

Tesis de Posgrado

Aspectos comparativos de los receptores de corticoides en médula espinal e hipocampo

Moses, Daniel Fernando

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Moses, Daniel Fernando. (1991). Aspectos comparativos de los receptores de corticoides en médula espinal e hipocampo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2403_Moses.pdf

Cita tipo Chicago:

Moses, Daniel Fernando. "Aspectos comparativos de los receptores de corticoides en médula espinal e hipocampo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2403_Moses.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ASPECTOS COMPARATIVOS DE LOS RECEPTORES
DE CORTICOIDES EN MEDULA ESPINAL E HIPOCAMPO

Autor: DANIEL FERNANDO MOSES

Director: Dr. ALEJANDRO F. DE NICOLA

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL
Obligado 2490, Buenos Aires

Tesis presentada para optar al
Titulo de Doctor en Ciencias Quimicas

AÑO 1991

Tesis.
2403
ej. 2.

**A mis Padres
pues sin ellos
no hubiese podido**

A Patricia y Nicolas
Porque me acompañaron
en todo momento.

A mis Amigos

Deseo agradecer a:

- Mi Director de Tesis, Dr. Alejandro F. De Nicola, por depositar su confianza en mí, por haberme guiado en este difícil camino, brindándome todo su apoyo.
- Dr Virgilio G. Foglia, Director del Instituto de Biología y Medicina Experimental.
- Dr Charreau, por haberme conectado con el mundo científico, en mis años de estudiante.
- Dr. Osvaldo Fridman, por haberme acompañado en mis primeros pasos.
- Eduardo Ortí y Héctor Coirini, por su calidéz y compañerismo.
- Ana María Magariños, con la que discutí numerosas veces los resultados experimentales, brindándome su valioso consejo.
- Susana "Peti" González y Mónica "Méneca" Ferrini, por haberme tranquilizado en momentos de pánico y por su alegría constante.
- Claudia "Mamá" Grillo, Gerardo "Papá" Piroli y Santiago Vallée, la gente linda del "19", por su ayuda permanente.
- Elsa di Matteo, por su inestimable colaboración.
- Claudia Heller, Liliana Weisenberg y Silvia Tornello, compañeras de laboratorio durante los primeros años.
- Lino Barañao, mi Consejero de Tesis, por su interés, amistad y consejo.
- Las "chicas" de Biblioteca, María Teresa Di Vietro y María Laura Pisano, por su gran ayuda en momentos de confusión. Sin duda son las mejores Bibliotecarias del mundo.
- Todo el personal del Instituto, por su compañerismo.
- Al "Tano" Nicolini, mi primer profesor de química.
- A la Lic. Zulma Maggi

INDICE

| | |
|--|-----------|
| CAPITULO I: INTRODUCCION GENERAL..... | 1 |
| Introducción General..... | 2 |
| Estructura y función de los corticoides..... | 5 |
| Estructura química..... | 5 |
| Biosíntesis..... | 7 |
| Transporte..... | 8 |
| Acciones fisiológicas..... | 10 |
| Generalidades..... | 10 |
| Efectos en SNC..... | 13 |
| Retroalimentación negativa de GC en SNC..... | 16 |
| Glucocorticoides y médula espinal..... | 16 |
| Glucocorticoides e hipocampo..... | 18 |
| Mecanismos de acción de los GC..... | 22 |
| Receptores de GC..... | 22 |
| Estructura de los receptores de GC..... | 28 |
| Transformación del receptor de GC..... | 40 |
| Receptores de GC en el SNC..... | 46 |
| Receptores en Médula Espinal..... | 48 |
| Heterogeneidad de los sitios receptores en SN..... | 48 |
| Papel fisiológico de los diferentes sitios receptores en SN..... | 51 |
| Anatomía y función del HC y ME..... | 54 |
| Sistema nervioso..... | 54 |
| Células del SN..... | 54 |
| Bioquímica del sistema nervioso..... | 57 |
| Anatomía y función de ME..... | 59 |
| Anatomía de ME..... | 59 |
| Función de la ME..... | 63 |
| Anatomía y función del HC..... | 65 |
| El HC y los receptores de GC..... | 67 |
| | |
| CAPITULO II - COMPARACION DE LOS RECEPTORES DE GC EN EL HC Y LA ME..... | 68 |
| Introducción..... | 69 |
| Materiales y Métodos..... | 71 |
| Animales de experimentación..... | 71 |
| Diseción de la ME y del HC..... | 71 |
| Captación nuclear de (³ H)-CORT..... | 73 |
| Determinación de condiciones de incubación que minimicen el intercambio..... | 74 |
| Ocupación de los receptores celulares luego de inyecciones de CORT..... | 77 |
| Incubación con inhibidores de la transformación-translocación..... | 78 |

| | |
|---|------------|
| Efecto de la enzima ARNsa sobre la unión del complejo HR a ADN-celulosa..... | 79 |
| Ensayos con ARN..... | 79 |
| Determinación de la unión del complejo HR a ADN-celulosa..... | 80 |
| Resultados | 82 |
| Captación de (³ H)-CORT in vivo..... | 82 |
| Determinación de ID50 in vivo..... | 82 |
| Inhibidores endógenos..... | 83 |
| Acción de la enzima ARNsa A..... | 86 |
| Bloqueo de la acción de la ARNsa mediante el uso de ARN..... | 91 |
| Discusión..... | 94 |
| | |
| CAPITULO III - HETEROGENEIDAD Y TRANSFORMACION DE LOS RECEPTORES DE GC EN LA ME Y EL HC..... | 100 |
| Introducción..... | 101 |
| Materiales y Métodos | 103 |
| Animales de experimentación..... | 103 |
| Marcación de sitios receptores en SNC..... | 103 |
| Ensayos de saturación..... | 110 |
| Unión de los subtipos I y II a ADN-celulosa..... | 112 |
| Análisis estadístico..... | 114 |
| Curvas de competencia..... | 114 |
| Cromatografía en columnas de ADN-celulosa..... | 115 |
| Medición de la concentración de K ⁺ por conductimetría..... | 119 |
| Resultados | 120 |
| Curvas de competencia con RU-28362..... | 120 |
| Ensayos de punto único..... | 124 |
| Ensayos de saturación..... | 128 |
| Transformación de los subtipos de receptores y sensibilidad a ARNsa..... | 130 |
| Cromatografía en ADN-celulosa..... | 132 |
| Discusión..... | 136 |
| | |
| CAPITULO IV - PARAMETROS DE UNION DE LOS SITIOS TIPO II EN HC Y ME..... | 144 |
| Introducción..... | 145 |
| Materiales y Métodos | 147 |
| Animales de experimentación..... | 147 |
| Experimentos de saturación..... | 147 |
| Cálculo de parámetros. Análisis estadístico y computacional..... | 149 |
| Resultados | 154 |
| Experimentos de saturación..... | 154 |
| Simulaciones por computadora..... | 161 |
| Simulando variaciones en la concentración del competidor..... | 163 |
| Discusión..... | 170 |

CAPITULO V - ACCION DE QUELANTES DE METALES DE TRANSICION SOBRE LA TRANSFORMACION DE LOS RECEPTORES DE GC EN HC Y ME......179

Introducción......180

Materiales y Métodos......182

Animales de experimentación.....182

Marcación de sitios receptores en SNC.....182

Determinación de la unión del complejo HR a ADN-celulosa.....183

Tratamiento estadístico.....184

Resultados......185

Influencia del EDTA a la unión de receptores totales a ADN-celulosa.....185

Influencia de la O-Fenentrolina en la unión de receptores totales a ADN-celulosa.....187

Acción del EDTA sobre la unión de sitios tipo II a ADN-celulosa.....187

Discusión......192

CAPITULO VI - CONCLUSIONES FINALES......195

BIBLIOGRAFIA......208

TRABAJOS PUBLICADOS QUE SE PRESENTAN EN ESTA TESIS......227

ABREVIATURAS

| | | |
|-------------------|-------|--|
| (³ H) | | Prefijo que indica producto tritiado |
| aa | | Aminoácido/s |
| ACTH | | Adrenocorticotrofina |
| ADN | | Acido Desoxiribonucleico |
| ADX | | Adrenalectomía/Adrenalectomizado |
| ALDO | | Aldosterona |
| AMP | | Adenosina-5'-monofosfato |
| AMPc | | Adenosina-3',5'-monofosfato ciclico |
| ANOVA | | Análisis de la Varianza |
| AR | | Receptor sensible a Andrógenos |
| ARN | | Acido Ribonucleico |
| ARNsa | | Enzima Ribonucleasa (A o T) |
| ATP | | Adenosina-5'-trifosfato |
| BSA | | Albumina Bovina Sérica |
| CBG | | Transcortina |
| CORT | | Corticosterona |
| CRF | | Factor liberador de Adenocorticotrofina |
| DEAE | | Dietilaminoetano |
| DEX | | Dexametasona |
| DOC | | Desoxicorticosterona |
| EDTA | | Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético |
| ER | | Receptor sensible a Estrógenos |
| GABA | | Acido gama-aminobutírico |
| GC | | Glucocorticoide |
| GR | | Receptor sensible a Glucocorticoides |
| GRE | | Elementos de respuesta a Glucocorticoides |
| h | | Prefijo que indica de origen humano |
| HC | | Hipocampo |
| HDL | | Lipoproteínas de alta densidad |
| HR/H-R | | Complejo hormona receptor |
| Hsp90 | | Proteína Heat Shock de peso molecular 90 KDa |
| i.p | | Intra peritoneal |
| i.v | | Intra venoso |
| ID50 | | Concentración inhibitoria al 50% |
| Ka | | Constante de afinidad |
| KCl | | Cloruro de potasio |
| Kd | | Constante de disociación |
| KDa | | KiloDaltons |
| LDL | | Lipoproteínas de baja densidad |
| LRF | | Factores reguladores controlados por ligando |
| MC | | Mineralocorticoide |
| ME | | Médula Espinal |
| MR | | Receptor sensible a Mineralocorticoides |
| MTV | | Virus del tumor mamario |

POMC.....Proopiomelanocortina
PR.....Receptor sensible a Progesterona
RU-26752.....3-(3'-oxo-7' α -propil-17' β -hidroxi-androstan-4'
-en-17' α il)-propionolactona
RU-26988.....11 β ,17 β -dihidroxi-17 α -(1'-propionil)-androstan
-1,4,6-trien-3-ona
RU-28362.....11 β ,17 β -dihidroxi-6-metil-17 α -(1'-propionil)
-androstan-1,4,6-trien-3-ona
s.c.....Subcutáneo
SN.....Sistema nervioso
SNC.....Sistema nervioso central
TA.....Acetónido de triamcinolona
wt.....Tipo salvaje o "wild type"

INTRODUCCION

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL

El complejo conjunto de fenómenos que operan a nivel de un ser viviente supone no sólo un número extenso de reacciones, sino también una sutil y eficiente interrelación entre éstas. A nivel molecular ello significa que cualquier transformación de una sustancia en otra, dentro de cualquier célula viva, se encuentra perfectamente coordinada con la etapas precedentes y sucesivas, de manera tal que, en todos los casos los niveles de cualquier metabolito se adecuan a los requerimientos celulares en un momento dado.

Los organismos multicelulares han seguido una estrategia de adaptación al medio que implica la agrupación y la diferenciación en la cual cada célula cumple papeles determinados. Conjuntos de células que cumplen una misma función se constituyen en tejidos y así diferentes tejidos se conjugan como órganos, dentro de un organismo multicelular complejo como son los mamíferos. La interrelación entre las diferentes células del mismo o distintos tejidos y órganos es un mecanismo primordial para la supervivencia de los organismos multicelulares. Esta interrelación implica la existencia de vías de comunicación entre las mismas células del conjunto. Las formas

de comunicación entre las diferentes células es muy variada, así como también la información intercambiada. Un tipo de transmisión es el protagonizado por mensajeros hormonales que, en respuesta a cierta clase de estímulo, un tejido secreta. Estas sustancias poseen estructuras muy específicas y hacen las veces de señal que puede ser captada por receptores celulares sensibles a estas hormonas y que se encuentran en células distantes de aquellas que originaron la señal [1].

El sistema nervioso central (SNC), como tejido altamente especializado, no escapa a los mecanismos de interrelación. El cerebro es muy sensible a los niveles de distintas hormonas que circulan por sangre [2]. Descubrimientos como la neurosecreción por Speidel (1919) o Scharrer (1928), y los hallazgos del control nervioso y neurohumoral de la hipófisis por parte de Popa y Fielding (1930), han sentado las bases de la neuroendocrinología y la visión del cerebro como glándula secretora de hormonas y neurotransmisores [3].

Una definición de hormona propuesta por Huxley en 1935, que pone énfasis en la función biológica de las mismas, indica que estas sustancias se deben considerar primeramente como moléculas que transfieren información de un grupo de células a otro, para el bienestar de la población celular en su conjunto.

Existen diferentes tipos de hormonas entre las cuales se encuentran las hormonas esteroideas, las cuales derivan todas de un precursor común que es el colesterol. Este grupo de hormonas incluye a los Glucocorticoides (GC), Mineralocorticoides (MC), Progesterona, Estrógenos y Andrógenos. Todo este conjunto de sustancias hormonales poseen efectos biológicos diferentes entre sí que dependen en cierta medida de su estructura química.

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS CORTICOIDES

ESTRUCTURA QUIMICA

Químicamente, se considera como glucocorticoides (GC) a las moléculas del grupo del cortisol y la corticosterona (CORT). En cambio la 11-desoxicorticosterona (DOC) es considerada como un mineralocorticoide (MC) puro. La figura I.1 indica las estructuras planas de los corticoides mencionados, que muestran características comunes como son: un grupo ceto en C3, doble enlace entre C4-C5, un grupo ceto en C20 y un grupo hidroxilo en C21. El grupo hidroxilo en el C11 parecería marcar la diferencia entre MC y GC. La aldosterona (ALDO), que es MC casi 100 veces mas potente que DOC, posee al igual que los GC un hidroxilo en C11 (fig. I.1), pero el grupo aldehido en el C18 hace que la forma aldehídica o forma abierta de la molécula esté en equilibrio con tautómeros cíclicos en los cuales el C18 reacciona con los hidroxilos estéricamente cercanos. En los fluidos biológicos el equilibrio se halla desplazado hacia uno de los tautómeros, verificándose, entonces, la ausencia del grupo ubicado en el C11 de la molécula de MC [4].

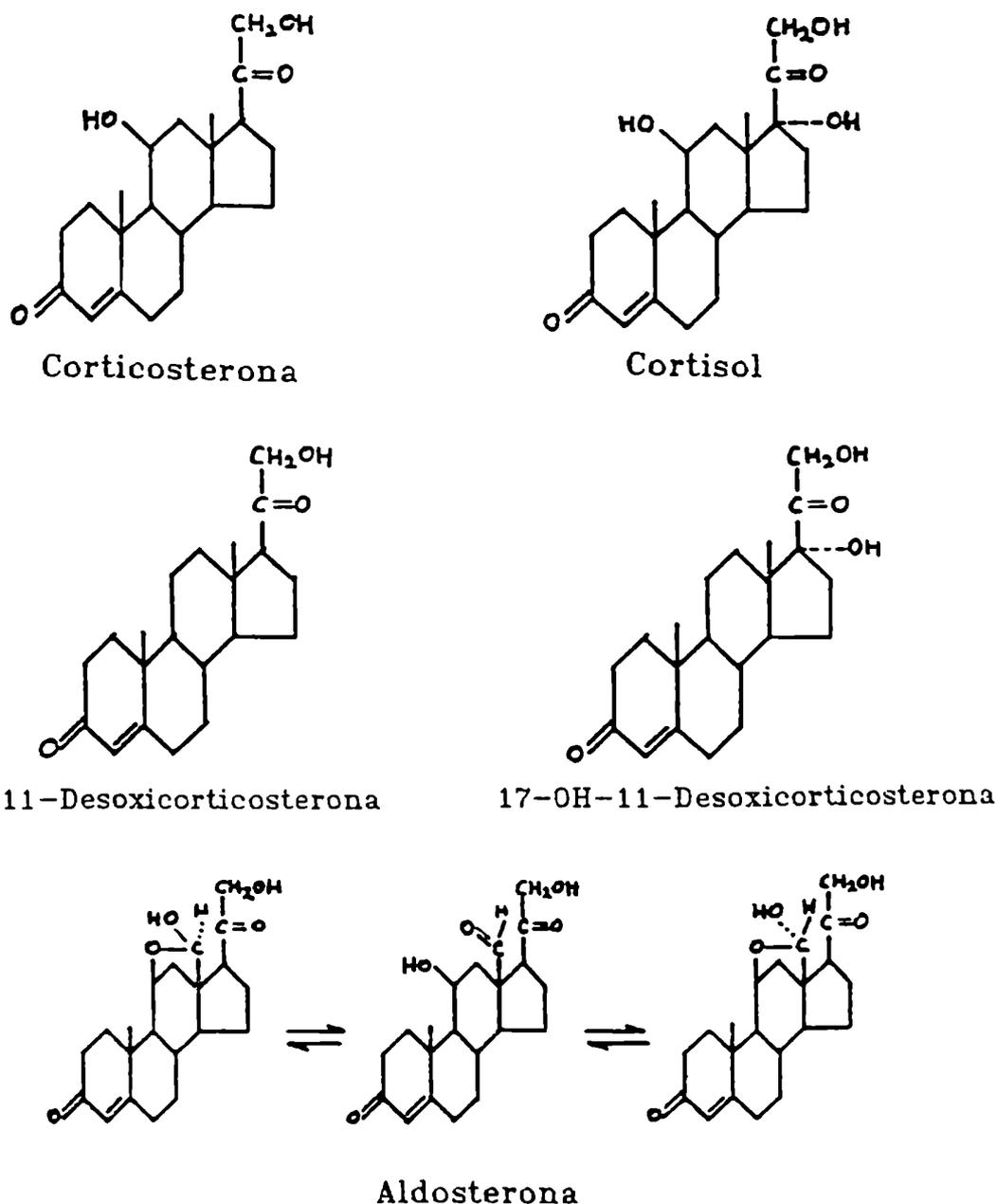


Figura I.1: Estructuras planas de los corticoides. Las hormonas Corticosterona y Cortisol son glucocorticoides (GC), siendo la primera el GC principal de la rata. 11-desoxicorticosterona y 17-hidroxi-11-desoxi-corticosterona son mineralocorticoides (MC), pero menos potentes que Aldosterona (ALDO), que se muestra en sus formas abierta y cíclica [4].

BIOSINTESIS

La corteza adrenal es la glándula endócrina encargada de la producción de los GC y MC. Esta se encuentra dividida en tres zonas morfológicas, zona glomerulosa, fasciculada y reticular. Las zonas fasciculada y reticular son las encargadas de la biosíntesis de los GC bajo el control hipofisario que ejerce la hormona adrenocorticotrofina (ACTH). La zona glomerulosa, relativamente independiente de ACTH, produce MC. El origen sintético de todas las hormonas esteroideas es el colesterol, molécula que posee 27 átomos de C, que puede ser captado por el tejido esteroideogénico desde la sangre (tal vez la vía primordial) vía lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL), o ser sintetizado de novo a partir de acetato. El colesterol aportado a las células por las lipoproteínas, se esterifica con ácidos grasos y se deposita en el citoplasma en forma de gotas lipídicas, éstas se hidrolizan a colesterol libre por acción de la colesterol esterasa y es admitido que el colesterol libre es el precursor activo de las hormonas adrenales.

La síntesis de GC comienza por la ruptura de la cadena lateral del colesterol por parte de un sistema multienzimático mitocondrial que α -hidroxila en C20 y C22 y luego una desmolasa rompe la unión entre los dos átomos de C mencionados dando lugar

a la pregnenolona mas ácido isocaproico. La formación de cortisol y corticosterona tiene lugar por la acción concertada de enzimas mitocondriales y microsomales a partir de la pregnenolona que da lugar a la progesterona (vía delta 4) o bien a la 17 α -hidroxipregnenolona (vía delta 5). A partir de esta última se forma cortisol, mientras que en especies animales que no tienen la enzima 17 α -hidroxilasa (ratón y rata) la progesterona origina la corticosterona (CORT) [5].

TRANSPORTE

Dado el carácter hidrofóbico de la mayoría de los corticoides adrenales, éstos son transportados por la sangre unidos a proteínas plasmáticas. Las fuerzas involucradas en esta asociación son uniones puente hidrógeno e hidrófobas, es decir, no covalentes. La introducción de hidroxilos y grupos carbonilo al esqueleto de la molécula de los corticoides, aumenta la polaridad de la misma y tiende a disminuir la proporción de hormona unida a proteínas del plasma. Esto último se llama *Regla de la Polaridad*, que indica que cuanto mas polar es un esteroide, menor es su tendencia a asociarse con proteínas transportadoras, lo cual significa que la CORT tiene mayor tendencia a unirse a proteínas que el cortisol, y éste a su vez mayor tendencia que la ALDO.

El complejo entre el GC y las proteínas séricas está en equilibrio dinámico, ya que existe una proporción de hormona que no está unida a proteína y que por lo tanto viaja libre en plasma. Tres son las proteínas encargadas del transporte de GC: albúmina, α -1-glicoproteína ácida y transcortina (CBG). La afinidad de éstas por los GC depende de la temperatura, siendo mayor a 4°C que a 37°C. El cortisol y CORT se unen preferentemente a CBG; cuando los niveles de cortisol plasmático, que normalmente están dentro del rango de 10-20 μ g/dl, superan los 30-40 μ g/dl, el exceso de hormona se une a albúmina. En condiciones basales el cortisol se halla unido a transcortina en un 77.3%, mientras que la albúmina une 15% y el 7.7% restante está libre.

La importancia de las proteínas séricas transportadoras de GC radica en que la hormona biológicamente activa es la que está libre, y no la que se halla unida a proteínas. Este hecho se manifiesta en la mayor potencia biológica de los esteroides sintéticos que no se unen a CBG y circulan libres en sangre [5,6]. Algunos laboratorios le asignan a las concentraciones de proteínas transportadoras en sangre una función adicional dada la existencia en tejido periférico y cerebro de heterogeneidad en la población de sitios receptores para GC. Esta heterogeneidad implica la existencia de más de un sitio de unión para CORT en

varias especies estudiadas, es decir que dicha hormona se une con alta afinidad a sitios receptores típicos de MC tanto como a sitios específicos de GC, estos últimos inclusive con menor afinidad. La regulación del acceso de CORT o ALDO a los receptores estaría dado, entre otros factores, por los niveles de CBG en sangre, e indirectamente por la cantidad de CORT unido a CBG, en tanto que ALDO tendría una proporción mayor de hormona libre *activa* capaz de unirse a receptores [7-9].

ACCIONES FISIOLÓGICAS

Generalidades

Los GC son hormonas sistémicas que regulan el metabolismo en la mayoría de las células de los mamíferos. El término Glucocorticoide se originó al comprobarse que estas hormonas regulaban el metabolismo hidrocarbonado, aún cuando muchas funciones no estén en relación con los hidratos de carbono.

Sus acciones se pueden clasificar en *anabólicas* y *catabólicas*, aunque esta clasificación no encuadra numerosas funciones dentro del sistema nervioso central (SNC), las que comentaremos más adelante. Las acciones anabólicas o de síntesis son ejercidas principalmente en el hígado, riñón y pulmón. En el

hígado hay gluconeogénesis a partir principalmente de aminoácidos. Promueve la captación de aminoácidos circulantes, la inducción de transaminasas que convierten los aminoácidos en α -cetoácidos que son los precursores de la glucosa. Además promueven la síntesis de enzimas claves de la gluconeogénesis y de la síntesis de glucógeno, induciendo la deposición de glucógeno en el hígado y la liberación de la glucosa recién formada a sangre. Estas acciones, en conjunto con la inhibición de la captación de la glucosa por tejidos periféricos, causan hiperglucemia y pueden originar diabetes esteroidea si existen niveles elevados durante lapsos prolongados [5,8,10].

En el riñón, los GC son también gluconeogénicos y además activan la filtración glomerular. En el pulmón, la acción anabólica se manifiesta por la aceleración de la maduración del órgano en el feto mediante la inducción de la producción de dipalmitoilfosfatidil-colina, un surfactante pulmonar. Adicionalmente suprimen la inflamación, inhibe numerosas reacciones inmunes e inhibe secreción de hormonas y neuropéptidos [10].

Los efectos catabólicos incluyen la proteólisis en músculo, tejido linfoideo, tejido conectivo y hueso, además de la lipólisis en el tejido adiposo (tabla I.A).

Tabla I.A: Efectos estimulantes e inhibitorios de los GC.

=====

Efectos estimulantes

1. Depósito de glucógeno en hígado
2. Gluconeogénesis a partir de aminoácidos en hígado
3. Captación hepática de aminoácidos circulantes
4. Transaminasas hepáticas
5. Biosíntesis de proteínas en el hígado
6. Lipólisis en tejido adiposo
7. Formación de cuerpos cetónicos
8. Filtración glomerular renal
9. Eritropoyesis y leucopoyesis
10. Secreción estomacal (ácido clorhídrico y pepsina)
11. Elevación de la presión arterial
12. Resistencia al estrés
13. Propiedades cardiotónicas
14. Crecimiento y maduración del pulmón fetal

Efectos inhibitorios

1. Captación de glucosa por células periféricas
2. Metabolismo proteico en músculo, hueso y tejido linfoideo
3. Lipogénesis en tejido adiposo
4. Reabsorción tubular renal de agua
5. Número de eosinófilos, basófilos y linfocitos en sangre
6. Crecimiento del tejido linfático normal y patológico
7. Síntesis de matriz ósea (osteoporosis)
8. Respuesta inmunitaria
9. Respuesta anti-inflamatoria y anti-alérgica
10. Secreción de CRF y ACTH
11. Supresión de mediadores: citoquinas, prostanoides, quininas, serotonina

=====

{Modificado de A.F.De Nicola, en "Endocrinología Molecular" (R. S. Calandra y A.F.De Nicola editores). El Ateneo, Buenos Aires, pp. 199-219 (1985)}.

Todos los efectos enunciados son de difícil interpretación a la hora de unificarlos para entender o hallar el factor común que subyace en las acciones mencionadas [10]. La idea que se tenía hace algunos años era que los glucocorticoides se liberaban a circulación ante una amenaza a la homeostasis corporal con la función de ayudar o exacerbar los mecanismos corporales encargados de contrarrestar los efectos causados por el estrés. Actualmente se cree que la acción de estas hormonas tienden a **suprimir** los mecanismos defensivos corporales para evitar que una reacción prolongada de éstos produzca, paradójicamente, daño al mismo organismo que los había generado como respuesta ante factores estresantes [8,10]

Efectos en SNC

Los corticoides disparan una multitud de efectos en el SNC, éstos van desde la regulación del crecimiento celular y diferenciación a alteraciones en la actividad electrofisiológica de las neuronas. Es sabido que los corticoides también influyen en los patrones de comportamiento animal y humano. Por ejemplo, se ha determinado una relación entre niveles altos de corticoides en sangre y cuadros depresivos en humanos [11]. Por otro lado, debido a la multiplicidad de efectos ejercidos por los corticoides en SNC, la distinción clásica entre GC y MC en base a

los efectos desencadenados en tejidos periféricos podría no ser apropiada o adecuada cuando se habla de los mismos en este sistema [12].

El SNC es capaz de captar esteroides adrenales, entre ellos CORT. La captación de hormonas por el cerebro ha sido estudiada mediante la inyección de cantidades trazadoras de hormonas radioactivas. La zona más importante en la acumulación de corticoides, derivada de los estudios de captación realizados, es la zona límbica, siendo además el sitio de acción más importante [12,13]. Con el objeto de ejercer su acción en el SNC, los corticoides deben atravesar la barrera hematocefálica. Estudios realizados por Perdridge y Mietus [14] indican que el pasaje de dichas hormonas por la barrera es del tipo no saturable y probablemente ocurra mediante difusión simple, dadas las características liposolubles de estas hormonas.

Los GC tienen efecto inhibitorio en el crecimiento y proliferación de células nerviosas. El efecto más notorio es una disminución en el peso tisular de cerebro y cerebelo de ratas [15,16], y además hay disminución del contenido de ADN en dichos tejidos, pero esta menor cantidad de ácidos nucleicos es debida a menor división celular y no a necrosis del tejido, tanto nervioso como de glía [17,18]. Además de inhibir la proliferación celular,

la administración de GC retarda el desarrollo del árbol dendrítico [19] y podrían interferir en la normal formación de sinápsis, también se ha visto que suprime la mielogénesis en el sistema nervioso en desarrollo. La administración neonatal de GC a ratas provocan el atraso en la maduración de potenciales evocados [20] y cambios en los patrones de comportamiento en la natación [21]. Estos animales sufren polidipsia [22] y problemas de regulación de la glucemia [23].

