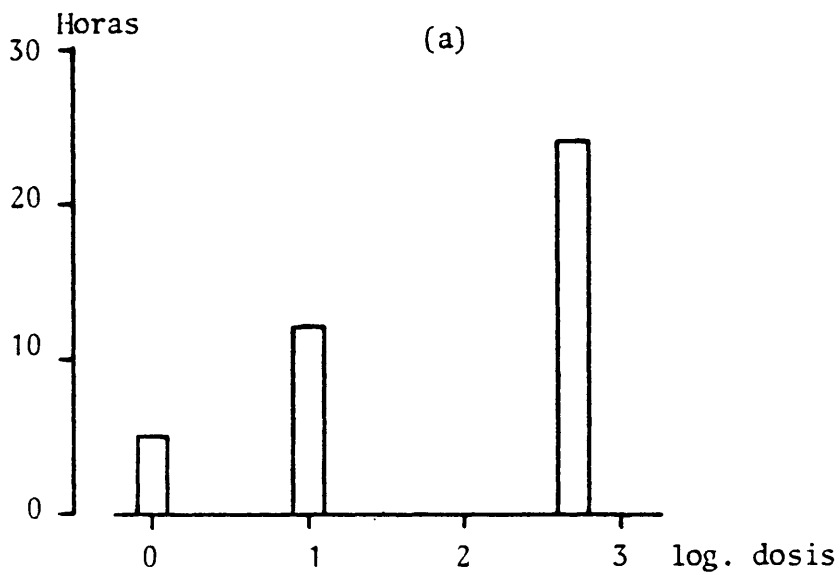
Las dosis utilizadas en este trabajo de 0,5, 0,01 y 0,001 $\mu\text{g}/\text{kg}$, son muy inferiores a las empleadas normalmente, lo que no nos permite hacer comparaciones directas, pero sí -- hay que resaltar que las dosis mayores aquí estudiadas han= producido depleciones del orden de 75% y 70%, y por lo tanto han sido tan efectivas en lo que a la depleción se refiere como las empleadas por los autores anterioremente citados.

En lo que respecta a la recuperación citosólica, al --- igual que se vió en útero, y como se presentará posteriormente en hipotálamo, se observa que es más lenta cuanto mayor es la dosis administrada. En la Fig. 33(b) se pone de manifiesto que el tiempo al que se alcanza el nivel de los -- controles guarda relación lineal con el logaritmo de la dosis.

Esta observación está de acuerdo esencialmente con lo -- descrito en la escasa bibliografía existente sobre este aspecto, en la que, para dosis mayores que las aquí utilizadas, los tiempos de recuperación son mucho más largos que - los encontrados en este trabajo. En esta línea, en el trabajo de CIDLOWSKI y MULDOON (1977) a las 15 horas post-inyección aún no se ha culminado la recuperación citosólica, y en el de SPONA y COL. (1980a) la concentración de los controles no se alcanza hasta las 20-30 horas de la administración de la hormona.

Tras la fase de recuperación, la denominada de sobretiro. en la que se produce la acumulación de receptores en el citosol por encima de los valores control, se observa en las= tres dosis. Es durante esta fase cuando se registran los máximos valores de R_c , y es de destacar que los tiempos a los que se miden estos máximos, están en relación directa con - el logaritmo de la dosis correspondiente. Fig. 33(a).

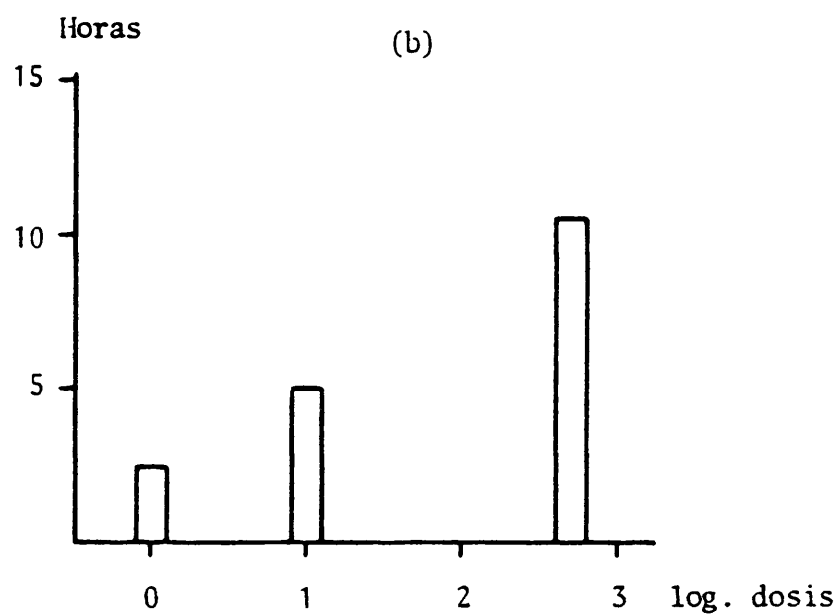
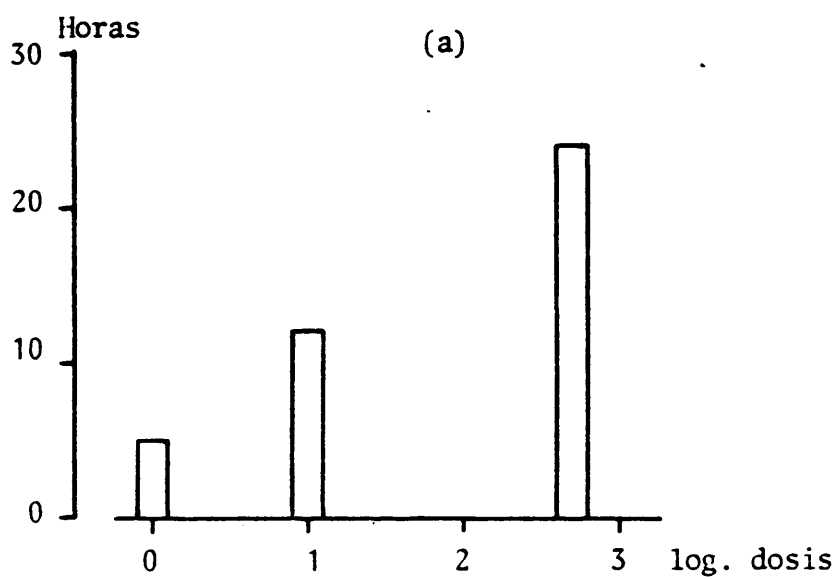
FIG. 33



RELACIONES ENTRE LOS TIEMPOS A LOS QUE SE ALCANZA LA MAXIMA CONCENTRACION DE R_c (a) Y LOS TIEMPOS A QUE COMIENZA EL SOBRETIRO (b) CON EL LOGARITMO DE LA DOSIS ADMINISTRADA.

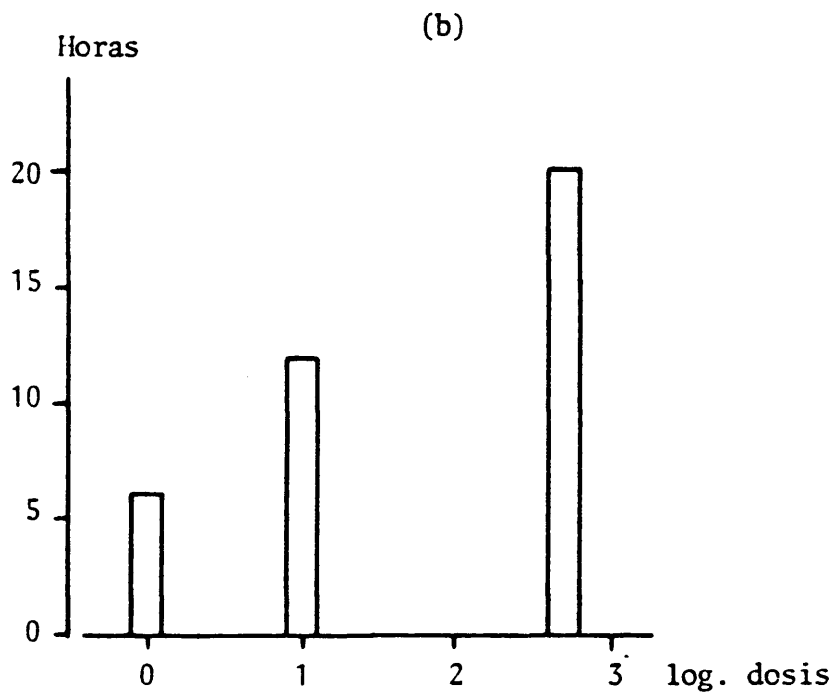
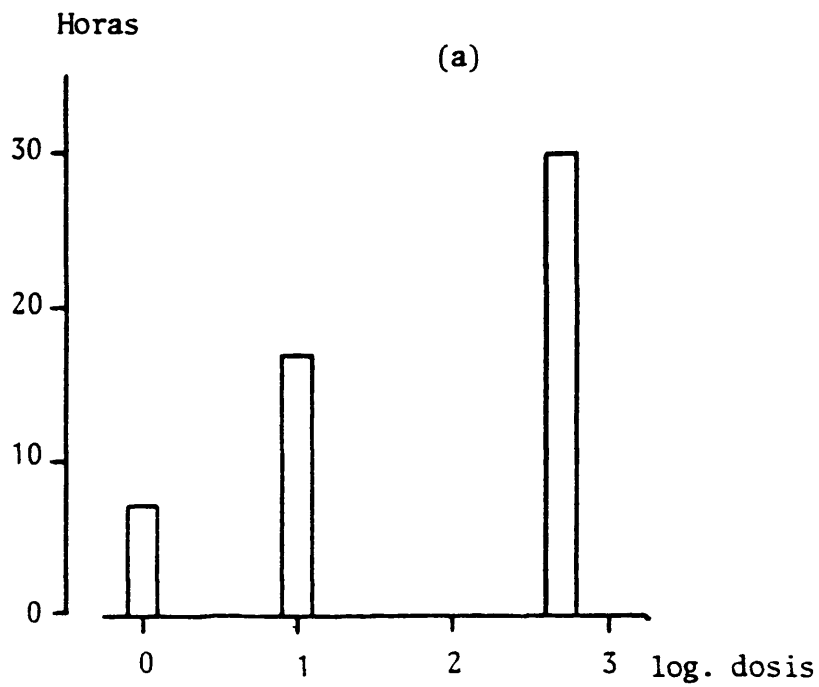
O-
I-

FIG. 33



RELACIONES ENTRE LOS TIEMPOS A LOS QUE SE ALCANZA LA MAXIMA CONCENTRACION DE R_c (a) Y LOS TIEMPOS A QUE COMIENZA EL SOBRETIRO (b) CON EL LOGARITMO DE LA DOSIS ADMINISTRADA.

FIG. 34



RELACIONES ENTRE LA DURACION DEL CICLO DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (a) Y DEL SOBRETIRO (b) CON EL LOGARITMO DE LA DOSIS ADMINISTRADA.

Esta fase de sobretiro no la registra SPONA (1981), que hace medidas puntuales a las 30, 50 y 75 horas post-inyección. Es probable que el sobretiro se manifestara entre los intervalos de tiempo indicados, ya que son más largos que los considerados en este trabajo.

El ciclo, para las tres dosis estudiadas, finaliza con el retorno de la población de receptores a los valores del control, destacando de nuevo la relación directa que se observa entre la duración del ciclo y el logaritmo de la dosis. Fig.34(a).

CONSIDERACION SOBRE LA EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN LAS TRES DOSIS ENSAYADAS .-

Las dinámicas de los Rn adenohipofisarios ante los diferentes estímulos de estradiol, presentan una evolución muy similar en lo que respecta al aumento inicial de la concentración de receptores que culmina en un máximo registrado a las 5 horas de la inyección para las tres dosis utilizadas, Figs.29, 30 y 31 .

El incremento inicial en el contenido de receptores nucleares observados en este trabajo, es similar a los obtenidos por otros autores (ANDERSON, 1973 y SPONA, 1980a, 1980b) en el sentido de registrarse un aumento significativo en las primeras horas tras la inyección, seguido por un regreso más lento a los niveles control.

En cuanto a los máximos niveles de Rn, hay que señalar que si bien los valores presentados por los autores anteriormente citados son superiores a los aquí obtenidos, hay que tener presente que las dosis por ellos utilizadas son -

del orden de 20 a 1000 veces superiores a las ensayadas en este trabajo.

En lo que respecta a la duración del ciclo de los Rn, se observa que es más largo para la dosis mayor, con una duración de 24 horas que en las dosis de 10 y 1 ng E₂/kg. que fué de 16 y 12 horas respectivamente.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por otros autores, encontramos que con dosis mayores como la de 40 µg/kg utilizada por SPONA, (1980 a) (1980b) en ratas ovariectomizadas y adrenalectomizadas, el regreso a los niveles control ocurre sobre las 20 horas después de la inyección, tiempo del orden de la aquí encontrado para la dosis de 500 ng E₂/kg.

CONSIDERACIONES SOBRE LA EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS Y NUCLEARES PARA CADA DOSIS ENSAYADA .-

Con la finalidad de analizar las variaciones de las concentraciones de receptores citosólicos y nucleares conjuntamente, se eligió esta forma de expresión porcentual de los resultados, que se han representado en la Fig. 35, 36, y 37.

De su estudio comparativo, se pone de manifiesto una evolución en la relación Rc-Rn entre las tres dosis ensayadas. Comparando las Figuras 35 y 37 correspondientes a las dosis de 500 y 1 ng/kg como situaciones extremas, destaca en primer lugar que en las primeras horas tras la inyección de 500 ng E₂/kg, la depleción de los Rc va acompañada por un aumento significativo de los Rn. La posterior recuperación de la capacidad de captación citosólica tiene lugar cuando los niveles de Rn comienzan a descender. Este tipo de relación "especular" entre la concentración de Rc y Rn que se observa

para la dosis de 500 ng/kg, coincide parcialmente con los resultados encontrados por SPONA (1980) en lo que a Rc se refiere expresados en % del control, si bien los niveles de recaptación nuclear a las primeras horas post-inyección son superiores, efecto que se justifica probablemente por la magnitud de la dosis empleada (40 µg/kg.).

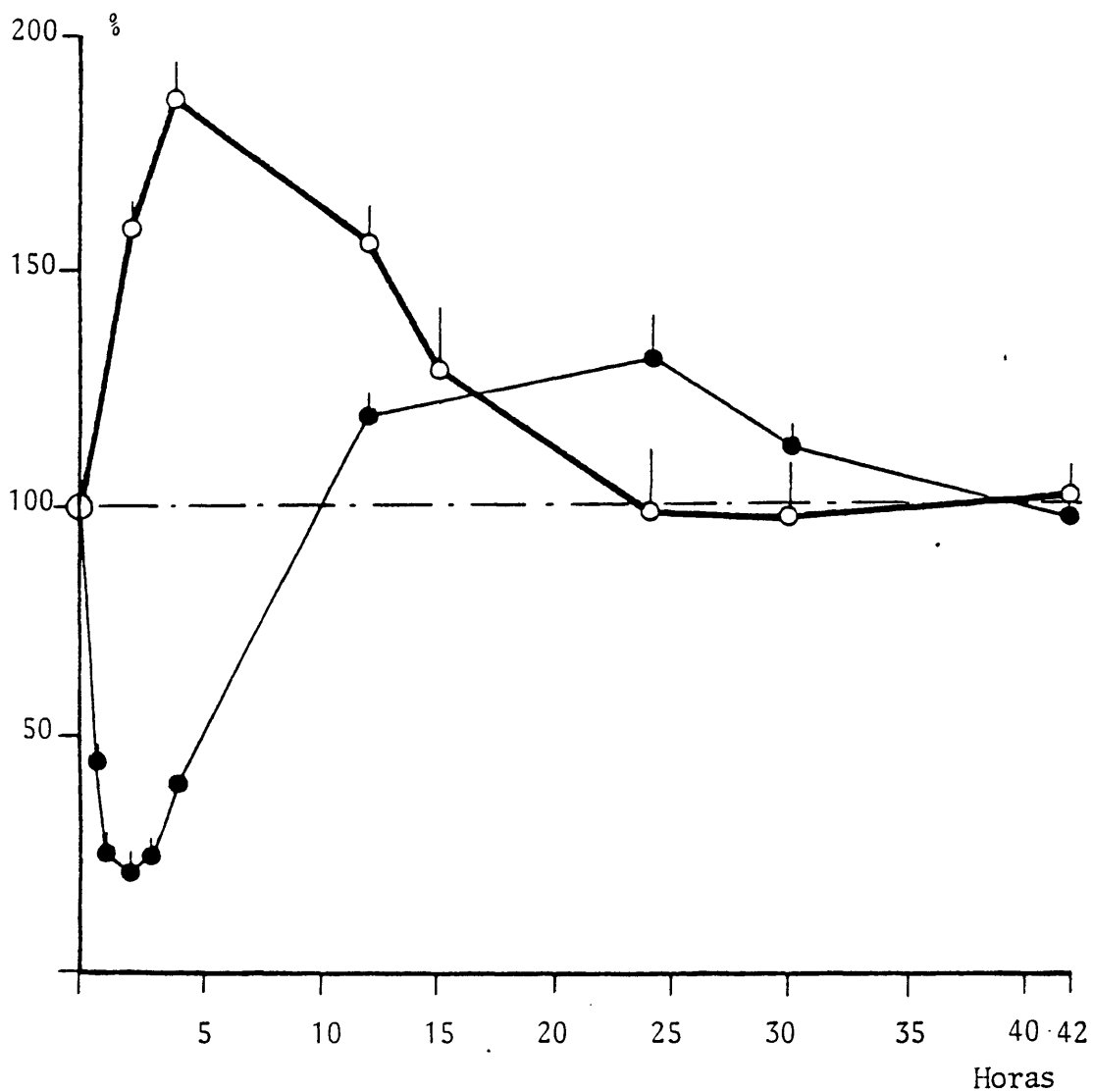
Frente a esta situación, la dinámica que origina la administración de la dosis de 1 ng/kg, se caracteriza por la ausencia de depleción de los Rc y por el aumento significativo de los Rn en las primeras dos horas post-inyección. En una segunda fase se produce el aumento de Rc simultáneo con una continuación del aumento de Rn. Finalmente, tras alcanzar con conjuntamente sus máximos valores, Rc y Rn regresan simultáneamente a los niveles del control.

De la relación Rc-Rn que se encuentra para la dosis de 1 ng/kg. no se ha encontrado ningún precedente bibliográfico - que detecte estos aumentos y disminuciones simultáneos de receptores citosólicos y nucleares.

Ante estas dos situaciones límites claramente diferenciadas, la que se obtiene por el efecto de la dosis de 10 ng/kg encaja como una dinámica de transición entre ambas. En las primeras dos o tres horas se aprecia el mismo comportamiento Rc-Rn que en la dosis de 500 ng/kg., es decir, una fuerte depleción citosólica acompañada de un aumento significativo de la capacidad de captación nuclear. En las dos horas siguientes se presenta un aumento paralelo de los receptores citosólicos y nucleares como lo observado en la dosis de 1 ng/kg. Por último, a partir de la quinta hora cuando los Rc han culminado su repleción y los Rn alcanzado su máximo, la relación Rc-Rn que presenta esta dosis intermedia se asemeja a -

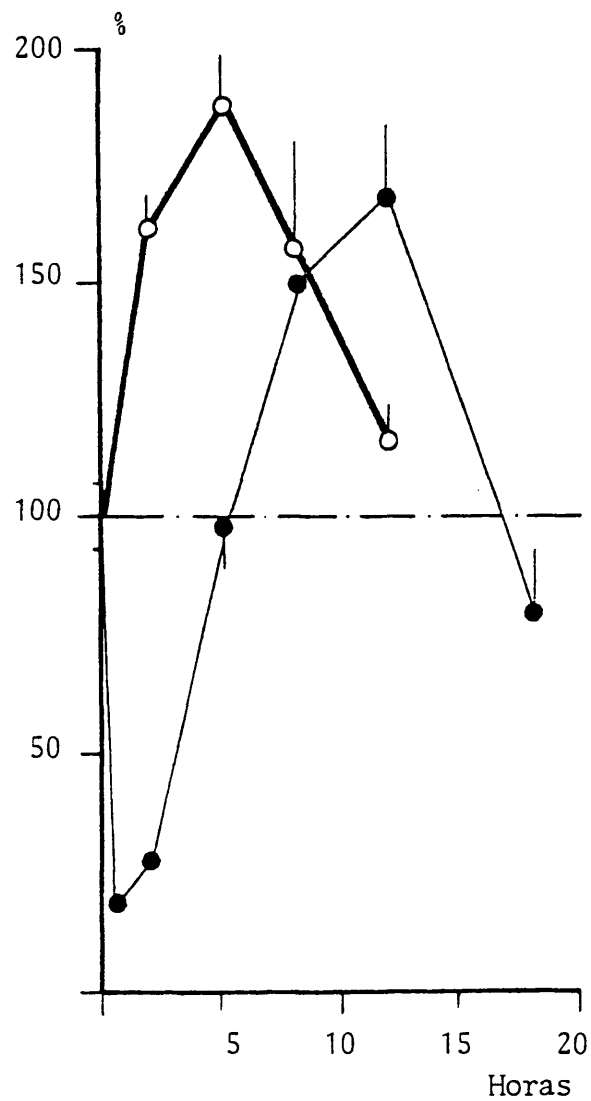
la de 500 ng/kg. en cuanto que aumentan los Rc cuando los Rn disminuyen, y a la de 1 ng/kg. por presentar la finalización del ciclo con un descenso simultáneo y paralelo de los receptores citosólicos y nucleares.

FIG. 35



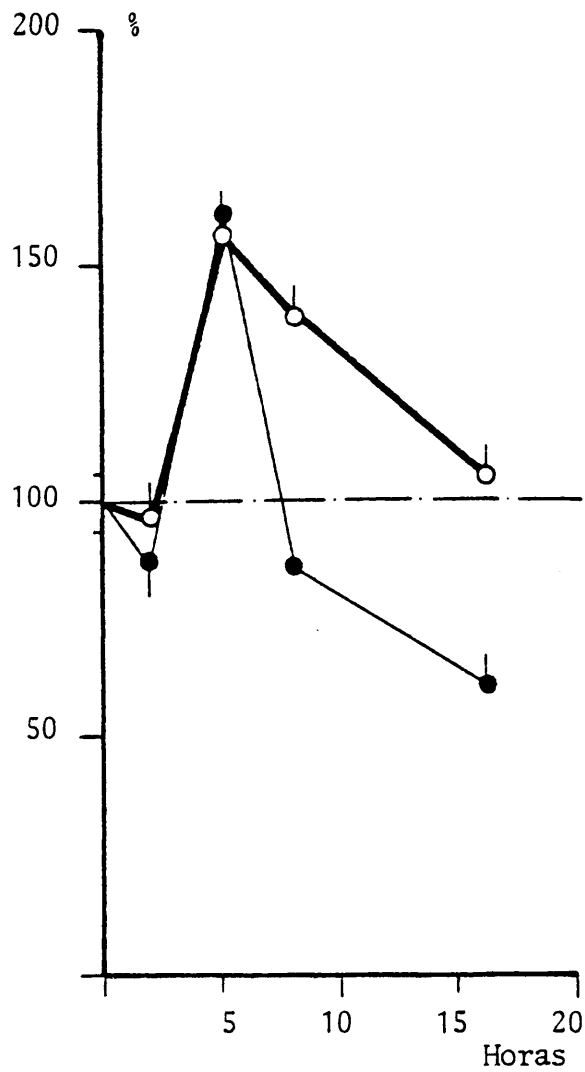
EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (●) Y NUCLEARES (○) EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE DE VARIACION RESPECTO DEL VALOR CONTROL (113.4 ± 5.9 fm/mg Prot. o 413.8 ± 24.3 fm/mg DNA).

FIG. 36



EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (●) Y NUCLEARES EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE DE VARIACION RESPECTO DEL VALOR CONTROL (113.4 ± 5.9 fm/mg Prot. o 413.8 ± 24.3 fm/mg DNA)

FIG. 37



EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (●) Y NUCLEARES (◦) EN ADENOHIPOFISIS TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE DE VARIACION RESPECTO DEL VALOR CONTROL (113.4 ± 5.9 fm/mg Prot. o 413.8 ± 24.3 fm/mg DNA).

3.4.- RECEPTORES EN HIPOTALAMO .-

3.4.1.- EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS DE HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE LAS DIFERENTES DOSIS DE ESTRADIOL .-

Evolución tras la administración de 500 ng E₂/kg .-

En las primeras horas que siguen a la administración de estradiol, y del mismo modo que en útero y adenohipófisis, se observa una rápida depleción de los receptores citosólicos == que alcanzan el valor de 2.45 fm/mg Prot. (el 70% de disminución) a las dos horas de la inyección de la hormona frente a los 8.4 fm/mg Prot. del control ($p < 0.005$). Fig. 38.

A partir de la tercera hora empieza a hacerse patente la recuperación de los Rc que culmina a las doce horas con 8.03 fm/mg Prot., para mantenerse a este nivel de los controles -- hasta por lo menos las treinta horas.

Evolución tras la dosis de 10 ng E₂/kg .-

La concentración de Rc disminuye por la administración de esta dosis, registrándose el mínimo a las dos horas con 4.28 fm/mg Prot. valor que representa un 50% de disminución respecto del control ($p < 0.025$). Fig. 39.

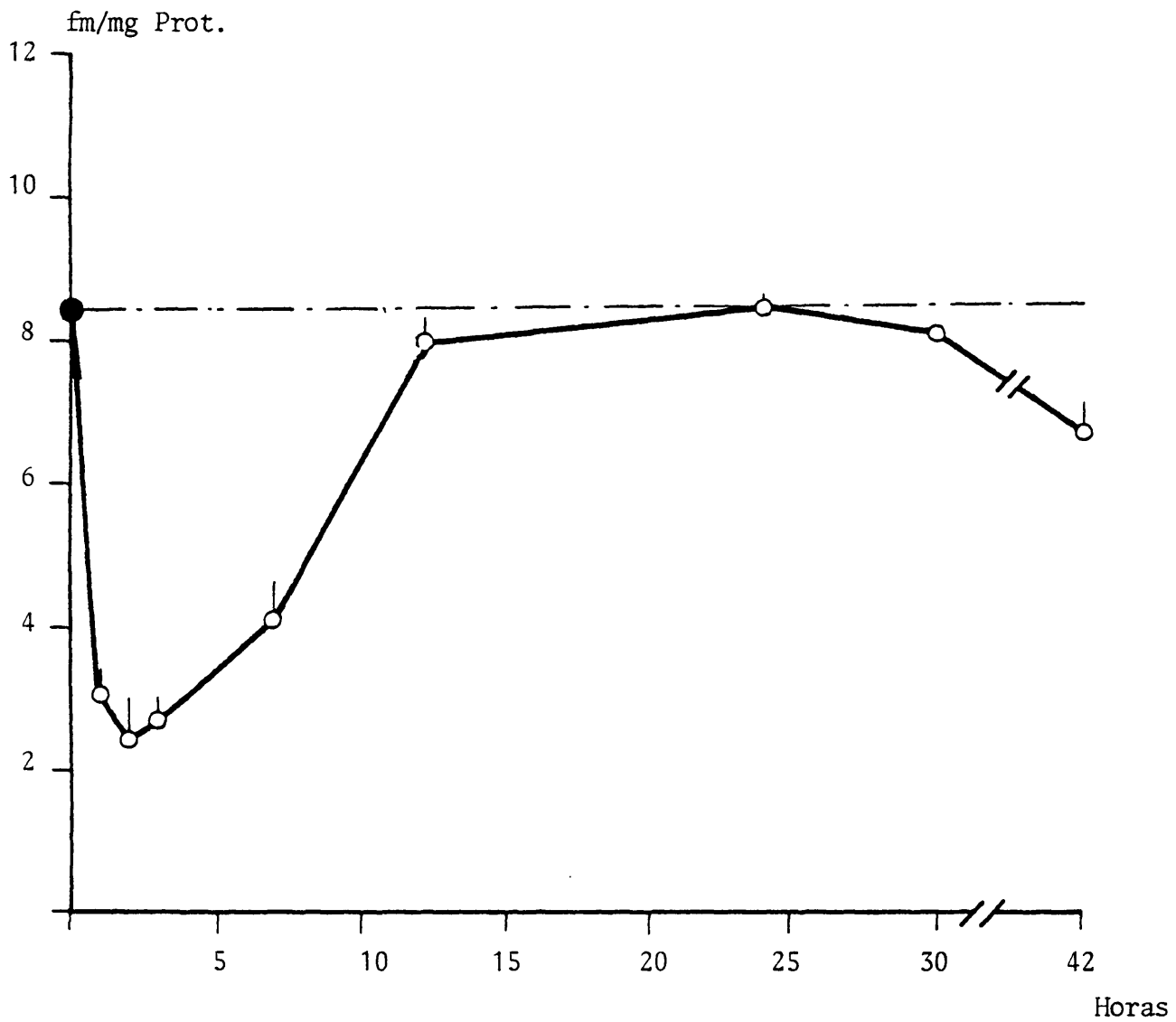
La recuperación citosólica que se produce a partir de este tiempo, es más rápida que en la dosis anterior, de forma = que a las cinco horas postinyección se detectó la máxima concentración de receptores con 10,53 fm/mg Prot. (n.s. respecto del control). A las ocho horas la concentración disminuye a = 9,67 fm/mg Prot. y a las doce horas llega a ser inferior al =

control (7,86 fm/mg Prot.) aunque no es significativo.

Evolución tras la administración de la dosis de 1 ng E₂/kg .-

Esta dosis no produjo variaciones significativas en la concentración de receptores citosólicos hipotalámicos, Fig. 40, si bien los valores obtenidos de 10.07, 10.55 y 9.38 fm/mg == Prot. a las dos, cinco y ocho horas respectivamente tienden a mostrar una dinámica en la que de modo semejante a las encontradas en útero y adenohipófisis para esta dosis, se superan= los niveles del control tras la inyección sin haberse detectado previamente depleción citosólica.

FIG. 38



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E_2 /kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/mg PROTEINAS \pm D.E.

T A B L A 38A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg prot.	% Control
1	4	3.25 ± 0.29	38.3
2	8	2.49 ± 0.48	29.6
3	4	2.64 ± 0.23	31.5
7	4	4.06 ± 0.45	48.3
12	8	8.03 ± 0.47	95.6
24	12	8.44 ± 1.04	100.5
30	4	8.13 ± 0.87	96.8
CONTROL	32	8.40 ± 0.59	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg Prot., OBTENIDAS EN CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

		1	2	7	12	24	30
CONTROL	t	3.87	4.38	3.22	0.27	0.03	0.19
	p <	0.005	0.005	0.01	N.S.	N.S.	N.S.
1	t		0.96	1.07	6.15	3.1	3.76
	p <		N.S.	N.S.	0.025	0.05	0.05
2	t			1.68	5.84	3.46	4.01
	p <			N.S.	0.025	0.025	0.025
7	t				4.32	2.56	2.93
	p <				0.025	0.05	0.05
12	t					0.24	0.07
	p <					N.S.	N.S.
24	t						0.16
	p <						N.S.

T A B L A 38B

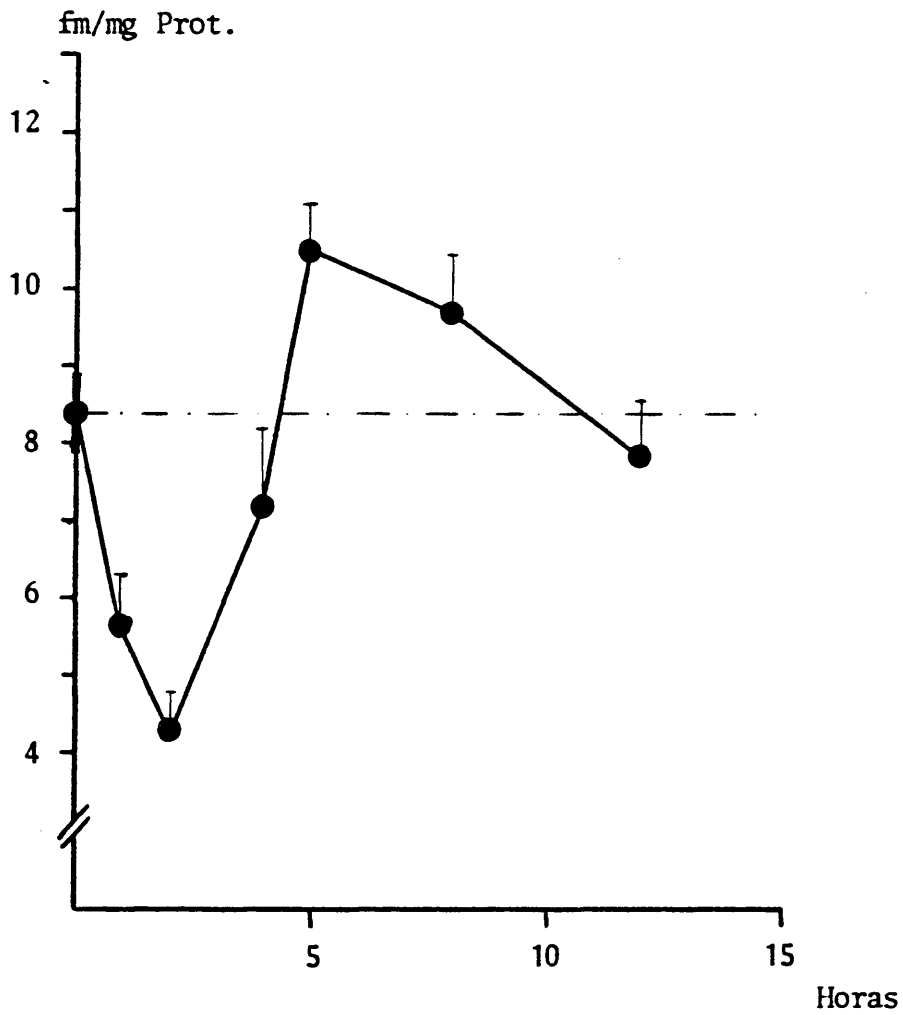
EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	8	0.055 ± 0.015	32.9
7	4	0.086 ± 0.007	51.5
12	8	0.148 ± 0.005	88.6
24	8	0.200 ± 0.11	119.8
30	4	0.151 ± 0.02	90.4
42	4	0.165 ± 0.005	98.8
CONTROL	28	0.167 ± 0.015	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO, OBTENIDAS EN CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

		2	7	12	24	30	42
CONTROL	t	3.37	2.5	0.59	0.46	0.48	0.06
	p <	0.01	0.025	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
2	t		1.39	4.38	0.56	3.39	5.19
	p <		N.S.	0.025	N.S.	0.05	0.025
7	t			5.12	0.75	2.92	6.56
	p <			0.025	N.S.	0.05	0.025
12	t				0.35	0.14	1.7
	p <				N.S.	N.S.	N.S.
24	t					0.32	0.23
	p <					N.S.	N.S.
30	t						0.66
	p <						N.S.

FIG. 39



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/mg PROTEINAS \pm D.E.

T A B L A 39A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂-kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg prot.	% Control
1	4	5.66 ± 0.64	67.4
2	4	4.28 ± 0.5	50.9
4	8	7.21 ± 1.38	85.8
5	4	10.53 ± 0.63	125.4
8	4	9.67 ± 0.72	115.1
12	8	7.86 ± 0.71	93.6
CONTROL	32	8.40 ± 0.59	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg Prot., OBTENIDAS EN CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		1	2	4	5	8	12
CONTROL	t	2	3.05	0.77	1.56	0.92	0.39
	p <	0.05	0.01	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
1	t		1.20	0.72	3.84	2.94	1.63
	p <		N.S.	N.S.	0.05	0.05	N.S.
2	t			1.41	5.48	4.33	2.92
	p <			N.S.	0.025	0.025	0.05
4	t				1.55	1.11	0.29
	p <				N.S.	N.S.	N.S.
5	t					0.63	1.99
	p <					N.S.	N.S.
8	t						1.26
	p <						N.S.

T A B L A 39B

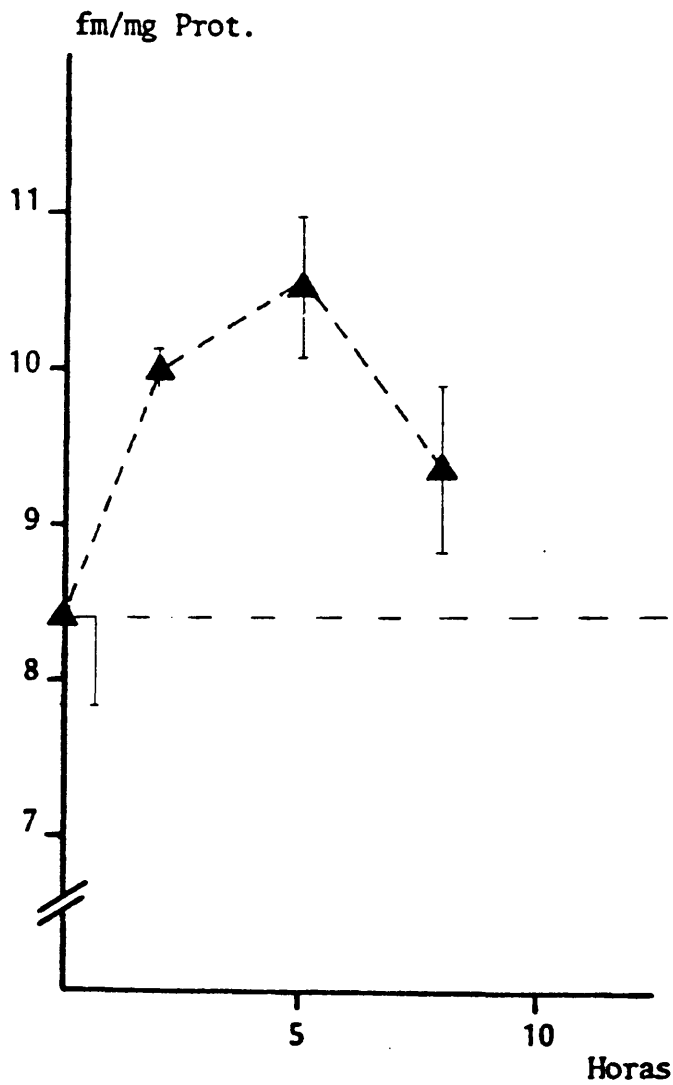
EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	4	0.099 ± 0.05	59.2
4	8	0.166 ± 0.031	99.4
5	4	0.246 ± 0.061	147.3
8	4	0.174 ± 0.06	104.2
12	8	0.178 ± 0.13	106.6
CONTROL	28	0.167 ± 0.015	100

COMPARACIONES ENTRE LAS COMPARACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LAS DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		2	4	5	8	12
CONTROL	t	1.54	0.027	1.62	0.144	0.13
	p <	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
2	t		0.81	1.32	0.68	0.402
	p <		N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
4	t			0.83	0.08	0.06
	p <			N.S.	N.S.	N.S.
5	t				0.59	0.34
	p <				N.S.	N.S.
8	t					0.019
	p <					N.S.

FIG. 40



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN = FEMTOMOLES/mg PROTEINAS ± D.E.

T A B L A 40A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS EN
CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg prot.	% Control
2	12	10.07 ± 0.02	119.9
5	8	10.55 ± 0.46	125.6
8	8	9.38 ± 0.56	111.7
CONTROL	32	8.40 ± 0.59	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm /mg Prot. OBTENIDAS EN CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA -- LAS DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		2	5	8
CONTROL	t	1.57	1.60	0.72
	p<	N.S.	N.S.	N.S.
2	t		0.98	1.17
	p<		N.S.	N.S.
5	t			1.14
	p<			N.S.

T A B L A 40B

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENO EN
CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	12	0.239 [±] 0.023	143.1
5	8	0.250 [±] 0.007	149.7
8	8	0.243 [±] 0.023	145.5
CONTROL	28	0.167 [±] 0.015	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN CITOSOL DE HIPOTALAMO PARA -- LAS DOSIS DE 1 ng E₂/kg.

		2	5	8
CONTROL	t	2.35	2.57	2.18
	p _{<}	0.025	0.025	0.05
2	t		0.30	0.09
	p _{<}		N.S.	N.S.
5	t			0.21
	p _{<}			N.S.

3.4.2.- EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES HIPOTALAMICOS TRAS LA ADMINISTRACION DE LAS DIFERENTES DOSIS DE ESTRADIOL .-

Como ya se indicó en Material y Métodos (3.1.3.), en el ensayo de los receptores nucleares hubo de hacerse pool de al menos cuatro hipotálamos para conseguir una medida aceptable de la -- concentración de receptores. Esto lleva aparejada una alta captación inespecífica difícil de eliminar mediante los lavados, y que con frecuencia enmascaran la captación específica invalidando parte de los ensayos. Por esta razón, y dado que cada experimento con seis u ocho animales sólo nos permite hacer una ó dos determinaciones de receptores para esta fracción, y por tanto = disponer de un número bajo de datos, es por lo que presentamos= este apartado con ciertas reservas. No obstante hemos creído == oportuno incluir los resultados obtenidos con las dosis mayores por estar en concordancia con los presentados por otros autores. ANDERSON (1973), ROY y McEWEN (1979), LIEBERBURG y col. (1981), WHITE y LIM (1978) y KELNER y col. (1980).