A nivel molecular los GC inducen numerosas enzimas de neuronas o de glía. Estimulan la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa en tejidos derivados de la cresta neural [12], también aumenta la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa en una línea celular de neuroblastoma derivada de ratón [24,25], estimula la acetilcolinesterasa y la colina-acetiltransferasa particularmente en cerebelo [12,26] y también la glicerol fosfatodeshidrogenasa y la ornitina descarboxilasa [12,27]. Además activan la síntesis de glutamina sintetasa en astrocitos [28].

Los GC modulan la transmisión sináptica excitatoria y inducen el aumento de síntesis de serotonina [25], modulan la recaptación de GABA ya que animales adrenalectomizados presentan un aumento de la recaptación del neurotransmisor, efecto revertido por la administración de CORT [25].

Retroalimentación negativa de GC en SNC

En cuanto a la regulación de la síntesis y secreción de CRF y ACTH, por parte de los GC, éstos cumplen un rol muy importante y muy estudiado respecto de su acción en el SNC. Desde luego, la regulación de la liberación de ACTH por parte de los GC está dada principalmente, en tejidos extranerviosos, en la adenohipófisis, la cual es sensible a altas concentraciones de GC circulantes [2]. En este tejido, la síntesis/procesamiento y secreción de productos derivados de la proopiomelanocortina (POMC) está bajo control inhibitorio de los GC, los que actúan a nivel genómico suprimiendo la expresión del gen de la POMC [29]. Dentro del SNC la regulación por retroalimentación negativa, que ejercen los GC, está centrada en el hipotálamo, influyendo en la síntesis y liberación de CRF [30], y también en áreas extrahipotalámicas, principalmente el hipocampo, zona extremadamente sensible aún a bajos niveles de hormonas circulantes [2,31].

Glucocorticoides y Médula Espinal

La ME es capaz de concentrar distintos esteroides como estradiol, andrógenos y corticosterona, tanto en rata como en pollo [32-36]. Correlacionado con estos resultados, se observan una variedad de acciones de los GC en esta región del SNC. Por

ejemplo, estas hormonas modulan la actividad de la enzima γ -Glutamil Transpeptidasa, involucrada en el transporte de aminoácidos, en ME en desarrollo de pollo [37]. Además se observó que los GC modularían la recaptación de 5-hidroxi-Triptamina (5-HT) en ME de gato [38], también se comprobó que al administrarse dosis agudas de corticoides a esta especie, aumentaban los niveles de 5-HT, dopamina y noradrenalina en la ME a la hora de haber comenzado el tratamiento [38] y a las 24 hs del tratamiento los niveles de estos neurotransmisores en ME eran menores que en los controles; tal vez por acción de la hormona sobre la enzima monoamino oxidasa [38]

Cuando se emplea acetónido de triamcinolona (TA) se observa que éste provoca un aumento en la velocidad de recuperación de neurotransmisores almacenados, respecto de controles [39]. Por otro lado los GC actúan sobre la actividad electrofisiológica de la ME. Los reflejos segmentados de la ME constituyen un arco reflejo que en su forma más simple involucra una sinápsis y dos neuronas o sea lo que se conoce como reflejo monosináptico. Tratamientos agudos o crónicos con GC afectan las funciones reflejas en ME de gato [39].

Los GC son usados amplia y rutinariamente en el tratamiento de traumatismos de la ME [44]. Las lesiones en dicha

zona del SNC produce una variedad de efectos degenerativos progresivos [41-45], entre ellos procesos autodestructivos [42]. Las acciones benéficas de los GC en dichos traumas serían en parte por su acción inhibitoria en la peroxidación de los lípidos de membrana, disminución de la formación de radicales libres inducida por lesiones, y por aumento en la actividad de la ATPasa Na⁺-K⁺ dependiente.[43,44,46]. Las dosis empleadas entran dentro del orden de 20 mg/Kg de peso, dosis altas, y algunos autores cuestionan dicha terapia por la falta de efectos beneficiosos respecto de los efectos colaterales de las dosis de corticoides empleadas [44]. Hall et. al. analizan parámetros fisiológicos en ME dañadas, como el flujo sanguíneo en ME, y encuentran que dosis de GC sintéticos del orden ya mencionado produce mejoras en dichos parámetros pero dosis muy altas (60 mg/Kg) son menos efectivas que las dosis menores (30 mg/Kg) [43].

Glucocorticoides e Hipocampo

Distintas áreas cerebrales acumulan corticoides, en particular CORT en ratas, pero el HC se destaca mostrando la mayor sensibilidad para captar y retener hormona aún con bajos niveles de CORT circulante [8]. Si bien numerosas enzimas del SNC y en especial del HC no se ven afectadas por los GC, algunas como la enzima glicerol-fosfato deshidrogenasa está influenciada por

estas hormonas. Esta enzima es preponderantemente glial y está relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono. El transporte de GABA en terminales nerviosas presinápticas del HC se vieron afectadas por los GC o la falta de los mismos en animales ADX, mientras que otras terminales de distintas áreas cerebrales no se vieron afectadas por los GC. Este efecto estaría relacionado con la remoción de GABA de sitios presinápticos luego de su liberación [8].

Las hormonas adrenales afectan el metabolismo de la 5-HT, mientras que la remoción de las adrenales (ADX) disminuye el *turnover* de 5-HT en HC, el suministro de GC activa la enzima triptofano hidroxilasa, que regula el metabolismo de dicha amina. Aquí los GC aparecen como factores facilitadores de la génesis de sistemas neuronales conteniendo 5-HT [8].

La acción de los GC en el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal está muy estudiada [2,30,31]. Fuera del hipotálamo el HC juega un papel muy significativo en la regulación de la secreción de ACTH [2]. Lesiones en el HC mostraron ciertas alteraciones en el funcionamiento del eje hipófiso-adrenal [2], cuando se extrae el HC se demostró una reducción en la sensibilidad del eje al GC sintético DEX [31,47], y lesiones en dicha zona del SNC inducen un aumento de la secreción, basal y en situación de estrés, de GC

[2]. Asimismo, la hipocampectomía produce aumento de la secreción de CRF y ACTH, y del ARNm para CRF en el núcleo paraventricular [31,48], lo que testifica que el HC cumple una función inhibitoria en el funcionamiento del eje.

Otra acción de los GC en el HC es la regulación de la acción del péptido intestinal vasoactivo (VIP) cerebral en la acumulación de AMPc en el HC. Se puede decir que el HC es un sitio de interacción entre neuropéptidos y los GC [2].

Por otro lado los GC están involucrados en el envejecimiento y degeneración del tejido nervioso del HC [49]. Una exposición prolongada a GC, ya sea exógenos o endógenos, en concentraciones dentro del límite superior del rango fisiológico, lleva a pérdida de células nerviosas, en especial las neuronas piramidales, ésto acompañado de proliferación glial e infiltración [49]. La acción de los GC, sobre la degeneración neuronal en HC, sería facilitatoria o coadyuvante de los efectos tóxicos de conocidos citotóxicos como el compuesto 3-acetil piridina o de generadores de radicales libres [49]. Estas demostraciones se correlacionarían con los hallazgos en ratas viejas, en las que existen niveles elevados de GC circulantes, asociados a pérdida neuronal hipocámpica y astrogliosis [50]. A

nivel humano, se asemejan al HC del enfermo con Alzheimer, los que presentan pérdida de neuronas del HC, aumento de los GC circulantes y resistencia a la inhibición con DEX [51].

MECANISMOS DE ACCION DE LOS GC

Todos los efectos producidos por los GC en las células llamadas blanco son mediados a nivel celular por receptores intracelulares específicos. En 1968 Munck y col. hacen referencia por primera vez a la existencia de sitios receptores para GC en tejidos sensibles a estas hormonas [52,53].

RECEPTORES DE GC

Conceptualmente, el receptor hormonal es una macromolécula capaz de unir sustancias biológicamente activas (hormonas o fármacos) produciendo una respuesta fisiológica como resultado de esa acción. Esta definición conlleva dos conceptos independientes: uno estructural que involucra el reconocimiento hormona-receptor y su interacción, y el otro es la activación de la respuesta celular producto de la interacción anterior. Un receptor, para definirlo como tal, tiene que cumplir ciertos requisitos como ser: saturabilidad, baja capacidad, alta afinidad por la hormona, y especificidad, entre otros conceptos [1].

Los receptores de hormonas esteroides son proteínas heteroméricas intracelulares que en el caso de los GC se acepta actualmente que se ubican en el citoplasma cuando no están unidos a hormona [40,52-55].

La unión de hormona al receptor es requisito previo para que se disparen distintos eventos intracelulares. Un modelo de estos eventos utilizado actualmente es el que se muestra en la figura I.2 [52]. Este modelo está sustentado por numerosa evidencia [54,56,57] e implica diferentes pasos, los cuales son importantes en la mediación del efecto final de la hormona en la célula blanco [52]. Como se comentó anteriormente, las hormonas esteroides viajan por sangre unidas mayoritariamente a proteínas plasmáticas y la fracción activa es la que viaja libre, en equilibrio con la unida a transportadores [5,6]. El paso siguiente involucra la entrada de la hormona al interior de la célula. El proceso de entrada de la hormona a la célula sería, según algunos autores, por difusión simple a través de la membrana plasmática [52,54], aunque existen evidencias de la existencia de transporte facilitado [58]. Una vez en el interior de la célula la hormona se une a su receptor. Como ya se mencionó, la interacción hormona-receptor posee características especiales (leer más arriba), una de ellas es la alta afinidad del receptor por la hormona específica que permite, aún en bajas concentraciones de hormona intracelulares, que el receptor interaccione y una al esteroide (en particular al GC) [52]. En general, la constante de disociación de los receptores de hormonas esteroides (la inversa de la constante de afinidad) está

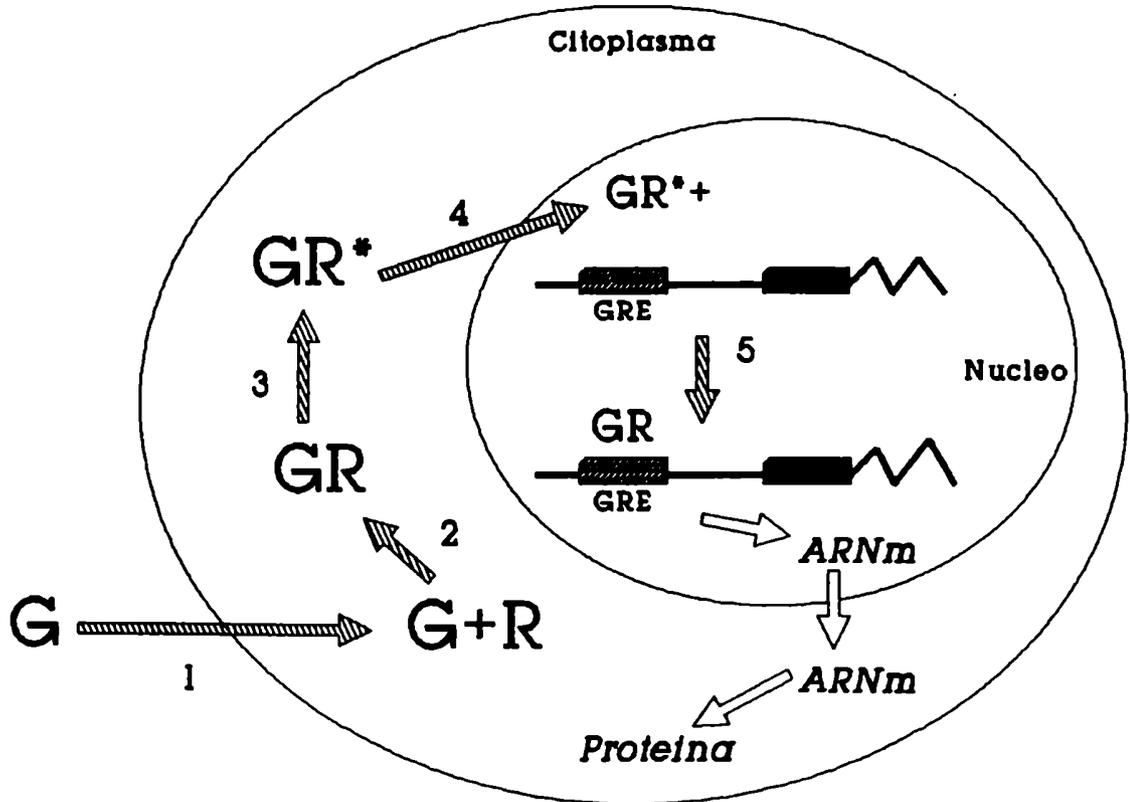


Figura 1.2: Modelo cíclico de la acción de los GC en una célula blanco. Los pasos indicados son los siguientes: 1) entrada y captación de la hormona (G) por la célula; 2) unión de la hormona a su receptor (R); 3) transformación del complejo hormona-receptor; 4) translocación al núcleo; 5) asociación del complejo con sitios específicos del genoma (GRE) [52].

en el orden de 1-20nM según el tejido [57,59,60], la cual está dentro del rango de las concentraciones fisiológicas de hormonas en sangre [52]. Otra característica es la alta especificidad de los sitios receptores por la hormona correspondiente, en este caso por los GC, lo que implica que posee baja afinidad por hormonas esteroideas diferentes como progesterona o estradiol (fig. I.3) [32,61,62].

La tercera etapa de este modelo involucra la adquisición por parte del complejo hormona-receptor, recién formado, de la capacidad de unirse a ADN. Este proceso se llama **transformación** [52,54,63,64]. En ausencia de hormona el receptor normalmente no interactúa o no puede adquirir la capacidad de interactuar con ADN [52], aunque existen trabajos que señalan la existencia de receptores sin hormona asociada unidos a ADN (null receptors) [55,65]. Por lo general se acepta que el receptor sin hormona unida no interactúa con ADN y que por lo tanto es inactivo [52]. A la transformación del receptor le sigue el proceso de translocación del complejo al núcleo. Debido al PM del receptor (aprox 97 KDa) el cual es mayor que 70 KDa, límite para la entrada al núcleo por difusión simple, existirían mecanismos de importación del mencionado complejo al interior del núcleo [52]. Existen trabajos que muestran la presencia de señales de localización nuclear dentro de la estructura aminoacídica del

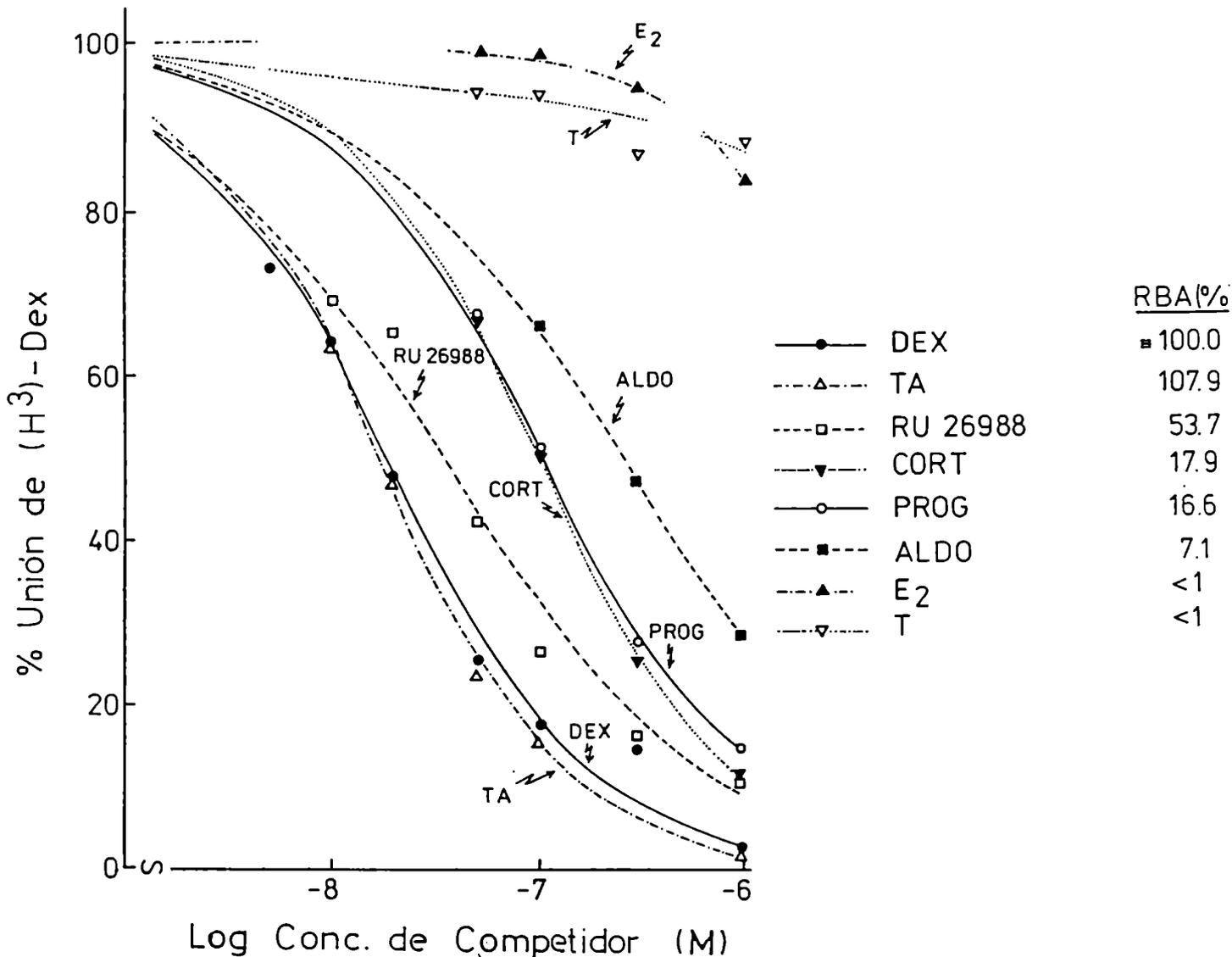


Figura 1.3: Competición de la unión de (³H)DEX en citosol de ME. Citosol con (³H)DEX 10 nM se incubó en buffer TEMG con molibdato 20 mM sin o con un rango de 10-1000 nM de los siguientes competidores: DEX, TA, RU-26988, CORT, progesterona (PROG), ALDO, estradiol (E₂) y testosterona (T). En la figura se graficó el % de unión del ligando tritiado vs el log de la concentración del competidor (M). La afinidad relativa de unión (RBA) para cada competidor se muestra debajo del gráfico. El valor RBA para DEX se tomó como 100% {Tomado de Ortí, E., Tesis Doctoral, 1985}.

receptor de GC [66,67], que permitirían al complejo ingresar al núcleo. También es posible que la asociación del receptor con ciertos tipos de ARN [68-70] permitan tal importación [67,71]. Adicionalmente se encontró que los receptores de GC están asociados indirectamente al sistema de microtúbulos intracelular de células intactas, a través de proteínas unidas al receptor denominadas Hsp 90 o proteínas *heat shock* de 90 KDa [72,163].

Finalmente, dentro del núcleo, los complejos hormona-receptor se unen a sitios específicos del genoma llamados elementos de respuesta a GC (GRE) [52,54,65,73]. Estas secuencias de bases que se encuentran dentro del ADN, regularían la velocidad de iniciación de la transcripción de grupos de genes determinados, actuando sobre secuencias promotoras cercanas. Estos elementos GRE son grupos de secuencias consenso del tipo TGTTCT [52,54,74]. También existen trabajos que mencionan acciones posttranscripcionales de los receptores de GC [54], que involucran la estabilización de ARNm recién sintetizados [52].

Existen modelos del ciclo de los receptores para GC que involucran los eventos posteriores, y poco estudiados, luego de la acción genómica de los complejos hormona-receptor, esto es el retorno al citoplasma y la posterior adquisición de capacidad de unión a un nuevo esteroide [55].

Estructura de los Receptores de GC

La estructura de los receptores para hormonas esteroideas en general y para GC en particular fue y es objeto de intenso estudio. Actualmente se considera que el receptor de GC no transformado, es decir sin hormona unida, es un oligómero heterólogo que contiene un solo sitio de unión del esteroide, con un peso molecular de aproximadamente 300 KDa que posee adosadas distintos tipos de proteínas que no unen esteroide [55,72].

Los primeros pasos en la determinación de dicha estructura implicaron la utilización de técnicas de digestión con diferentes tipos de proteasas y condiciones controladas de reacción [52,54,56,75]. Principalmente se utilizaron tripsina y quimiotripsina que dieron lugar o permitieron definir tres fragmentos o dominios dentro del receptor de GC (fig I.4), un dominio que une hormona esteroide, otro que se une a ADN y el tercero y menos conocido que se denominó dominio inmunológico ya que los anticuerpos contra los receptores reconocían esta porción de la proteína [56]. El receptor nativo tiene un PM de

Dominios del Receptor de GC

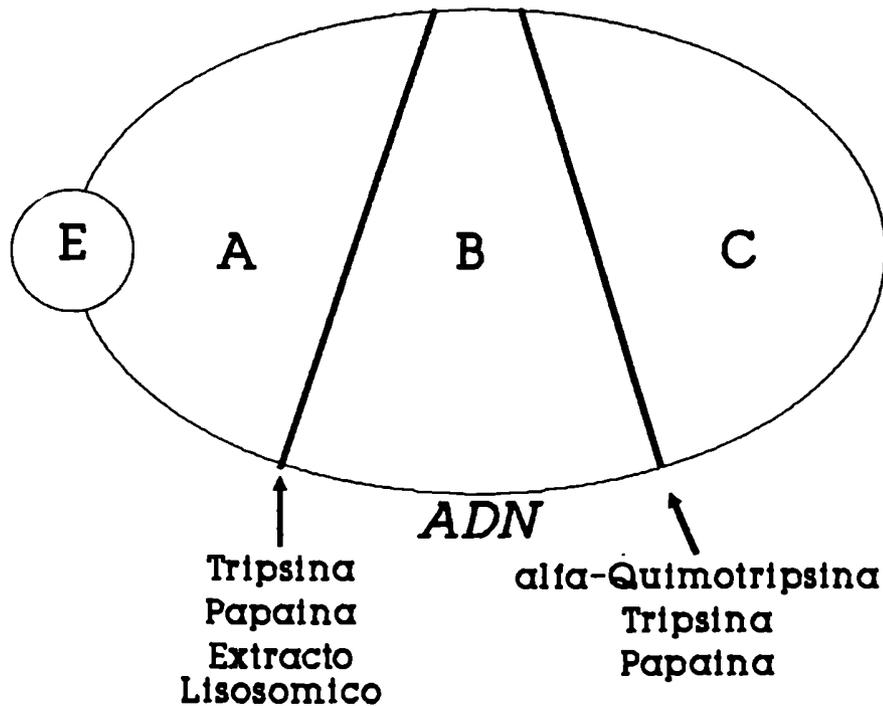


Figura I.4: Dominios del receptor de GC. El receptor presenta tres dominios, cuyas propiedades son: A) contiene el sitio de unión para ligando; B) contiene el sitio de unión para ADN y C) contiene el determinante inmunológico. Los tres dominios pueden separarse por acción enzimática y de extractos lisosómicos. Tomado de Carlstedt-Duke y col. [56].

aproximadamente 97 KDa [52,56]. La acción de las proteasas dio lugar a un fragmento del receptor de PM aprox. 27 KDa que podía unir esteroide pero no tenía afinidad alguna por ADN y no daba reacción con anticuerpos anti-receptor, por lo que se estaba en presencia de la porción A (fig I.4) [52,54,56]. Una proteólisis mas suave daba lugar a un fragmento de receptor, de PM aprox. 32 KDa, capaz de unir al ligando y que poseía afinidad por ADN pero no reaccionaba con anticuerpos [56]. De los tres dominios expuestos en la figura I.4 el único que reacciona con los anticuerpos es el C por lo que se dedujo que dicha porción del receptor sería la más expuesta o más superficial de la molécula del receptor [52]. Trabajos de Gustafsson y col. definieron que el dominio A está sobre el extremo carboxi terminal de la molécula, el dominio que une ADN se encuentra adyacente al dominio A y el dominio C o inmunogénico es el que ocupa el resto del receptor hasta el extremo amino terminal [54,75].

Con el advenimiento de las técnicas de ingeniería genética y del clonado de secuencias de proteínas celulares, se pudo obtener con más detalle información sobre la estructura de los receptores de hormonas esteroides. Con el clonado del gen del receptor de GC [65,76,77], se obtuvo la secuencia completa de aminoácidos y la ubicación de los dominios de unión a esteroide y ADN [52,65,73]. La zona de unión a esteroide, en el caso de los

receptores de GC humanos, comprende los aa 528 a 777 (fig I.5), ya sabemos que ésto es en el extremo carboxi-terminal del receptor [52]. Al comparar receptores de distintas hormonas esteroides en cuanto a la conservación de la secuencia aminoacídica en esta zona de la estructura proteica, las diferencias son moderadas principalmente debidas a las diferencias en estructura química de los distintos ligandos correspondientes a cada receptor [65]. En esta zona se encuentra la especificidad estructural por un determinado esteroide. Si se modifican aminoácidos de esta porción de la molécula por mutaciones puntuales de los genes correspondientes, se observan cambios importantes en la afinidad del receptor resultante por el ligando correspondiente [54]. Adicionalmente, en esta zona se encuentran grupos sulfidrilo reducidos (SH-) que son importantes para la interacción ligando receptor, ya que al usar reactivos que los oxidan o bloquean el receptor no puede unir al esteroide [78,79]. Los análisis de la estequiometría de la reacción de unión del ligando al receptor, revelan que existe un solo sitio de unión a esteroide por molécula de receptor nativo [54].

La zona adyacente al dominio de unión al esteroide corresponde, como ya dijimos, a la porción que une ADN. Esta

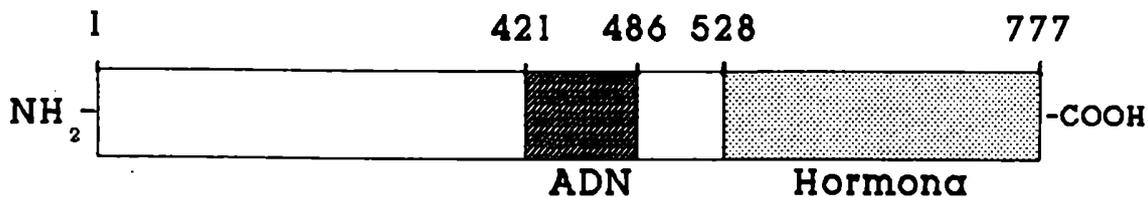


Figura I.5: Diagrama esquemático del receptor de GC humano. Se señalan las localizaciones de los dominios de unión a ADN (aa 421-486) y de unión a esteroide (aa 528-777), sobre la porción carboxi-terminal de la molécula. El aminoácido 1 se ubica en el extremo amino-terminal y el aminoácido 777 sobre el extremo carboxi-terminal. Tomado de Distelhorst [52].

porción del receptor comprende unos pocos aminoácidos, entre 65 a 85 aa, y se encuentra en la mitad más cercana al extremo carboxi-terminal [52,65,80]. La composición aminoacídica de esta zona del receptor ha sufrido muy pocas variaciones no sólo entre diferentes tipos de receptores, sino entre receptores similares de muy diferentes especies animales, en otras palabras es una zona cuyo código está altamente conservado [65]. En esta sección de la estructura del receptor se encuentran secuencias de aminoácidos que reconocen sitios específicos dentro del genoma celular, a los cuales se unen. Estos sitios de unión dentro del ADN de la célula se llaman GRE [65]. Analizando los aminoácidos que componen esta zona de unión al ADN se encuentra que está enriquecida en cisteínas y lisinas ordenadas en patrones repetitivos, las cuales forman estructuras específicas de unión al genoma llamadas *Zinc fingers* o dedos de zinc [52,80]. Estas estructuras han sido reconocidas en numerosas proteínas que poseen la capacidad de unirse al ADN, ya sean receptores o no, y que poseen propiedades regulatorias de la transcripción genética [81]. Esta capacidad de regular la transcripción, en la medida que los receptores estén unidos a ligando, es un factor común de toda la familia de los receptores de hormonas esteroideas.

La existencia de estas estructuras de unión al genoma celular, ha recibido confirmación por numerosos trabajos que

indican el requerimiento de Zn para la unión del complejo hormona-receptor al ADN o al menos la sensibilidad de esta unión a la concentración de conocidos quelantes de los metales de transición como EDTA u o-fenantrolina [52,81-83]. Un dato adicional lo provee la necesidad, también en esta porción del receptor, de grupos sulfidrilo reducidos para que se pueda unir al ADN [78,79]. Numerosas proteínas reguladoras nucleares, las cuales no son receptores, poseen esta estructura de unión al ADN, que consiste en los *zinc fingers* [81].