Evolución tras la administración de la dosis de 500 ng E₂/kg .-

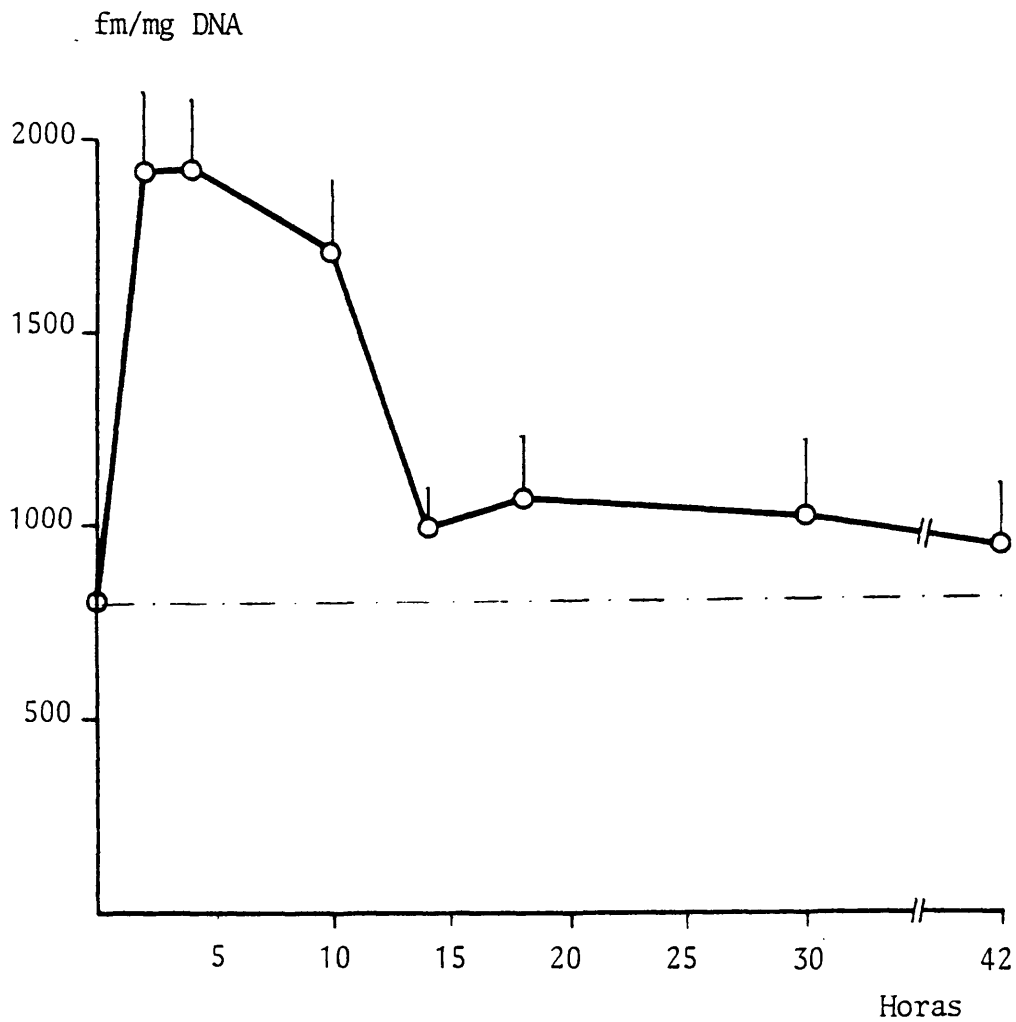
En la Fig. 41 se representan los valores obtenidos que a su vez se recogen en la Tabla 41A . Se puede apreciar como la -- concentración de Rn aumenta significativamente a las dos horas= con un valor de 1910 fm/mg DNA ($p < 0.01$ respecto del control),= concentración que se repite a las cuatro horas en las que se midió una concentración de 1909.7 fm/mg DNA. Después de este tiempo, la concentración de Rn decrece de modo que a las catorce horas y hasta las cuarenta y dos horas se contabilizaron unos valores de 998.6 y 967.6 fm/mg DNA (n.s.respecto del control).

Evolución tras la administración de la dosis de 10 ng E₂/kg .-

Los resultados expuestos en la Tabla 42A y representados en=

la Fig. 42 muestran un aumento en la concentración de Rn tras la inyección que alcanza su valor máximo a las ocho horas con 1651 fm/mg DNA ($p < 0.01$ respecto del control), y un regreso a los niveles basales a las doce horas con 815 fm/mg DNA (n.s. - respecto del control).

FIG. 41



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/MG DNA \pm D.E.

T A B L A 41A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fmol/mg DNA	% Control
2	8	1910 ± 210.1	23.8
4	8	1909.7 ± 181.4	23.8
10	8	1705 ± 187.6	212.5
14	8	998.6 ± 95	124.5
18	8	1073 ± 161	133.7
30	8	1019 ± 122.3	127.1
42	8	967.6 ± 102.6	120.6
CONTROL	12	802.2 ± 28.6	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg DNA, OBTENIDAS EN NUCLEOS DE HIPOTALAMO PARA LA = DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

		2	4	10	14	18	42
CONTROL	t	4.9	5.63	4.45	1.09	1.51	1.41
	p <	0.01	0.01	0.025	N.S.	N.S.	N.S.
2	t		0.0007	0.5	2.41	2.23	2.85
	p <		N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
4	t			0.55	2.63	2.44	3.19
	p <			N.S.	N.S.	N.S.	0.05
10	t				2.00	1.81	2.44
	p <				N.S.	N.S.	N.S.
14	t					0.22	0.11
	p <					N.S.	N.S.
18	t						0.39
	p <						N.S.

T A B L A 41B

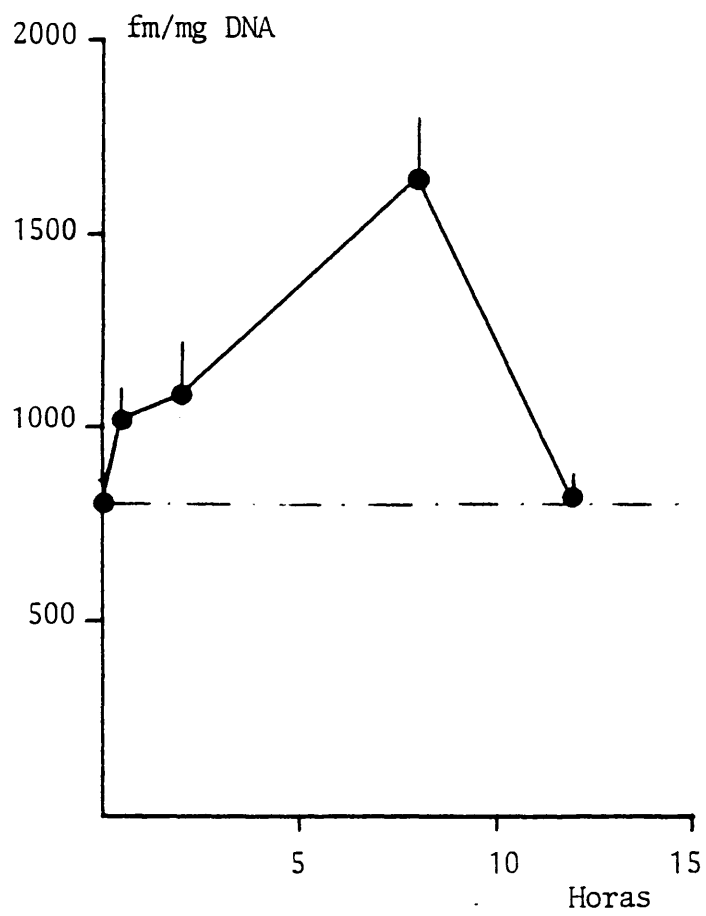
EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
2	8	0.77 ± 0.09	187.8
4	8	0.89 ± 0.08	217.1
10	8	0.77 ± 0.09	187.8
18	8	0.61 ± 0.06	148.8
30	8	0.44 ± 0.05	107.3
CONTROL	12	0.41 ± 0.02	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADOS EN fm/mg TEJIDO OBTENIDAS EN NUCLEOS DE HIPOTALAMO PARA LAS DOSIS DE 500 ng E₂/kg.

		2	4	10	18	30
CONTROL	t	3.6	5.32	1.77	2.96	0.49
	p <	0.025	0.01	N.S.	0.05	N.S.
2	t		0.70	0.0	1.06	2.27
	p <		N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
4	t			0.41	2.02	3.38
	p <			N.S.	N.S.	0.05
10	t				0.57	1.18
	p <				N.S.	N.S.
18	t					1.60
	p <					N.S.

FIG. 42



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLAS/MG DNA [±] D.E.

T A B L A 42A

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO	RECEPTORES		VARIACION
Horas	N	fmol/mg DNA	% Control
0.5	8	1035 ± 82.8	129
2	8	1090 ± 131	136
8	8	1651 ± 149	206
12	12	815.4 ± 34.9	105
CONTROL	12	802.2 ± 28.6	100

COMPARACIONES ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE RECEPTORES EXPRESADAS EN fm/mg DNA OBTENIDAS EN NUCLEOS DE HIPOTALAMO PARA LAS DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

		0.5	2	8	12
CONTROL	t	2.37	1.98	5.21	0.74
	p<	0.05	N.S.	0.01	N.S.
0.5	t		0.25	2.56	1.49
	p<			N.S.	N.S.
2	t			2.00	1.28
	p<			N.S.	N.S.
8	t				3.73
	p<				0.05

T A B L A 42B

EVOLUCION TEMPORAL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES DE
HIPOTALAMO PARA LA DOSIS DE 10 ng E₂/kg.

TIEMPO		RECEPTORES	VARIACION
Horas	N	fm/mg Tejido	% Control
0.5	6	0.6 ± 0.072	146.3
8	8	0.68 ± 0.064	165.8
12	8	0.33 ± 0.046	80.5
CONTROL	12	0.41 ± 0.02	100

3.4.3.- EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES DE ESTRADIOL EN HIPOTALAMO. -

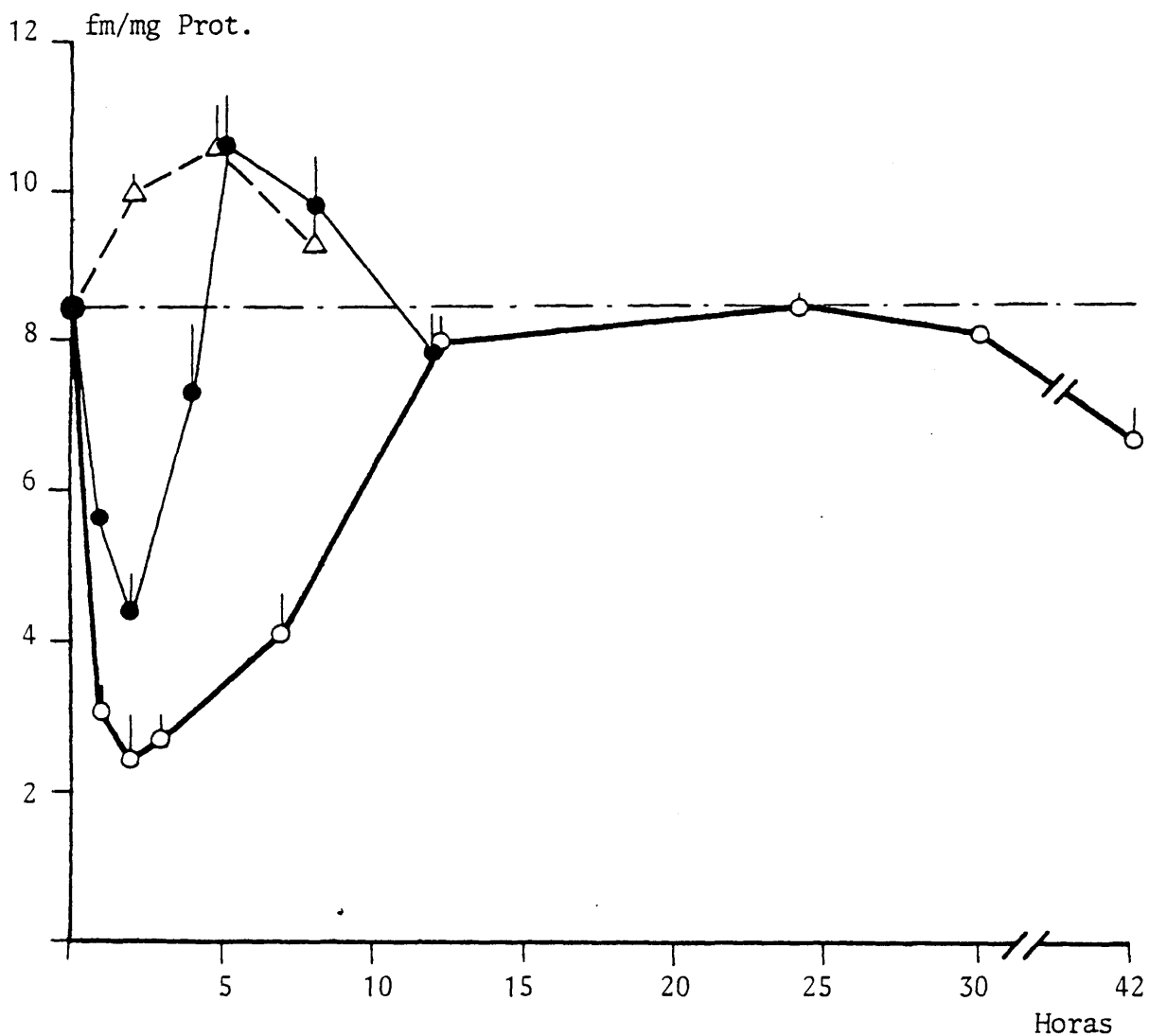
CONSIDERACIONES SOBRE LA EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN LAS TRES DOSIS ENSAYADAS .-

Al comparar las evoluciones de los receptores citosólicos = de hipotálamo ante los estímulos de las diferentes dosis de estradiol, Fig. 43, destacan las depleciones que originan las dosis mayores, 500 y 10 ng E₂/kg., frente a su ausencia en la dosis de 1 ng E₂/kg., hecho este que también se observó en tejido uterino y adenohipofisario

A las dos horas postinyección, la disminución en la concentración de Rc fué del 70% para la dosis de 500 ng/kg. y del == 50% para la de 10 ng/kg. La depleción que produjo la dosis mayor es del orden de la encontrada por CIDLOWSKI y MULDOON(1974) en ratas ovariectomizadas para dosis de 4 y 20 µg/kg., y mayor que las obtenidas por LIEBERBRUG (1980) en ratas ovariectomizadas y adrenalectomizadas con una dosis de 2.7 µg/kg. MORRIS == (1976) obtuvo un 50% de depleción para una dosis de 4 µg/kg., = del orden de la aquí obtenida para la dosis de 10 ng/kg.

La posterior recuperación de la concentración de Rc que se=presenta después de las dos horas, hemos observado que es más=lenta para la dosis de 500 ng/kg. que para la de 10 ng/kg, in=virtiéndose doce horas en recuperar la concentración del con=trol en la dosis de 500 ng /kg., frente a las cinco horas que =emplea la de 10 ng/kg. Esta relación inversa entre dosis y ==tiempo de recuperación citosólica ha sido observada también ==por CIDLOWKI (1974), aunque al tiempo máximo por ellos estudiado (15 horas), aún la concentración de receptores es inferior=a la de los controles. MORRIS (1976) y LIEBERBURG (1980) para=

FIG. 43



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 (Δ), 10 (\bullet) y 500 (\circ) ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLES/MG PROTEINAS \pm D.E.

las dosis anteriormente citadas coinciden en que la recuperación citosólica culmina a las 24 horas postinyección, máximo tiempo por ellos estudiado.

Ninguna de las tres dosis ensayadas en este trabajo produjo aumentos significativos de la concentración de receptores sobre los niveles control. Esta etapa de sobretiro tampoco ha sido detectada por ninguno de los autores anteriormente citados, aunque en estos casos, la ausencia de sobretiro pudiera ser debida al retraso en la recuperación citosólica como consecuencia de la magnitud de la dosis utilizada (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por CIDLOWSKI, 1974 ; 2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por LIEBERBURG, 1980 y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por MORRIS, 1976).

CONSIDERACIONES SOBRE LA EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES PARA LAS TRES DOSIS ENSAYADAS .-

El modo en que evoluciona la concentración de los receptores nucleares tras la administración de la dosis de 500 ng/kg es similar al obtenido por otros autores que detectan el máximo valor de concentración de Rn a las primeras horas de la inyección de la hormona, y un posterior retorno a los niveles del control.

ROY y McEWEN (1979) y KELNER y GORSKY (1980) en ratas ovariectomizadas, y utilizando ambos la misma dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, detectan el máximo valor una hora después de administrar el estradiol, y si bien, los valores absolutos de la concentración de Rn difieren al trabajar los primeros con receptores extraídos con KCl y los segundos con cromatina cruda, obtienen ambos el mismo orden de variación respecto de los controles: 1150% y 1500% respectivamente.

Estos aumentos relativos de la concentración de Rn son mayores que los obtenidos en este trabajo para la dosis de 500 ng/kg a las dos horas postinyección (237%), aunque hay que == destacar que la dosis que aquí se ha utilizado es 40 veces menor.

En cuanto al tiempo que la concentración de Rn permanece = superior a la de los controles, los autores antes citados encuentran que la retención de los receptores por el núcleo se prolonga durante 10-12 horas. En nuestros resultados, es también a este tiempo cuando se observa el regreso de la concentración de Rn a los niveles control.

En ratas prepúberes (ANDERSON y PECK, 1974) y en intactas= (WHITE y LIM, 1978), la retención de receptores en el núcleo= es menor, 6 y 4.5 horas respectivamente, para dosis también = mayores que las aquí ensayadas.

CONSIDERACIONES SOBRE LA EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS Y NUCLEARES PARA CADA DOSIS ENSAYADA .-

Los valores de la concentración de receptores citosólicos= y nucleares para las dosis de 500 y 10 ng/kg, expresados en = porcentaje de variación respecto del control, se han represen= tado en las Fig. 44 y 45.

Las evoluciones temporales de la concentración de los re= ceptores citosólicos y nucleares para la dosis de 500 ng/kg,= es de tipo especular como la encontrada en adenohipófisis pa= ra esta misma dosis, esto es, aumento de los Rn cuando se pro= duce la depleción de los Rc y la posterior disminución de los Rn simultánea con la recuperación de la concentración de los= Rc, hasta alcanzar ambos los niveles del control en el que se

mantienen estabilizados.

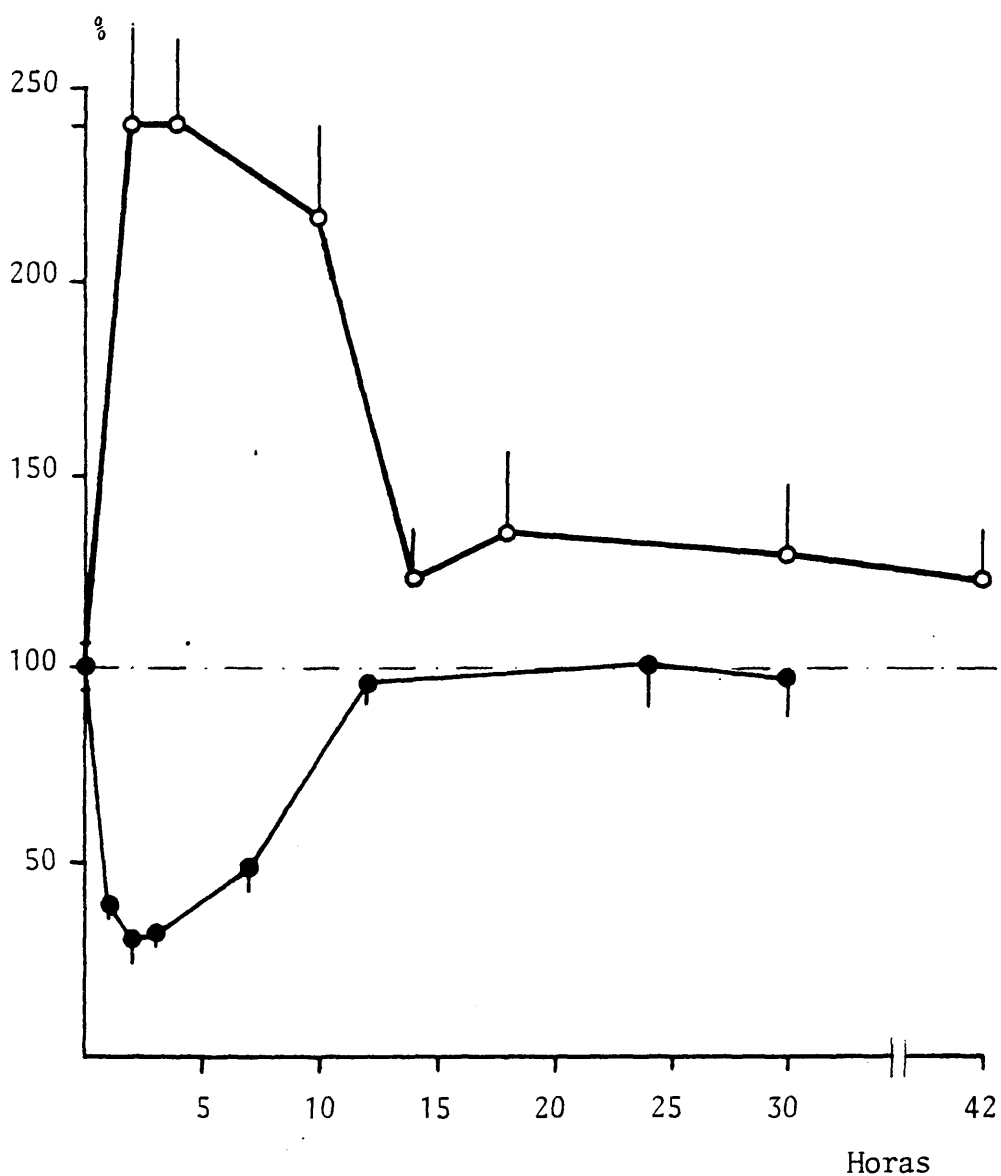
La evolución Rc-Rn que se presenta para la dosis de 10 ng/kg, Fig. 45 es semejante a la observada para la dosis mayor - en las dos primeras horas postinyección, produciéndose el aumento de los Rn mientras se observa disminución de los Rc. -- Posteriormente, después que los receptores citosólicos han comenzado la recuperación, sigue aumentando el contenido de receptores nucleares mientras dura la repleción citosólica.

La falta de datos puntuales de la concentración de Rn entre las dos y ocho horas para la dosis de 10 ng/kg, no nos == permite establecer comparaciones entre ambas evoluciones durante este tiempo, pero lo que sí se manifiesta coincidiendo con lo observado en todos los tejidos estudiados y para las tres dosis ensayadas, es el regreso simultáneo a los niveles control de la concentración de ambos receptores.

Las interrelaciones Rc-Rn difieren según sea la dosis administrada, y aunque no existe ningún trabajo previo que en este tejido analice conjuntamente las variaciones de ambos tipos de receptores en función de la dosis, encontramos dentro del conjunto de los resultados aquí presentados, que las variaciones de la concentración de receptores en hipotálamo == guarda gran similitud con las que se obtuvieron para adenohipófisis y útero con la dosis de 10 ng/kg.

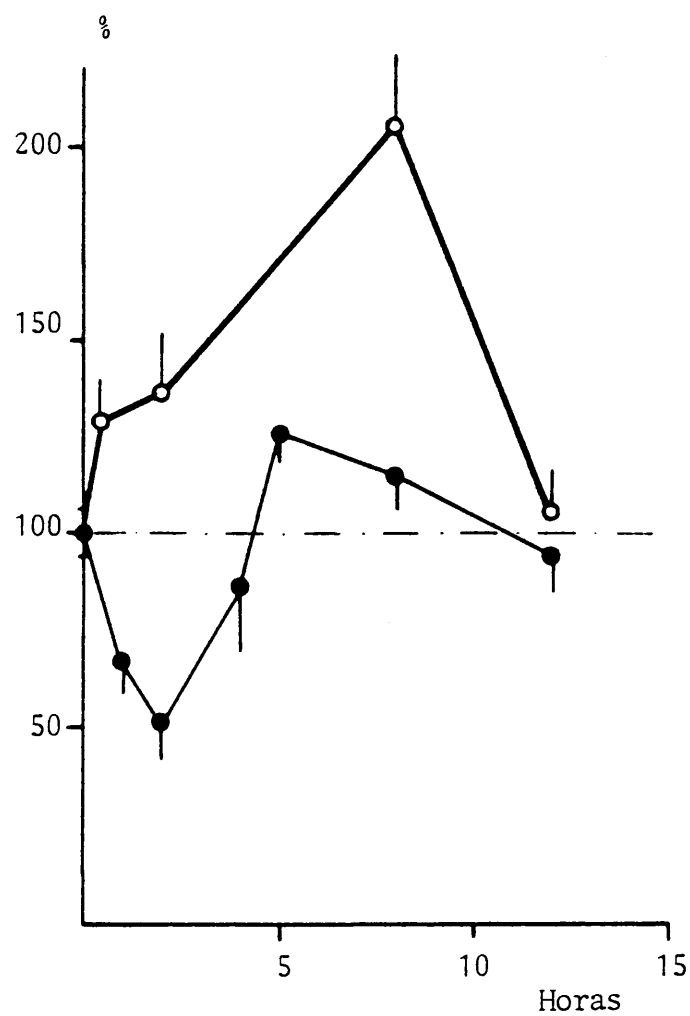
Las variaciones en el contenido de Rn tras la administración de estradiol no siempre son un reflejo de la dinámica de los Rc, en el sentido de que los aumentos de Rn sean debidos == únicamente a disminuciones de Rc y viceversa, dándose situaciones en las que se producen aumentos y disminuciones simultáneas de ambos tipos de receptores, hecho este del que se == tratará en la discusión.

FIG. 44



EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (●) Y NUCLEARES (○) EN HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE DE VARIACION RESPECTO DEL VALOR CONTROL (8.4 ± 0.59 fm/mg Prot. o 802.2 ± 28.6 fm/mg DNA).

FIG. 45



EVOLUCION CONJUNTA DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (●) Y NUCLEARES (○) EN HIPOTALAMO TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE DE VARIACION RESPECTO DEL VALOR CONTROL (8.4 ± 0.59 fm/mg Prot. o 802.2 ± 28.6 fm/mg DNA).

3.5.- CAPTACION "IN VIVO" DE ESTRADIOL POR SUS TEJIDOS DIANA .-

Los resultados que a continuación se describen corresponden a experimentos realizados inyectando 500 ng de ^3H -Estradiol por kg. a ratas en las mismas condiciones experimentales que usando estradiol frío. Se estudió la fijación que se produce en citosol y núcleos de útero,= adenohipófisis e hipotálamo entre 0.5 y 12 horas después de la inyección.

El objetivo perseguido con este experimento fué el de tratar de dilucidar las relaciones existentes entre el estradiol inyectado y la dinámica intracelular de los receptores. Este planteamiento surgió de los resultados descritos en las secciones precedentes, en las que la acumulación de receptores nucleares en útero con la dosis de 500 ng E_2/kg , se observó que era lenta y progresiva en comparación con la acumulación aguda y rápida descrita por otros autores. Por otra parte, la discrepancia entre la medida de receptores nucleares en útero y adenohipófisis tras inyectar 500 ng/kg. de estradiol frío, cuya comparación exhaustiva se realiza en el apartado 3.7, contrastaba con su similar comportamiento para esta dosis en los receptores citosólicos y discutida en el apartado 3.6.

Todo ello aconsejó realizar el ciclo intracelular del ^3H -Estradiol paralelamente al de los receptores citosólicos y nucleares.

El procedimiento seguido tal como se describe en la correspondiente sección de Material y Métodos, fué análogo al usado para la obtención de receptores, con el objeto de que los resultados fueran comparables.

3.5.1.- CAPTACION DE $^3\text{H-E}_2$ POR EL UTERO .-

Captación citosólica.- La Tabla 46 presenta los valores de las captaciones de $^3\text{H-E}_2$ por el citosol uterino.

El máximo nivel de $^3\text{H-E}_2$ en citosol de útero se obtuvo 10 minutos después de la inyección, con 1.41 fm/mg tejido. A las dos horas de la inyección, el nivel ha descendido significativamente con respecto al nivel alcanzado a los 10 minutos, y continúa descendiendo hasta las 12 horas, a las que el nivel es sólo de 0.39 fm/mg tejido.

Captación nuclear.- La Tabla 46 muestra la captación de $^3\text{H-E}_2$ por núcleos de útero.

La acumulación de $^3\text{H-E}_2$ alcanza su mayor nivel con 4.22 fm/mg tejido, dos horas después de la inyección. Este nivel es significativamente más alto que la máxima captación en citosol a los 10 minutos ($p < 0.05$).

La captación nuclear desciende significativamente a 4 horas después de la inyección ($p < 0.05$) y a las 12 horas aún retiene una concentración de 1.28 fm/mg tejido. ($p < 0.001$ respecto del valor a las dos horas).

3.5.2.- CAPTACION DE $^3\text{H-E}_2$ POR ADENOHIPOFISIS .-

Captación citosólica.- La captación de $^3\text{H-E}_2$ por el citosol de AHF se muestra en la Tabla 47.

El máximo nivel de captación de $^3\text{H-E}_2$ se registró 10 minutos después de la inyección con 1.02 fm/mg tejido. Este valor desciende significativamente 2 horas después ($p < 0.05$) y continúa con esta tendencia hasta las 12 horas, a las que el

TABLA 46

EVOLUCION DE LA CONCENTRACION DE $^3\text{H-E}_2$ EN CITOSOL Y NUCLEOS DE UTERO TRAS LA INYECCION DE 500 ng/kg DE $^3\text{H-E}_2$.

TIEMPO	CITOSOL	NUCLEOS
	fm/mg Tejido	fm/mg Tejido
10 min.	1.41 \pm 0.10 (4)	2.83 \pm 0.41 (3) Δ
2 horas	1.13 \pm 0.12 (4)	4.22 \pm 0.23 (3)
4 "	0.79 \pm 0.11 (3) Δ	2.23 \pm 0.5 (2) Δ
12 "	0.39 \pm 0.04 (4) \bullet	1.28 \pm 0.08 (4) \circ

() número de experimentos.

Significatividad respecto del máximo valor (10' para citosol, 2 horas para núcleos).

(Δ $p < 0.05$; \bullet $p < 0.01$; \circ $p < 0.001$).

TABLA 47

EVOLUCION DE LA CONCENTRACION DE $^3\text{H-E}_2$ EN CITOSOL Y NUCLEOS DE ADENOHIPOFISIS TRAS LA INYECCION DE 500 ng/kg DE $^3\text{H-E}_2$.

TIEMPO	CITOSOL	NUCLEOS
	fm/mg Tejido	fm/mg Tejido
10 min.	1.02 \pm 0.13 (4)	1.07 \pm 0.15 (4)
2 horas	0.60 \pm 0.04 (2) Δ	1.48 \pm 0.3 (2)
4 "	0.49 \pm 0.09 (4) Δ	0.65 \pm 0.12 (4) Δ
12 "	0.27 \pm 0.03 (4) \bullet	0.51 \pm 0.20 (4) Δ

() Número de experimentos.

Significatividad respecto del máximo valor (10' para citosol, 2 horas para núcleos).

(Δ $p < 0.05$; \bullet $p < 0.01$; \circ $p < 0.001$).

nivel ha sido de sólo 0.27 fm/mg tejido.

La evolución de la captación de $^3\text{H-E}_2$ por citosol de AHF = es muy semejante a la descrita para el útero.

Captación nuclear.- Los valores obtenidos para la captación = de $^3\text{H-E}_2$ por núcleos de AHF se muestran en la Tabla 47.

El máximo nivel de $^3\text{H-E}_2$ nuclear se detectó 2 horas des---pués de la inyección, con 1.48 fm/mg tejido. Esta concentra--ción disminuye en las 2 horas siguientes registrándose un va--lor de 0.65 fm/mg tejido ($p < 0.05$ respecto del valor a los 10 minutos), y continúa en esa línea hasta las 12 horas a las = que el nivel es de 0.51 fm/mg tejido.

3.5.3.- CAPTACION DE $^3\text{H-E}_2$ POR HIPOTALAMO .-

Captación citosólica.- La captación citosólica de $^3\text{H-E}_2$ por = el citosol de hipotálamo se muestra en la Tabla 48.

El máximo nivel se alcanza a los 10 minutos después de la inyección, con 0.43 fm/mg tejido. Este nivel cae significati--vamente en las horas sucesivas, y es de 0.041 fm/mg tejido a las 12 horas.

La captación de $^3\text{H-E}_2$ por hipotálamo es significativamente más baja que la encontrada en el útero y adenohipófisis === ($p < 0.01$ en ambos casos), lo cual coincide con los datos pre--sentados por varios autores (MCEWEN y Col., 1975; LIEBERBURG y Col., 1980).

Captación nuclear.- Los valores obtenidos para la captación = de $^3\text{H-E}_2$ por núcleos de hipotálamo se recogen en la Tabla 48.

El nivel máximo de $^3\text{H-E}_2$ se encontró 10 minutos después de la inyección, con 0.33 fm/mg tejido. Este nivel desciende ra-

TABLA 48

EVOLUCION DE LA CONCENTRACION DE $^3\text{H-E}_2$ EN CITOSOL Y NUCLEOS
DE HIPOTALAMO TRAS LA INYECCION DE 500 ng/kg DE $^3\text{H-E}_2$.

TIEMPO	CITOSOL	NUCLEOS
	fm/mg Tejido	fm/mg Tejido
10 min.	0.43 \pm 0.04 (3)	0.33 \pm 0.05 (4)
2 horas	0.11 \pm 0.03 (2) ●	0.09 \pm 0.007(2) Δ
4 "	0.059 \pm 0.009(3) ○	0.043 \pm 0.007(3) ●
12 "	0.041 \pm 0.003(4) ○	0.044 \pm 0.005(4) ○

() Número de experimentos.

Significatividad respecto del máximo valor (10' para citosol,
2 horas para núcleos).

(Δ $p < 0.05$; ● $p < 0.01$; ○ $p < 0.001$).

pidamente a las dos horas dando un valor de 0.09 fm/mg tejido ($p < 0.05$), y aún más hasta las 12 horas siguientes a la administración de estradiol con una concentración de 0.044 fm/mg=tejido. ($p < 0.001$)

El patrón de acumulación de $^3\text{H-E}_2$ observado en hipotálamo=es distinto totalmente del encontrado para útero y adenohipófisis, que muestran sus valores más altos 2 horas después de la inyección. También presenta una caída más rápida que la --descrita por MCEWEN y Col. (1975), que podría deberse a que --la dosis usada por éstos es mayor que la ensayada en este tra--bajo.

3.5.4.- NIVELES DE $^3\text{H-E}_2$ EN PLASMA Y EN CITOSOL DE UTERO ADENOHIPOFISIS E HIPOTALAMO .-

En la Tabla 49 se recogen las concentraciones plasmáticas de $^3\text{H-E}_2$ tras la inyección de 500 ng/kg. Su evolución, junto=con la de $^3\text{H-E}_2$ en citosol de útero, adenohipófisis e hipotá=lammo se representa en la Fig. 50.

El máximo nivel plasmático de $^3\text{H-E}_2$ se alcanzó a los 10 mi=nutos de la inyección con una concentración de 0.29 pm/ml de plasma. Este nivel disminuye significativamente a las 2 horas registrandose un valor de 0.024 pm/ml ($p < 0.001$). En las ho=ras siguientes su concentración continúa en descenso, siendo=a las 12 horas prácticamente indetectable.

El rango de oscilación de los niveles plasmáticos de estra=diol en la rata ciclante, medidos por radioinmunoensayo (RIA), está comprendido entre 80 pg/ml ó 0.22 pm/ml, máxima concen=tración que se registra en proestro y 10 pg/ml ó 0.03 pm/ml =que se mide en el diestro. Por consiguiente, la dosis de 500 ng/kg, ha proporcionado a los 10 minutos de la inyección unos

TABLA 49

EVOLUCION DE LA CONCENTRACION PLASMATICA DE $^3\text{H-E}_2$ TRAS LA INYECCION DE 500 ng/kg DE $^3\text{H-E}_2$.

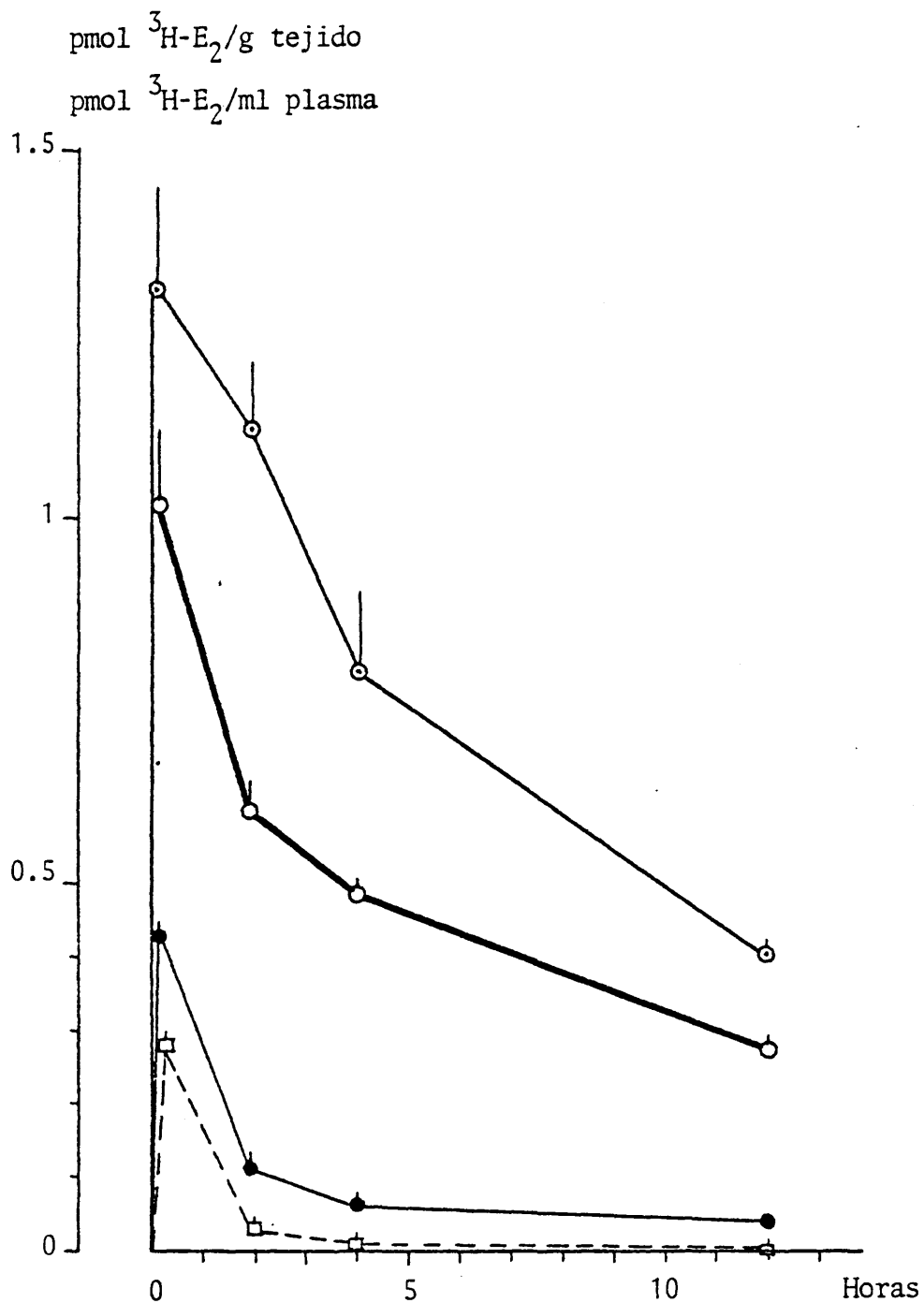
TIEMPO	pm/ml de Plasma
10 min.	0.297 \pm 0.010 (4)
2 horas	0.028 \pm 0.003 (2) Δ
4 horas	0.011 \pm 0.010 (4) \circ
12 horas	0.007 \pm 0.0001 (4) \circ

() Número de experimentos.

Significatividad respecto del valor a los 10 minutos.

(Δ $p < 0.001$; \circ $p < 0.01$)

FIG. 50



EVOLUCION DE LA CAPTACION DE ^3H -ESTRADIOL POR CITOSOL DE UTERO (\odot), ADENOHIPOFISIS (\circ), HIPOTALAMO (\bullet) Y PLASMA (\square) TRAS LA INYECCION DE 500 ng/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN FEMTOMOLEL/MG TEJIDO \pm D.E. (pmol/ml EN EL CASO DEL PLASMA).

niveles de estradiol circulantes del orden de los del proestro, que a las dos horas ha descendido a una concentración similar a la del diestro. (BARRACLOUGH y COL., 1979).

En cuanto a la evolución de la concentración de $^3\text{H-E}_2$ en útero, adenohipófisis e hipotálamo tras la inyección de 500 ng/kg de estradiol, puede observarse que el máximo de captación citosólica se registra a los 10 minutos en todos los tejidos, coincidiendo con la máxima captación plasmática. En citosol de útero, la concentración máxima fué de 1.41 fm/mg tejido, mayor que las registradas en adenohipófisis e hipotálamo, que dieron unos valores de 1.05 y 0.43 fm/mg tejido respectivamente. Tanto en adenohipófisis como en hipotálamo, la acumulación de $^3\text{H-E}_2$ disminuyó significativamente a las dos horas, mientras que en útero sólo lo fué a partir de la cuarta hora postinyección.

En general, durante todo el intervalo de tiempo estudiado, la acumulación de $^3\text{H-E}_2$ fué siempre mayor en útero que en adenohipófisis, y en ésta mayor que en hipotálamo. Este hecho está en relación con el contenido de receptores de cada tejido, que se ha comprobado que son más abundantes en útero que en adenohipófisis, y en adenohipófisis mayor que en hipotálamo. (ANDERSON, 1973; CIDLOWSKI y MULDOON, 1974; MORRIS, 1976; LIEBERBERG, 1980).

El paralelismo que siguen las evoluciones de la concentración de $^3\text{H-E}_2$ citosólico en los tres tejidos al compararlos entre sí, sugiere que en todos ellos la hormona ha sido procesada de modo similar. Además su paralelismo con la evolución de la concentración de $^3\text{H-E}_2$ plasmático, induce a pensar que el aporte plasmático de la hormona debe ser un condicionante importante de dicha dinámica.

3.5.5.- RELACIONES ENTRE LOS NIVELES DE RECEPTORES DE ESTRADIOL Y LA ACUMULACION DE $^3\text{H-E}_2$ EN LOS TEJIDOS DIANA .-

En las Figs. 51, 52 y 53 se muestra la evolución conjunta de la concentración de receptores de estradiol en útero, = adenohipófisis e hipotálamo tras la inyección de 500 ng/kg de estradiol frío y la acumulación de $^3\text{H-E}_2$ en citosol y núcleos de dichos tejidos tras inyectar por la misma vía intraperitoneal la misma dosis de $^3\text{H-E}_2$.

Las evoluciones de la concentración de receptores citosólicos y nucleares en cada tejido ya han sido comentadas en los apartados 3.2, 3.3 y 3.4, al igual que las variaciones de la acumulación de $^3\text{H-E}_2$ que lo fueron de los apartados 3.5.1, = 3.5.2 y 3.5.3 de esta misma sección.