Además de la familia de receptores de hormonas esteroideas clásicas, existen otros receptores que no pertenecen estrictamente a este grupo pero que poseen también un dominio de unión al ADN de estructura similar a los anteriores y con un alto grado de homología con ellos. Estos receptores adicionales corresponden a los de la hormona tiroidea, vitamina D (es un esteroide), ácido retinóico y dioxina [52,65,73,80]. Adicionalmente, el dominio de unión al ADN del receptor de GC también tiene un alto grado de homología con el producto del oncogen *erb-A*, el cual como protooncogen codifica para el receptor de la hormona tiroidea [52]. Estas observaciones han llevado a proponer una gran familia o superfamilia de receptores que involucra a los de las hormonas esteroideas clásicas y los ya mencionados en este párrafo (fig I.6). Todos los miembros de esta

superfamilia regulan la transcripción de determinados genes o grupos de genes, dependiendo de la presencia o no del ligando correspondiente y se los llama genéricamente Factores Reguladores Controlados por Ligando o LRFs [65]. Como su nombre lo indica, estas moléculas intracelulares regulan los procesos nucleares sólo si la presencia del ligando las dispara.

Una propiedad muy interesante de esta familia de receptores es que los dominios de unión de ligando y de ADN se comportan en forma independiente [65,73]. Esta conclusión está dada por lo siguiente: mediante manipulaciones genéticas se han construido pseudo receptores que consisten en el dominio de unión a ADN del receptor de GC y el dominio de unión del ligando correspondiente al receptor de estradiol, y se estudió el comportamiento de la molécula sobre un gen dado (*reporter gene*) que poseía el promotor del virus del tumor mamario (MTV), conocido promotor regulado por los GC. El resultado consistió en que la transcripción del gen estaba a cargo o regulada por estradiol en lugar de por CORT [65], además en ausencia de estradiol dicho gen no se transcribía. Este resultado indica hasta qué punto los dos dominios analizados son independientes entre sí pero necesarios para la completa acción de los

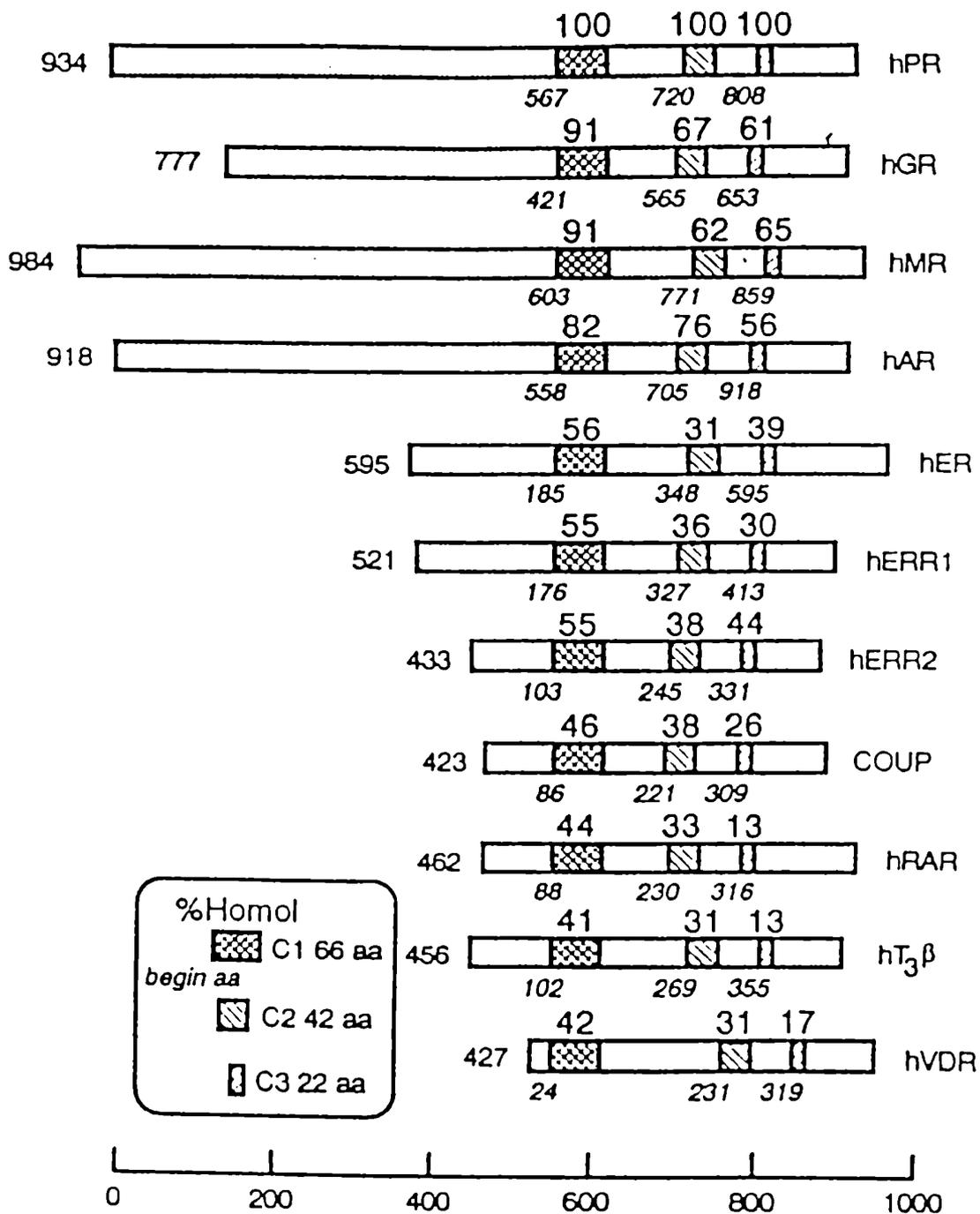


Figura I.6: Diagrama esquemático de los distintos receptores miembros de la familia de receptores o LRFs. En la figura se incluyen los receptores de progesterona humano (hPR), GC humano (hGR), MC humano (hMR), androgenos humano (hAR), estradiol humano (hER), ácido retinoico humano (hRAR), hormona tiroidea humano (hT₃β) y el receptor de la vitamina D humano (hVDR). Los receptores hERR1, hERR2 y COUP no tienen ligando conocido. Se señalan los grados de homología de las distintas moléculas y, a la izquierda, la cantidad de aminoácidos. Tomado de Carson-Jurica y col. [84].

receptores ya que sin ligando no hay unión al ADN ni regulación de la expresión genética. En el caso que se delecione la parte que une la hormona, el receptor mutado es capaz de unirse a ADN y de regular la transcripción de los genes específicos pero sin necesidad de la presencia del ligando [80].

Por último, la porción del receptor menos conocida es la zona o dominio inmunológico ubicado en el extremo amino-terminal del receptor de GC [52,73,75]. Esta zona podría modular la función del receptor y se la ha rebautizado dominio regulatorio [73], ya que mutaciones en esta porción de la molécula del receptor provocan alteraciones en la actividad del receptor. Por otro lado, la eliminación total de este dominio no bloquea por completo la acción del receptor [52]. De las tres porciones en que se dividió el receptor ésta es la de mayor variabilidad entre los diferentes tipos de sitios receptores de esteroides y registra la presencia de gran proporción de aminoácidos ácidos [65].

A la estructura básica del receptor se asocian distintas moléculas, protéicas y no protéicas, que de alguna manera intervienen en la función del mismo. La más conocida es una proteína de peso 90 KDa con características idénticas a las proteínas llamadas heat shock protein 90 (Hsp 90), encontradas

asociadas al receptor en pollo [85], por lo tanto se acepta que dicha proteína es del tipo Hsp 90 [52,55,73]. Según trabajos de Munck y col., el receptor de GC lleva asociadas dos moléculas Hsp 90 (fig. 1.7)[55,73]. Estas proteínas, muy abundantes en el citoplasma celular, estarían asociadas al citoesqueleto [72], y cumplirían una función en el proceso de transformación de la molécula receptora ya que las proteínas Hsp 90 se encuentran asociadas a ésta en situaciones previas a la transformación. Al unirse la hormona y producirse la transformación, las Hsp 90 se separarían de la molécula receptora [52,55,73].

Otra molécula asociada al receptor sería un tipo de ácido ribonucleico (ARN). Numerosos trabajos indican que porciones de ARN se encuentran unidos al receptor de GC y de otras hormonas esteroides, y que cumpliría un papel importante en la transformación del receptor [68-71,86-89]. Así, la acción de enzimas ARNsas aumenta la cantidad de complejo hormona receptor unido a ADN-celulosa [36,68,86,90]. Vedekis y col. habrían identificado el tipo de ARN asociado con el receptor como ARN de transferencia (ARNt) [70]. Existen otros trabajos que especulan con la posibilidad de que el ARN asociado intervendría en la importación del receptor de GC al núcleo [71].

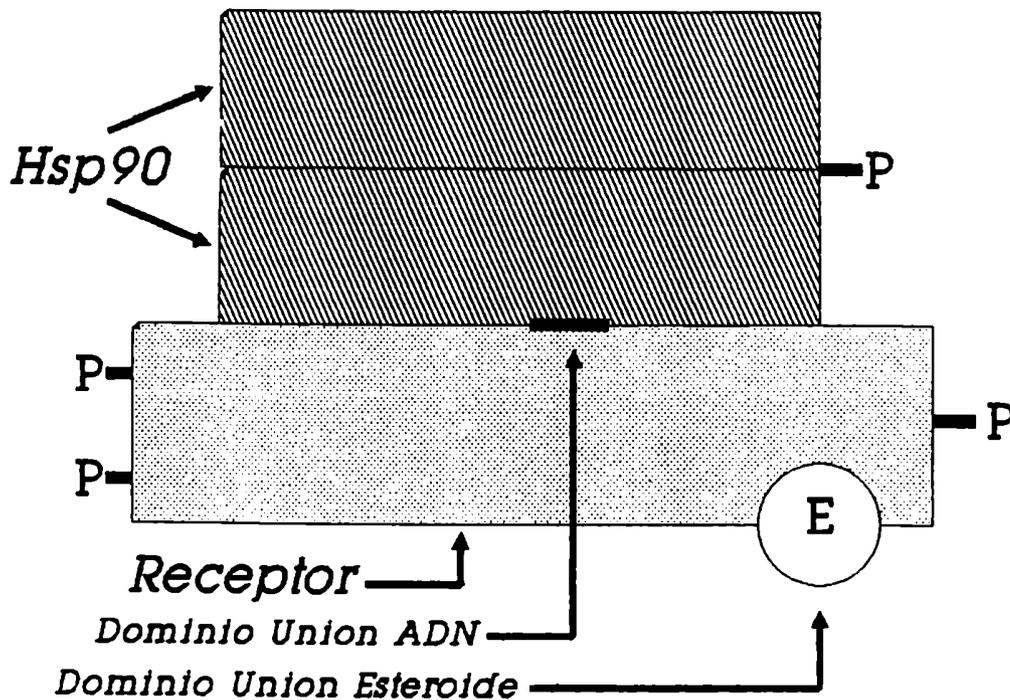


Figura I.7: Esquema de un receptor de GC en estado previo a la transformación. En este esquema se puede observar la presencia de las proteínas Hsp 90 unidas al receptor tapando el dominio de unión a ADN. El receptor de GC propiamente dicho, el cual lleva unidas tres moléculas de fosfato, pesa aproximadamente 100 KDa. Tomado de Munck y col. [73].

También existen evidencias de asociaciones de otras proteínas al receptor, una de aprox 59 KDa y otra de aprox 72 KDa. Todavía no han sido caracterizadas y su función se desconoce [54,73].

Transformación del receptor de GC

Como mencionamos en secciones anteriores, se acepta que el receptor cuando no está unido a ligando, se encuentra en el citoplasma y no asociado a ADN [52]. La estructura del receptor en este estado es la que se esquematiza en la figura I.7 [55,73].

La unión del ligando, en este caso GC, dispara los procesos posteriores, entre ellos la transformación del mismo, que terminan por regular la transcripción de diferentes genes en la célula efectora [65]. Esencialmente el proceso de transformación del receptor implica el pasaje de un estado de baja afinidad por ADN, a un estado con capacidad de unirse a ADN [52]. Este proceso se puede reproducir en experimentos *in vitro* y este cambio se refleja en el comportamiento del complejo hormona-receptor en cromatografías con columnas de DEAE-celulosa, ADN-celulosa, Carboximetil-celulosa, ATP-sefarosa (fig I.8), ya que adquiere una alta afinidad por polianiones [32,91,92]. Se considera que el complejo H-R sufrió un cambio conformacional

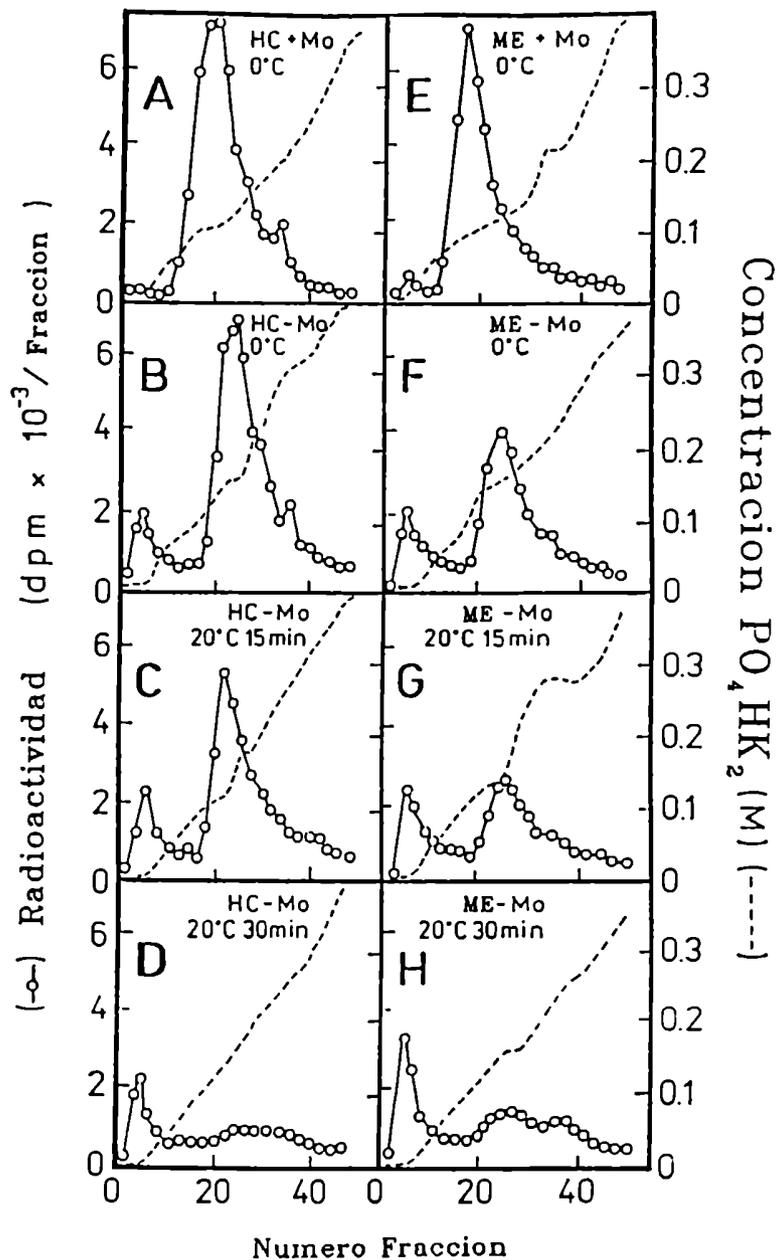


Figura 1.8: Separación de complejos transformados y no transformados por cromatografía en DEAE-celulosa. Los citosoles de ME (paneles E-H) y de HC (paneles A-D) fueron preparados en TEMG con molibdato de sodio (factor que inhibe la transformación, paneles A y E), para obtener los complejos no transformados, o en TEMG sin molibdato de sodio (paneles B-D y F-H). Los citosoles se incubaron con (^3H)DEX y luego se sometieron a condiciones de transformación, para finalmente sembrar en columnas de DEAE-cel. equilibradas con buffer TEMG. La radioactividad unida se eluyó con un gradiente lineal de fosfato de potasio 0-0.4 M. En las fracciones se determinó radioactividad (-o-o-) y concentración de fosfato (---). Tomado de Ortí E., Tesis Doctoral [32].

que implica la exposición de aminoácidos básicos, antes ocultos, que le dan la afinidad observada por polianiones [91]. Además, se especulaba con una defosforilación del complejo [93]. Actualmente se conoce con más detalle este proceso que no involucra, al menos en un principio, defosforilación alguna, ya que según Munck y col. no existen cambios en el estado de fosforilación del receptor al transformarse [73].

Existen actualmente dos modelos que pretenden explicar los cambios producidos en el complejo H-R que lo llevan a unirse a ADN [52,54]. El primero llamado **modelo de disociación** implica la separación de las proteínas Hsp 90 del cuerpo principal del receptor, exponiendo de esta manera el sitio de unión a ADN en el complejo que se encontraba bloqueado [52,55], según muestra la figura I.9. Hay evidencias experimentales que soportan este modelo como la posibilidad de transformar el complejo H-R exponiéndolo a alta fuerza iónica o calentamiento suave, procesos ambos que inducirían la separación de las proteínas mencionadas [36,52,54,90,92]. Mientras que sales como MoO_4Na_2 estabilizan al complejo en su estado no transformado [52,93].

Otro modelo propuesto es el llamado **modelo conformacional** (fig I.10). De acuerdo a este modelo, la porción

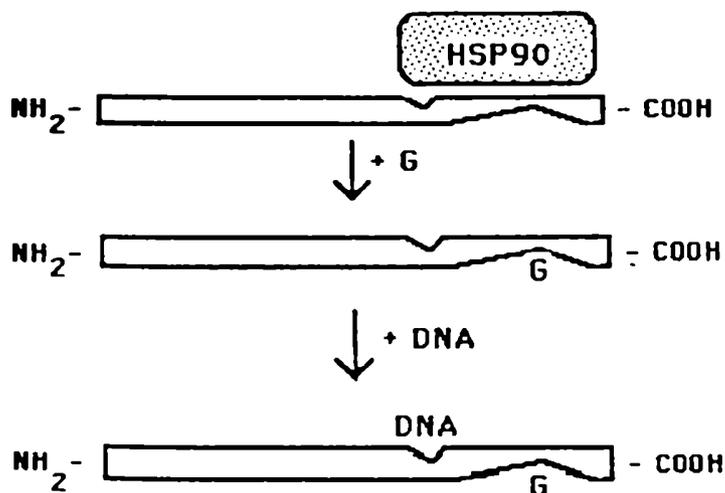


Figura I.9: Proceso de transformación del receptor de GC según el Modelo de Disociación. En ausencia de hormona, el receptor está unido no covalentemente con dos moléculas de Hsp 90 manteniendo el sitio de unión a ADN inaccesible. Cuando el receptor se une a la hormona (G), la molécula del receptor se disocia de las Hsp 90, dejando el dominio de unión a ADN accesible para unirse a sitios específicos del genoma. Tomado de Distelhorst C. W. [52].

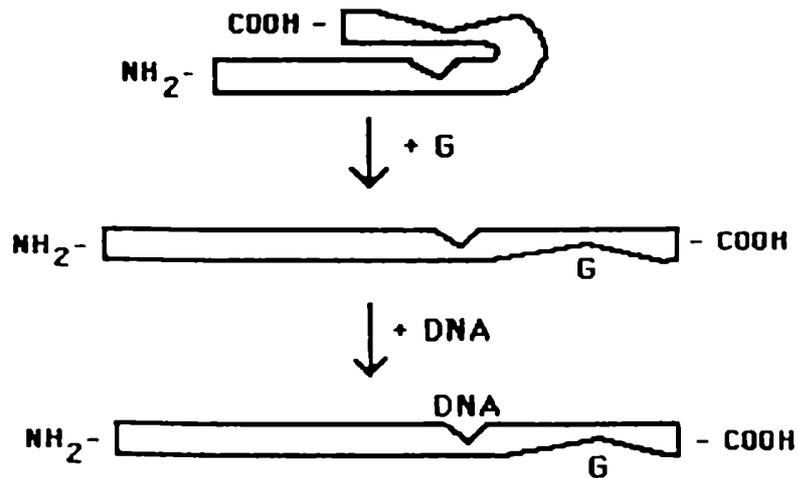


Figura I.10: Proceso de transformación del receptor de GC según el Modelo Conformacional. En ausencia de hormona, la conformación del receptor de GC es tal que la porción carboxi-terminal del mismo oculta al sitio de unión al ADN. Cuando la hormona (G) se une al receptor, la conformación del receptor cambia dejando libre el dominio de unión a ADN. Tomado de Distelhorst C. W. [52].

carboxi-terminal del receptor, que es el dominio de unión a esteroide, bloquea el sitio de unión a ADN que se encuentra adyacente. Este modelo se basa en resultados experimentales que muestran que al separar el dominio de unión a esteroide del resto del receptor se obtiene un pseudoreceptor capaz de unirse al ADN en ausencia de hormona, es decir un receptor constitutivamente transformado [52,80].

Estos dos modelos no son mutuamente excluyentes, ya que se puede pensar en la posibilidad de que el dominio de unión a esteroide posea una zona de unión a las proteínas Hsp 90 (de hecho la poseen) [73], y por lo tanto, al separar esta porción del resto del receptor éste no puede unir, en el estado basal, a las proteínas Hsp 90, y por lo tanto se une a ADN en ausencia de hormona [52].

Estos modelos podrían sufrir complicaciones adicionales debido a la existencia de otras proteínas asociadas al receptor, además de factores que influirían en la unión del receptor a ADN. No debemos olvidar la interacción del receptor con moléculas específicas de ARN que podrían jugar un rol fundamental en el proceso de transformación o translocación al núcleo, aunque esto merece estudios más detallados [52,68-71,87-89].

RECEPTORES DE GC EN EL SNC

La primera prueba de la existencia de sitios receptores para GC en el SNC provino de los estudios de captación *in vivo* de esteroides radiomarcados, en cerebro de ratas ADX. La hormona (^3H)CORT, derivado radioactivo del glucocorticoide natural de la rata, es captado y retenido por varias horas principalmente en el HC y en menor medida en septum y amígdala, siendo posible correlacionar estos resultados con la presencia de receptores específicos [2,8,13]. El hecho adicional de que la hormona marcada se acumule en los núcleos de las áreas cerebrales estudiadas, indicaba posiblemente acciones al nivel del genoma celular, típico de los receptores de hormonas esteroideas [8].

Cuando se realizan las mismas experiencias con diferentes esteroides marcados, éstos se acumulan en las diferentes áreas cerebrales según diferentes patrones. Por ejemplo (^3H)deoxicorticosterona y (^3H)progesterona son captados y retenidos pobremente mientras que el glucocorticoide sintético (^3H)DEX se acumula en cerebro en forma uniforme en numerosas áreas del mismo, sin que existan, como en el caso de CORT en HC, áreas preferenciales de acumulación del esteroide [8].

Mediante técnicas *in vitro* de determinación de la unión de GC a sitios receptores, se ha ensayado la presencia de dichos

sitios en diferentes citosoles correspondientes a distintas zonas del SNC. La concentración de los sitios de unión para (^3H)CORT y (^3H)DEX, resultó semejante a la encontrada por técnicas *in vivo*. Las características físico-químicas de los receptores en el SNC resultaron semejantes, pero no idénticas, a aquéllas encontradas para los sitios de unión en tejidos periféricos (timo, hígado, riñón) [8]. Por medio de técnicas autoradiográficas en cortes de cerebro de ratas inyectadas con los GC marcados, se obtuvo también una distribución semejante a la obtenida mediante las técnicas antes mencionadas. Curiosamente, la captación y distribución de la marca de (^3H)ALDO era semejante a la obtenida cuando se utilizaba (^3H)CORT. Las células gliales captan también GC pero con preponderancia de (^3H)DEX sobre (^3H)CORT, resultado que recuerda lo observado en la hipófisis [8].

La regulación del número de sitios receptores, cuya variación es una forma de modular la respuesta del SNC a las hormonas esteroideas, está a cargo de diferentes factores. Entre ellos, están los factores ambientales, endócrinos y neurales. Entre estos últimos se encuentran los neuropéptidos y los neurotransmisores, los cuales son capaces de regular la cantidad de receptores para GC en el SNC [2,8].

Receptores en Médula Espinal

Los numerosos efectos ejercidos por los GC en la ME suponen la existencia de sitios receptores para estas hormonas. Trabajos de Clarck y col. [94] muestran la presencia de unión de GC a receptores en esta zona del SN, previamente se había estudiado la captación de esteroides en la ME por técnicas autoradiográficas y se encontró retención de (^3H)CORT en motoneuronas medulares [95].

Trabajos posteriores, también por autoradiografías, indican la captación de (^3H)CORT y (^3H)ALDO en ME. Las motoneuronas de las distintas zonas de la ME y neuronas del asta posterior, captaron preferencialmente (^3H)CORT, en cambio (^3H)ALDO fue captado por neuronas del asta anterior [96,97]. Experimentos realizados en nuestro laboratorio profundizaron en esta línea de trabajo, caracterizando las propiedades físico-químicas de los receptores de GC y MC en ME. Además, se correlacionaron la unión de los GC a receptores con la regulación de dos enzimas: Glicerolfosfato deshidrogenasa y Ornitina descarboxilasa [27,32,60,62].

Heterogeneidad de los sitios receptores en SN

Una explicación coherente con el hecho de que la captación *in vivo* de (^3H)CORT y su distribución en distintas áreas cerebrales sea diferente de la distribución obtenida cuando

se utiliza (^3H)DEX, es la existencia de más de un sitio de unión para GC en SNC [2,7]. Esta suposición se confirmó con los trabajos de Reul y col. en los que se muestra la presencia de por lo menos dos sitios de unión para CORT en el SN [7,98]. Estos sitios receptores son homólogos a los identificados por Funder y col. en el riñón, y se los llama de igual forma: receptores tipo I y tipo II [2,99]. Los dos tipos de receptores descritos son codificados por distintos genes y al estudiar la localización y distribución de los ARNm correspondientes, se obtuvieron resultados similares a los observados cuando se estudia la distribución de los sitios receptores [2].

Estos sitios de unión de hormonas adrenales, ligan con distinta afinidad CORT, DEX y ALDO, hecho que complica la interpretación de la función de dichos sitios en el SN y los niveles de ocupación de los mismos por las hormonas naturales en situaciones fisiológicas. Los receptores tipo I presentan alta afinidad por CORT y se los encuentra concentrados principalmente en el HC, además del riñón. Los sitios tipo II poseen baja afinidad por CORT y se los encuentra distribuidos en forma más o menos uniforme en las distintas áreas cerebrales, además está ampliamente difundido en tejidos periféricos blancos de las hormonas adrenales, como ser riñón e hígado [2].

Respecto de la ALDO, el MC natural más potente y de conocida acción renal, los sitios tipo I poseen afinidad similar a la que se mide por CORT, mientras que los sitios tipo II tienen muy baja afinidad por el MC [2]. Esta última observación es consistente con experimentos de saturación realizados con (³H)ALDO por distintos laboratorios, donde se encontró que la hormona marcada se une a más de un sitio, puesto que el gráfico de Scatchard correspondiente resultó curvilíneo [8,32]. El gráfico mencionado se rectificaba cuando se competía la unión de (³H)ALDO con bajas concentraciones de CORT [8,32], quedando únicamente el sitio de alta afinidad uniendo la hormona marcada. Esta unión también podía competirse en presencia de concentraciones más elevadas de CORT, indicando que ambos se estaban uniendo a los mismos sitios receptores [2,8].

En cuanto al glucocorticoide sintético DEX existen diferentes resultados. En trabajos previos al año 1989 se menciona que los sitios receptores tipo I tienen baja afinidad por esta hormona, mientras que los sitios tipo II tienen alta afinidad por DEX. Esta afirmación se basa en los hechos experimentales que muestran una distribución *in vivo* de DEX en el SN, diferente a la obtenida cuando se utiliza CORT [2,9,100]. Pero trabajos recientes muestran lo contrario, es decir que los sitios tipo I tienen alta afinidad por DEX (al igual que CORT y

ALDO) y los sitios tipo II observan baja afinidad por este GC sintético [101,102]. Queda por aclarar el significado funcional de dicho resultado.

Papel fisiológico de los diferentes sitios receptores en SN

La función de los distintos tipos de receptores es objeto de estudio actualmente, sin embargo se pueden sacar varias conclusiones. La diferencia de afinidades de los sitios tipo I y tipo II por CORT, el GC natural de la rata, implica que con bajos niveles fisiológicos de hormona circulando por sangre, estarían ocupados totalmente los sitios tipo I pero no los tipo II, mientras que durante situaciones que impliquen altos niveles de esta hormona en sangre (por ejemplo en situaciones de estrés), se ocuparían también los sitios tipo II [2]. En experimentos realizados por nuestro laboratorio se encontró que ambos sitios de unión están involucrados en el control, por retroalimentación negativa, de los niveles de CORT circulantes [31]. Algunos autores sugieren que en un sistema con un solo tipo de sitio receptor, éste no podría adecuar su respuesta a cambios en los niveles hormonales dentro de un rango amplio como el observado para las variaciones de concentración de CORT en diferentes situaciones. Mientras que un sistema binario, como el observado

en el SN con los dos sitios receptores, puede adaptarse a un amplio rango de concentraciones de hormona circulante y responder en consecuencia [2,103].

Otro aspecto interesante es la alta afinidad de los sitios tipo I tanto por ALDO como por CORT. Debido a que existe una gran diferencia de concentraciones entre estas dos hormonas, ya que la concentración de CORT es 100 veces más alta que la de ALDO, estos sitios receptores estarían permanentemente ocupados por CORT. Sin embargo, ALDO posee efectos conocidos en el SN como la regulación del apetito salino en ratas intactas como ratas ADX tratadas con CORT [104]. Para explicar esta paradoja se sugirió que los niveles de CBG, la cual une CORT pero no ALDO, regula el acceso del GC a los sitios tipo I. ALDO, al viajar en mayor proporción en forma libre, tendría, pese a su baja concentración, mayor acceso a dichos sitios receptores aún en presencia de altas concentraciones de CORT [7,8,9]. Sin embargo, esta teoría se ve desvirtuada porque no se ha encontrado CBG en el cerebro [31]. Por otro lado se especula que, al igual que en el riñón, la presencia en el SN de la enzima 11 β hidroxiesteroide deshidrogenasa, que virtualmente inactiva a la CORT al metabolizarla, permitiría el acceso de ALDO a los sitios tipo I con grandes concentraciones de CORT en el medio [2]. Sin embargo, en el riñón no se ha demostrado co-localización de

11 β hidroxiesteroide deshidrogenasa y receptores tipo I sino mas bién lo contrario, ya que ambas moléculas estan presentes en células de zonas alejadas, por lo que esta teoria no explicaría la especificidad de unión de ALDO a nivel celular [105]. Hoy en día se habla de "Receptores Fisiológicos" para MC cuando se tiene un efecto hormonal *in vivo*, sin que pueda explicarse el mecanismo que lleva la asociación de un receptor con el MC, en una región determinada.

ANATOMIA Y FUNCION DE HC Y ME

SISTEMA NERVIOSO (SN)

Células del SN

Las neuronas de la ME, al igual que las del resto del SNC, son las unidades funcionales de la misma. Todas las vías nerviosas, circuitos y arcos reflejos están compuestos por unidades neuronales interconectadas entre sí y dispuestas de manera simple o compleja.

Las Neuronas funcionales son mas bien grandes (Fig I.11) aunque existen amplias variaciones en cuanto al tamaño en diferentes partes del SNC. Contienen núcleo grande, con nucleolo. El citoplasma contiene neurofibrillas y una sustancia granulosa que se tiñe con colorantes básicos, que reciben el nombre de cuerpos de Nissl (como el método de coloración), que no es otra cosa que ribosomas asociados a membranas. Además, el citoplasma posee aparato de Golgi, mitocondrias y diversas inclusiones como pigmentos y lípidos. Del cuerpo neuronal se expanden una o mas prolongaciones que constituyen las dendritas y el axón. La zona donde se extienden las dendritas de una dada neurona se llama campo dendrítico.

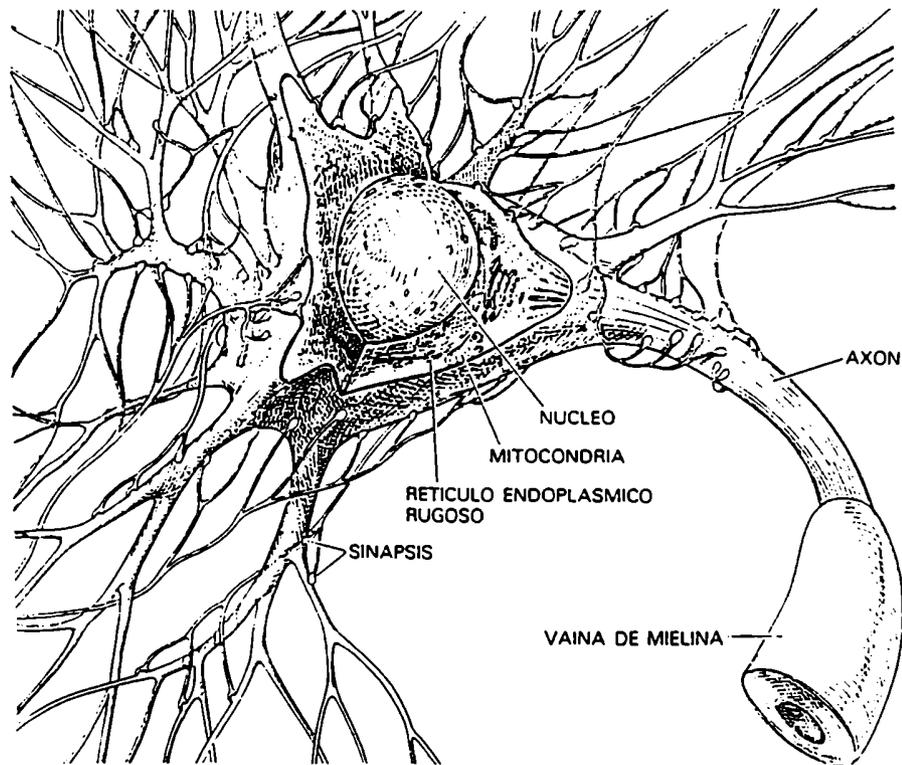


Figura 1.11: Cuerpo celular de una neurona. Contiene material genético y todo el aparato metabólico común a todas las células. A diferencia del resto de las células somáticas, las neuronas no se dividen luego del desarrollo embrionario. Poseen diversas dendritas y un único axón que sale del cuerpo celular. El cuerpo celular y las dendritas están cubiertos de sinapsis que es de donde se recibe la información proveniente de otras células [106].

El axón es una prolongación aislada, también llamada fibra nerviosa, que surge de una región de protoplasma conocida como el cono de implantación y puede poseer longitudes desde menos de un milímetro hasta casi un metro. En su extremo distal cada axón se ramifica en arbolizaciones terminales, el teledendrón. Además, cada axón puede tener ramas colaterales. El axón contiene mitocondrias, neurofilamentos, microtúbulos y retículo endoplásmico liso, pero carece de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas. Los axones pueden ser mielínicos o amielínicos. La vaina de mielina es formada y mantenida por células especializadas llamadas oligodendrocitos, y está compuesta por capas concéntricas de membranas con alta concentración de lípidos y baja concentración de proteínas. La vaina está interrumpida por constricciones a intervalos regulares llamadas estrangulaciones de Ranvier. En el SN periférico los axones se hallan rodeados por una membrana superficial, la vaina de Schwann [107,108].

La neuroglía, cuyo origen embrionario es similar al de las neuronas, ya que ambos progenitores, neuroblastos y glioblastos, provienen de las células neuroepiteliales, está constituida por elementos celulares que componen el tejido intersticial del SN. La cantidad de células de la neuroglía es mayor que el número de neuronas en una relación 10:1.[107]. Se

diferencian de estas últimas porque conservan toda la vida la facultad de dividirse y no forman interconexiones entre sí ni con neuronas, además no generan potenciales de acción [32].

Existen dos categorías de células de la glía, la macroglía y la microglía. La macroglía está formada por astrocitos y oligodendrocitos, las primeras están involucradas en el flujo iónico, en la regulación del metabolismo de la neurona, además intervienen en el metabolismo del GABA, y poseen receptores para neurotransmisores. Los oligodendrocitos están involucrados como intermediarios en el metabolismo neuronal y en la formación de las vainas de mielina [108].

La microglía, que tiene origen mesenquimático, es decir no nervioso, está constituida por pequeñas células con prolongaciones ramificadas y se la considera como el sistema de "limpieza" del SN, tiene la capacidad de transformarse en macrófagos [108].

Bioquímica del Sistema Nervioso

Las neuronas poseen la maquinaria común a todas las células vivas. Están especializadas, a diferencia del resto de las células, en la transmisión de impulsos nerviosos, lo que

implica la necesidad de mantener gradientes iónicos y sintetizar, transportar y liberar mensajeros químicos llamados neurotransmisores.

El SNC es el mayor consumidor de energía en el organismo, hecho que queda en evidencia por su gran irrigación sanguínea y por su gran consumo de oxígeno. A diferencia de otros tejidos, el SN no puede utilizar como combustibles ni aminoácidos ni triglicéridos, su única fuente de energía es la glucosa (en ocasiones los cuerpos cetónicos) y este hidrato de carbono sólo lo oxida en condiciones aeróbicas. El cerebro, siendo el 2% del peso corporal, consume el 20% del oxígeno en reposo. Esta tasa de consumo de energía tan alta sería para mantener los gradientes iónicos intermembrana.

La neurotransmisión es un proceso complejo que involucra la despolarización de la membrana de la neurona por la apertura de los canales de sodio, propagándose el impulso despolarizante a lo largo del axón y las dendritas, y luego se cierran inmediatamente, abriéndose los del potasio para reestablecer el potencial negativo normal. Cuando el impulso llega a la terminal sináptica se producen una serie de eventos que culminan en la liberación de los neurotransmisores almacenados en esa porción de la neurona.

Los neurotransmisores se pueden dividir en tres grupos:
a) aminas biogénicas como catecolaminas, serotonina, acetilcolina e histamina; b) aminoácidos como glutamato y aspartato, GABA, glicina, etc.; c) neuropéptidos como encefalinas, sustancia P, β -endorfinas, etc..

Las moléculas del transmisor liberado en el espacio intersináptico, cruza dicho espacio interactuando con sus receptores específicos situados en la membrana post-sináptica. Dicha interacción puede causar la excitación de la neurona o su inhibición, la contracción de una fibra muscular o la síntesis y/o secreción de una hormona en una célula glandular. Dichos efectos son mediados por los receptores específicos y la acción puede ser directa sobre proteínas de membrana o por la formación de segundos mensajeros como los nucleótidos cíclicos (fig I.12) [109].

ANATOMIA Y FUNCION DE ME

Anatomía de ME

La ME es una estructura larga y cilíndrica, revestida por las meninges, que se encuentra dentro del conducto raquídeo o vertebral. Se extiende desde el agujero occipital, donde se continúa con el bulbo, hasta el borde inferior de la primera

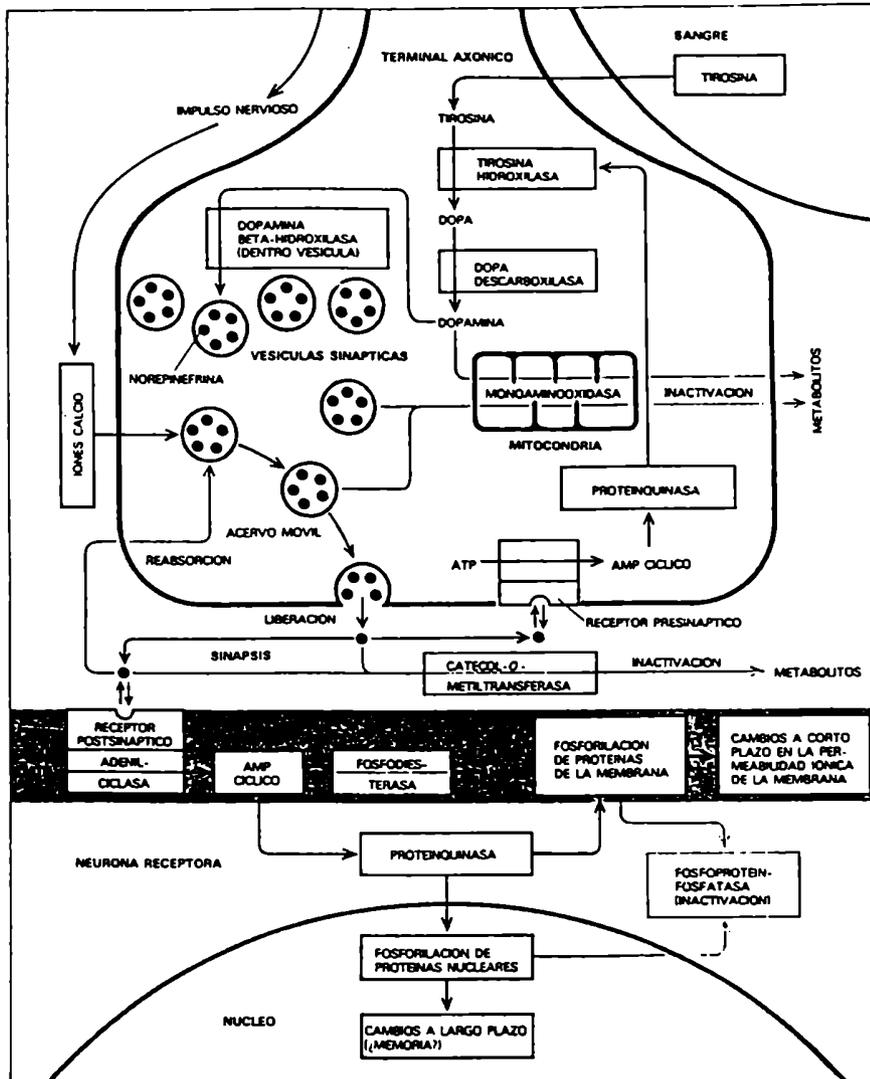


Figura I.12: La transmisión química. Se representa el proceso de transmisión en una sinápsis de norepinefrina. En primer lugar el neurotransmisor se sintetiza en 3 etapas a partir del aminoácido tirosina y se almacena en vesículas. La llegada del impulso provoca la entrada de los iones de calcio, induciendo la liberación de norepinefrina al espacio sináptico. Las moléculas de transmisor se unen a sus receptores específicos de la membrana postsináptica produciendo efectos eléctricos y químicos (mediados por AMPc). El efecto termina por una reabsorción o por degradación enzimática del neurotransmisor. Los receptores presinápticos median la inhibición de la síntesis del neurotransmisor [109].

vértebra lumbar. Tiene dos ensanchamientos, el cervical y el lumbar, cada uno de ellos relacionado con las raíces que inervan, respectivamente, a las extremidades superiores e inferiores. En sentido caudal al engrosamiento lumbar, la ME presenta una terminación cónica, el cono medular o *conus medullaris*. Una condensación de la piamadre, que se extiende caudalmente desde el cono medular, forma el *filum terminale*.

Mientras que la ME es una estructura continua, los 31 pares de nervios espinales asociados con regiones localizadas producen una segmentación externa. Sobre la base de dicha segmentación externa se considera que la ME está compuesta por 31 segmentos. Los segmentos medulares se encuentran divididos del siguiente modo: 8 cervicales (C), 12 torácicos (T), 5 lumbares (L), 5 sacros y 1 coccígeo en el humano, mientras que en la rata hay 8 C, 13 T, 6 L y 4 sacras [110]. El gran número de raíces lumbosacras que rodean al *filum terminale* recibe el nombre de cola de caballo o *cauda equina*. Los nervios espinales emergen desde el conducto raquídeo a través de los agujeros intervertebrales (fig I.13).

En cortes transversales la ME consta de una sustancia gris central en forma de mariposa y un manto de sustancia blanca que lo rodea. La sustancia gris contiene células nerviosas y sus

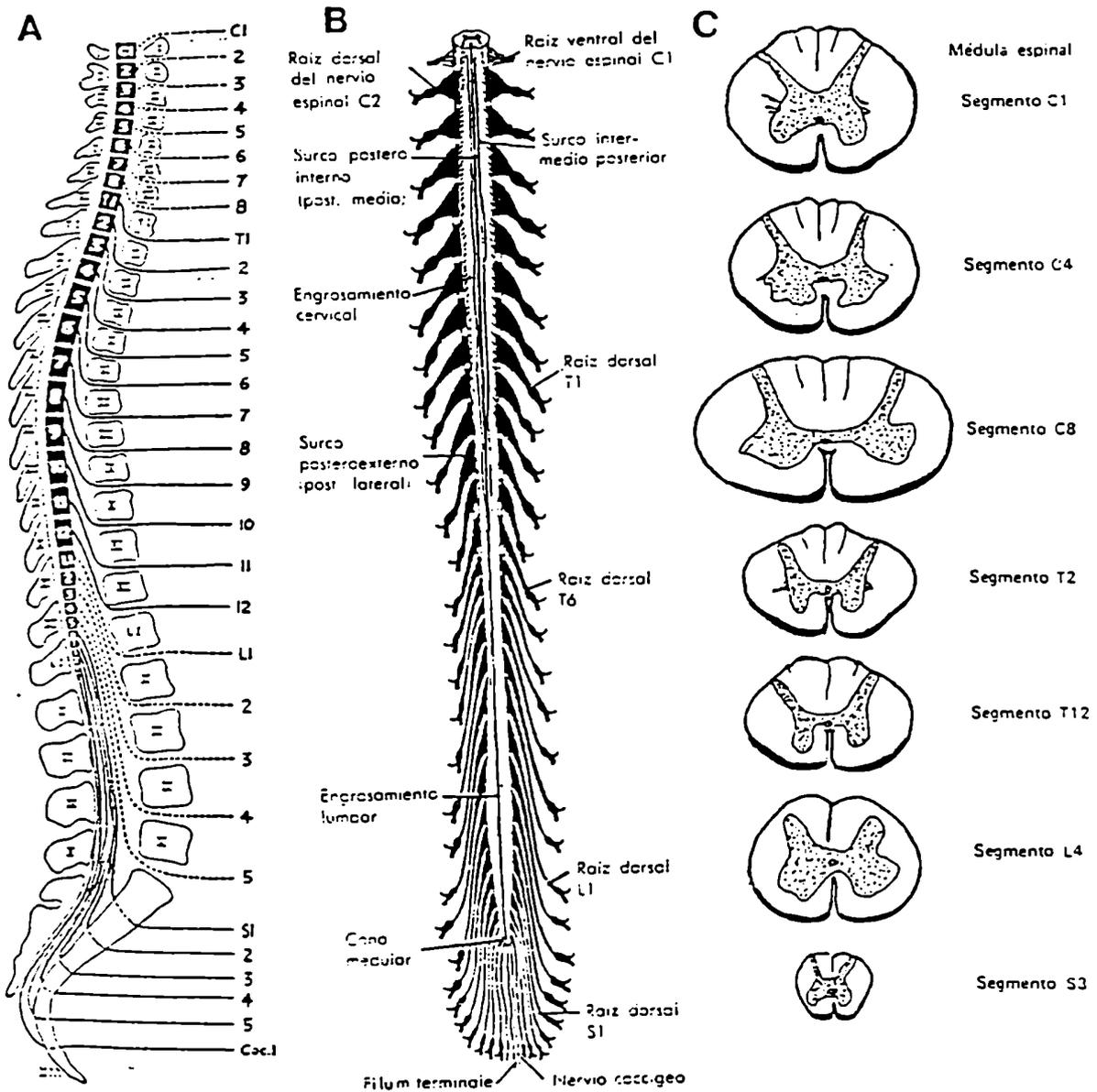


Figura I.13: Anatomía de la ME. A: Posición de los segmentos de la ME con referencia a los cuerpos y apófisis espinosa de las vértebras. B: Vista posterior que muestra los filamentos radiculares dorsales y los ganglios espinales. C: Esquema de algunos segmentos de la ME a diferentes niveles, que permite apreciar variaciones en la forma, tamaño y topografía de las sustancias gris y blanca [108].

prolongaciones. Cada mitad de la ME tiene una columna gris posterior (sensitiva) o "asta posterior" que se extiende casi hasta la superficie, y un asta o columna gris anterior (motora), que se extiende hacia adelante pero sin llegar hasta la superficie. En los segmentos torácicos se observa un asta lateral pequeña y afilada. La comisura gris, que conecta a la sustancia gris de ambos lados, circunda al conducto central o conducto del epéndimo.

La sustancia blanca, que rodea a la sustancia gris, contiene escasos cuerpos neuronales o dendritas, pero está compuesta por fibras nerviosas mielínicas y amielínicas, las cuales son ascendentes y descendentes, y sus células neurológicas de sostén.

Los diferentes niveles de la ME muestran variaciones en cuanto a forma y tamaño, en la cantidad relativa de sustancia gris y blanca y en la disposición y configuración de la sustancia gris (fig I.13). Las columnas grises alcanzan su punto máximo en los engrosamientos cervical y lumbar, que están asociados con los nervios más importantes que inervan a las extremidades [108].

Función de la Médula Espinal

La ME de los mamíferos mantiene aún las funciones de los animales multisegmentados. Las señales sensoriales se transmiten

a través de los nervios espinales a cada segmento de la ME, causando respuestas motoras localizadas. Las respuestas motoras de la ME son automáticas y ocurren instantáneamente en respuesta a una señal sensorial. Además, siguen ciertos mecanismos específicos denominados reflejos.

El reflejo de estiramiento o miotático consiste en la interacción de una neurona sensorial de la ME con una neurona motora y se acciona cuando un músculo tiende a estirarse produciendo la contracción del mismo, es un mecanismo de retroalimentación que impide variaciones en la longitud del músculo. Estos reflejos permiten a un individuo mantener las partes del cuerpo en la posición deseada pese al efecto de fuerzas externas, como la gravedad, que tiende a sacarlo de su postura. Estos reflejos reciben el nombre de antigravitacionales.

El reflejo flexor, que es un reflejo polisináptico, es la respuesta automática a estímulos dolorosos. Consiste en la contracción de músculos flexores e inhibición de músculos extensores, propiciando un rápido retiro del miembro afectado del sitio de donde provino el estímulo.

Las funciones de la ME luego de extraer el cerebro reflejan la magnitud de la misma. El animal puede pararse debido a reflejos iniciados en las plantas de los pies y producen la

tensión de los músculos de los miembros. El animal comienza a realizar, si está suspendido, movimientos de marcha. Esto demuestra que los reflejos básicos de la locomoción se encuentran en la ME. También mantiene el reflejo de rascado, o sea que localiza el lugar de donde provino el estímulo. Además, existen reflejos de vasoconstricción y vasodilatación para controlar la temperatura.

Estos reflejos muestran que muchas de las actividades diarias son controladas por la ME y que el cerebro ejerce una acción moduladora [111,112].

ANATOMIA Y FUNCION DEL HC

El hipocampo (HC) es una estructura del sistema límbico en forma de coma alargada, constituida por un tipo de corteza cerebral que se ha plegado hacia adentro, para formar la superficie ventral del asta inferior del ventrículo lateral; la cola se extiende con el ventrículo lateral conjuntamente con el cuerpo caloso, que se halla localizado por encima del HC. Por encima del cuerpo caloso, existen vestigios evolutivos remanentes del HC, los cuales son generalmente ignorados para estudios fisiológicos y bioquímicos [113,114]. Un extremo del HC se halla inmediatamente vecino a los núcleos amigdalinos y se fusionan a lo largo de sus bordes con la circunvalación del HC,

que es la corteza de la superficie ventromedial del lóbulo temporal. La terminología utilizada para la denominación de esta estructura, va de acuerdo a la establecida por Pribram y Kruger [115].

El HC tiene muchas conexiones con casi todas las partes del sistema límbico (tálamo anterior, septum, área preóptica, amígdala, hipotálamo, etc.). Su principal eferente es el Fornix, que lo comunica con varios núcleos diencefálicos hipotalámicos. La irrigación sanguínea del hipocampo se produce a través de los vasos coroides anteriores y posteriores, los cuales son muy sensibles a cambios de presión intracraneal.

Funcionalmente, el HC es una estructura que está siendo objeto de estudio. El mismo está relacionado con procesos de memoria y aprendizaje [116,117]. Desde el punto de vista neuroendócrino el HC es una zona extrahipotalámica donde los GC ejercen su acción para regular los niveles sanguíneos de estas hormonas. La ablación de esta estructura produce alteraciones en el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal e incrementa la secreción de GC basal y bajo condiciones de estrés [2,31]. Además, el HC está involucrado en la regulación negativa de la liberación de ACTH [2].

El HC y los receptores de GC

Es interesante señalar la elevada concentración de receptores de GC tipo I y tipo II, en el HC, y su posible papel regulatorio en la respuesta al estrés y de la retroalimentación negativa [2,8,31]. Por su extrema plasticidad, los receptores de GC del HC son sumamente sensibles a los niveles hormonales sanguíneos y aumentan o disminuyen preferencialmente en respuesta a dichos niveles hormonales [2]. Se ha descrito el fenómeno de "down-regulation" de los receptores de HC de ratas diabéticas [118,119,120], ratas tratadas con GC [121], animales estresados, y ancianos [2]. Por este motivo es que resultó importante comparar estos sitios receptores con los correspondientes de la ME, ya que el concepto actual involucra al HC como órgano "clásico" para la acción de los GC en el SN.

**Comparación de los Receptores
de GC en el HC y la ME**

CAPITULO II

INTRODUCCION

En la Introducción General [cap. I] se había mencionado que en el cerebro y en otras regiones del sistema nervioso central se encuentran presentes receptores para hormonas de la corteza adrenal [2,8,122,123].

Por estudios previos se han identificado moléculas que unen glucocorticoides en la médula espinal (ME) de la rata, exhibiendo propiedades correspondientes a sitios receptores [31,32,62,94-96,124,125]. Estudios bioquímicos *in vitro* han demostrado que los sitios de unión en la ME y el hipocampo (HC)-este último un tejido blanco clásico para hormonas esteroideas en cerebro [122,123]- muestran varias propiedades en común. Así, se observan similitudes en el coeficiente de sedimentación obtenido por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, en la afinidad relativa determinada por agonistas y competidores (especificidad), en la capacidad de transformación de los receptores a formas que denotan afinidad por ADN, y en el comportamiento en columnas de intercambio iónico como DEAE y ADN-celulosa [32,62,124]. Sin embargo, bajo condiciones experimentales *in vivo*, la captación de corticosterona tritiada (^3H)CORT)por parte de los núcleos celulares purificados es

diferente, siendo más alta en el HC en comparación con la ME, no obstante que el contenido de sitios receptores citosólicos en la médula es aproximadamente el 50% o puede ser similar al contenido del HC [124]. Se describió una situación similar en el nervio óptico [126].

Estos resultados sugieren que, en la ME, una fracción de sitios receptores citoplasmáticos no translocarían al núcleo de una manera análoga a los sitios llamados receptores crípticos descritos en el HC [122]. En el presente capítulo se muestran estudios efectuados sobre las posibles causas de la marcada reducción en la captación de (^3H)CORT por parte de los núcleos de la ME empleando tres aproximaciones al problema: a) primero se comparó la ocupación de los receptores citoplasmáticos de ambos tejidos empleando distintas dosis de CORT exógena; b) la segunda aproximación consistió en la búsqueda de inhibidores de la transformación/translocación [91,127]; y c) se estudió la sensibilidad de dichos tejidos a la acción de la enzima ribonucleasa A (ARNsa A) dado que existe evidencia de ARN asociado a receptores esteroideos [70,86,128-132]. Se acepta que dicha enzima aumenta la afinidad de receptores para GC, y otras hormonas esteroideas, por el ADN en distintos sistemas [68,133].

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 200-250 gr de peso. Las mismas se adrenalectomizaron (ADX) por aproximación dorsal, en forma bilateral, 2 a 3 días antes del sacrificio y se mantuvieron durante ese lapso de tiempo en grupos de a 10 animales en jaulas apropiadas donde disponían de alimento balanceado y NaCl 0.9% *ad libitum*.

Los animales fueron sacrificados por decapitación para luego extraerles el hipocampo (HC) y la médula espinal (ME), para ser utilizados en los distintos experimentos.