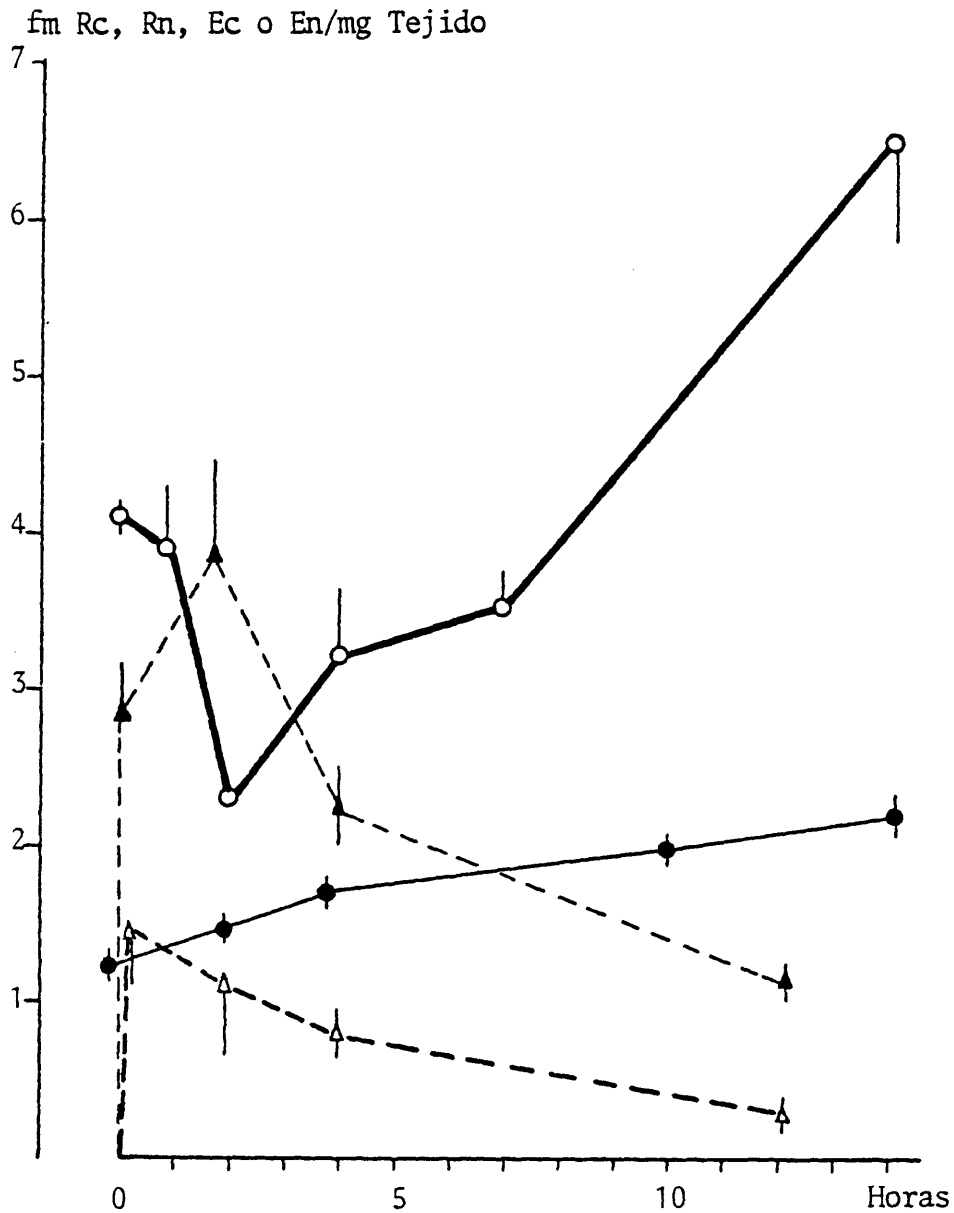
Puede observarse en las dos horas que siguen a la administración del estradiol, tanto en útero como en adenohipófisis, que el descenso de receptores citosólicos va acompañado de == una disminución en la concentración de $^3\text{H-E}_2$ de citosol, tal como corresponde al proceso de formación del complejo estradiol-receptor y a su inmediata translocación al núcleo. Durante este tiempo, a nivel nuclear se detectan en ambos tejidos = aumentos en la concentración de receptores y en la acumulación de $^3\text{H-E}_2$. En adenohipófisis se da una clara coincidencia entre los máximos de concentración de Rn y de $^3\text{H-E}_2$ nuclear = con el mínimo de receptores citosólicos. Sin embargo, en útero, si bien se observa la coincidencia entre el mínimo de Rn con el máximo de acumulación de $^3\text{H-E}_2$ en núcleos, no se registra la coexistencia de los máximos niveles de receptores y = $^3\text{H-E}_2$ a nivel nuclear.

Esta divergencia entre las evoluciones de la concentración

de Rn y $^3\text{H-E}_2$ en núcleos de útero, incide directamente en el desconocimiento actual sobre la naturaleza de la captación y retención nuclear de los receptores, que implica tanto a los complejos estradiol-receptor procedentes del citosol, como a los propios lugares aceptores de la cromatina, y que será abordado en el apartado de discusión.

Señalar también que la dosis de 500 ng E_2 /kg, que ha producido unos niveles circulantes de estrógeno próximos a los fisiológicos, ha proporcionado a los tejidos diana una concentración de estradiol que de ningún modo ha desbordado a la concentración de receptores citosólicos disponibles. El nivel de receptores previo a la inyección es mayor o igual que la máxima acumulación de $^3\text{H-E}_2$ tanto en útero como en adenohipófisis aunque no en hipotálamo donde el número de receptores citosólicos es considerablemente más bajo.

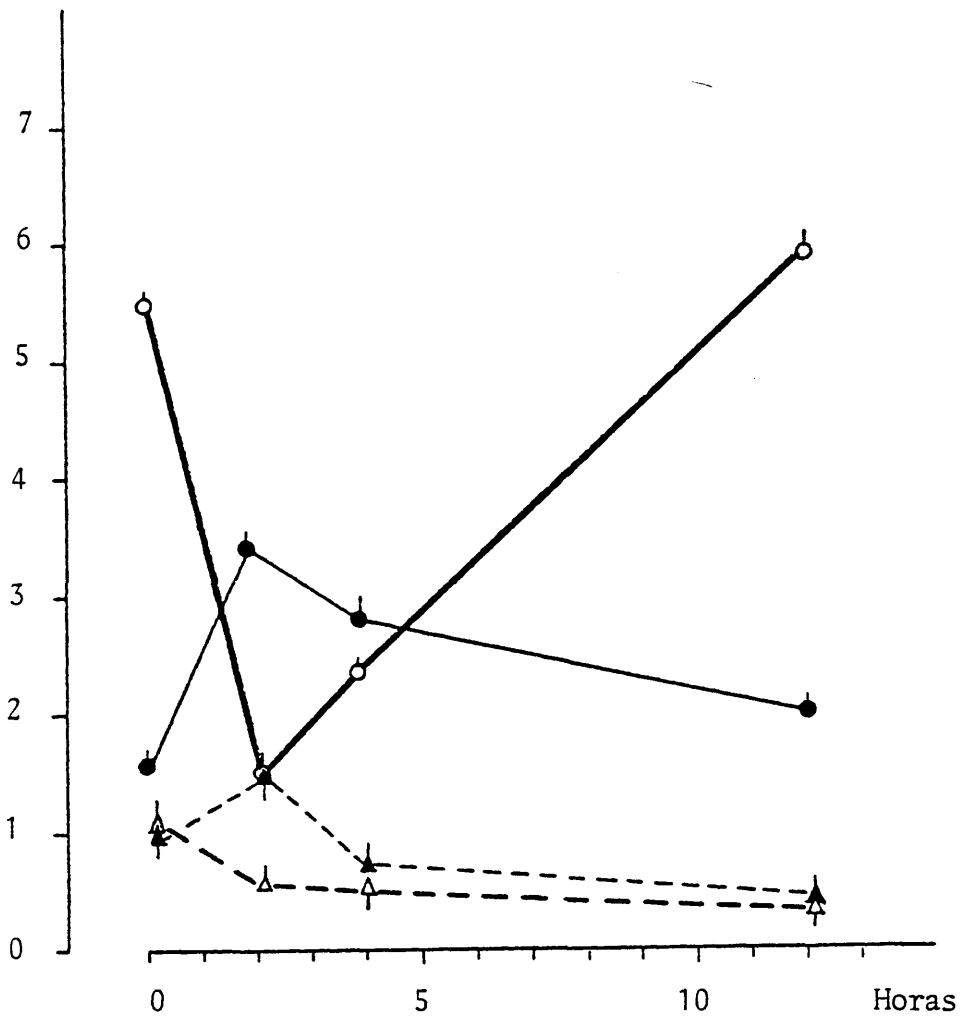
FIG. 51



EVOLUCION DE LA CAPTACION (---) DE ^3H -ESTRADIOL POR CITOSOL (Δ) Y NUCLEOS (\blacktriangle) DE UTERO TRAS LA INYECCION DE 500 ng ^3H -E₂/kg. Y DE LOS RECEPTORES (—) CITOSOLICOS (o) Y NUCLEARES (•) TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS VALORES SE EXPRESAN EN fmol/mg TEJIDO.

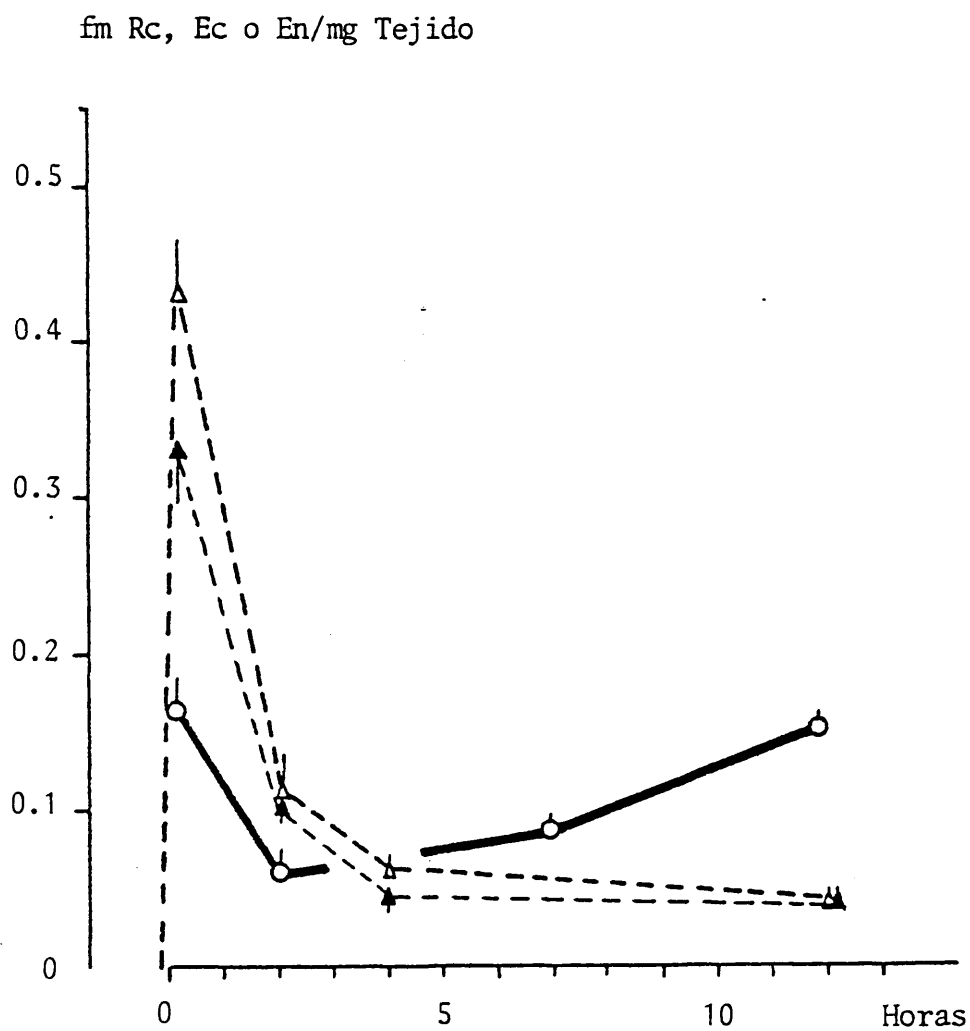
FIG. 52

fm Rc, Rn, Ec o En/mg Tejido



EVOLUCION DE LA CAPTACION (---) DE ^3H -ESTRADIOL POR CITOSOL (Δ) Y NUCLEOS (\blacktriangle) DE ADENOHIPOFISIS TRAS LA INYECCION DE 500 ng ^3H - E_2 /kg Y DE LOS RECEPTORES (—) CITOSOLICOS(\circ) Y NUCLEARES (\bullet) TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E_2 /kg. LOS VALORES SE EXPRESAN EN fmol/mg TEJIDO.

FIG. 53



EVOLUCION DE LA CAPTACION (---) DE ^3H -ESTRADIOL POR CITOSOL (Δ) Y NUCLEOS (\blacktriangle) DE HIPOTALAMO TRAS LA INYECCION DE 500 ng ^3H -E₂/kg. Y DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS (—) TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS VALORES SE EXPRESAN EN fmol/mg TEJIDO.

3.6.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DINAMICAS DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO, ADENOHIPOFISIS E HIPOTALAMO.

En las Fig. 54, 55 y 56 se han presentado las evoluciones de las concentraciones de los receptores citosólicos que se han obtenido para cada una de las dosis ensayadas. Los valores de la concentración de Rc se expresan en porcentaje de variación respecto de los correspondientes valores control.

La dosis de 500 ng E₂/kg. Fig. 54, produjo en los tres tejidos estudiados el máximo de depleción citosólica a las dos horas de su administración. La intensidad de la misma fué similar en todos los casos estando comprendida entre 60% para útero y el 78% para adenohipófisis.

La recuperación de la concentración de Rc, o fase de repleción, se produjo en todos los casos en el mismo periodo de tiempo, alcanzandose los valores de los controles en torno a las 10 horas post-inyección.

En la fase de sobretiro, en la que se ponen de manifiesto las diferencias entre tejidos para esta dosis. Tanto en útero como en adenohipófisis, se consiguen valores superiores a los controles, mientras que su concentración en hipotálamo permanece a nivel basal.

Al representar conjuntamente las evoluciones de los Rc en útero, adenohipófisis e hipotálamo, Fig. 55, tras la administración de la dosis de 10 ng E₂/kg, se pone de manifiesto que su incidencia en la dinámica de los receptores es diferente en cada tejido. Mientras que en útero esta dosis no es capaz de producir depleción significativa, permaneciendo la concentración de receptores ligeramente inferior al control durante las primeras cinco horas post-inyección, en adenohipófisis e hipotálamo provoca una depleción citosólica del 70%.

Para esta dosis tambien coinciden en el tiempo el aumento de la concentración de Rc por encima de los valores control, y a partir de entonces =

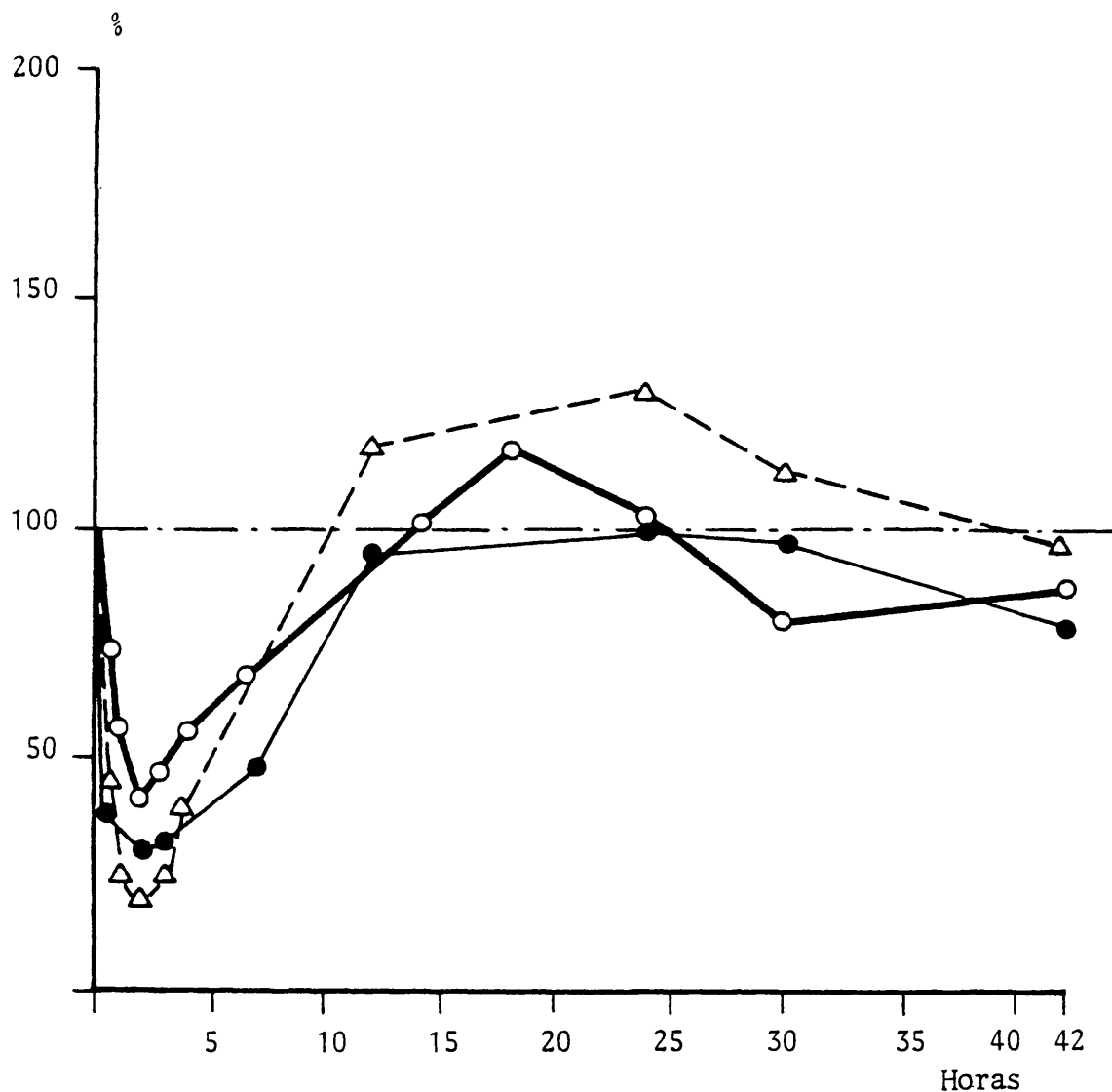
vuelven a manifestarse diferencias en sus evoluciones. Mientras que en = hipotálamo los Rc aunque superiores al control no son significativas, en útero y adenohipófisis se observa una dinámica coincidente, alcanzando = ambos el máximo de su concentración en torno al 150% sobre el control a las 12 horas, así como un regreso paralelo a los niveles basales a las = 18 horas.

La dosis de 1 ng E_2 /kg, Fig. 56 no produjo depleción significativa en ninguno de los tejidos, y sin embargo, al igual que ocurrió en útero para la dosis de 10 ng E_2 /kg., se registró tanto en útero como en adenohipófisis un considerable aumento de la concentración de receptores sobre el nivel control a las cinco horas post-inyección. En hipotálamo la concentración de Rc a este tiempo no fué significativamente superior a la de = los controles.

De la comparación de los efectos producidos por cada una de las dosis en los tres tejidos aquí estudiados, puede resaltarse como tanto la dosis de 500 ng E_2 /kg. como la de 1 ng E_2 /kg., afectan de modo análogo a = la población de receptores citosólicos. La dosis mayor produce depleción significativa en todos ellos y una fase de sobretiro muy similar en útero y adenohipófisis, mientras que la dosis de 1 ng E_2 /kg. se caracteriza en todos los tejidos por la ausencia de depleción y por el temprano y = elevado aumento de la concentración de receptores sobre los niveles del = control en útero y adenohipófisis. La dosis intermedia de 10 ng E_2 /kg. = produce una dinámica de receptores que en el caso del útero se asemeja = a la que se obtiene con el pulso de 1 ng E_2 /kg., y en el caso de adenohipófisis es similar a la que se presenta por efecto de la dosis de 500 ng E_2 /kg.

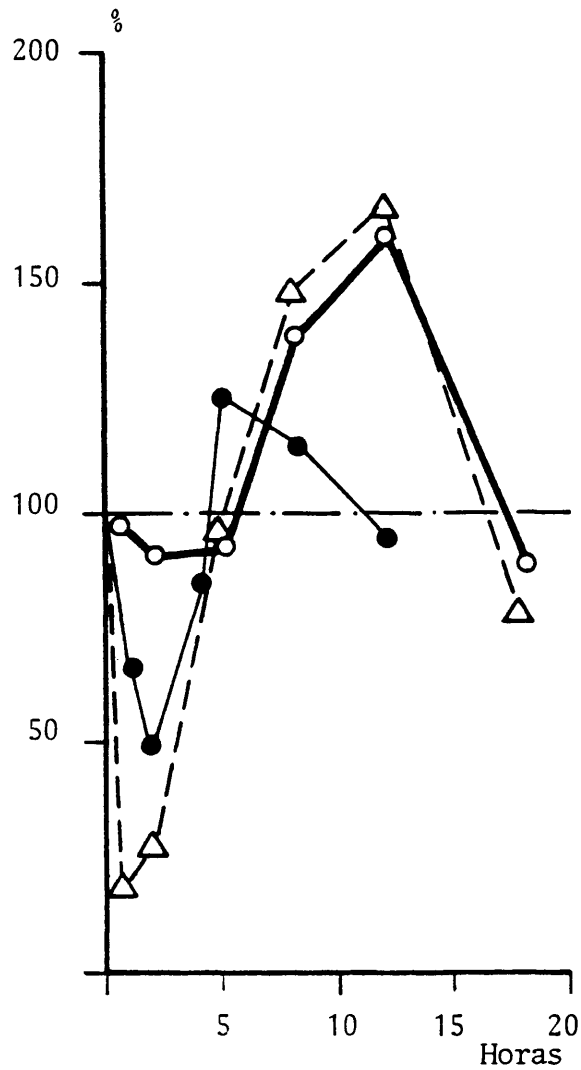
Las semejanzas y diferencias que se han observado tras la administración de cada dosis entre los tres tejidos aquí estudiados posiblemente = guardan relación con la dotación de receptores y la capacidad de respuesta de cada uno de ellos al estradiol.