DISECCION DE LA ME Y DEL HC

HC: El cerebro se ubica en forma ventral, pudiéndose observar de esta forma el hipotálamo (fig II.1), realizándose un corte empleando un instrumento filoso, en forma vertical aproximadamente 3 mm por delante de una línea imaginaria que pasa entre el hipotálamo y el quiasma óptico (A), luego se realiza otro corte inmediatamente por detrás del hipotálamo (C). La porción del cerebro así obtenida se recuesta sobre el plano

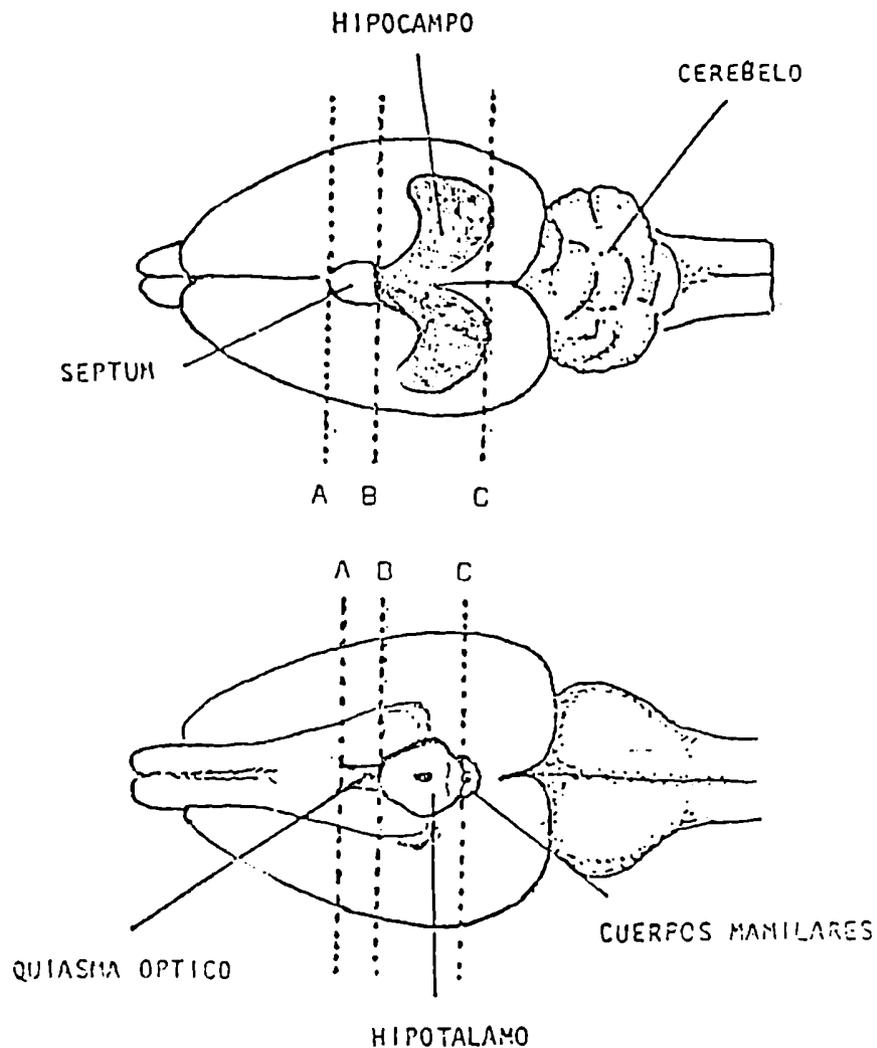


FIGURA II.1: Diagrama del cerebro de rata en donde se describe los cortes realizados para obtener el hipocampo (HC), tal como se menciona en el texto, utilizado para los ensayos. La línea imaginaria B no se utiliza para realizar cortes en la extracción del HC.

transversal y con ayuda de pinzas se separa cuidadosamente la corteza cerebral de manera de dejar expuesta la zona del hipocampo que queda por debajo de ésta. Posteriormente se desprende el hipocampo de su base inferior, separándolo del septum. Así obtenemos el hipocampo total con sus zonas dorsal, medial y ventral, que se utilizará para los ensayos posteriores [31,134].

ME: La ME se obtuvo luego de una cuidadosa laminectomía desde la base del cerebro hasta el filum terminale. El tejido así obtenido se utilizó completamente sin seccionarlo en distintas zonas, incluyendo por lo tanto las secciones de ME comprendidas entre las vertebrae C1-C8 (cervicales), T1-T12 (torácicas), L1-L5 (lumbares), cola de caballo y *filum terminale*.

CAPTACION NUCLEAR DE (³H)-CORT

A las ratas operadas (ADX) se les administró 50 µCi/100g de la hormona tritiada por vía i.v. disuelta en un vehículo consistente en etanol-salina 30%. Una hora más tarde se sacrificaron los animales y los tejidos se homogenizaron en buffer N₁ de McEwen y Zigmod [135]. Luego de centrifugar y lavar los núcleos crudos con buffer N₁₁, éstos se purificaron mediante centrifugación a 16000 xg durante 60 min. en un colchón de sacarosa 2M. La radioactividad de los núcleos fue extraída

lavando con etanol absoluto dos veces, luego se secaron los extractos para posteriormente agregar líquido centellante [124], momentos más tarde se midió la radioactividad extraída en un contador de radiación β por centelleo líquido. Los resultados se expresaron como fmol (^3H)-CORT/mg ADN. El ADN se determinó por el método de la difenilamina [136]. También se determinó la radioactividad en una alícuota del homogenizado para poder calcular la relación (^3H)Nucleo/(^3H)Homogenizado [124].

DETERMINACION DE CONDICIONES DE INCUBACION QUE MINIMICEN EL INTERCAMBIO

Intercambio (exchange), es un término que se utiliza para indicar el proceso mediante el cual la hormona endógena, que permanece unida al receptor específico, es desalojada de dicha unión por la hormona marcada, agregada en una incubación *in vitro*, quedando así todos los receptores, o la mayoría de ellos, unidos a un ligando marcado. Las condiciones de incubación que favorezcan este proceso permiten la medición de todos los sitios receptores, con mínimo error. En nuestro trabajo experimental fue necesario buscar condiciones que anulen, o al menos hagan despreciable, el proceso de intercambio, a fin de poder medir la población de receptores libres luego de inyectar al animal una dosis determinada de ligando no radioactivo (ver mas adelante).

Con este objetivo se realizaron una serie de curvas de tiempo utilizando ME de animales ADX. Se obtuvo el citosol homogenizando con buffer TEMGMO, éste se dividió en 2 partes, a una de ellas se la incubó con CORT fría (500nM) durante 20 h a 0°C ocupándose, durante este lapso, la mayoría de los sitios receptores. La otra porción de citosol quedó intacto a 0°C durante las 20 h. Luego se separó la hormona libre con carbón-dextrán (2%-0.2%) y a continuación se agrega a este citosol pretratado, así como también a la fracción intacta, (³H)DEX 20nM, incubando este sistema durante los tiempos indicados en la figura II.2. Al término de los mismos, se separó al complejo hormona-receptor mediante columnas de Sephadex-LH20 [137]. Los resultados resumidos en la figura II.2, indican que a las 4 h de incubación con la DEX tritiada todavía no se observa intercambio al comparar los niveles de hormona unida en el citosol pretratado respecto de los mismos en la fracción control (citosol intacto). A las 24 h de incubación los niveles de ligando unido a receptor son similares en ambas fracciones investigadas, por lo que podríamos decir que hubo intercambio. Dados estos resultados podemos concluir que incubando aproximadamente 3 h estamos en condiciones de reducir al máximo el intercambio de ligando endógeno por hormona agregada *in vitro*, permitiendo evaluar el número de sitios receptores libres en el citosol bajo estudio [27,32].

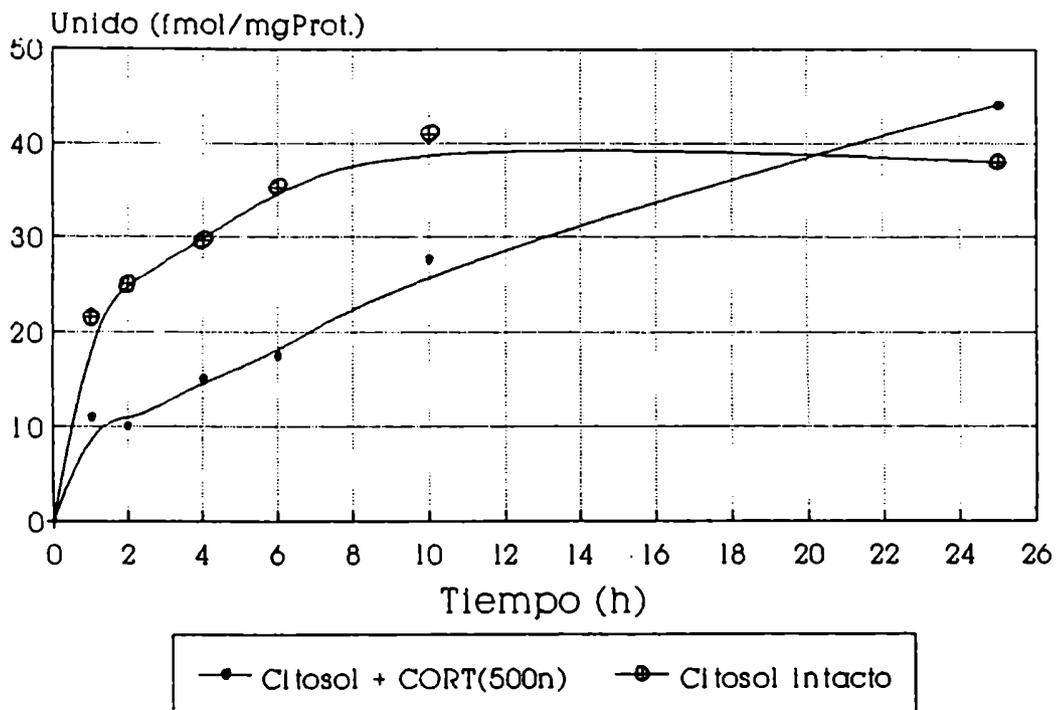


FIGURA II.2: Curva de asociación de (^3H)DEX y receptores de citosol de ME (en fmol/mg prot.) en función del tiempo según procedimiento mencionado en Materiales y Métodos. Citosol intacto (\oplus) y citosol preincubado con CORT (500 nM) (\bullet) durante 20 h a 0°C .

OCUPACION DE LOS RECEPTORES CELULARES LUEGO DE INYECCIONES DE
CORT

Se administraron dosis s.c. de vehículo o de 0.05, 0.5, 1.0, 5.0 y 10 mg/kg de CORT disuelto en propilenglicol, a animales ADX. Una hora más tarde las ratas se sacrificaron perfundiéndolas con una solución de NaCl 0.9% (salina) por vía intracardiaca, con el objeto de eliminar toda la sangre posible de los tejidos a extraer. La ME y el HC así tratados se disecaron y homogenizaron (teflón-vidrio) en bufer 10mM tris, 1.5mM EDTA, 2mM mercaptoetanol, 10% glicerol, pH=7.4 con el agregado de molibdato de sodio 20mM (TEMGMO). Luego de centrifugar a 105000 xg durante 1h, el citosol resultante se incubó junto con (³H)CORT 40nM durante 3h a 0°C. En estas condiciones de incubación se impide, en gran medida, el intercambio de los receptores ocupados con la hormona fría inyectada, con el ligando tritiado agregado al medio de incubación, determinando así los receptores que están libres. Además, se efectuaron incubaciones paralelas agregando dexametasona (DEX) fría 1000x , con el objeto de medir la unión inespecífica. La hormona libre se separó del ligando unido por medio de filtración molecular en minicolumnas de Sephadex LH-20 [32,36,62]. Se utilizaron 0.3g de Sephadex por columna, equilibrados con 3 ml de buffer como mínimo 3h antes de su utilización. Se llenaron las columnas y se enfriaron 1h antes de

proceder a la filtración, la que consistió en sembrar una alícuota de 150 μ l del citosol y luego 150 μ l de buffer. Se esperó como mínimo 15 min. y se eluyeron las macromoléculas del complejo hormona-receptor con 600 μ l de buffer, recogién dose el eluido en viales de vidrio.

La radioactividad se determinó agregando líquido centellante y contando en un contador de centelleo. Se expresó el resultado en fmol/mg proteína o como porcentaje de los receptores totales medidos en los animales ADX inyectados únicamente con propilenglicol (vehículo). Las proteínas se determinaron por el método de Lowry *et. al.* [138].

INCUBACION CON INHIBIDORES DE LA TRANSFORMACION-TRANSLOCACION

El hígado, la médula espinal y el hipocampo fueron extraídos y homogenizados (teflón-vidrio) en buffer TEMG conteniendo 30mM KCl, con el objeto de mantener una fuerza iónica similar al buffer TEMGMO. Una vez obtenido el citosol de los tejidos nerviosos se los calentó a 100°C por 15min. para inactivar los receptores y otros componentes termolábiles, sabiendo que los inhibidores de la transformación descritos en varios tejidos demostraron ser termoestables a 100°C [91,127,139]. Luego de remover el precipitado proteico por centrifugación a 3000 rpm, 250 μ l del sobrenadante, que contenía

de 4 a 6 mg prot./ml, fueron agregados a 250 μ l de citosol de hígado. Los controles consistían en 250 μ l de citosol hepático diluido con un volumen similar de buffer con agregado adicional de BSA (6 mg/ml) para mantener la concentración proteica aproximadamente constante. La incubación se realizó a 0°C durante 3h con el agregado de (³H)DEX 20nM \pm 1000x DEX frío; luego de este paso se procedió a medir la unión a ADN-celulosa.

EFEECTO DE LA ENZIMA ARNasa SOBRE LA UNION DEL COMPLEJO HR A ADN-CELULOSA

Los citosoles de médula espinal e hipocampo se prepararon en buffer TEMG con KCl 30mM, se incubaron alícuotas de ambos tejidos con (³H)DEX 20nM (\pm 1000x DEX fría en exceso) durante 3h a 0°C. Hasta ese momento los receptores de glucocorticoides no estaban transformados, y recibieron 50 μ l de buffer conteniendo 3 mg/ml de ARNasa A o, en el caso de los tubos controles, BSA. La mezcla así formada se calentó a 20°C durante 30 min. con el fin de producir la transformación del complejo hormona-receptor [140,141]. Luego, se procedió a determinar la unión a ADN-celulosa.

ENSAYO CON ARN

Se utilizó un ARN heterólogo (Sigma). El ensayo efectuado fue esencialmente similar al descripto más arriba,

puesto que se utilizó ARNsa además del poliribonucleótido. Los citosoles de hígado e hipocampo se prepararon en buffer TEMG con KCl 30mM, se incubaron alícuotas de ambos tejidos con (³H)DEX 20nM ($\pm 1000\times$ DEX fría en exceso) durante 3h a 0°C. Hasta ese momento los receptores de glucocorticoides no estaban transformados, y recibieron 50 μ l de buffer conteniendo 3 mg/ml de ARNsa A, ARN (1mg/tubo)+ARNsa y, en el caso de los tubos controles, BSA. La mezcla así formada se calentó a 20°C durante 30 min. Luego de este proceso de transformación se procedió a medir la unión a ADN-celulosa.

DETERMINACION DE LA UNION DEL COMPLEJO HR A ADN-CELULOSA

Luego del período de incubación, Los tubos se sometieron a un calentamiento a 20°C durante 30 min, con el objeto de transformar a los receptores [180]. Finalmente, una alícuota de 150 μ l se filtró en minicolumnas de Sephadex LH-20 para obtener la unión total, mientras que otra alícuota de 200 μ l, cuya hormona libre se extrajo por medio de carbón-dextrán 2%-0.2%, se sembró en columnas de ADN-celulosa y la fracción unida se eluyó con NaCl 0.3M [124,140]. Los resultados fueron expresados en fmol/mg prot., y como porcentaje del unido total que quedó retenido por las columnas de ADN-celulosa luego de la transformación inducida por calor.

A pesar de que la eficacia de separación de la hormona libre por parte de las minicolumnas de Sephadex LH-20 y el carbón-dextrán es distinta, se utilizó este último para evitar una excesiva dilución de la mezcla de incubación, previo a la siembra en las columnas de ADN-celulosa, cosa que ocurriría de usarse el primero.

RESULTADOS

CAPTACION DE (³H)CORT *IN VIVO*

Sesenta minutos después de inyectar (³H)CORT i.v. a ratas ADX, se determinó la radioactividad, tanto en el homogenizado como en la fracción nuclear purificada de ME e HC (tabla II.A). Se encontró que la marcación predominaba en el HC, en coincidencia con los niveles de sitios receptores encontrados en ambos tejidos [124]. No obstante la radioactividad encontrada en homogenizado y núcleos de las zonas estudiadas, la relación núcleo/homogenizado del HC era más alta que la de ME (8.4±0.7% en HC, 1.5±0.15% en ME), siendo en esta última 5 veces menor ($p < 0,02$).

DETERMINACION DEL I_{d50} *IN VIVO*

Mientras varios factores podrían ser la causa de esta diferencia, se especuló con que la baja incorporación nuclear de la hormona tritiada en la ME podría deberse a una menor afinidad de los receptores citosólicos para captar al glucocorticoide del torrente sanguíneo *in vivo*. En consecuencia se procedió a determinar el K_d *in vivo* (I_{d50}) para la CORT, en ambos tejidos. Para ello se construyeron curvas dosis-respuesta obtenidas

inyectando CORT s.c. en distintas dosis a ratas ADX, y midiendo la cantidad de receptores libres resultantes de la incubación con (^3H)CORT *in vitro* bajo condiciones de no intercambio de la hormona fría inyectada, a los receptores previamente ocupados por la hormona tritiada [27,32]. Como se muestra en la fig II.3, las curvas de (^3H)CORT unida a receptores libres decaen en forma paralela para ambos tejidos, y la dosis correspondiente a la mitad de la máxima ocupación, tomada como medida de la afinidad *in vivo* (Id 50), están dentro del mismo rango: 0.8 ± 0.22 mg CORT/kg para HC y 0.53 ± 0.035 para la ME ($t = 1.27$, $p: \text{NS}$).

INHIBIDORES ENDOGENOS

Un segundo factor en juego, que produzca los resultados observados en la tabla II.A, sería la presencia de inhibidores endógenos de la transformación/translocación en la ME, que impedirían la llegada al núcleo de los receptores cargados con la hormona. En los experimentos efectuados para determinar esta posibilidad, los receptores citosólicos de hígado se incubaron con (^3H)DEX en presencia o no de extractos hervidos, a fin de desnaturalizar las proteínas, provenientes de la médula espinal o hipocampo. El hecho de calentar a ebullición los citosoles de ambos tejidos nerviosos resultó en una completa destrucción de los receptores de glucocorticoides, quedando cualquier inhibidor

Tabla II.A: Captacion nuclear de (³H)CORT "in vivo" en la ME e HC de ratas ADX.

| CAPTACION (fmol/mg ADN) | | | | | | |
|-------------------------|----------------|--------|----------------|-----------|--------|----------------|
| Rata | Médula Espinal | | | Hipocampo | | |
| | Homogen. | Núcleo | % ^a | Homogen. | Núcleo | % ^a |
| 1 | 850.0 | 12.3 | 4.0 | 2431.4 | 239.2 | 9.8 |
| 2 | 667.3 | 8.7 | 1.3 | 2824.6 | 208.3 | 7.4 |
| 3 | 1063.1 | 18.9 | 1.8 | 4062.1 | 333.8 | 8.2 |
| xm± | 860.1± | 13.3± | 1.5± | 3106.0± | 260.4± | 8.4± |
| E.S. | 114.0* | 2.9** | 0.2** | 491.0 | 37.0 | 0.7 |

Se inyectaron 50 µCi/100g de (³H)CORT i.v. a ratas ADX, las que se sacrificaron 1 h más tarde. Los núcleos de los tejidos mencionados se purificaron según McEwen y Zigmond [135], y se midió la radioactividad del homogenizado crudo y del extracto etanólico de los núcleos purificados.

(*) p< 0.05; (**) p< 0.02, vs. valores correspondientes del HC (test de "t" apareado)

(^a) Núcleo/Homogenizado*100

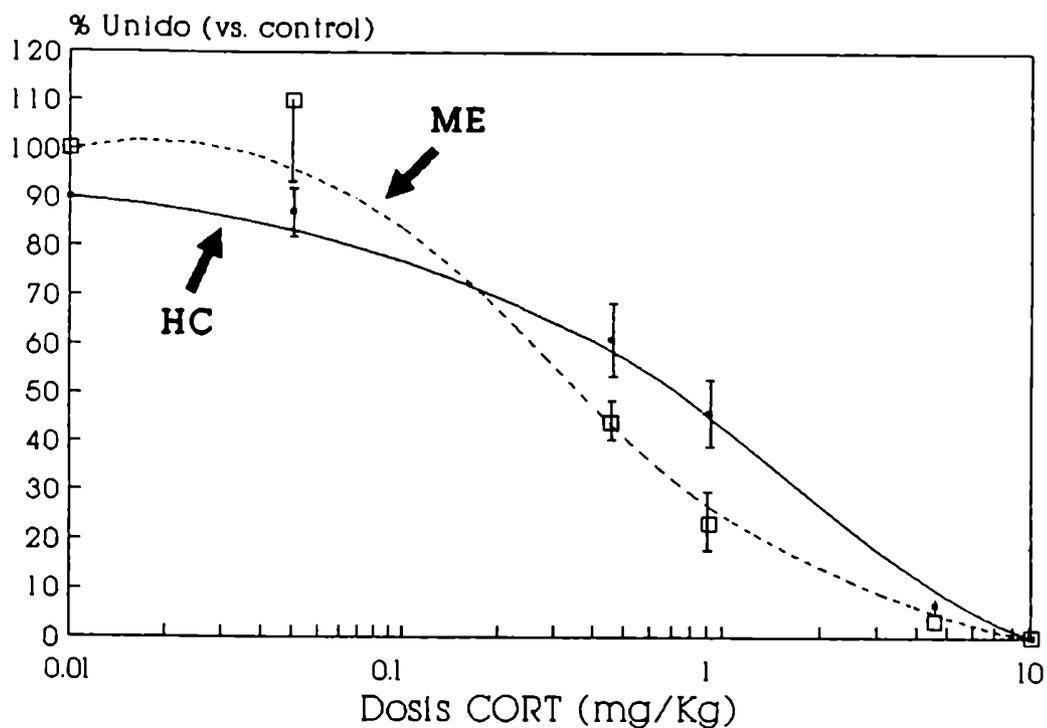


FIGURA II.3: Curvas dosis-respuesta de los receptores citosólicos de ME e HC obtenidas mediante inyecciones s.c. de CORT no radioactiva. Ratas macho ADX fueron inyectadas con vehículo o bien con 0.05; 0.5; 1.0; 5.0 y 10.0 mg/kg de CORT disuelta en propilenglicol. Luego de 1 h se sacrificó a los animales y los citosoles preparados con los tejidos nerviosos mencionados fueron incubados con $(^3\text{H})\text{CORT}$ 40 nM por 3 hs a 0°C . Bajo estas condiciones sólo se determinan los receptores libres. Los datos se expresan como el porcentaje de $(^3\text{H})\text{CORT}$ unido respecto de la unión en ratas controles y cada punto representa la media \pm E.S. de tres experimentos. Los resultados obtenidos con la dosis máxima (10 mg/kg) se los consideró como inespecíficos, restándose de los demás valores. La dosis correspondiente a la mitad de la ocupación máxima se la calculó mediante un programa de computadora, así como la curva teórica graficada. Así, los valores obtenidos son: 0.8 ± 0.22 mg/kg para HC y 0.53 ± 0.035 mg/kg para ME, valores no significativamente diferentes.

termoestable presente en los tejidos. Después de la incubación, los receptores hepáticos fueron sometidos a condiciones que inducen la transformación de los mismos, mediante el calentamiento a 20°C durante 30 min., para luego medir el porcentaje de receptores transformados, mediante la unión a columnas de ADN-celulosa y posterior elución de la fracción unida al ADN con NaCl 300mM. Mediante este procedimiento, se encontró que la aplicación de ambos extractos calentados produjeron una ligera inhibición de la unión de los receptores hepáticos al ADN de las columnas (fig II.4 $p < 0.05$), pero ninguno de los dos tejidos nerviosos contenían cantidades predominantes de dichos inhibidores termoestables, respecto del otro.

ACCION DE LA ENZIMA ARNsa A

Frente a publicaciones que sugerían la presencia de pequeños fragmentos de ARN asociados al receptor de glucocorticoides [69,70,128,129], otro factor a ensayar, para intentar explicar las diferencias encontradas en la captación nuclear de (3 H)CORT, fue la sensibilidad de los receptores de HC y ME a la acción enzimática de la ARNsa A. Citosoles de ambos tejidos fueron incubados primeramente con (3 H)DEX y luego transformados por calor agregando o no ARNsa A (50 μ l de una sl 3mg/ml). Como antes, la unión de los receptores a ADN-celulosa se consideró una

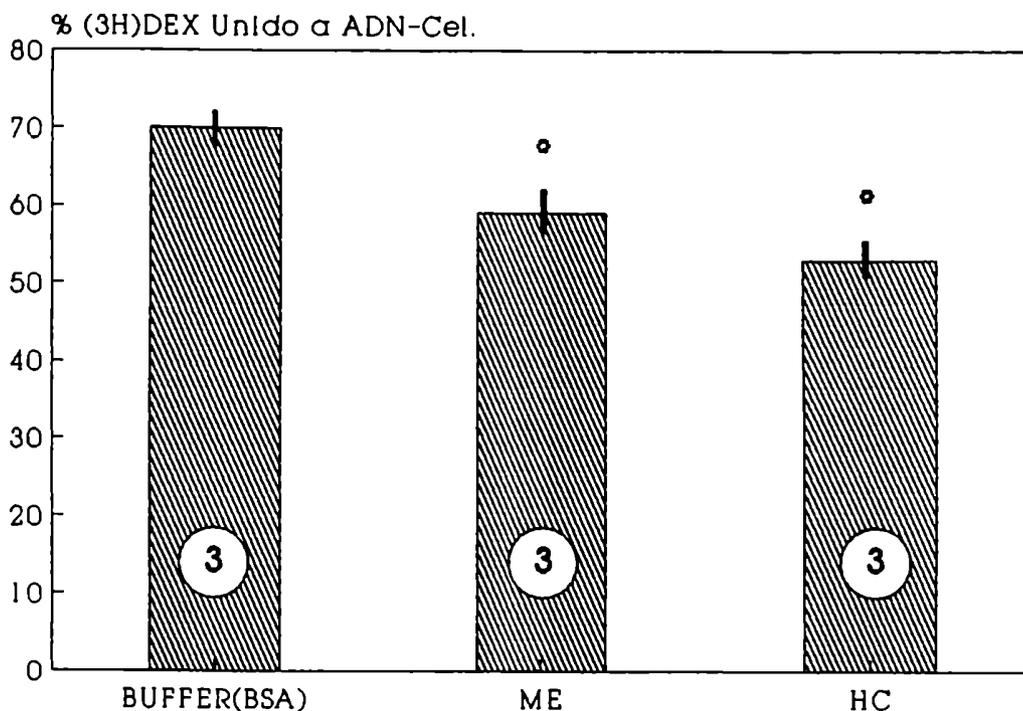


FIGURA II.4: Efecto de los extractos de ME e HC calentados a 100°C, sobre la unión de los receptores de hígado a ADN-celulosa. Los citosoles de ambos tejidos nerviosos se calentaron a 100°C durante 15 min. y luego se centrifugaron. Los sobrenadantes se agregaron a sendos tubos con citosol de hígado mientras que los controles sólo recibieron BSA en buffer. Luego de la incubación durante 3 hs a 0°C con (3H)DEX ($\pm 1000^*$ DEX no radioactivo), los complejos formados se sometieron a condiciones que favorecen la transformación de los mismos (20°C-30 min.). Se filtraron sendas alícuotas por columnas de Sephadex LH-20 para determinar la unión total, y por columnas de ADN-celulosa. La radioactividad eluida de estas últimas con NaCl 300mM se consideró proveniente de los receptores transformados, y se expresó como porcentaje de la unión total.

(*) $p < 0.05$ vs buffer-BSA

medida de la transformación de los mismos. La fig II.5 muestra cómo la unión total de (³H)DEX a receptores citosólicos, medida mediante columnas de Sephadex LH-20, se incrementó luego de la incubación con ARNsa en el caso del HC mientras que en la ME no hubo tal cambio. La cantidad de receptores unidos a ADN-celulosa, comparable en ambos tejidos en las incubaciones control, fue estimulada por acción de la ARNsa solamente en el caso del HC. Así, mientras el 45% del total de receptores de ME mostró afinidad por ADN-celulosa, con o sin la presencia de ARNsa en la mezcla de incubación, el mismo tratamiento en el caso de los receptores de HC resultó en un aumento de la afinidad relativa a ADN-celulosa del 30 al 43% (p<0.01).

El paso siguiente fue estudiar la acción de diferentes concentraciones de la enzima ARNsa A en la mezcla de incubación. La tabla II.B muestra que las diferentes concentraciones empleadas (1.5, 3.0 y 6.0 mg/ml) incrementan el grado de asociación de los complejos hormona-receptor a ADN-celulosa en el caso del HC mientras que la ME permanece insensible a la enzima en todo el rango estudiado.