FIG. 54



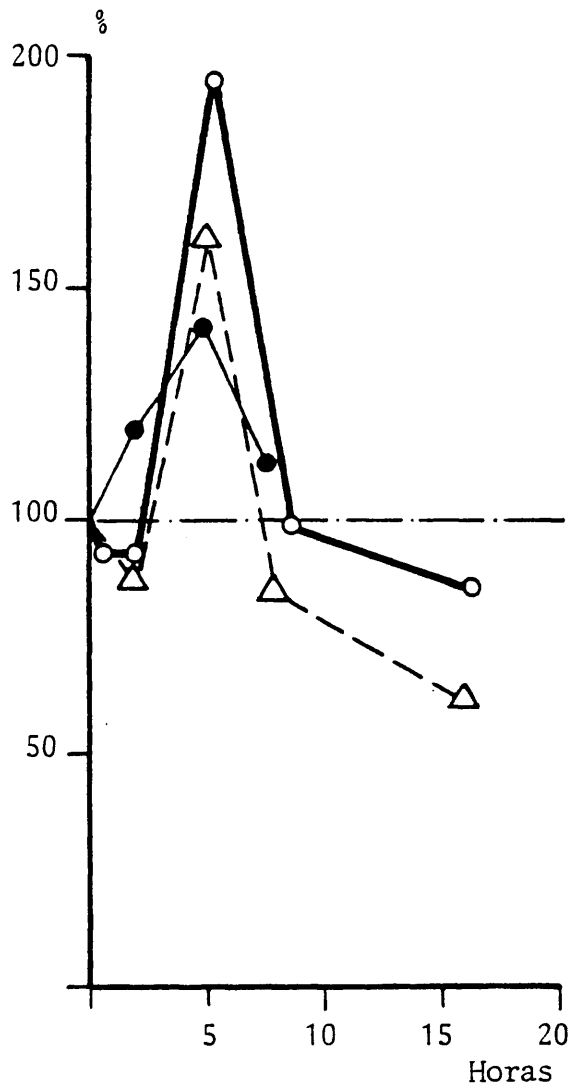
EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO (○), ADENOHIPOFISIS (Δ) E HIPOTALAMO (●) TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE RESPECTO AL CONTROL. (217.2 ± 10.9 fm/mg Prot. EN UTERO; 113.4 ± 5.9 fm/mg Prot. EN ADENOHIPOFISIS y 8.4 ± 0.59 fm/mg Prot. EN HIPOTALAMO).

FIG. 55



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO (o), ADENOHIPOFISIS (Δ) E HIPOTALAMO (•) TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE RESPECTO AL CONTROL. (217.2 ± 10.9 fm/mg Prot. EN UTERO; 113.4 ± 5.9 fm/mg Prot. EN ADENOHIPOFISIS y 8.4 ± 0.59 fm/mg Prot. EN HIPOTALAMO).

FIG. 56



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES CITOSOLICOS EN UTERO (○), ADENOHIPOFISIS (Δ) E HIPOTALAMO (●) TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE RESPECTO AL CONTROL (217.2 ± 2.9 fm/mg Prot. EN UTERO; 113.4 ± 5.9 fm/mg Prot. EN ADENOHIPOFISIS Y 8.4 ± 0.59 fm/mg Prot. EN HIPOTALAMO).

3.7.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DINAMICAS DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN UTERO Y ADENOHIPOFISIS .-

Las evoluciones de la concentración de Rn en útero y adenohipófisis = para las dosis ensayadas de 500, 10 y 1 ng E₂/kg. se representan conjuntamente en las Figs. 57, 58 y 59, en las que la concentración de Rn se expresa en porcentaje de variación respecto de los correspondientes controles.

Puede observarse como todas las dosis utilizadas produjeron acumulación de receptores en núcleos, presentandose una clara relación directa= entre la dosis inyectada y el tiempo en que la concentración de receptores permaneció superior a la de los controles. Este hecho fué también observado con los receptores citosólicos (3.5), y al igual que se comentó = para los Rc, tampoco la duración del ciclo de los Rn para cada una de = las dosis presenta diferencias significativas entre útero y adenohipófisis.

El modo en que la dosis de 500 ng E₂/kg. afectó a la concentración de receptores nucleares en estos tejidos fué muy diferente, Fig. 57. La depleción citosólica de receptores de AHF tiene una clara respuesta a nivel nuclear con el rápido aumento de los Rn, mientras que en útero no se detecta este aumento inicial, retrasandose el máximo hasta las 18 horas= post-inyección.

Con la dosis de 10 ng E₂/kg., Fig. 58, de nuevo se presentan las diferencias entre útero y adenohipófisis antes indicadas, si bien en el caso del útero se adelanta la detección del máximo a las 8 horas, aproximándose así, a la dinámica observada en AHF para esta dosis que además es muy similar a la que se obtuvo con la dosis de 500 ng E₂/kg.

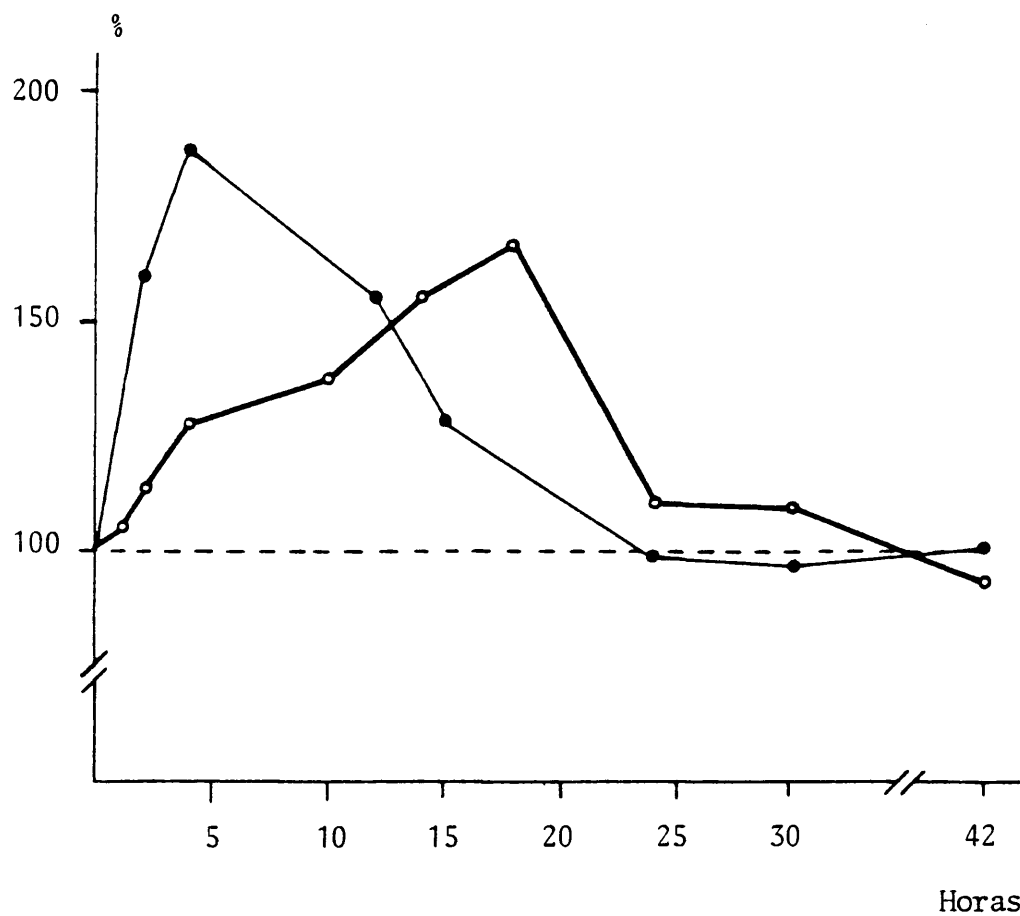
A diferencia de lo observado con las dosis de 500 y 10 ng E₂/kg.; con la dosis más baja, 1 ng E₂/kg., ambos tejidos responden del mismo modo =

en lo que a la evolución de los receptores nucleares se refiere. Tanto en útero como en adenohipófisis se produce el máximo a las cinco horas de la inyección de estradiol con un regreso posterior y paralelo a los niveles del control, que culmina aproximadamente a las diez horas.

Del análisis conjunto es de destacar como la población de receptores nucleares de cada tejido se ve afectada de diferente modo según sea la dosis de estradiol que se administre. El rango de dosis que aquí se ha utilizado ha desvelado un tipo de evolución diferenciada entre útero y adenohipófisis para las dosis de 500 y 10 ng E₂/kg. mientras que la dosis de 1 ng E₂/kg. afectó por igual a ambos tejidos. Es probable además que la respuesta de cada tejido esté también condicionada por su dotación de efectores nucleares así como por la intensidad con que los receptores sean retenidos por la cromatina.

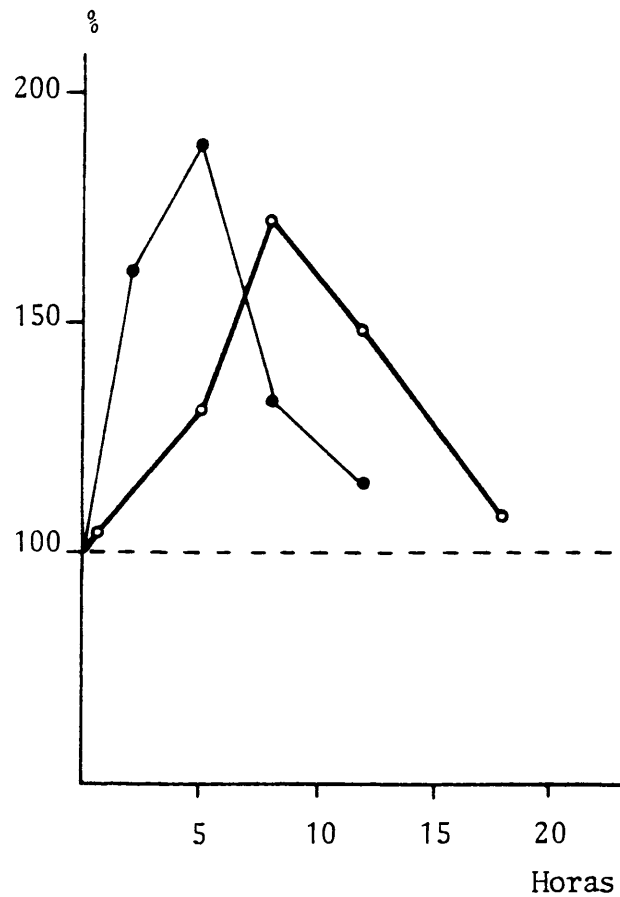
Como ya se indicó (1.2.5) el conocimiento acerca de la forma en que actúan los receptores a nivel nuclear es un aspecto de su acción que aún está por dilucidar. En el apartado de Discusión se debatirá esta cuestión considerando el conjunto de los resultados que se han obtenido.

FIG. 57



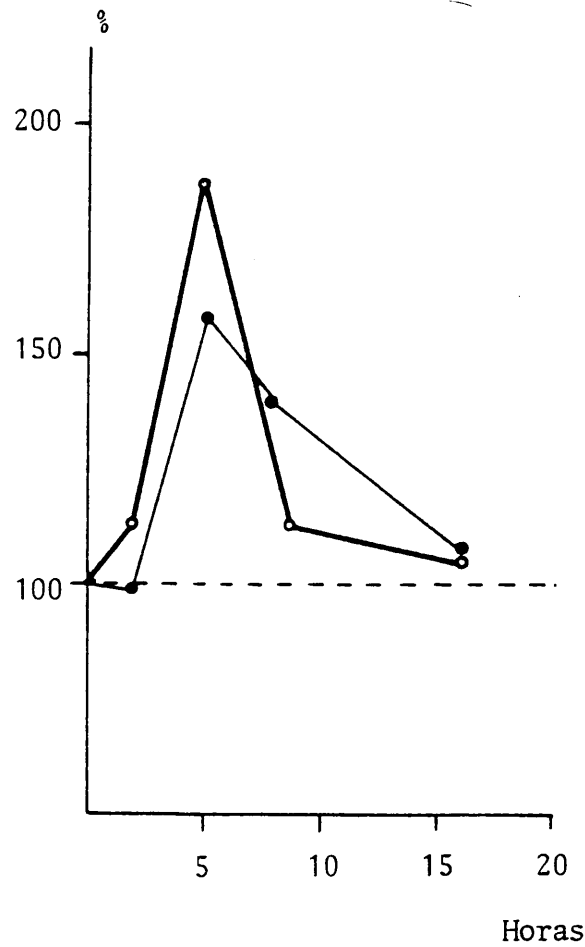
EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN UTERO (○) Y ADENOHIPOFISIS (●) TRAS LA ADMINISTRACION DE 500 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE RESPECTO AL VALOR CONTROL (283.0 ± 11.3 fm/mg DNA EN UTERO Y 413.8 ± 24.3 fm/mg DNA EN ADENOHIPOFISIS).

FIG. 58



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN UTERO (○) Y ADENOHIPOFISIS (●) TRAS LA ADMINISTRACION DE 10 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE RESPECTO AL VALOR CONTROL (283.0 ± 11.3 fm/mg DNA EN UTERO Y 413.8 ± 24.3 fm/mg DNA EN ADENOHIPOFISIS).

FIG. 59



EVOLUCION DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN UTERO (○) Y ADENOHIPOFISIS (●) TRAS LA ADMINISTRACION DE 1 ng E₂/kg. LOS RESULTADOS SE EXPRESAN EN PORCENTAJE RESPECTO AL VALOR CONTROL = (283.0 ± 11.3 fm/mg DNA EN UTERO y 413.8 ± 24.3 fm/mg DNA EN ADENOHIPOFISIS).

4.- DISCUSSION

El uso de dosis bajas de estradiol ha producido en los tejidos diana estudiados, útero, adenohipófisis e hipotálamo, una perturbación en la concentración de sus receptores citosólicos y nucleares, que si bien, en líneas generales, es semejante a la que se conoce para las dosis altas normalmente empleadas por otros autores, ha permitido detectar una serie de hechos diferenciales que hasta ahora no han sido descritos y sobre los que se va a centrar esta discusión.

La confrontación de cada una de las dinámicas de Rc obtenidas para cada dosis y en cada uno de los tejidos con los resultados de otros autores, ya se ha llevado a cabo en los correspondientes apartados de Resultados 323, 333 y 343.

Como ya se ha expuesto, la llegada del estradiol a la célula diana produce la complejación con el receptor citosólico y la posterior translocación del complejo E-R formado al núcleo. Con respecto a la depleción inicial, la disminución del contenido de receptores citosólicos como consecuencia de la formación del complejo E-R y su posterior translocación al núcleo, se observará siempre que a la célula diana llegue suficiente cantidad de estradiol que haga detectable la depleción. En este sentido se puede considerar que la dosis de 500 ng/kg, que alcanza unos niveles máximos de estradiol circulante del orden de los medidos en plasma de ratas en proestro, Fig. 50, ha producido un alto nivel de complejación como se comprueba por la magnitud de la depleción encontrada. Con la dosis de 1 ng/kg no se produjo en ningún tejido depleción significativa, lo que indica que se habrán formado muy pocos complejos ER. Como se verá a lo largo de la discusión, esta ausencia de depleción significativa no implicará necesariamente que la célula diana no responda al estímulo hormonal.

La dosis de 10 ng/kg no produjo depleción significativa en útero y sí en adenohipófisis e hipotálamo. Este desigual comportamiento = podría atribuirse a diferencias tisulares en lo que respecta a la = dotación de receptores, a las capacidades de retención de la hormo- na o a la desigualdad en la síntesis de los propios receptores.

El mecanismo de acción hormonal generalmente aceptado para las = hormonas esteroideas, (JENSEN, 1982), supone que una vez formado el complejo estradiol-receptor, y tras sufrir un proceso de activación hasta ahora no totalmente esclarecido, es translocado al núcleo. La llegada de estos complejos al núcleo, desencadena un conjunto de -= eventos uno de los cuales es el aumento de síntesis de proteínas en general, y en particular del propio receptor citosólico responsable de la fase de repleción y posterior sobretiro del ciclo del recep-=- tor. En la Figs 5,6,7 se muestra que las tres dosis ensayadas son == efectivas desde el punto de vista de la síntesis proteica, incremen- tandose a diversos tiempos después de la inyección de estradiol. Res- pecto a los Rc, varios autores han demostrado que la inyección de = cicloheximida frena la aparición de Rc tras la inyección de estra-=- diol, impidiendo que se manifieste la recuperación y el sobretiro, = concluyendo que el estradiol induce la síntesis de su propio recep- tor.

En los experimentos aquí presentados, la inducción de síntesis = de receptores por el estradiol aparece en las tres dosis ensayadas= y en todos los tejidos. Particularmente espectacular resultó el au- mento detectado en la dosis de 1 ng/kg al cabo de 5 horas de la in- yección. Teniendo en cuenta que esta dosis no produce depleción de= receptores citosólicos, este experimento prueba además que la deple- ción no es imprescindible para que se produzca la síntesis de recep- tores inducida por el estradiol, así como el aumento de la síntesis proteica global.

El estudio comparativo de las evoluciones de los Rc durante la depleción y repleción para las tres dosis, sugiere que su concentración podría estar gobernada por la resultante de dos procesos= simultáneos: la aparición de receptores por síntesis inducida y = su desaparición por complejación con el estradiol inyectado.

De este modo se explicaría que la dosis de 500 ng/kg tenga una repleción más lenta que las dosis menores, pues en las células de tejidos diana la complejación del receptor con el estradiol plasmático es superior a la síntesis de los Rc durante algún tiempo. Sólo cuando la concentración de estradiol en plasma caiga lo suficiente, se producirá un aumento neto de Rc que se manifiesta en = la repleción y posterior sobretiro. Lo contrario ocurriría con la dosis de 1 ng/kg donde la síntesis de receptores inducida por el estradiol, se manifiesta con mucha más intensidad que la complejación como consecuencia de la pequeña dosis administrada.

También tendría explicación el comportamiento de los Rc en la dosis de 10 ng/kg en útero, donde sin detectarse depleción significativa, los valores de Rc se mantienen durante cinco horas inferiores a los del control. Esto sugiere que durante este tiempo -- los procesos de síntesis y complejación deben ser aproximadamente del mismo orden. La presencia de una depleción importante de Rc en AHF e HT con esta dosis podría explicarse si en estos tejidos el proceso de síntesis basal de receptor fuera más débil que= en útero, en cuyo caso sería superado por el proceso de complejación con el E₂ plasmático y aparecería depleción.

Así pues, los resultados obtenidos sugieren que las depleciones de Rc en los tejidos diana tras inyectar estradiol, se ven -- contrarrestadas por los procesos de síntesis de receptor. Aparentemente este proceso contiene dos componentes: síntesis basal, in dependiente del estradiol y probablemente más intensa en útero --

que en AHF e HT, y síntesis inducida por el estradiol presente -- tras cierto tiempo de actuación del estrógeno en todos los tejidos diana, y enmascarada durante algunas horas en las dosis más altas por la complejación con el estradiol procedente del plasma.

Por la misma razón que el útero se comporta de un modo distinto que la adenohipófisis y el hipotálamo, cabe pensar que la respuesta al estradiol de los tejidos diana pueda cambiar también a lo largo de la vida, y los comportamientos descritos aquí para == útero de ratas castradas, no ser extrapolables a ratas normales o prepúberes. Así, el uso de dosis altas de estradiol en ratas prepúberes por parte de otros autores, no es extraño que den lugar a resultados bien distintos a los aquí presentados.

Como se apuntó anteriormente, la entrada de complejos ER al núcleo se manifiestan con un aumento de la concentración de receptores nucleares, que en las investigaciones realizadas en este sentido fundamentalmente en ratas prepúberes, alcanza su máxima concentración de una a tres horas después de la inyección para retornar posteriormente con más lentitud a los niveles basales. La evolución de los receptores nucleares para las dosis normalmente utilizadas, muestra una dinámica que es una imagen especular de la = seguida por los receptores citosólicos, en la que se corresponden en el tiempo el máximo de acumulación nuclear con el mínimo de -- concentración de receptores citosólicos.

Este tipo de relación entre la evolución de los Rc y los Rn, se observa claramente en AHF y en HT con la dosis de 500 ng/kg.

Las relaciones Rc-Rn para las tres dosis en útero y para las = de 10 y 1 ng/kg en AHF difieren notablemente del modelo establecido. Como ya se señaló en resultados (3.2.2.) con la dosis de 500 ng/kg, el contenido de los Rn uterinos no evoluciona siguiendo = el patrón de imagen especular con respecto a los Rc.

Su aumento lento y progresivo empieza a ser significativo solamente a partir de la quinta hora postinyección. La interpretación de este comportamiento requiere de la interpretación previa de otros resultados obtenidos con las dosis más bajas y aún no debatido.