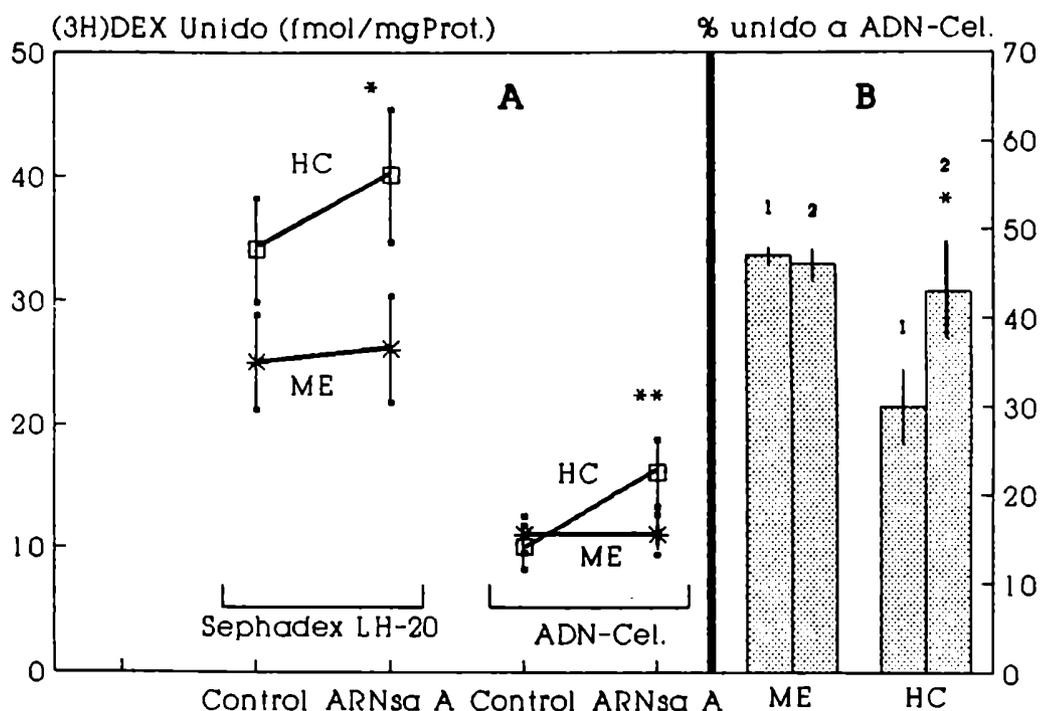


FIGURA II.5: Efecto de la enzima ARNsa A sobre las propiedades de unión de los receptores para GC en ME e HC. A: Se incubó el citosol con (^3H)DEX ($\pm 1000 \times$ DEX no radioactivo) 20 nM por 3 hs a 0°C , y los receptores se transformaron por calentamiento (20°C -30min.) en presencia o ausencia de 150 μg de ARNsa A. Luego se filtraron sendas alícuotas por columnas de Sephadex LH-20, para determinación de la unión total, y por columnas de ADN-celulosa, para determinar el grado de transformación. B: Porcentaje de la unión total que fue eluida de columnas de ADN-celulosa con NaCl 300mM. (1) Controles, (2) ARNsa A.

(*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$, vs control (muestras sin ARNsa), por test de "t" apareado.

Tabla II.B: Efecto de la enzima ARNasa A sobre la unión de (³H)DEX a los receptores citosólicos, y del complejo hormona-receptor a ADN-celulosa, en la ME y el HC.

| Unión de (³ H)DEX (fmol/mg ADN) | | | | | | | | |
|---|--------------|------|------|------|----------------|------|------|------|
| ARNasa (mg/ml) | ADN-Celulosa | | | | Sephadex LH-20 | | | |
| | ME | | HC | | ME | | HC | |
| | I | II | I | II | I | II | I | II |
| 0 | 13.0 | 13.3 | 21.0 | 13.9 | 23.0 | 20.7 | 46.0 | 45.7 |
| 1.5 | 13.0 | 12.9 | 30.0 | 27.2 | 24.0 | 20.5 | 60.0 | 63.0 |
| 3.0 | 14.5 | 10.9 | 31.0 | 23.9 | 25.0 | 17.3 | 64.0 | 52.5 |
| 6.0 | 15.0 | 12.2 | 33.0 | 29.9 | 27.0 | 20.1 | 69.0 | 64.1 |

Las condiciones experimentales para determinar unión de (³H)DEX a receptores citosólicos y unión del complejo H-R a ADN-cel., fueron similares a las descritas en la fig. II.5, excepto las 3 concentraciones de ARNasa usadas. Los números I y II se refieren a dos experimentos separados.

BLOQUEO DE LA ACCION DE LA ARNsa MEDIANTE EL USO DE ARN

Se realizó un ensayo con el fin de confirmar la acción descrita de la enzima ARNsa, utilizando ARN de timo de ternera. Esta experiencia piloto tuvo como fin inhibir, en el HC, la estimulación de la afinidad a ADN-celulosa, obtenida con la ribonucleasa. Se utilizó como tejido control al hígado, ya que posee receptores para glucocorticoides profusamente descritos en la literatura [56]. Los citosoles de ambos tejidos se incubaron primero con (^3H)DEX 20 nM durante los tiempos establecidos (ver mat. y mét.), luego de lo cual se agregó ARNsa A, ARNsa A+ARN y BSA y se procedió a la transformación del receptor por calentamiento. En estas condiciones, luego de medir la unión a ADN-celulosa los resultados indicaron que la acción de la enzima fue bloqueada por el agregado de ARN en ambos tejidos (fig II.6). En el caso del hipocampo la unión basal resultó ser del 12%, con el agregado de ARNsa A se elevó a $33\pm 2.5\%$ y finalmente el bloqueo con ARN resultó en un leve descenso de la unión a ADN por cuanto el porcentaje fue del $25\pm 3\%$. En el caso del hígado el comportamiento fue similar (controles= $41.9\pm 0.3\%$, ARNsa= $48\pm 2.6\%$ y ARNsa+ARN= $43\pm 3.3\%$).

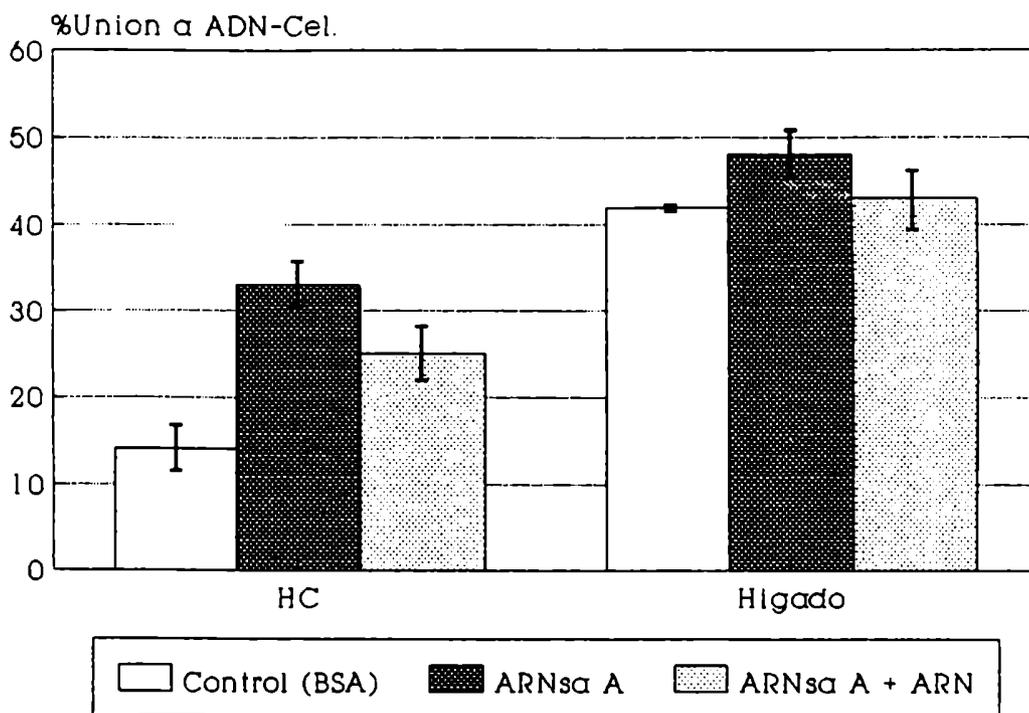


FIGURA II.6: Efecto del agregado de ARN de timo de ternera en la acción de la enzima ARNsa A sobre la unión del complejo H-R a ADN-celulosa. Las condiciones experimentales para determinar unión de (³H)DEX a receptores citosólicos y unión del complejo a ADN-cel., fueron similares a las descritas en la fig. II.5. La única diferencia estriba en que el grupo ARNsa A+ARN tiene además de la enzima, ARN. Los resultados se expresan como porcentaje de unión a ADN-cel. respecto de la unión total, y éstos representan la media ± E.S. de 2 experimentos.

Estos resultados muestran que el efecto de la ARNsa A es probablemente enzimático, contrariamente a lo descrito por Rossini [132] que sugiere la posibilidad de efectos no enzimáticos de esta proteína sobre la regulación del receptor de glucocorticoides.

DISCUSION

Los estudios presentados fueron llevados a cabo para comparar algunas propiedades de los receptores de la ME y el HC, luego de observar que núcleos purificados de ME no concentraban radioactividad en el grado en que lo hacían los núcleos del HC cuando se inyectaban ratas ADX con (^3H)CORT.

El objetivo del estudio fue la investigación de los posibles mecanismos responsables de la baja captación nuclear de la ME. Primero se consideró la existencia de diferentes afinidades para captar la hormona marcada de la sangre por los tejidos estudiados, explicando así los resultados de la tabla II.A. No obstante, se encontró que dichas afinidades *in vivo*, expresadas como la dosis inyectada que produce la ocupación de la mitad de la población de sitios receptores tisulares, eran comparables en ambos tejidos ($X_m = 0.8 \text{ mgCORT/kg}$ para HC y 0.5 para ME). Los resultados muestran que la afinidad por la CORT administrada *in vivo* fue comparable en ambos tejidos nerviosos, coincidiendo con hallazgos previos *in vitro*, en los cuales la afinidad por receptores totales para (^3H)DEX fue también similar [124].

En segundo lugar, se especuló con que la captación de CORT dentro del núcleo podría ser modulada por factores citoplasmáticos, los cuales inhibirían la transformación y/o translocación del receptor. Varios laboratorios han informado la presencia, en tejidos corticosensibles, de inhibidores de la transformación, que también previenen la degradación del receptor [91,127]. Dahmer *et. al.* [142] encontró un inhibidor de la translocación, que afecta la unión del complejo hormona-receptor al núcleo o a ADN-celulosa. Este último es termolábil en contraste con el inhibidor de la transformación [127]. Los experimentos realizados demostraron que las dos zonas estudiadas del SNC contenían un factor que resistía el calentamiento y reducía la unión del complejo HR a ADN cuando los citosoles de la ME y el HC fueron desnaturalizados por calentamiento y luego testeados en un sistema heterólogo, compuesto por receptores citosólicos del hígado incubados con (³H)DEX. No obstante, dicho inhibidor no estaba concentrado preferentemente en ME, y la posibilidad de que éste contribuyera a la baja captación nuclear *in vivo* fue descartada.

Además de los inhibidores mencionados, las moléculas de ARN podrían modular también los movimientos del complejo HR dentro de la célula [67,71]. Varios trabajos sugieren que el ARN estaría asociado con la forma citoplasmática de los receptores en

hígado, glándula mamaria y células MCF-7 [70,131,143,144], y el macrocomplejo así formado se comportaría como una ribonucleoproteína [129]. Además, la adición de ribonucleasas del tipo A o T producen un aumento en la unión del complejo HR a ADN-celulosa, sugiriendo que estas enzimas estarían involucradas en algún paso de la transformación del receptor *in vitro* [128,132,143,144]. Por otro lado, el ARN puro inhibe la unión del complejo HR a ADN-celulosa [130,143,144], y este efecto no sería debido a la competencia que pudiera ejercer el poliribonucleótido por el mismo sitio de unión a ADN en el receptor, ya que habrían sitios de unión, en la proteína receptora, separados para ADN y ARN [87,145,146]. Algunos autores sugieren la posibilidad de que la ribonucleasa A module la afinidad a ADN del complejo HR mediante efectos no enzimáticos [132], pero la existencia de publicaciones que informan de la inhibición de la unión a ADN-celulosa observada al agregar ARN, descartarían acciones colaterales de la ARNsa A en su acción sobre el complejo hormona-receptor [131,143,146,147].

Consecuentemente con estos informes, investigamos la sensibilidad de los receptores para glucocorticoides en ME y el HC, a la enzima ARNsa A. Los resultados muestran que la enzima estimula la capacidad de unión del receptor a (³H)DEX y además la unión de dicho complejo a ADN-celulosa, pero esto sucede

únicamente con el hipocampo. El estudio muestra que la enzima ensayada estimula en mayor medida la unión a ADN-celulosa respecto de la unión del receptor a la hormona tritiada, demostrando la estimulación neta de la afinidad del complejo HR al polianión acoplado a celulosa (61% contra 24%). Este aumento registrado en la unión a ADN-celulosa, se debería a la acción enzimática de la ARNsa A, degradando ARN acoplado al complejo HR, puesto que los ensayos con agregado de ARN puro en conjunto con la enzima, inhibe por lo menos parcialmente a ésta en su acción estimulante sobre la unión a ADN-celulosa. Los resultados descartarían acciones no enzimáticas de la ARNsa A tal como sugiere Rossini [132].

Los resultados alcanzados no dan una explicación para la falta de efecto del tratamiento enzimático con ARNsa A en la ME, no obstante se puede suponer que:

A) Los receptores para glucocorticoides en este tejido no poseen ARN asociado.

B) Podría existir una gran actividad de enzimas ARNsa endógenas que actuarían en un corto lapso de tiempo, previo a la incubación con ARNsa exógena.

C) La disociación enzimática del ARN asociado al receptor estaría prevenida por un factor endógeno desconocido.

En este contexto, Anderson y Tymoczko [145], detectaron un factor termoestable en hígado de rata que funciona como un estabilizante de la asociación entre el ARN y el receptor de glucocorticoides. Si este mecanismo se aplica a la ME, se podría sugerir que una fuerte asociación del ARN al receptor retendría a éste en el citoplasma, imponiendo un impedimento para la translocación al núcleo. Sin embargo, después de cromatografías en columnas de DEAE y ADN-celulosa, se pudo observar que el receptor de ME es susceptible a la transformación inducida por calor [124].

El fenómeno descrito para la ME puede ser otro ejemplo de las observaciones realizadas en otros tejidos neuronales. McEwen *et. al.* [123] describió que la depleción de receptores estrogénicos citosólicos en el hipotálamo, área preóptica y amígdala, de receptores progestínicos en pituitaria y neurohipófisis, y receptores de glucocorticoides de hipocampo fue incompleta luego de administrar agonistas. Sheridan [148] propuso que sitios de unión neurales androgénicos, que pueden unir testosterona y dihidrotestosterona con la misma afinidad, no se acumulan en el núcleo. También se ha descrito una baja captación

nuclear de (^3H)CORT en el nervio óptico [126]. Se podría sugerir que una gran asociación entre el ARN y el receptor llevarían a una translocación incompleta. Es posible que este mecanismo esté involucrado, en alguna medida, con la existencia de receptores crípticos en el hipocampo [122].

Otra explicación para los resultados de la tabla II.A podría partir de los resultados publicados por Reul y De Kloet [7], quienes propusieron que la CORT se une en cerebro a los receptores de glucocorticoides y también a los receptores de mineralocorticoides. Estos últimos se encuentran preferentemente en el hipocampo y muestran una afinidad de 6 a 10 veces más alta por la CORT que los mismos receptores de glucocorticoides. Esto podría implicar que inyecciones trazadoras de (^3H)CORT llevarían a ocupar preferentemente los sitios de unión para mineralocorticoides. La posibilidad de que la proporción relativa de estos sitios de unión sea diferente en la ME respecto del HC es objeto de análisis en el próximo capítulo.

**Heterogeneidad y Transformación
de los Receptores de GC
en la ME y el HC**

CAPITULO III

INTRODUCCION

En el capítulo anterior hemos realizado comparaciones entre los sitios receptores de ME e HC tomando a los mismos como una población homogénea [cap II,36]. Las diferencias encontradas en la captación nuclear de (^3H)CORT inyectado i.v. *in vivo* no se debían a la ocupación diferencial de los receptores totales *in vivo* ni a la presencia de inhibidores de transformación o translocación. Una posible explicación a esta captación nuclear diferenciada sería la expresión de diferentes poblaciones de sitios receptores por parte de la ME y el HC.

Los sitios de unión del SNC son, a la luz de distintas publicaciones, heterogéneos [2,7,8,149,150]. Existen por lo menos dos sitios de unión para esteroides adrenales [98,151]. Estos dos sitios son homólogos con aquéllos identificados por Funder y col. en riñón, y se los denomina de igual forma [99], sitios de unión tipo I y tipo II. Los receptores tipo I tienen mayor afinidad por CORT que los sitios tipo II, y se encuentran concentrados primordialmente en el HC, así como en el riñón [99,151]. Los sitios receptores tipo II se encuentran distribuidos en forma más homogénea en todo el SNC y se hallan presentes tanto en glía como en neuronas [8].

Por nuestra parte, el laboratorio encontró que podían coexistir 2 o 3 sitios receptores en el HC [61]. En este capítulo analizamos las diferentes poblaciones de receptores en HC y ME, en cuanto a su composición en sitios tipo I y tipo II, con el fin de hallar una explicación a la menor captación nuclear de (³H)CORT por parte de esta última zona del SNC, tal como se mencionó en el anterior capítulo. Con este fin utilizamos (³H)DEX, (³H)CORT y (³H)ALDO, en conjunción con competidores específicos no radioactivos para poder discriminar las distintas subpoblaciones de receptores [7,59,149]. Además, analizamos la capacidad de transformación de los diferentes tipos de receptores y su sensibilidad a la enzima ARNsa, para profundizar más el estudio de este efecto, ya descrito en el capítulo anterior.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 200-250 gr de peso. Las mismas se adrenalectomizaron (ADX) por aproximación dorsal, en forma bilateral, 2 a 3 días antes del sacrificio y se mantuvieron durante ese lapso de tiempo en grupos de a 10 animales en jaulas apropiadas donde disponían de alimento balanceado y NaCl 9% ad libitum.

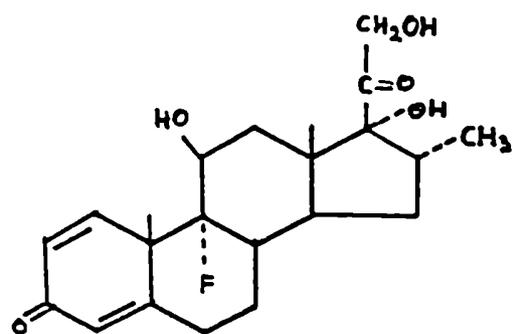
Los animales fueron sacrificados por decapitación para luego extraerles el hipocampo (HC) y la médula espinal (ME), para ser utilizados en los distintos experimentos.

MARCACION DE SITIOS RECEPTORES EN SNC

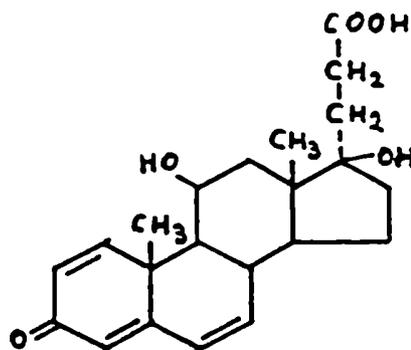
El HC y la ME se homogenizaron en 2-3 volúmenes de buffer TEMGMO y luego se centrifugó durante 1h a 105000g. Se tomaron alícuotas de 0.2 ml del citosol obtenido y se agregaron a tubos que contenían concentraciones constantes saturantes (ensayos de punto único) de los ligandos: (6,7-³H)DEX (45.8 Ci/mmol); (1,2,6,7-³H)CORT (85.8 Ci/mmol) o (1,2,6,7-³H)ALDO (80 Ci/mmol) con o sin la presencia de competidores no radioactivos

sintéticos [90]. Estos últimos, en conjunción con los ligandos marcados permiten caracterizar las diferentes poblaciones de receptores presentes en las zonas estudiadas (Fig III.1). Las características más importantes de estas moléculas sintéticas son: a)no se unen a transcortina; b)son más resistentes a la metabolización y c)son mas específicos que los esteroides naturales y DEX. Para los receptores de glucocorticoides se ha desarrollado el RU-28362, que interactúa exclusivamente con los sitios tipo II, siendo más específico que otros compuestos usados anteriormente como el TA o DEX (sintéticos) o CORT y cortisol (naturales) los cuales se pueden unir en mayor o menor medida a receptores tipo I. En cambio, para los receptores de mineralocorticoides se ha desarrollado el compuesto RU-26752, el cual se une exclusivamente a los sitios tipo I, siendo la afinidad por los sitios tipo II despreciable [61,152,153]. Estos compuestos químicos fueron proporcionados por el Dr. Philibert de Roussel-UCLAF, Francia.

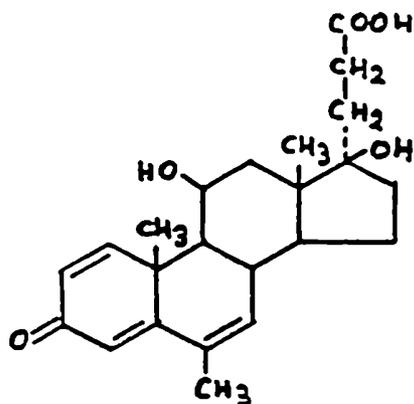
Los tubos con la mezcla de incubación se mantuvieron a 0°C durante 20 h para alcanzar el equilibrio, luego de lo cual se separó la hormona libre de la unida al receptor mediante columnas de Sephadex LH-20 [137]. Los eluidos de las columnas se recogieron en viales, y la radioactividad allí acumulada se determinó en un contador de centelleo líquido.



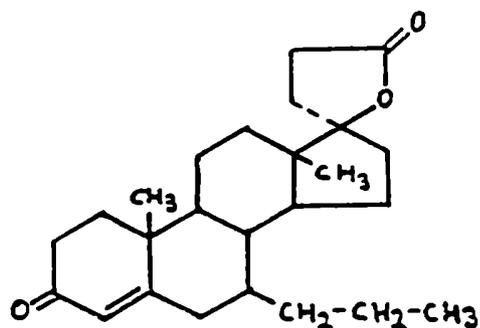
DEX



RU26988



RU28362



RU26752

Figura III.1: Estructuras químicas planas de los esteroides sintéticos utilizados. DEX, RU-28362 y RU-26988 se comportan como GC, mientras que el RU-26752 es un MC "puro".

Las proteínas se determinaron de acuerdo a la técnica de Lowry *et. al.* [138] y los resultados se expresaron en fmol del (³H)esteroide unido/mg de prot. .

Los protocolos utilizados en la determinación de la cantidad de sitios para cada subtipo de receptor implican la coexistencia de dos poblaciones de macromoléculas semejantes, llamadas tipo II o "sitio glucocorticoide clásico", y tipo I [2]. Este último fue considerado por De Kloet [154] como poseedor de dos expresiones fenotípicas diferentes llamadas: a) especie CORT-preferencial (tipo Ia en la Fig III.2) y b) receptor mineralocorticoide verdadero (tipo Ib en la Fig III.2); basándose en evidencias fisiológicas y farmacológicas. Nosotros hemos empleado (³H)DEX y (³H)CORT con el fin de poder discriminar diferentes poblaciones de receptores, como se ha hecho previamente [61,149]. Con la utilización de (³H)DEX hemos confeccionado el siguiente protocolo:

Tubo (A):(³H)DEXA solo.

Tubo (B):(A)+RU-28362 100 veces en exceso (RU-28362 100*).

Tubo (C):(B)+CORT 100 veces en exceso (CORT 100*).

Tubo (D):(A)+DEX no radioactivo 1000 veces en exceso (DEX 1000*).

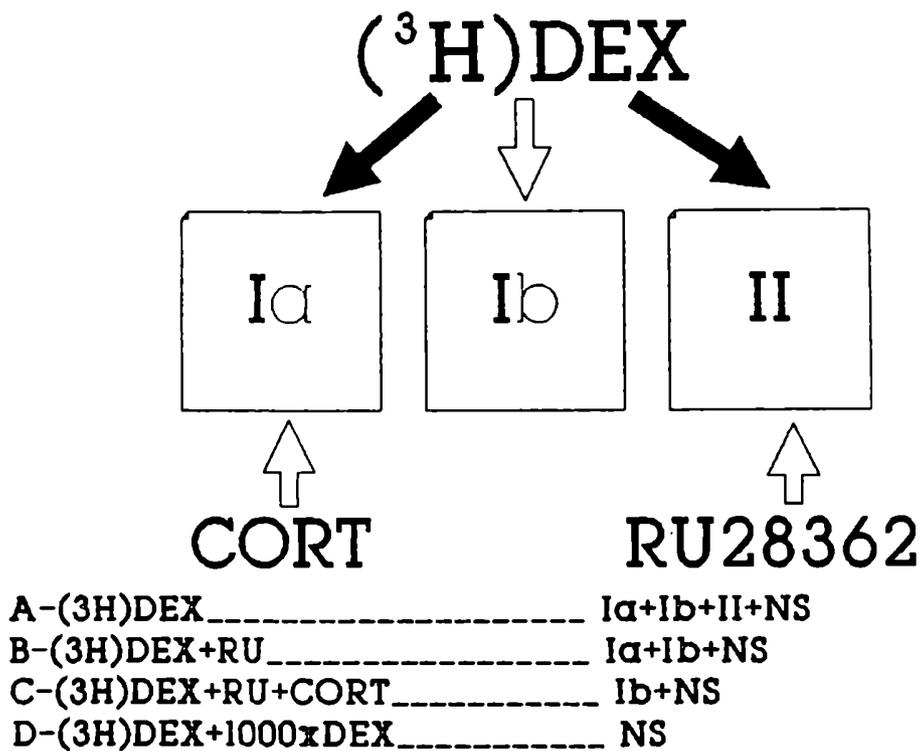


Figura III.2: Determinación de sitios de unión tipo I y tipo II mediante el empleo de un bloqueante estereoespecífico de los sitios II (RU-28362) y el desplazamiento del ligando unido a los sitios tipo I utilizando CORT. Las incubaciones se realizaron con (³H)DEX. La concentración de los subtipos de receptores se obtuvo matemáticamente. La unión inespecífica se estima utilizando DEX radioinerte en exceso (1000x).

Hemos considerado que (A) menos (B) da como resultado la unión a sitios tipo II, (B) menos (C) da la unión a sitios tipo Ia, mientras que con (C) menos (D) obtenemos la unión a sitios tipo Ib, asumiendo que los sitios tipo II y Ia son bloqueados selectivamente por el RU-28362 y CORT respectivamente (fig III.2) [61]. Operativamente hemos considerado a los sitios tipo I como la suma de Ia + Ib.

Cuando se utilizó (³H)CORT (fig III.2b), se consideró que este ligando ,solo, se une a los sitios tipo I y tipo II (tubo (A)), (³H)CORT mas RU-28362 1000* se une a sitios tipo I mas unión no específica (tubo (B)) ,finalmente en el tubo (C) colocamos la hormona tritiada mas 1000 veces esta concentración en RU-28362 además de RU-26752, que en conjunto bloquean ambos tipos de receptores y miden únicamente la unión no específica. De este modo la unión a sitios II resulta de (A) menos (B), mientras que la unión a sitios tipo I se determina de (B) menos (C). (³H)CORT no fue considerado adecuado para diferenciar los dos fenotipos de los receptores subtipo I, ya que esta hormona posee una afinidad comparable a ALDO por los receptores marcados con (³H)ALDO, como ha sido publicado anteriormente [2,61,155]. Sin embargo existe una población de receptores que poseen alta afinidad por CORT pero para los que ALDO es un agonista débil [118,156].

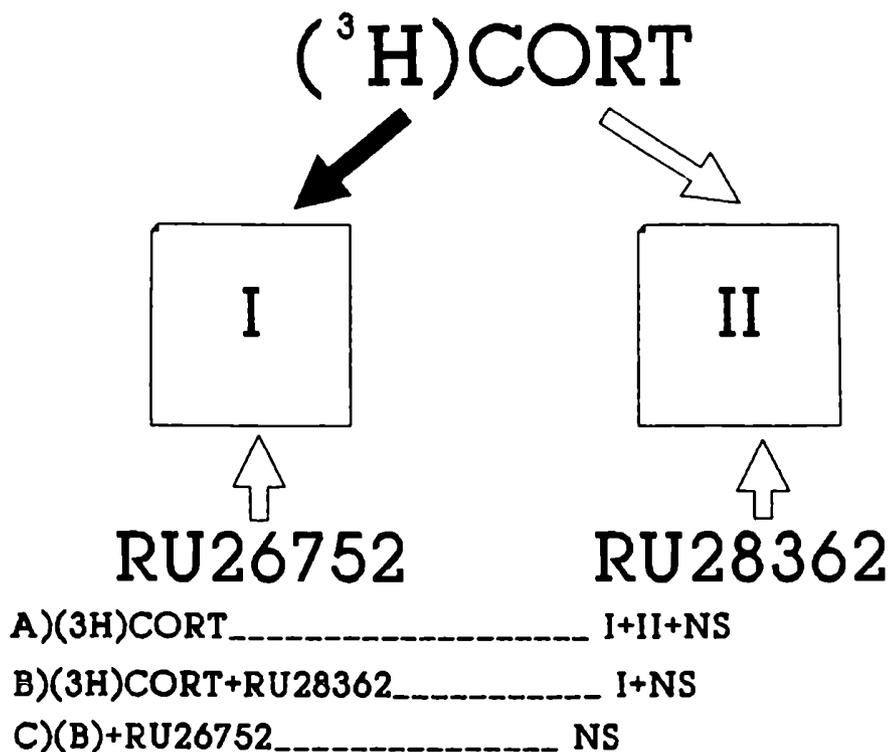


Figura III.2b: Determinación de sitios de unión tipo I y tipo II utilizando (³H)CORT, mediante el empleo de bloqueantes estereoespecíficos de los sitios II (RU-28362) y de los sitios I (RU-26752). Las incubaciones se realizaron con (³H)CORT. La concentración de los subtipos de receptores se obtuvo matemáticamente. La unión inespecífica se estima de (C).