Para la dosis de 1 ng/kg se observó tanto en útero como en adenohipofisis, que el máximo de Rn es simultáneo con el de Rc. Por otra parte, los niveles de mayor concentración de receptores nucleares son del mismo orden de magnitud para las tres dosis utilizadas en el caso de útero y para las dosis mayores en adenohipófisis.

Estos hechos son difíciles de explicar dentro del conocimiento actual acerca de los receptores nucleares. La teoría más ampliamente aceptada establece que los receptores nucleares proceden de los citosólicos previamente complejados al estradiol y translocados al núcleo. Si esto fuera cierto, en este trabajo = se debería haber detectado mayor concentración de receptores en núcleo cuanto mayor fuese la dosis de estradiol administrada. Al haberse obtenido los mismos niveles máximos de Rn para dosis de 1, 10 y 500 ng/kg en útero, es posible concluir que esta teoría no explica satisfactoriamente estos hechos.

La coincidencia entre la evolución de los receptores citosólicos y nucleares con la dosis de 1 ng/kg, induce a pensar que al núcleo es posible que hayan entrado receptores no ligados al estradiol, que se añadirían a los que procedan de los que han = entrado en forma de complejo E-R como hasta ahora se ha venido = afirmando.

Haciendo extensiva esta hipótesis al resto de las dosis utilizadas en útero, 500 y 10 ng/kg, se comprueba que desde que se observa acumulación de receptores en el citosol, o lo que es lo

mismo, desde que se empieza a producir la repleción se observa = también aumento del contenido de receptores en los núcleos. Figs. 23 y 24.

No obstante en adenohipofisis e hipotalamo, con la dosis de 500 ng/kg, la acumulación de Rn muestra una evolución explicable por la teoría en uso sobre su procedencia, con aumentos de Rn coincidiendo con la depleción de Rc, y a su vez, disminución de Rn cuando se produce repleción de Rc. Figs. 33 y 44.

Para las dosis de 10 y 1 ng/kg la hipótesis en uso sobre el origen de los Rn vuelve a ser insuficiente, pues se observan aumentos de Rn no justificados por descensos previos de Rc, cuando no aumento simultáneo de ambos parámetros. Fig. 24 y 25. Cabe por tanto concluir, que la utilización de dosis bajas de estradiol permite poner de manifiesto que los receptores nucleares = medidos puedan tener un doble origen: los complejos E-R previamente translocados al núcleo, o la entrada de receptores citosólicos libres al núcleo, coincidiendo con las fases en que se intensifica su síntesis.

Las diferencias encontradas en los patrones de acumulación de Rn por la dosis de 500 ng/kg en adenohipófisis y útero hacen pensar que en el origen de los Rn puede participar algún otro = proceso nuclear no observado cuantificando unicamente los receptores. Por ello, se diseñó el experimento consistente en administrar $^3\text{H-E}_2$ por la misma vía intraperitoneal y en la misma = dosis de 500 ng/kg que el estradiol frío, con el fin de comparar la acumulación de la hormona en citosol y núcleos con la = evolución de las concentraciones de Rc y Rn.

En adenohipófisis, al confrontar las dinámicas seguidas por las concentraciones de $^3\text{H-E}_2$ y receptores tanto a nivel citosólico como nuclear (Fig. 52) se observa una disminución simultánea de la concentración de $^3\text{H-E}_2$ y de receptores, tal como co=

responde a las etapas de formación del complejo y su translocación al núcleo. Esta evolución se ajusta perfectamente al modelo en uso sobre las variaciones que sufre la concentración de receptores tras la administración de estradiol. A nivel nuclear, se refleja este suceso detectandose incremento de la concentración de $^3\text{H-E}_2$ y de receptores, por lo que parece evidente que los receptores medidos a nivel nuclear proceden de los complejos E-R previamente formados en el citosol.

A nivel de útero Fig. 51, se observa también la formación del complejo E-R en el citosol, dada la disminución paralela de las concentraciones de $^3\text{H-E}_2$ y de Rc. Sin embargo, a nivel nuclear únicamente el aumento de la concentración de $^3\text{H-E}_2$, cuyo máximo se detecta a las 2 horas nos confirma la presencia de complejos E-R tal como predice la teoría en uso. La concentración de Rn aumenta lentamente, y no empieza a ser significativa hasta después de las 5 horas de la inyección.

Esta diferencia en la evolución de los receptores nucleares uterinos con respecto a lo observado por otros autores, podría ser atribuible a la baja dosis utilizada. El que los complejos E-R nucleares, efectivamente presentes en el núcleo, no sean medidos como receptores por la técnica de desplazamiento con $^3\text{H-E}_2$, sugiere la posibilidad que los aceptores específicos de la cromatina puedan fijar los complejos E-R de modo que resulten inaccesibles a la medida por este método. La dosis de 500 ng/kg podría haber producido una complejación inicial del receptor en un grado tal, que al translocarse al núcleo los complejos E-R no hayan sobresaturado a los aceptores específicos de la cromatina. De este modo, la concentración de Rn no sería asequible inicialmente a su detección.

Desde este punto de vista, la utilización de dosis altas de

estradiol, podrían producir un número de complejos E-R muy superior al número de lugares aceptores específicos de la cromatina, apareciendo de este modo complejos E-R fijados a lugares no específicos, y por tanto asequibles a la medida.

A su vez la divergencia entre el comportamiento de los Rn en útero y adenohipófisis, podría ser atribuida a la menor dotación de aceptores nucleares en este tejido, donde sería mayor el número de complejos E-R unidos a lugares no específicos de la cromatina.

Desgraciadamente el conocimiento actual acerca del número de aceptores, de su naturaleza, y de la forma en que se produce su unión con el complejo E-R, no permite concretar mas esta hipótesis, que requerirá de futuros experimentos para ser confrontada.

Abundando en el estudio de los Rn, encontramos que en el caso de útero, sus concentraciones máximas no son significativamente diferentes entre las tres dosis, y que para todas ellas, tras alcanzarse el máximo nivel de concentración se produce el descenso hasta los niveles control. Estas dinámicas de los Rn, sugieren que debe existir una relación entre los máximos de su concentración y la finalización del proceso de acumulación en este compartimento celular.

El retorno de los niveles de receptores citosólicos y nucleares desde los niveles máximos a los del control, no ha sido estudiado en profundidad. Al menos dos teorías son posibles para explicar la disminución de la concentración de Rn. Por una parte = estaría la disminución de Rn como consecuencia de su salida en = forma libre al citoplasma, lo que incluye su posible reutilización, y por otra el que hayan sido objeto de degradación intracelular.

Algunos autores han aportado datos en los que se apunta que

la salida del receptor en forma libre y activa al citosol es posible (MULDOON, 1981). Si esto fuese cierto, en los experimentos aquí presentados debería haberse observado acumulación de receptores en el citosol simultáneamente con la disminución de los receptores nucleares. Las figuras 23, 24 y 25, muestran claramente que las concentraciones de Rc y Rn uterinos sufren aumento y disminuciones simultáneas. Estos hechos sugieren que tal reflujó de receptores no ocurre, o al menos no es decisivo en la evolución temporal de los mismos.

En base a lo anteriormente expuesto, la hipótesis que apoyan los resultados aquí presentados es la apuntada en segundo término, que interpreta el hecho de los descensos finales en la concentración de receptores como consecuencia de un proceso de degradación intracelular. Al ser simultáneos los descensos de Rc y Rn, el proceso degradativo afectará a ambos tipos de receptores. En este sentido, el hecho descrito que el nivel máximo de Rn uterinos es similar en las tres dosis ensayadas y en las dosis de 10 y 500 ng/kg en adenohipófisis, sugiere que tras alcanzarse un determinado nivel de concentración de receptores nucleares se desencadene el proceso degradativo.

Si tal como se expuso anteriormente, los niveles de Rn son atribuibles mayoritariamente y al menos en las dosis más bajas a receptores que han entrado en forma libre al núcleo, es posible que una concentración determinada de esta forma de receptor, sea la señal que desencadene el proceso degradativo.

El desconocimiento actual sobre lo que realmente ocurre a nivel nuclear no nos permite discutir de lleno esta posibilidad. Parece claro que los resultados de estudiar comparativamente los efectos que dosis bajas de estradiol sobre la población de recep

tores celulares, han revelado una dinámica que posiblemente resulte enmascarada cuando se utilizan dosis elevadas, que parecen apoyar esta hipótesis. En este sentido, se precisa de nuevas investigaciones que aborden el estudio de este hecho concreto a través de la medida de otros parámetros.

5.- CONCLUSIONES

- 1.- La inyección de 500 ng E_2 /kg produjo en útero, adenohipófisis e hipotálamo de la rata castrada, un ciclo de variación en la concentración de receptores citosólicos de estrógenos caracterizado por una disminución inicial o depleción, una recuperación posterior o repleción y una acumulación transitoria de un exceso de receptores sobre el nivel basal o sobretiro. La depleción se debe esencialmente a la formación de complejos entre el estradiol y el receptor y su posterior translocación al núcleo. La repleción se produce por la inducción de síntesis de receptor por el propio estradiol. El sobretiro, es debido a la acumulación de receptores sintetizados en exceso durante la estimulación del proceso por el estradiol.
- 2.- El útero respondió con aumento del contenido proteico y de receptores citosólicos a todas las dosis de estradiol ensayadas. La ausencia de depleción de receptor citosólico en las dosis de 1 y 10 ng/kg en este órgano, revela que dicho proceso no es una condición necesaria para que se produzca respuesta celular a la hormona. Sugiere además que la síntesis basal de receptor citosólico podría compensar la menor cantidad de receptores que se complejan con bajas dosis de estradiol e impedir que se manifieste la depleción.
- 3.- La utilización de dosis decrecientes de estradiol evidenció diferencias tisulares en su efecto sobre los receptores citosólicos: la dosis de 500 ng/kg, produjo depleción significativa en útero, adenohipófisis e hipotálamo; la dosis de 10 ng/kg produjo depleción significativa en adenohipófisis e hipotálamo pero no en útero, y la dosis de 1 ng/kg no produjo depleción en ninguno de los tejidos.
Aparentemente, las diferencias tisulares en la intensidad y duración de la depleción de Rc tras una determinada dosis está =

correlacionada con la dotación inicial de receptores y la capacidad de síntesis de receptor, probablemente distinta para cada tejido.

- 4.- El proceso de repleción de receptores citosólicos en útero, adenohipófisis e hipotálamo, fué más rápido cuando menor la dosis = inyectada. Estos resultados sugieren que la acumulación de receptor citosólico en las células depende del balance de dos procesos opuestos: síntesis de receptor inducida por el estradiol y = utilización del receptor para formar complejos con el estradiol= plasmático, cuyo acceso a las células sería más prolongado cuanto mayor fuera la dosis ensayada.
- 5.- Los sobretiros de receptores citosólicos obtenidos fueron más in tensos y más tempranos en todos los tejidos estudiados cuanto = menor la dosis de estradiol administrada. De estos datos no puede deducirse que las dosis bajas estimulen más intensa y tempranamente la síntesis del receptor. Más bien parecen indicar que = las dosis más altas producen una mayor utilización del receptor responsable de que el receptor citosólico no unido al estradiol= se acumule más lentamente.
- 6.- La duración total del ciclo depleción-repleción-sobretiro del re ceptor citosólico, fué proporcional a la dosis de estradiol in-- yectada en todos los tejidos estudiados. De ello puede deducirse que el tiempo durante el que la síntesis de receptor permanece = estimulada depende directamente de la dosis ensayada.
- 7.- Todas las dosis de estradiol utilizadas, produjeron aumento de la concentración de receptores nucleares en útero, adenohipófisis e hipotálamo. Ello implica que dosis tan bajas como 1 ng E₂/kg, in-

ducen translocación de receptores al núcleo.

- 8.- Los niveles máximos de receptor nuclear fueron similares para las dosis de 500, 10 y 1 ng/kg, tanto en útero como en adenohipófisis. La falta de correlación entre la dosis de estradiol inyectada y la concentración de receptores medidos en los núcleos de cada tejido, sugiere que el aumento de receptores nucleares no es debido exclusivamente a la translocación de complejos receptor citosólico-estradiol al núcleo, pues ello implicaría una relación dosis-respuesta en la acumulación de receptores nucleares.
- 9.- La concentración de receptores nucleares en adenohipófisis e hipotálamo, aumenta bruscamente tras la inyección de 500 ng/kg y después desciende paulatinamente. En útero, en cambio, el aumento de receptores nucleares con dicha dosis fué lento y progresivo. La dinámica de los receptores nucleares fué similar en adenohipófisis y útero cuando se ensayaron dosis de 1 y 10 ng/kg. Ello sugiere que adenohipófisis e hipotálamo retienen los complejos estradiol-receptor de forma más lábil que el útero.
- 10.- La inyección de 500 ng $^3\text{H-E}_2$ /kg dió lugar a una acumulación de radioactividad en los núcleos de útero, más rápida, intensa y de dinámica distinta a la acumulación de receptores nucleares después de inyectar 500 ng/kg. Ello permite suponer que parte de los complejos estradiol-receptor citosólicos que se translocan al núcleo se unen a los receptores nucleares de la cromatina de modo tal que quedan inaccesibles a la medida por los métodos utilizados.
- 11.- La inyección de 1 ng E_2 /kg produjo un aumento de receptores nucleares simultáneo con el sobretiro de receptores citosólicos tanto en adenohipófisis como en útero. En las dosis de 10 y 500 ng/kg

coexistieron los procesos de repleción y/o sobretiro con aumento de los receptores nucleares. Estos datos permiten pensar que los receptores citosólicos no unidos al estradiol pueden translocarse al núcleo, al menos durante las fases de estimulación de la síntesis de receptores.

- 12.- El retorno de la concentración de receptores citosólicos y nucleares desde el nivel máximo a los valores basales fué simultáneo en todas las dosis y situaciones experimentales. Ello sugiere la posibilidad de la existencia de un mecanismo de degradación del receptor que opera sobre toda la población de receptores celulares cuando su concentración es alta.
- 13.- La existencia de coincidencias globales entre las dinámicas de acumulación de receptores en el citosol y en el núcleo, durante los procesos de síntesis de receptor, y de disminución simultánea de receptores en ambos compartimentos durante los procesos de degradación, sugiere que la membrana nuclear no es una barrera importante para el receptor estrogénico, que se distribuiría en equilibrio entre dichos compartimentos celulares.
- 14.- El hecho de que el nivel máximo de receptores nucleares en útero fuera similar para las tres dosis ensayadas y que, independientemente del tiempo, una vez alcanzado dicho nivel se produzca el retorno a los niveles basales de receptor citosólico y nuclear, sugiere que una concentración crítica de receptor nuclear unido al estradiol podría inducir el proceso de degradación del receptor y/o inhibir su síntesis.
- 15.- El empleo de dosis de estradiol que producen niveles plasmáticos fisiológicos o subfisiológicos de hormona ha permitido tener ==

acceso a algunos aspectos de la dinámica de los receptores citosólicos y nucleares de estradiol que con frecuencia han pasado desapercibidos en otras investigaciones realizadas usando dosis de estradiol suficientemente altas como para enmascarar los procesos = intracelulares de depleción, síntesis y degradación del receptor.

6.- BIBLIOGRAFIA

- ALBERGA, A. and BAULIEU, E.E. (1974): Mode of action of steroid hormones. En: Advances in Steroid Analysis (II)- Cap.11, pags. 114-153. Proceeding of Second International Symposium on Steroid Analysis.
- ANDERSON, J., CLARK, J.H. and PECK, E.J. (1972): Determination of specific sites by ^3H -oestradiol exchange. Biochem. J. 126:561-567.
- ANDERSON, J.N., PECK, E.J. and CLARK, J.H. (1973): Nuclear receptor estrogen complex: Accumulation, retention and localization in the hypothalamus and pituitary. Endocrinology; 93:711-717.
- ANDERSON, J.N., PECK, E.J. and CLARK, J.H. (1974): Nuclear receptor estradiol complex: a requirement for uterotrophic responses. Endocrinology. 95:174-178.
- BAILLY, A., LEFEVRE, B., SAVOURET, J.F. and MILGROM, E. (1980): Activation and changes in sedimentation properties of steroid receptors. J. Biol. Chem. 255:2729-2734.
- BARRACLOUGH, CH.A., WISE, PH.M., TURGEON, J., SHANDER, D., DEPAULO, L. and RANCE, N. (1979): Recent studies on the regulation of pituitary LH and FSH secretion. Biology of Reproduction, 20:86-97.
- BENSADOU, A. and WEINSTEIN, D. (1976): Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem. 70:241-250.
- BLACK, N.J., JONES, C.D. and GOODE, R.L. (1981): Differential interaction of antiestrogens with cytosol estrogen receptors. Moll. Cell. Endocr., 22:95-103.
- BURGEN, A.J.V., ROBERTS, G.C.C. and FEENEY, J. (1975): Binding of flexible ligands to macromolecules. Nature., 253:753-755.
- BURTON, K. (1956): A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J., 62:315-323.

- CARLSON, R.A. and GORSKI, J. (1980): Characterization of a unique population of unfilled estrogen-binding sites associated with the nuclear fraction of immature rat uteri. *Endocrinology*. 106:1776
- CIDLowski, J.A. and MULDOON, P.G. (1974): Estrogenic regulation of cytoplasmic receptor population in estrogen-responsive tissues of the rat. *Endocrinology*. 95:1621-1629.
- CIDLowski, J.A. and MULDOON, T.G. (1978): The dynamics of intracellular estrogen receptor regulation as influenced by 17-beta-estradiol. *Biol. Reprod.* 18:234-246.
- CLARK, J.H. and PECK, Jr. E.J. (1976): Nuclear retention of receptor-oestrogen complex and nuclear acceptor sites. *Nature*. 260:635-637.
- CLARK, J.H., MARKAVERICH, B.M., UPCHURCH, S., ERIKSSON, H., HARDIN, J.W. and PECK, Jr. E.J. (1980): Heterogeneity of estrogen binding sites; relationships to estrogen receptor and estrogen responses. *Recent Progr. Horm. Res.* 36:89-156.
- CONVEY, E.M. and REECE, R.P. (1969): Influence of the estrous cycle on the nuclei acid content of the rat anterior pituitary. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132:878-880.
- COURVELIN, J.C., BOUTON, M.M., BAULIEU, E.E., NURET, P. and CHAMBON, P. (1976): Effect of estradiol on rat uterus DNA-dependent RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* 251:4843-4849.
- DAVIES, P., SINE, J.S., NICHOLSON, R.I. (1979): Effects of estradiol and the antiestrogen tamoxifen on steroid hormone receptor concentration and nuclear ribonucleic acid polymerase activities in rat uteri. *Endocrinology*. 195:1366-1342.

- DE BOER, W., NOTIDES, A.C., KATZENELLERBOGEN, B.S., HAYES, J.R. and KATZENELLERBOGEN, J.A. (1981): The capacity of the antiestrogen CI-628 to activate the estrogen receptor in vitro. *Endocrinology* 108:206-212.
- DE HERTOGH, R., EKKA, E., VANDERHEYDEN, I. and HOET, J.S. (1971): In vivo observation on reversible binding of estradiol-17 $6,7^3\text{H}$ in rat uterus: measurement of a "biological exchange constant" and of the "tissue capacity". *Endocrinology*. 88:165-174.
- DELETRE, J., MORNON, J.P., OJASOO, T. and RAYNAUD, J.P. (1980): An approach to the mapping of the steroid hormone receptor. En: *Perspectives in Steroid Receptor Research*. Ed. F.Bresciani. Pags. 1-22. Raven Press. N.Y.
- DE SOMBRE, E., HURST, D., KAWASHIMA, T., JUNGBLUT, P.W. and JENSEN, E. (1967): Sulfhydryl groups and estradiol-receptor interaction. *Fed. Proc.* 26:536 (abstr.).
- DE SOMBRE, E. and LYTTLE, C.R. (1980): Specific uterine protein synthesis as a guide to understanding the biologic significance of the estrogen-receptor interaction. En: *Perspectives in Steroid Receptor Research*. Ed. F.Bresciani. Pags. 167-181. Raven Press. N.Y.
- DIAZ CHICO, B.N., DIAZ CHICO, J.C., DIAZ DIAZ, M.E. (1980): Effect of LH-RH, gonadotrophins or sex hormones on protein synthesis in hypothalamus an pituitary of immature female rat in vivo . *Rev. Esp. Fisiol.* 36:249-259.
- DIX, C.J. and JORDAN, V.C. (1980): Modulation of rat uterine steroid hormone receptors by estrogen and antiestrogen. *Endocrinology* 107: 2011-2020.

DUAX, W.L., WEEKS, CH.M. and ROHRER, D.C. (1976): Crystal structure of esterooids: mollecular conformation and biological function. Rec. Prog. Horm. Res. 32:81-116.

ERIKSSON, H., UPCHURCH, S., HARDIN, J.W., PECK, E.J. and CLARK, J.H. (1978): Heterogeneity of estrogen receptor in the cytosol and nuclear fractions of the rat uterus. Biochem. Biophys. Res.Com . 81:1-7.

FANCHENKO, N.D., STURCHAK, S.U., SHCHEDRINA, R.N., PIVNITSKY, K.K., NOVIKOV, E.A. and ISCHKOV, V.L. (1979): The specificity of the human uterine receptor. Acta Endocr. (Kbh) 90:165-167.

FISHMAN, J. (1976): Estrogen metabolism by neuroendocrine tissues. En:Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology. Ed. F. Naftolin, K.J. Ryan and I.J. Davies. Pags. 347-355. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdan.