Los ensayos de puntos únicos contenían a las hormonas marcadas en una concentración única en todos los tubos: 20 nM de (³H)DEX , 40 nM de (³H)CORT.

ENSAYOS DE SATURACION

La ME y el HC fueron homogenizados en buffer TEMGMO (Teflón-vidrio), y el homogenato obtenido se lo centrifugó a 105000xg durante 1h a 0-4°C. El citosol así obtenido se dividió en alícuotas de 200 µl y se incubó con (³H)DEX en un rango de concentraciones de 5 a 20 nM con o sin la presencia de RU-28362. La unión inespecífica se determinó por incubaciones paralelas con DEX 1000x utilizando solamente 4 puntos dentro del rango de concentraciones de la hormona tritiada. Se construyó así una línea recta, característica de la unión no específica, mediante el método de los cuadrados mínimos obteniéndose un $r^2 > 0.99$ en todos los casos. Con la curva de calibración inespecífica así construida se calculó la unión específica como la resta de la unión inespecífica, obtenida de la recta, a la unión total, en cada punto experimental.

La incubación se mantuvo durante 20h a 0°C, luego de lo cual se separó la hormona libre de la unida mediante minicolumnas de Sephadex-LH20. Se recogieron los eluidos de las columnas, que contenían la radioactividad de la hormona unida, y se determinó

su contenido radioactivo por centelleo en medio líquido. Los resultados se expresaron como fmol de (^3H)DEX específicamente unido por mg de proteína.

Los procedimientos para determinar las diferentes subpoblaciones de sitios de unión involucra la incubación de (^3H)DEX ($\pm 1000\times$ de hormona fría) en presencia o ausencia de RU-28362. Sin este último, la hormona marcada se une a los dos sitios de unión, pero con el competidor RU-28362 la (^3H)DEX se une solamente a los sitios receptores tipo I, quedando bloqueados los sitios tipo II. En el caso de experimentos del tipo de saturación se realizaron dos incubaciones paralelas para determinar los parámetros de unión de los sitios receptores. En una serie de tubo (serie E) se utilizó (^3H)DEX que se incubó en ausencia del competidor frío, bajo estas condiciones se pueden observar ambos sitios de unión. Los datos obtenidos se ajustaron para dos sitios de unión y se calcularon los parámetros según el método de las pendientes límite de Rodbard y col. [157]. En la otra serie paralela de tubos (serie G) se agrega el competidor no radioactivo (RU-28362) en una concentración de 500 nM por tubo. Finalmente, a la serie de puntos inespecíficos se le agregó (^3H)DEX + DEX 1000x.

Los parámetros de unión de los sitios tipo I se calcularon a partir de la serie de tubos G utilizando el método

gráfico lineal directo de Cressie y Keightley [158], ya que en estos casos se asume la presencia de un solo sitio de unión. La única fuente de datos para determinar la constante Kd_2 y B_{max2} es la serie de tubos E, pero estamos en presencia, además, de los receptores tipo I, por lo que se determinó el valor de Kd_2 con ayuda de la ecuación Ec1 y los datos combinados de las series de tubos E y G:

$$Kd_2 = \frac{B_{max2} * F}{B_t - \frac{B_{max1} * F}{(Kd_1 + F)}} - F \quad Ec1$$

donde Kd_1 , Kd_2 , B_{max1} y B_{max2} corresponden a las constantes de disociación y al número máximo de sitios receptores para los sitios tipo I y II, F corresponde a la concentración de hormona libre y B_t equivale a la hormona marcada unida en forma específica tal como se la calcula de la serie de tubos E. Para calcular Kd_2 se utilizan los valores de Kd_1 y B_{max1} obtenidos de los valores dados por la serie de tubos G y B_{max2} se calcula conociendo $B_{max_{total}}$ de la serie E y B_{max1} . Se informa el valor de Kd_2 promedio de los datos individuales obtenidos, en un dado experimento, con cada punto experimental conformado por el par de valores B_t, F de la serie E.

UNION DE LOS SUBTIPOS I Y II A ADN-CELULOSA

El citosol de HC o ME se obtuvo en buffer TEMG con el agregado de KCl 30 mM en reemplazo del molibdato de sodio, conocido inhibidor de la transformación del complejo hormona-receptor. Se incubaron fracciones del citosol con (³H)DEX 20 nM, los sitios de unión tipo I fueron marcados después de bloquear los subtipo II con RU-28362 100, mientras que los receptores tipo II fueron determinados luego del bloqueo selectivo de los subtipo I con RU-26752 100. Luego de 3hs de incubación a 0°C, las fracciones recibieron 300µg de ARNsa A (Sigma) o 50 µl de buffer (controles); esta enzima ha demostrado que incrementa la afinidad de los complejos hormona-receptor a polianiones y ADN-celulosa [129,144]. Las mezclas fueron calentadas a 20°C durante 30 min. para inducir la transformación del receptor, luego una alícuota fue destinada para medir unión total procesándola a través de Sephadex LH-20 para separar la hormona libre [137]. Otra alícuota se trató con una mezcla de carbón-dextrán (DCC) con el mismo fin de separar la hormona libre de la unida, esta última se aplica a minicolumnas conteniendo ADN-celulosa de acuerdo a la técnica de Kovacs *et. al.* [63]. Las columnas se lavaron extensivamente con buffer y los complejos hormona-receptor se eluyeron posteriormente con buffer conteniendo NaCl 300mM. Finalmente, se calculó el porcentaje de complejo unido a ADN-celulosa respecto de la unión total, para los subtipos de receptor I y II separadamente.

ANALISIS ESTADISTICO

Se analizaron los datos obtenidos mediante al test de "t" de Student, como se indican en las figuras y tablas. Los parámetros de unión de los gráficos de Scatchard fueron calculados mediante el método Lineal Directo de Cressie y Keightley [158] en una computadora Hewlett-Packard HP86, en el caso de estar en presencia de un solo sitio de unión. Para analizar los datos de los experimentos de saturación sin agregado de competidores no radioactivos, lo que presupone que estamos en presencia de más de un sitio de unión con diferentes afinidades, se utilizó el método de las pendientes límite de Rodbard y col. [157].

CURVAS DE COMPETENCIA

El HC y la ME se homogenizaron en 2-3 volúmenes de buffer TEMGMO y luego se centrifugó durante 1h a 105000g. Se tomaron alícuotas de 0.2 ml del citosol obtenido y se agregaron a tubos que contenían los competidores RU-28362 o RU-26752 en concentraciones 0x, 0.5x, 1x, 10x y 100x (respecto de la concentración de ligando marcado usado en el ensayo). Los tubos se preincubaron 20 min. previo al agregado de los ligandos radioactivos (^3H)CORT o (^3H)DEX en concentraciones fijas saturantes de 40 nM y 20 nM, respectivamente. Se realizó la

incubación durante 20 h a 0°C, para luego separar la hormona marcada libre de la unida por columnas de Sephadex LH-20. El volumen V_0 de las columnas, que contenían los receptores marcados con el ligando tritiado, se recogieron en viales para luego ser cuantificada la radioactividad correspondiente en un contador de centelleo líquido. La unión no específica se determinó por duplicado en incubaciones paralelas utilizando una concentración 1000x del ligando frío correspondiente, respecto de la hormona radioactiva utilizada en un ensayo dado. Los resultados se expresaron como porcentaje de unión específica respecto de la unión obtenida en las incubaciones controles (sin competidor agregado, B_0). Se graficó % de unión específica vs logaritmo de la relación $(RU_{xxxxx})/((^3H)\text{esteroide})$.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS DE ADN-CELULOSA

La cromatografía se realizó en columnas de 1 cm de diámetro por 25 cm de largo en la que se agregó un lecho de 3 gr de ADN-celulosa (Sigma) previamente resuspendida y lavada con Buffer TEMG + BSA hasta eliminar las partículas más finas que podrían tapar la columna (3 lavados con 20 ml del buffer). Una vez formada la columna se lavó nuevamente con 70 ml del buffer con un flujo controlado por una bomba peristáltica, equivalente a 400 μ l/min, quedando lista para el ensayo. Cabe mencionar que

después de cada experiencia la columna se lavó con el buffer ya mencionado hasta equilibrar el sistema (aprox. 100 ml de buffer), siendo la concentración de iones similar al buffer de lavado (medido por conductividad).

Los citosoles de ME y HC, obtenidos como ya ha sido mencionado, se incubaron durante 18 hs a 0 °C en presencia de (³H)DEX 20 nM y RU-26752 100x (se marcan únicamente los sitios tipo II), luego de lo cual se transforman los complejos hormona-receptor por incubación a 20 °C durante 30min. El total del volumen de incubación (3ml) es sembrado en la columna, lo que representa aproximadamente 3x10⁶ de cpm totales (equivalente a aprox. 5x10⁴ cpm de unión específica a receptor), se conecta la bomba para que penetre todo el volumen sembrado y se detiene la misma durante 15min para que la mezcla reaccione con el ADN acoplado a celulosa. Luego de dicho lapso se comienza con el lavado correspondiente con buffer 60-70ml de TEMG+BSA mediante un flujo de 200µl/min controlando la radioactividad del buffer (30 cpm) y del buffer del final del lavado que nunca supera los 80 cpm. Cuando se termina el proceso de lavado se comienza con el gradiente lineal de elución, para lo cual se colocan en 2 reservorios cónicos 10-12 ml de buffer de lavado (recipiente 1 en la figura III.3), y una cantidad equivalente de buffer de alta fuerza iónica (TEMG+BSA+KCl 300mM) [159] en el recipiente 2.

Ambos recipientes no se conectan entre sí hasta que se da comienzo al ensayo, el recipiente 1 posee un agitador mecánico para asegurar la mezcla del volumen de buffer del reservorio 2 que entra al recipiente 1. Para comenzar con la elución de los complejos hormona receptor que se unieron al ADN de la columna, se abre la llave A (fig III.3) que conecta ambos recipientes, se conecta el agitador en el recipiente 1 y se enciende la bomba peristáltica a un flujo de 200µl/min. Se recogen 400µl/tubo en un colector de fracciones programado a tal efecto. Es importante mencionar que todas las operaciones se realizaron en un cuarto refrigerado, cuya temperatura ambiente nunca supera los 4°C. Una vez terminado el gradiente de elución se continúa lavando la columna con buffer de alta fuerza iónica (300mM de KCl) hasta equilibrar la misma, recogiendo siempre 400µl por tubo a un flujo de 200µl/min. Cuando se finaliza el ensayo se procede a lavar la columna como se ha mencionado al comienzo. Mientras que con las fracciones se reservan 200µl para medición de la radioactividad por determinación en un contador de centelleo líquido y el resto del volumen de cada tubo (200µl) se utiliza para medir la concentración de potasio por conductimetría.

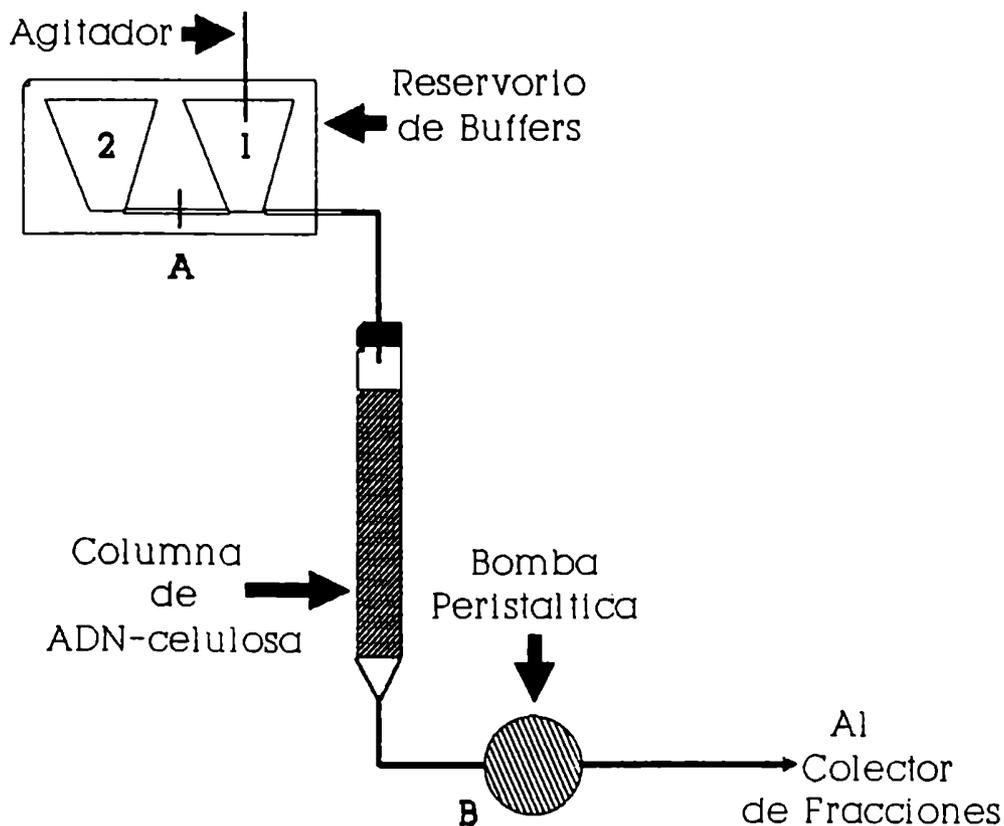


Figura III.3: Esquema del sistema utilizado para la realización de las cromatografías en columnas de ADN-celulosa. Los reservorios cónicos 1 y 2, en la parte superior, contienen los buffers de baja y alta fuerza iónica, respectivamente. Se conectan por medio de la llave A, y con un agitador en el recipiente 1 se forma el gradiente lineal necesario para eluir los receptores, unidos a ADN, de la columna. El flujo está controlado por una bomba peristáltica B, y las fracciones son recogidas por un colector apropiado.

MEDICION DE LA CONCENTRACION DE K+ POR CONDUCTIMETRIA

La concentración de KCl en cada fracción se determinó por medio de un conductímetro (Artronic) con una celda de electrodos de Pt cuya constante resultó 1.1 cm^{-1} . El rango de la escala era de $0.05 \text{ } \mu\text{s/cm}$ a 200ms/cm , posibilitando la determinación de un amplio rango de concentraciones. Se tomaban alícuotas de $100 \text{ } \mu\text{l}$ de cada 5 fracciones recogidas y se diluía a 20 ml con agua bidestilada, se procedía a la medición de la conductividad sumergiendo la celda en dicho volúmen. En cada caso se construía una curva de calibración con 6 puntos distribuidos en todo el rango de concentraciones utilizados (0mM a 300mM de KCl), en todos los casos la curva de calibración resultó ser lineal dentro de la escala de concentraciones utilizada y el coeficiente r^2 siempre fue mayor que 0.999 . La concentración de K^+ se expresó como miliequivalentes/litro (meq/l).

RESULTADOS

CURVAS DE COMPETENCIA CON RU-28362

Los primeros experimentos realizados fueron curvas de desplazamiento incubando con (^3H)DEX 20.nM y compitiendo la unión con concentraciones crecientes del glucocorticoide sintético RU-28362. Los resultados se muestran en la figura III.4, donde se hace evidente, tal como lo indican varias publicaciones [2,7,98,100], la naturaleza heterogénea de los receptores de glucocorticoides en las dos zonas ensayadas, ya que concentraciones del competidor tan altas como 100x (respecto de la concentración de (^3H)DEX) son inefectivas para desplazar totalmente la unión de hormona tritiada tanto en el HC como, menos evidente, en la ME. La radioactividad que permanece unida a sitios receptores para las concentraciones máximas de competidor utilizadas son 50% del total en HC y 10% del total en ME. Otro dato importante que puede ser observado de este gráfico es, además de la mencionada heterogeneidad en los sitios receptores, la diferente composición de sitios de unión resistentes al competidor (sitios tipo I) y sensibles al mismo (sitios tipo II) que se detecta en ME y en el HC. En la ME sólo el 10% de los receptores totales no son desplazados de su unión con (^3H)DEX por

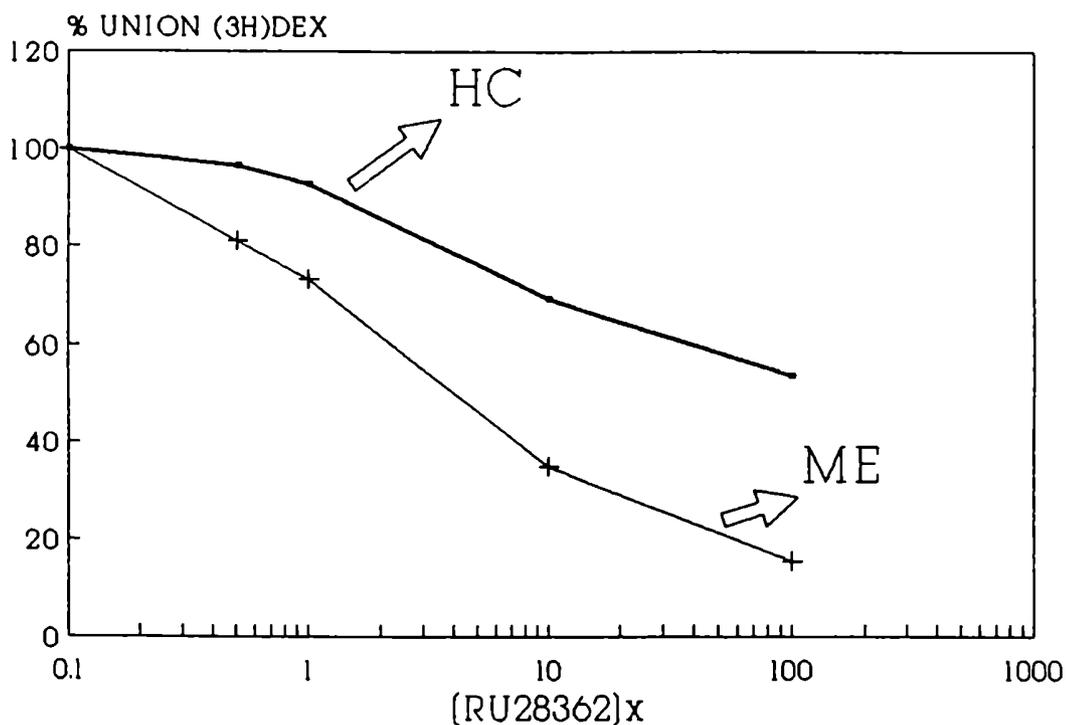


Figura III.4: Curvas de desplazamiento de la unión de (³H)DEX a receptores, en citosol de ME e HC, utilizando distintas concentraciones del compuesto RU-28362, el cual se une específicamente a sitios tipo II. Se tomaron alícuotas de 200µl, de los citosoles correspondientes, y se preincubaron con distintas concentraciones del GC sintético RU-28362, durante 20 min. luego de lo cual se agregó (³H)DEX en concentración única de 20nM, a cada tubo y se incubó durante 20 h a 0°C. La radioactividad inespecífica se determinó en incubaciones paralelas con (³H)DEX + 1000x DEX radioinerte. Se representa el % de unión respecto de controles (tubos sin competidor agregado, Bo) vs logaritmo de la relación RU/(³H)DEX.

el competidor RU-28362, los llamados receptores tipo I, mientras que el 90% sí es sensible al ligando no radioactivo y se los clasifica como receptores tipo II [149]. En cambio en el HC encontramos concentraciones similares tanto de sitios tipo I como de sitios tipo II [90], como lo demuestra la figura III.4, ya que el 50% de los sitios receptores totales es sensible al competidor RU-28362. Este último resultado es coherente con numerosas publicaciones que mencionan al HC como un tejido que mantiene concentraciones altas de sitios tipo I, respecto de diferentes zonas del SNC incluyendo la ME [2]. La concentración de receptores totales (sin RU-28362), en fmol/mg de proteína, medidos en esta serie de ensayos fue de 160 para el HC y de 56 para la ME (resultados de un único ensayo).

Cuando se cambia el ligando marcado por (^3H)CORT (40nM), y se compete con RU-28362, se obtienen resultados diferentes a pesar de estar usando los mismos tejidos y en diluciones similares a las usadas en los ensayos con (^3H)DEX. En el HC sólo el 15% de la unión específica total es sensible a dicho competidor, en la máxima concentración ensayada, lo que significa que el 15% de la unión de (^3H)CORT 40 nM representa los sitios tipo II y el resto representa los sitios tipo I (fig. III.5). En la ME el 39% de la hormona marcada unida fue sensible al RU-28362 100x (4 μM), mientras que el 61% de los sitios receptores totales

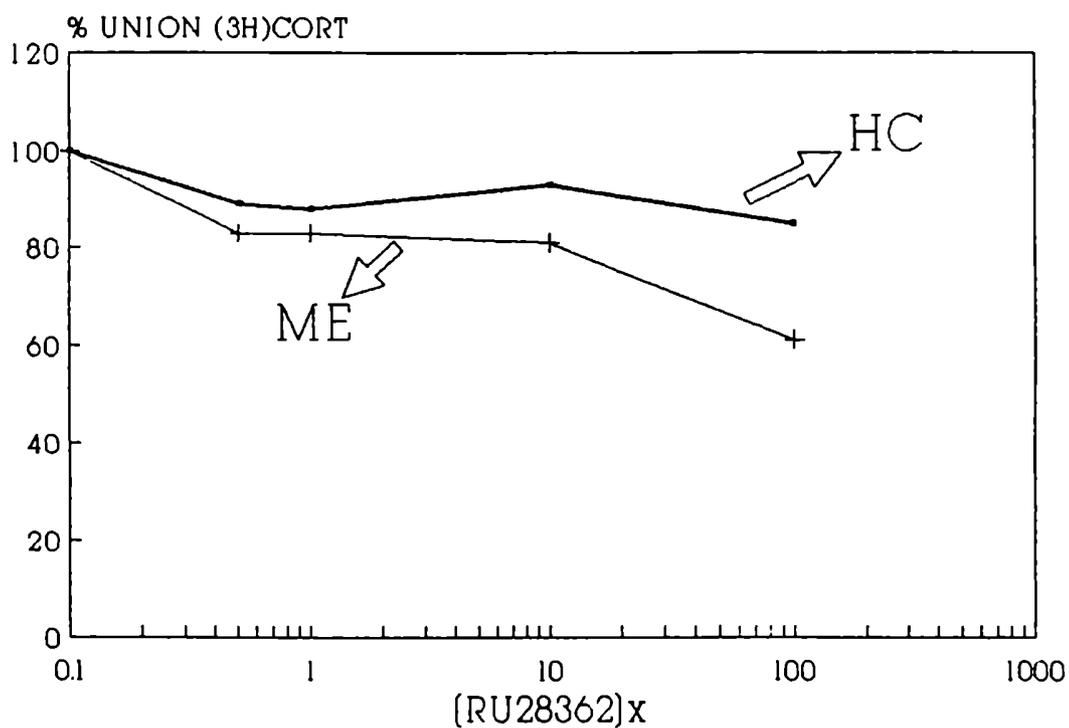


Figura III.5: Curvas de desplazamiento de la unión de (3 H)CORT a receptores, en citosol de ME e HC, utilizando distintas concentraciones del compuesto RU-28362, el cual se une específicamente a sitios tipo II. Las condiciones experimentales son similares a las descritas en la fig III.4. Se representa el % de unión respecto de controles (tubos sin competidor agregado, B_0) vs logaritmo de la relación RU/(3 H)CORT.

resultaron resistentes a la máxima concentración de competidor utilizada. Como se puede observar la hormona (^3H)CORT tiene afinidades diferentes a las vistas para (^3H)DEX por los sitios tipo I y tipo II, tal como menciona la literatura [2,7], ya que, de no ser así, no se justificarían los patrones de competencia diferentes observados cuando se utiliza (^3H)CORT y (^3H)DEX. La concentración de receptores totales, cuando no se colocaba competidor en la incubación, en esta serie de experimentos resultó de 224 Fmol/mg prot. para el HC y 36 Fmol/mg prot. para la ME (resultados de un único ensayo).

ENSAYOS DE PUNTO UNICO

Luego de los experimentos de competencia que señalan la heterogeneidad de los sitios de unión en la ME (principalmente) y en el HC (aunque ya publicado por otros autores), además de que sugieren que la composición de los receptores en los dos tejidos estudiados son diferentes, decidimos realizar una serie de experimentos de puntos únicos para confirmación de estos hallazgos utilizando una concentración saturante de (^3H)DEX o (^3H)CORT en presencia o ausencia de RU-28362 100x, que fue la concentración máxima utilizada en los ensayos de competencia y que consideramos adecuada para poder discriminar entre los distintos sitios de unión presentes en HC y ME.

La primera parte de estos ensayos se realizaron con (^3H)DEX y los resultados se muestran en la figura III.6. Estos experimentos mostraron cantidades equivalentes de sitios tipo I y tipo II en el HC, tal como se observó en los ensayos de competencia, con una relación I/II de 1.2 . En la ME la situación fue distinta, ya que mientras la concentración de sitios tipo II era comparable a la encontrada en el HC, los sitios tipo I se encontraban significativamente reducidos en comparación con los niveles hallados en el HC ($p < 0.02$), la relación I/II en la ME es de 0.3 . Estos resultados confirman que la concentración de sitios tipo I y tipo II son diferentes en la ME y el HC (fig III.6).

La segunda parte de los experimentos incluyeron el uso de (^3H)CORT, de esta manera comparamos resultados obtenidos con glucocorticoides sintéticos y naturales. La fig III.7 muestra los resultados obtenidos, donde se puede observar que los sitios tipo I marcados con la hormona natural se concentran preferentemente en el HC ($p < 0.001$), siendo este resultado similar al obtenido con (^3H)DEX. No obstante, la distribución de sitios en ambos tejidos difiere de la observada con (^3H)DEX, ya que la relación I/II en el HC es de 6.0 y la misma relación en la ME es de 1.0 como se puede observar comparando la figura III.6 y III.7. También se volvió a encontrar una baja concentración de sitios

³H)-DEX

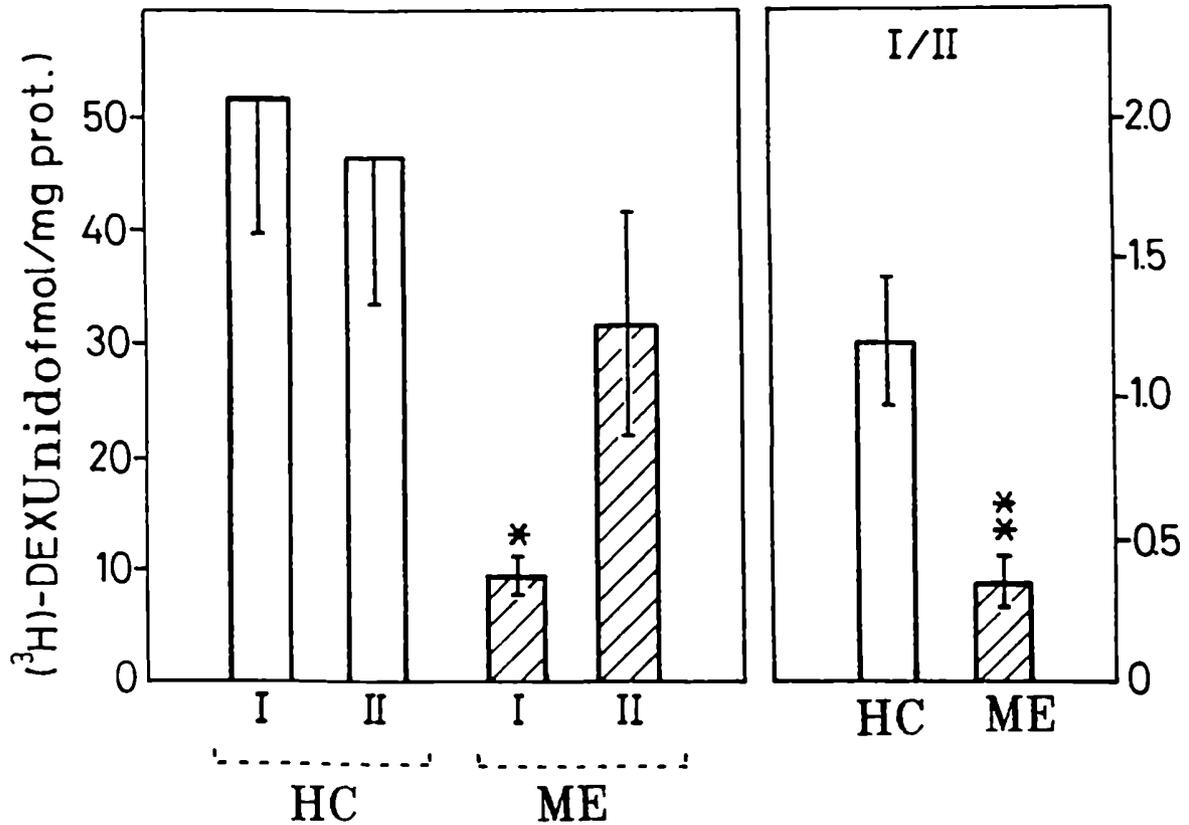


Figura III.6: Unión de (³H)DEX a receptores tipos I y II en ME e HC. El citosol de los tejidos nerviosos se incubó con DEX tritiada en una concentración fija de 20nM (A), mas RU-28362 (B), mas RU28362 y CORT (C), o con 1000x de DEX radioinerte (D). Se consideró que la unión a subtipo II resulta de A menos B, tipo I de B menos C, mientras que D representa la unión no específica. Los resultados se expresan como la media ± E.S. de 4 experimentos.