FOX, T.O. and JOHNSTON, C. (1974): Estradiol receptors from mouse brain and uterus: binding to DNA. Brain Res. 77:330-336.

FOX, T.O. (1977): Conversion of the hypothalamic estradiol receptor to the "nuclear" form. Brain Res. 120:580-583.

GALAND, P., FLANDROY, L. and MAIRESSE, N. (1978): Relationship between the estrogen induced protein I.P. and other parameters of estrogenic stimulation. A hypothesis. Life Sci. 22:217-238.

GORSKI, J., TOFT, D., SHYAMALA, G., SMITH, D. and NOTIDES, A.(1968): Hormone receptors: Studies on the interaction of estrogen with the uterus. Rec. Prog. Horm. Res. 29:45-79.

GORSKI, J. and GANNONG, F. (1976): Current models of steroid hormone action: a critique. Ann. Rev. Physiol. 38:425-451.

- HAAR, M.D.T. and MACKINNON, T.C.D. (1973): Changes in serum gonadotrophin levels and in protein levels and in-vivo incorporation of ^{35}S -methionine into protein of discrete brain areas and the anterior pituitary of the rat during the oestrus cycle. *J. Endocr.* 58:563-576.
- HARDIN, J.W., CLARCK, J.H., GLASSER, S.R. and PECK, Jr.E.J. (1976): RNA polymerase activity and uterine growth: differential stimulation by estradiol, estriol and nafoxidine. *Biochemistry.* 15:1370-1374.
- HAYES, J.R., RORKE, E.A., ROBERTSON, D.W., KATZENELLENBOGEN, B.S. and KATZENELLENBOGEN, J.A. (1981): Biological potency and uterine estrogen receptor interaction of the metabolites of the antiestrogen CI-628 and U23,469. *Endocrinology.* 108:164-172.
- HIROSE, M., TSAI, M. and O'MALLEY, B.W. (1976): Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct: Kinetics of initiation of in vitro transcription on chromatin. *J. Biol. Chem.* 251:1137-1146.
- HSUEH, A.J.W., PECK, Jr.E.J. and CLARK, J.H. (1976): Control of uterine receptors levels by progesterone. *Endocrinology* 98:438-444.
- HUGHES, N.R., COMPTON, J.G., SHRADER, W.T. and O'MALLEY, B.W. (1981): Interaction of the chick oviduct progesterone receptor with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 20:2481-2491.
- JENSEN, E.V. and JACOBSON, H.I. (1962): Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progr. Horm. Res.* 18:387-413.
- JENSEN, E.V. (1968): A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* 59:632-638.
- JENSEN, E.V. and DE SOMBRE, E.R. (1972): Mechanism of action of the female sex hormones. *Ann. Rev. Biochem.* 41:203-230.

JENSEN, E.V. (1979): Interaction of steroid hormones with the nucleus. *Pharmacol. Rev.* 30:477-491.

JENSEN, E.V. and DE SOMBRE, E.R. (1979): Steroid sex hormone receptors and action. En: *Endocrinology*. Ed. Leslie J. de Groot. Pags. 2055-2061. Grune and Stratton. N.Y.

JENSEN, E.V., GREENE, G.L., CLOSS, L.E., DE SOMBRE, E.R. and NADH, M. (1982): Receptor reconsidered: a 20-year perspective. *Recent Progr. Horm. Res.* 38:1-40.

JUNGBLUT, P.W., HUGHES, A., GAVES, J., KALLWEIT, E., MASCHLER, I., PARL, F., SIERRALTA, W., SZENDRO, P.I. and WAGNER, R.K. (1979): Mechanisms involved in the regulation of steroid receptors levels. *J. Steroid Biochem.* 11:273-278.

KALIMI, M., TSAI, S.Y., TSAI, M., CLARK, J.H. and O'MALLEY, B.W. (1976): Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct: correlation between nuclear-bound estrogen receptor and chromatin initiation sites for transcription. *J. Biol. Chem.* 251:516-523.

KAPP, R. and FOX, J.L. (1981): Responses of the anterior pituitary of ovariectomized rats to oestradiol-17 administration. *Acta Endocrinol.* 96:175-181.

KATZENELLENBOGEN, B.S. and GORSKI, J. (1975): Estrogen actions on syntheses of macromolecules in target cells. En: *The Biochemical Actions of Hormones*. Ed. G.Litwack. Pags. 187-238. Academic Press. N.Y.

KATZENELLENBOGEN, B.S., BAKOO, H.S., FERGUSON, E.R., LAN, N.C., TATEE, T., TSAI, T.S. and KATZENELLENBOGEN, J.A. (1979): Estrogen and antiestrogen action in reproductive tissue and tumors. *Recent Progr. Horm. Res.* 35:259-300.

- KELNER, K.L., MILLER, A.L. and PECK, Jr.E.J. (1980): Estrogen and the hypothalamus: nuclear receptor and RNA polymerase activation. *J. Receptor Research.* 1:215-237.
- KELNER, K.L. and PECK, Jr.E.J. (1981): Resolution of estrogen binding species in hypothalamus and pituitary. *J. Receptor Research.* 2:47-62.
- KING, R.J.B., GORDON, J., COWAN, D.M. and INMAN, D.R. (1966): The intranuclear localization of 6,7-³H -oestradiol-17 in dimethylbenzanthracene induced rat mammary adenocarcinoma and other tissues. *J. Endocrinol.* 36:139-150.
- KING, R.J.B. and MAINWARING, W.I.P. (1974): *Esteroid Cell Interaction.* Cap. 7,9. Baltimore. Univ. Park. Press.
- KING, R.J.B. and WHITEHEAD, M.I. (1980): Application of esteroid receptor analyses to clinical and biological investigation of the postmenopausal endometrium. En: *Perspectives in Steroid Receptor Research.* Ed. F.Bresciani. Pags. 259-271. Raven Press. N.Y.
- KORACH, K.S. and FORD, E. (1978): Estrogen action in the mouse uterus: an additional nuclear event. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 83:327-333.
- KORACH, K.S., METZELER, M. and McLACHLAN, J.A. (1979): Diethylstilbestrol metabolites and analogs. *J. Biol. Chem.* 254:8963-8968.
- KORACH, K.S., FOX-DAVIES, C. and BAKER, V. (1980): Differential response to estriol and estradiol in the mouse uterus: correlation to and additional nuclear event. *Endocrinology.* 106:1900-1906.
- KREY, L.C., LIEBERBURG, I., ROY, E. and McEWEN, B.S. (1979): Oestradiol plus receptor complexes in the brain and anterior pituitary gland: Quantitation and neuroendocrine significance. *J. Steroid Biochem.* 11: 279-284.

- LECLERQ, G., HULIN, N. and HEUSON, J.C. (1973): Interaction of activated estradiol receptor complex and chromatin in isolated uterine nuclei. *Eur. J. Cancer.* 9:681-685.
- LEROY, F., PREUMONT, A.M., GALAND, P. and BRACHET, J. (1972): Increased chromatin acid lability and antinomycin D binding in endometrial cells under the action of sex steroids. *J. Endocr.* 52:525-531.
- LIEBERBURG, I., McLUSKY, N. and McEWEN, B.S. (1980): Cytoplasmic and nuclear estradiol-17 binding in male and female rats brain: regional distribution, temporal aspects and metabolism. *Brain Res.* 193:487-503.
- LINKIE, D.M. (1977): Estrogen receptor in different target tissues: similarities of form,disimilarities of transformation. *Endocrinology.* 101:1862-1870.
- LINKIE, D.M. and SIITERI, P.K. (1978): A re-examination of the interaction of estradiol with target cell receptors. *J. Steroid Biochem.* 9:1071-1078.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- LUINE, V.N., KHYLCHEUSKAYA, R.I. and McEWEN, B.S. (1974): Oestrogen effects on brain and pituitary enzyme activities. *J. Neurochem.* 23: 925-934.
- LUINE, V.N., KHYLCHEUSKAYA, R.I. and McEWEN, B.S. (197 a): Effects of gonadal hormones on enzyme activities in brain and pituitary of male and female rats. *Brain. Res.* 86:283-292.

LUINE, V.N., KHYLCHEUSKAYA, R.I. and McEWEN, B.S. (197 b): Effect of gonadal hormones on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. *Brain Res.* 86:293-306.

LUINE, V.N. and McEWEN, B.S. (1977): Effects of an estrogen antagonist on enzyme activities and ^3H -estradiol nuclear binding in uterus, pituitary and brain. *Endocrinology.* 100:903-910.

MAIRESSE, N. and GALAND, P. (1979): Comparison between the action of estradiol and that of the antiestrogen U11-100A on the induction in the rat uterus of a specific protein (the Induced Protein). *Endocrinology.* 105:1248-1253.

MARKAVERICH, B.M., CLARK, J.H. and HARDIN, J.W. (1978): RNA transcription uterine growth: differential effects of estradiol, estriol and nafoxidine on chromatin RNA initiation sites. *Biochemistry.* 17: 3146-3152.

MARKAVERICH, B.M. and CLARK, J.H. (1979): Two binding sites for estradiol in rat uterine nuclei: relationship to uterotrophic response. *Endocrinology.* 105:1458-1462.

MARKAVERICH, B.M., UPCHURCH, S. and CLARK, J.H. (1980): Two binding sites for estradiol in rat uterine nuclei: relationship to stimulation and antagonism of uterine growth. In: *Perspectives in Steroid Receptor Research.* Ed. F.Bresciani. Pags. 143-165. Raven Press. N.Y.

MARTIN, P.M. and SHERIDAN, P.J. (1980): Intra-cellular distribution of estrogen receptors: a function of preparation. *Experientia.* 36: 620-622.

MAURER, H.R. and CHALKEY, G.R. (1967): Some properties of a nuclear binding site of estradiol. *J. Mol. Biol.* 27:431-441.

- McEWEN, B.S. (1976): Interactions between hormones and nerve tissue. *Scientific American*. 235:48-58.
- McEWEN, B., S., PFAFF, D.W., CHAPTAL, C. and LUINE, V.N. (1975): Brain cell nuclear retention of ³H-estradiol doses able to promote lordosis: temporal and regional aspects. *Brain. Res.* 86:155-161.
- MENON, K.N.J. and GUNAGA, K.P. (1976): Cytoplasmic and nuclear receptor-estradiol complex in the hypothalamus and pituitary: relationship with pituitary sensitivity to gonadotrophin releasing hormone and gonadotrophin secretion in the rat. *Neuroendocrinology*. 22:8-17.
- MERCIER, C., ALFSEN, A. and BAULIEU E.E. (1970): Sex steroid binding plasma protein. *Acta Endocrinol. suppl.* 147:204
- MESTER, J. and BAULIEU E.E. (1975): Dynamics of oestrogen-receptor distribution between the cytosol and nuclear fractions of immature rat uterus after oestradiol administration. *Biochem. J.* 146:617-623.
- MILGROM, E., ATGER, M. and BAULIEU E.E. (1973): Studies on estrogen entry into uterine cells and on estradiol-receptor complex attachment to the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta.* 320:267-283.
- MILGROM, E. (1981): Activation of steroid-receptor complex. En: *Biochemical Actions of Hormones*. Vol. III. Pags. 465-492. Cap.7. Academic Press. N.Y.
- MORRIS, I.D. (1976): Changes in brain, pituitary and uterine cytoplasmic oestrogen receptors induced by oestradiol-17 in the ovariectomized rat. *J. Endocrinol.* 71:343-349.
- MULDOON, T.G. (1980): Role of receptors in the mechanism of steroid hormone action in the brain. En: *The Endocrine Function of the Brain*. Ed. Marcella Motta. Cap.4. Pags. 51-93. Raven Press. N.Y.

MJELLER, G.C., HERRANEN, A.N. and JERVELL, K.F. (1958): Studies on the mechanism of action of estrogen. *Recent Progr. Horm. Res.* 14:95-139.

MJELLER, G.C., VONDERHAAR, B., KIM, V.H. and MATHIEU, M.L. (1972): Estrogen action: An inroad to cell biology. *Recent Progr. Horm. Res.* 28:1-49.

MULLER, R.E. and WOTIZ, H.H. (1979): Kinetics of estradiol entry into uterine cells. *Endocrinology.* 105:1107-1114.

MULLER, R.E., JOHNSTON, T.C. and WOTIZ, H.H. (1979): Binding of estradiol to purified uterine plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 254:7895-7900.

MURAYAMA, A., FUKAI, F., HAZATO, T. and YAMAMOTO, T. (1980a): Estrogen receptor of cow uterus: characterization of native and proteolized 4S estrogen receptors. *J. Biochem.* 88:955-961.

MURAYAMA, A., FUKAI, F., HAZATO, T. and YAMAMOTO, T. (1980b): Estrogen receptor of cow uterus: characterization of a cytoplasmic factor which binds with native 4S estrogen receptor to give 8S estrogen receptor. *J. Biochem.* 88:963-968.

MURAYAMA, A., FUKAI, F. and YAMAMOTO, T. (1980c): Estrogen receptor of cow uterus: molecular constitution of estrogen receptors binding factors. *J. Biochem.* 88:969-976.

MURAYAMA, A., FUKAI, F. and YAMAMOTO, T. (1980d): Disorganization and "in vitro" assembly of the constituents of the cytoplasmic estrogen receptor system of cow uterus. *J. Biochem.* 88:1457-1466.

MURAYAMA, A. and FUKAI, F. (1981): Characterization of estrogen receptor, estrogen receptor binding factors and a protease in the nuclei of gilt uterus. *J. Biochem.* 90:823-832.

NAFTOLIN, N., RYAN, K.S. and DAVIES, I.J. (1976): Androgen aromatization by neuroendocrine tissues. En: Subcellular mechanisms in reproductive neuroendocrinology. Ed. F.Naftolin, K.J. Ryan and I.J. Davies. Pags. 347-355. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam.

NIELSEN, S. and NOTIDES, A.C. (1975): Transformation of the rat uterine estrogen receptor after partial purification. *Biochim. Biophys. Acta.* 381:377-383.

NOTIDES, A.C., HAMILTON, D.E. and AUER, H.E. (1975): A kinetics analysis of the estrogen receptor transformation. *J. Biol. Chem.* 250: 3945-3950.

NOTIDES, A.C., LERNER, N. and HAMILTON, D.E. (1981): Positive cooperativity of the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:4926-4930.

O'MALLEY, B.W. and MEANS, A.R. (1974): Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science.* 183:610-620.

O'MALLEY, B.W., and SCHRADER, W.T. (1976): The receptors of steroid hormones. *Sci. Am.* 234:32-43.

PECK, Jr. E.J., PURGNER, J.J. and CLARK, J.H. (1973): Estrofilic binding sites of the uterus. Relation to uptake and retention of estradiol "in vitro". *Biochemistry.* 12:4596

PUCA, G.A. and BRESCIANI, F. (1968): Receptor molecules for estrogen from rat uterus. *Nature.* 218:967-969.

PUCA, G.A., NOLA, E., SICA, V. and BRESCIANI, F. (1971): Estrogen binding proteins of calf uterus. Partial purification and preliminary characterization of two cytoplasmic proteins. *Biochemistry.* 10: 3769-3780.

- PUCA, G.A., NOLA, E., SICA, V. and BRESCIANI, F. (1972): Estrogen binding proteins of calf uterus. intercalation between various forms and identification of a receptor-transforming factor. *Biochemistry*. 11: 4157-4165.
- RAYNAUD, J.P. (1973): Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. *Steroids*. 21:249-257.
- RAYNAUD, J.P. and BOUTON, M.M. (1980): The design of estrogens and /or antiestrogen on the basis of receptor binding. En: *Cytotoxic Estrogen in Hormone Receptive Tumors*. Ed. J. Rans, H. Martins and G. Leclerq. Pags. 49-70. Academic Press. N.Y.
- REJ, R. and RICHARDS, A.H. (1974): Interference by tris buffer in the estimation of protein by the Lowry procedure. *Annal. Biochem.* 62:240-267.
- ROBINSON, J.A. and LEAVIT, W.W. (1972): Estrogen-related changes in anterior pituitary RNA levels. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139:471-475.
- ROCHFORD, H., ANDRE, J., BASKEVITCH, P.P., KALLOS, J., VIGNON, F. and WESTLEY, B. (1980): Nuclear translocation of the estrogen receptor in uterus and mammary tumors. *J. Steroid Biochem.* 12:135-142.
- RODGERS, N.T. and KAUFMAN, D.G. (1981): The measurement of cytosolic estrogen receptors in human endometrial tissue and organ cultures. *J. Steroid. Biochem.* 14:801-806.
- ROSEBAUM, W., CHRISTY, N.P. and KELLY, W. (1966): Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen binding beta-globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26:1399

ROY, E.J. and McEWEN, B.S. (1979): Oestrogen receptors in cell nuclei of the hypothalamus-preoptic area-amygdala following an injection of estradiol or the antiestrogen CI-628. *J. Endocrinol.* 83:285-293.

RUH, T.S. and BAUDENTISTEL, L.J. (1977): Different nuclear binding sites for antiestrogen and estrogen receptor complexes. *Endocrinology.* 100:420-426.

RUH, T.S. and BAUDENTISTEL, L.J. (1978): Antiestrogen modulation of the salt-resistance nuclear estrogen receptor. *Endocrinology.* 102: 1838-1846.

SCATCHARD, G. (1949): The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660-672.

SCHNEIDER, (1957): Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. En: *Methods of Enzymology.* Vol.III, Pags. 680-684. Ed. S.P. Colowick and N.O. Kaplan. Academic Press. N.Y.

SHERIDAN, P.J., BUCHANAN, J.M., ANSELMO, V.C. and MARTIN, P.M.(1979): Equilibrium: the intracellular distribution of steroid receptors. *Nature.* 282:579-582.

SIITERI, P.K. and FEBRES, F. (1979): Ovarian hormone synthesis, circulation and mechanism of action. En: *Endocrinology.* Vol. III. Cap.110: Pag. 1041. Ed. L.J. De Groot. Grune and Stratton. N.Y.

SMITH, D.E. and GORSKI, J. (1968): Estrogen control of uterine glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 243:4169-4174.

SPELGBER, T.C., STEGGES, A.W. and O'MALLEY, B.W. (1971): Progesterone binding component of chick oviduct. III. Chromatin acceptor sites. *J. Biol. Chem.* 246:4188-4197.

SPONA, J., LEIBL, H. and BIEGLEMAYER, C. (1980a): Nuclear translocation of estrogen-receptor complex and stimulation of RNA synthesis by estrogens of different biological potencies in the female rat pituitary. *Biochim. Biophys. Acta.* 607:189-200.

SPONA, J., BIEGLEMAYER, C. and LEIBL, H. (1980b): Estrogen interaction with the anterior pituitary of female rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 633:361-375.

SPOONER, P. and GORSKI, J. (1972): Early estrogen effects on lipid metabolism in the rat uterus. *Endocrinology.* 91:1273-1283.

STORMSHAK, F., LEAKE, R., WERTZ, N. and GORSKI, J. (1976): Stimulatory and inhibitory effects of estrogen on uterine DNA synthesis. *Endocrinology.* 99:1501-1511.

STUMPF, W.E. (1968): Estradiol-concentrating neurons: topography in the hypothalamus by dry mount autoradiography. *Science.* 162:1001-1003.

SZEGO, C.M. and ROBERTS, S. (1953): Steroid action and interaction in Uterine Metabolism . *Recent. Progr. Horm. Res.* 8: 419-469.

TALLEY, D.J., LI, J.J., LI, S.A. and VILLEE, C.A. (1975): Biochemical comparison of estrogen receptors of the hamster hypothalamus and uterus. *Endocrinology.* 96:1135-1144.

TENG, C.S., HAMILTON, T.H. (1968): De role of cromatin in estrogen action in the uterus. I. The control of template capacity and chemical composition and the binding of ³H-estradiol-17-beta. *Proc. Nat. Sci. USA.* 60:1410-1417.

TOFT, D. and GORSKI, J.(1966): A receptor molecule for estrogen: Isolation from rat uterus and preliminary identification. Proc. Nat. Acad. Sci. 55:1574-1581.

TSAI, M., TOWLE, H.C., HARRIS, S.E. and O'MALLEY, B.W. (1976): Effects of estrogen on gene expression in the chick oviduct: comparative aspects of RNA chain initiation in chromatin using homologous versus escherichia coli RNA polymerase. J. Biol. Chem. 251:1960-1968.

VIC, P., GARCIA, M., ANDRE, J., HUMEAU, C. and ROCHEFORD, H. (1978): Modifications ultrastructurales precoces de la chromatine induite par les oestrogen dans l'endometre et les cancers du sein hormono dependants. C.I. Acad. Sci., Paris. 287:141-144.

WESTLEY, B.W. and ROCHEFORD, H. (1979): Estradiol induced proteins in the MCF₇ human breast cancer cell line. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90:410-417.

WHITE, J.O. and LIM, L. (1978): The estrogen receptor in the rat hypothalamus: nuclear responses to oestrogen administration. Biochem. Soc. Trans. 6:1310-1312.

YAMAMOTO, K.R. and ALBERTS, B.M. (1972): In vitro conversion of estradiol receptor protein to its nuclear form: dependence on hormones and DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69:2105-2109.

YAMAMOTO, K.R. and ALBERTS, B.N. (1976): Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription. Ann. Rev. Biochem.45:723-746.

YUH, K.M. and KEYES, P.L. (1979): Properties of nuclear and cytoplasmic estrogen receptor in the rabbit corpus luteum: evidence for translocation. Endocrinology. 105:690-696.