* p < 0.02 vs. tipo Ia de HC

** p < 0.001 vs. Ia/II en HC

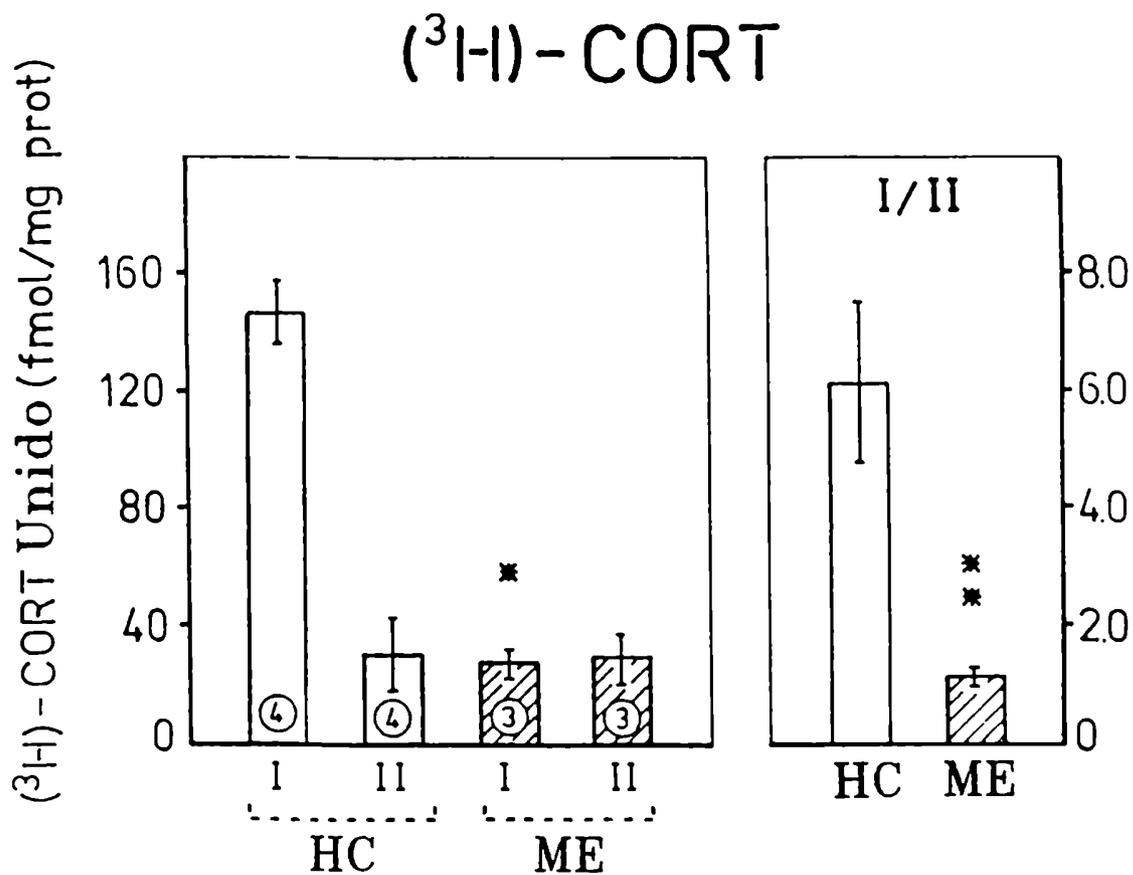


Figura III.7: Unión de (³H)CORT a receptores en ME e HC. Los citosoles correspondientes se incubaron con el ligando radioactivo sólo (A), mas RU-28362 (B), mas RU-28362 y RU-26752 (C). Se consideró que la unión a sitios tipo II resulta de A menos B, y los receptores tipo I de B menos C. Los resultados representan la media ± E.S. de 3-4 experimentos.

* p < 0.001 vs. tipo I de HC.

** p < 0.05 vs. I/II en HC.

tipo I en la ME respecto del HC en lo que atañe a la relación I/II en ambos tejidos.

ENSAYOS DE SATURACION

Luego de realizar los experimentos de punto único decidimos hacer análisis de saturación de ambos sitios de unión para poder medir las afinidades de estos sitios receptores además de su concentración, único dato posible de obtener con la metodología arriba mencionada, y describir así más apropiadamente a los diferentes sitios de unión. Para ello, utilizamos (^3H)DEX en concentraciones crecientes tal como se describió en Materiales y Métodos. La figura III.8 muestra los resultados en el HC (gráfico superior) y en la ME (gráfico inferior) con o sin el agregado del competidor no radioactivo RU-28362, en la forma de gráficos de Scatchard [160].

Los valores de $B_{\text{max}1}$ y $B_{\text{max}2}$ calculados de estos ensayos caen dentro del rango de valores obtenidos con los experimentos de punto único. La concentración de sitios tipo II resultó similar en las dos zonas estudiadas, mientras que los sitios tipo I se concentraron preferencialmente en el HC coincidentemente con resultados obtenidos por ensayos de punto único y con publicaciones anteriores [8,31,98]. Además, los valores de las constantes de afinidad de ambos sitios revela que la hormona

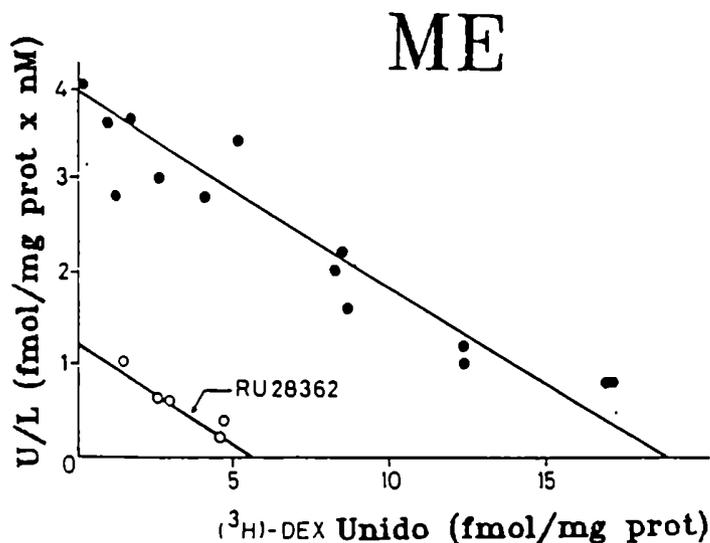
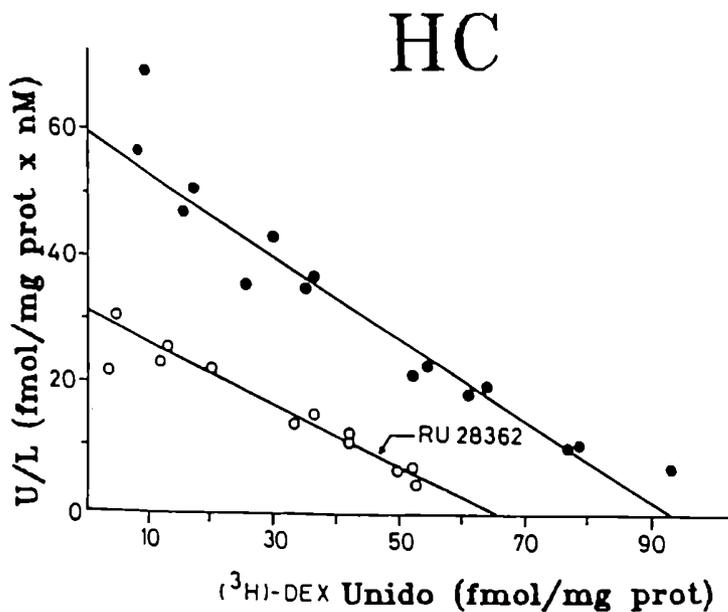


Figura III.8: Gráficos de Scatchard de la unión de (³H)DEX en ME (panel inferior) e HC (panel superior). Los citosoles obtenidos de cada tejido se incubaron en buffer TEMG con molibdato 20mM, durante 20 h a 0°C en presencia de la hormona radioactiva en un rango de concentraciones de 0.5 a 15 nM (\pm DEX radioinerte). Se trabajó en ausencia (O) o en presencia (O) del GC sintético RU-28362 agregado en una concentración fija de 500 nM/tubo. En presencia del competidor se marcaron los sitios tipo I con valores de K_{d1} de 5.0 nM en ME y 2.1 nM en HC, mientras que los valores respectivos de B_{max1} fueron 6.0 fmol/mg prot. en ME y 65.0 fmol/mg prot. en HC. Los valores obtenidos de K_{d2} calculados utilizando E_{c1} fueron de 3.5 nM en ME y 0.7 nM en HC. Los B_{max2} resultaron de 14 fmol/mg prot. en ME y 25.0 fmol/mg prot. en HC

(³H)DEX tiene alta afinidad por ambos sitios de unión aunque Kd₁ sea mayor que Kd₂, bajo las condiciones experimentales mencionadas, dato que es coherente con publicaciones anteriores [9,100].

TRANSFORMACION DE LOS SUBTIPOS DE RECEPTORES Y SENSIBILIDAD A ARNsa

El siguiente paso fue estudiar la transformación de los receptores, por la cual adquieren la habilidad de unirse a ADN-celulosa, promovida por el calentamiento o calentamiento mas la acción de la enzima ARNsa A [36,92,143,144]. La figura III.9 muestra los resultados al incubar el citosol de ME o HC con (³H)DEX en ausencia (marcación de sitios totales) o presencia de RU-28362 (marcación sitios tipo I) o presencia de RU-26752 (marcación de sitios tipo II). Paralelamente se ve la acción de la enzima mencionada en cada subtipo de receptor, así se puede observar en el panel izquierdo de la figura III.9 el porcentaje de unión a ADN-celulosa de los receptores tipo I, la enzima ARNsa tuvo acción en los receptores de ambos tejidos aumentando el porcentaje de complejos hormona-receptor unidos a ADN-celulosa en HC (p<0.02) y en ME (p<0.01). En cambio, para los sitios de unión tipo II (panel central), la enzima siguió siendo efectiva en los receptores de HC (p<0.01), pero no lo fue en la ME.

% de Unión a ADN-celulosa

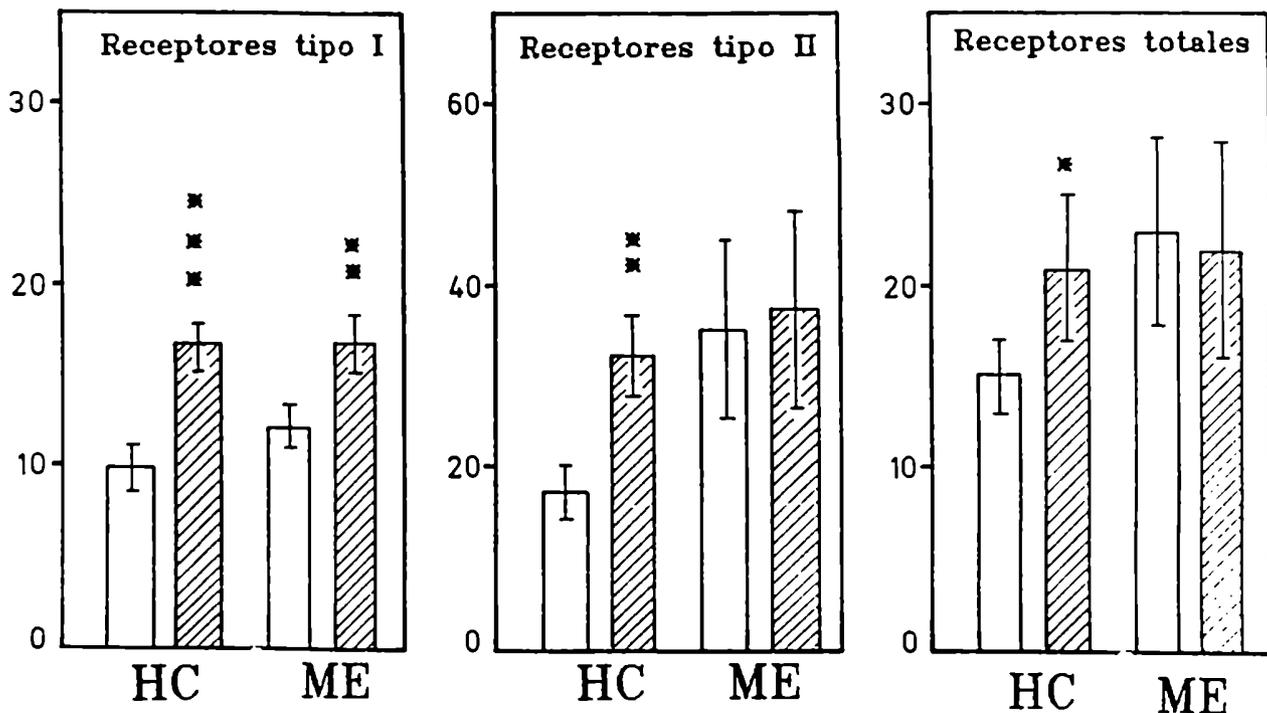


Figura III.9: Unión de los complejos H-R a ADN-celulosa en ausencia (barras vacías) o en presencia (barras rayadas) de ARNs durante el proceso de transformación. El citosol se incubó con (³H)DEX sólo, para marcar receptores totales (panel derecho), o con RU-26752 para marcar únicamente sitios tipo II (panel central), o con RU-28362 para marcar sitios tipo I (panel izquierdo). La enzima ARNs incrementó el % de unión a ADN-cel. para los sitios tipo I en HC (***) p < 0.02) y ME (** p < 0.01), los sitios tipo II de HC (** p < 0.01), y los receptores totales en HC (* p < 0.05). La enzima no tuvo efecto en los receptores totales y subtipo II de la ME. Los resultados representan la media ± E.S. de 3-4 experimentos por tipo de receptor.

Cabe mencionar que el porcentaje de unión a ADN en la ME sin agregado de la enzima, fué mas alto que el mismo en HC, siendo esto coherente con resultados anteriores de nuestro laboratorio [36]. Para receptores totales (panel derecho) el efecto enzimático se demostró nuevamente en el HC ($p < 0.05$) pero estuvo ausente en la ME, de acuerdo a resultados ya publicados [36]. El hecho de que los receptores tipo I de la ME sean sensibles a la ARNsa pero cuando se observan los sitios receptores totales en ME no se detecte sensibilidad a la enzima puede explicarse recordando que la concentración de sitios tipo I en la ME es muy baja y que la gran mayoría de los receptores sean del tipo II, que son insensibles a dicha enzima (fig III.9, panel central).

CROMATOGRAFIA EN ADN-CELULOSA

La diferencia existente entre los sitios tipo II de la ME, insensible a la ARNsa, pero presentando en condiciones basales mayor afinidad por ADN-celulosa, y los tipo II del HC, que responden a la acción de esta enzima (fig III.9, panel central), nos hizo pensar en los tipos de receptores de linfocitos encontrados por Gehring *et.al.* [159,164], tipo nativo o salvaje (wt), con afinidad nuclear deficiente (nt-) y con afinidad nuclear alta (nt⁺). Decidimos realizar cromatografías en columnas de ADN-celulosa, de los sitios tipo II, con el fin de

intentar correlacionar los receptores tipo II de la ME y el HC con los tipos de receptor descritos por Gehring, o al menos profundizar en las diferencias encontradas a partir de su sensibilidad a la enzima ribonucleasa. Los experimentos realizados se resumen en la figura III.10 donde observamos los perfiles de elución de la columna con el aumento de la concentración de KCl en el buffer de elución. Al pico de elución para los sitios tipo II del HC le correspondió una concentración de K^+ de 189 mM, mientras que para los mismos sitios de la ME el pico de elución correspondió a una concentración de 210 mM.

De este modo, estos resultados sugieren una heterogeneidad en el proceso de transformación a nivel tisular. Así, la transformación fue estimulada por la enzima ARNsa para los subtipos de receptor I, en ambas zonas ensayadas. Para los subtipos de receptor II, la transformación basal en el HC fue baja, pero la enzima estimuló la afinidad del complejo hormona receptor por ADN, mientras que la ME mostró una transformación basal alta, en cuanto a los receptores tipo II, pero también insensibilidad a la ribonucleasa.

ME

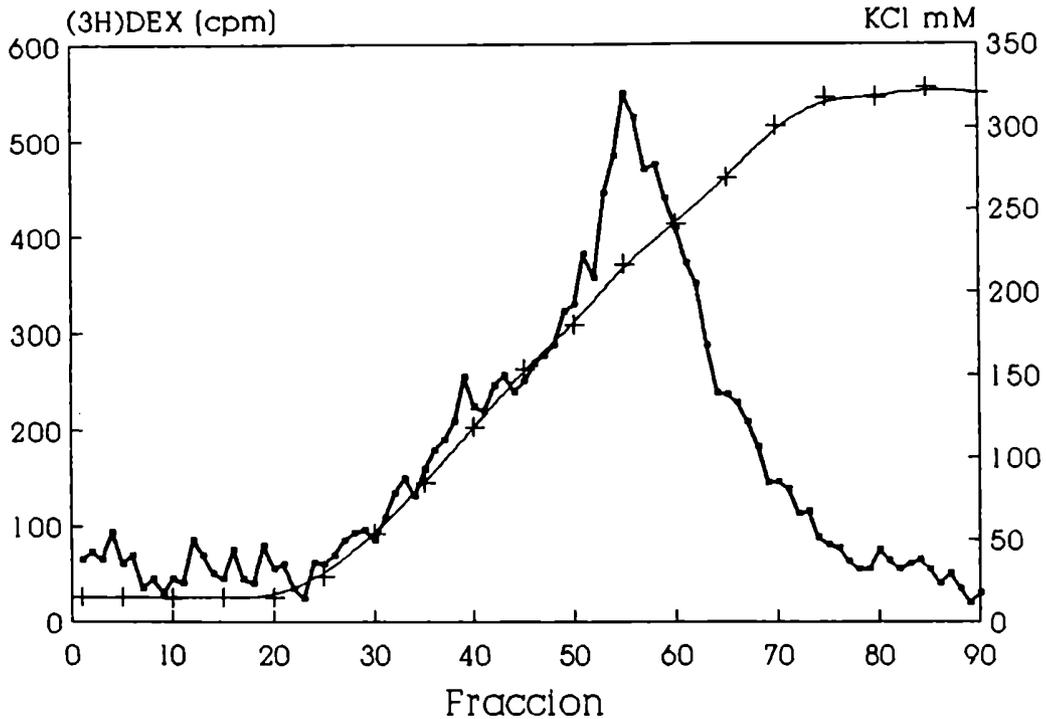


Figura III.10: Perfil de elución de los receptores tipo II transformados, de ME, sembrados en una columna de ADN-celulosa. El citosol fue incubado con $(^3\text{H})\text{DEX}$ en presencia de RU-26752, para marcar sitios tipo II, durante 18h a 0°C , luego de lo cual se transformó por calentamiento durante 30 min a 20°C , el total del volúmen incubado fue sembrado en la parte superior de la columna de ADN-cel. (3ml) y luego la columna se lavó para finalmente eluir los receptores con un gradiente lineal de KCl 0-300 mM. La línea gruesa representa el perfil de elución de los receptores marcados, mientras que la línea fina representa la concentración de KCl en mM. El pico de elución para los sitios tipo II de ME correspondió a una concentración de K^+ de 210 mM.

HC

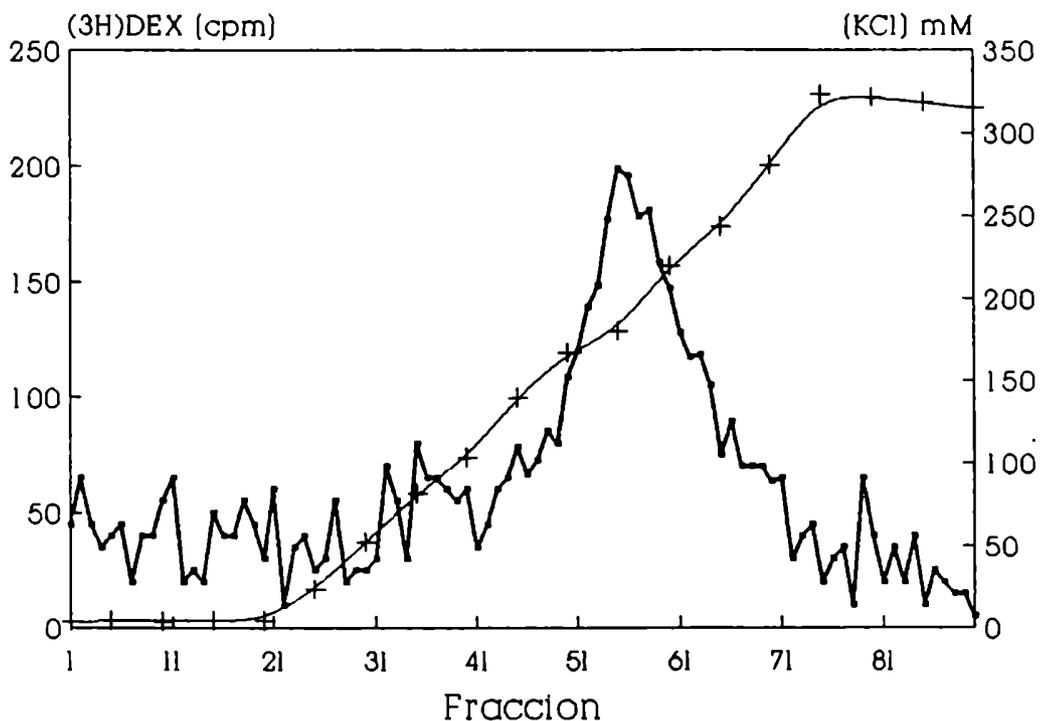


Figura III.11: Perfil de elución de los receptores tipo II transformados, de HC, sembrados en una columna de ADN-celulosa. Las condiciones experimentales son similares a las enunciadas en la fig III.10. La línea gruesa representa el perfil de elución de los receptores marcados, mientras que la línea fina representa la concentración de KCl en mM. El pico de elución para los sitios tipo II de HC correspondió a una concentración de K^+ de 189 mM.

DISCUSION

Los resultados de los experimentos realizados demuestran una heterogeneidad pronunciada en la población de receptores en citosol de HC y ME, para corticoides naturales y sintéticos. En el caso de las curvas de competencia se puede observar sitios de unión marcados que no son desplazables por las concentraciones más altas del competidor (fig III.4 y III.5 punto 100x). Este resultado se vé empleando (³H)DEX y (³H)CORT como ligandos marcados. En este último caso, a los sitios de unión no desplazables por el competidor RU-28362, se los llamó sitios CORT-preferenciales [7], y luego se los homologó a sitios tipo I [151,161], o sea sitios que poseen gran afinidad por el glucocorticoide natural de la rata, y también poseen alta afinidad por ALDO [7,151,161]. Para el caso de usar DEX tritiado, también encontramos sitios de unión no desplazables por RU-28362, mostrando que el glucocorticoide sintético también posee afinidad por los sitios tipo I [2,100,161]. Bajo este punto de vista es evidente que con estos experimentos se muestra la heterogeneidad de sitios de unión en la ME y el HC, y la diferente concentración de cada sitio receptor en ambos tejidos, hecho también observado por otros grupos de trabajo en diferentes zonas del SNC [2,7,100,151,161].

Cuando se usa (^3H)CORT o (^3H)DEX se observan diferencias en las concentraciones de los sitios de unión tipo I y tipo II, ya sea en el HC o la ME (fig III.6 y III.7). Este tipo de comportamiento podría deberse a dos causas diferentes:

A) La CORT posee afinidad comparable a DEX por los sitios II y muy alta afinidad por los sitios tipo I. Esta posibilidad implicaría que cuando se utiliza CORT tritiada para marcar ambos sitios de unión, la concentración de sitios tipo II sea comparable a la obtenida con DEX tritiada como marcador, pero la concentración de sitios tipo I será más alta pues (^3H)CORT posee mayor afinidad que (^3H)DEX por estos sitios y consecuentemente los estima con mayor exactitud.

B) La hormona (^3H)CORT posee alta afinidad por los sitios tipo I (y como veremos en el capítulo 4, (^3H)DEX también posee alta afinidad por los sitios tipo I), y muy baja afinidad por los sitios tipo II, en comparación con (^3H)DEX. Esta suposición también explicaría las figuras III.6 y III.7, y como consecuencia la hormona (^3H)CORT subestima la cantidad de sitios tipo II que se encuentran en las zonas estudiadas.

Esta última posibilidad se ve confirmada por publicaciones anteriores en las que se obtuvo baja afinidad de CORT por receptores tipo II, (trabajos posteriores a 1988 y resultados nuestros hablan también de alta afinidad de (3H)DEX por los sitios tipo I) [7,100,151,161].

Los ensayos de punto único permiten profundizar los estudios respecto de las concentraciones relativas de los diferentes sitios de unión tanto en ME como en HC. Empleando (3H)DEX y los competidores selectivos se observaron resultados coherentes con los ensayos de competencia, encontrándose dos sitios de unión en concentraciones relativas similares a las ya deducidas por los primeros experimentos. Una consecuencia importante de estos experimentos es que la alta afinidad que posee la hormona (3H)DEX por ambos sitios de unión la hace adecuada para revelar las concentraciones de estos sitios receptores en distintas zonas del SNC, ya que la CORT posee muy baja afinidad por los sitios II subestimando su concentración cuando se la emplea para marcar ambos receptores (fig III.6 y III.7) [151,161].

Los experimentos de saturación revelan que (3H)DEX posee baja afinidad por los sitios tipo I y alta afinidad por los sitios tipo II, esto dentro de las condiciones del ensayo ya mencionadas (en el capítulo siguiente veremos más al detalle este tema), de

acuerdo a publicaciones anteriores [8,100,151,161]. Este resultado, en cuanto a las afinidades, se repite tanto en ME como en HC. En cuanto a la concentración de los sitios de unión, este resultado es consecuente con los ensayos de puntos únicos.

Resumiendo, los ensayos hasta aquí realizados demuestran que existe heterogeneidad en los sitios de unión para glucocorticoides tanto en ME como en HC, que la concentración de estos sitios es diferente en las dos regiones bajo estudio y que (³H)CORT tiene poca afinidad por los sitios tipo II, siendo más adecuado trabajar con (³H)DEX para evaluar la concentración de los sitios de unión en distintas regiones del SNC, con la ayuda de competidores adecuados. Además se observó, como en publicaciones previas, que los sitios tipo II están más uniformemente distribuidos en las zonas estudiadas, y en general en todo el SNC, y que los sitios tipo I están preferentemente concentrados en el HC [2,8,31].

En nuestra última serie de experimentos relacionados con la transformación de los distintos sitios receptores, observamos que los sitios tipo I de ambas zonas fueron sensibles a la enzima ARNasa. Recordemos que la concentración absoluta de los sitios tipo I en ME es muy baja, y que sorprendentemente los sitios tipo II de ME se comportaron en forma diferente a la observada por los mismos

sitios del HC cuando se los somete a la acción de la ribonucleasa, sugiriendo una diferencia estructural entre ambos sitios tipo II. Previamente habíamos encontrado que (ver capítulo anterior): a) La transformación basal de los sitios receptores marcados únicamente con (^3H)DEX era mayor en la ME que la encontrada en HC y b) la sensibilidad a ribonucleasa A, una enzima que incrementa la afinidad del complejo hormona-receptor por ADN-celulosa [143,144], estaba presente en el HC pero no en la ME [36]. El aparente comportamiento refractario de los receptores totales de ME a la enzima se aclara con estos estudios que revelan la sensibilidad de los sitios tipo I tanto de la ME como del HC a la acción hidrolítica de la enzima. Debido a la baja concentración de los sitios tipo I en ME, el comportamiento refractario de los sitios tipo II de ME enmascara la respuesta de los anteriores en dicha zona del SNC. Los sitios tipo II de HC, como ya dijimos, fueron sensibles a la ribonucleasa.

Esta diferencia de comportamiento de los sitios tipo II de ME fue explorada más a fondo mediante las cromatografías en columnas de ADN-celulosa. Los resultados, aunque provisionales, sugieren que los sitios tipo II de ME necesitan mayor fuerza iónica para eluir de la columna. Este resultado es, tal vez, correlacionable con la mayor afinidad basal de los sitios tipo II de ME por ADN-celulosa, previamente mencionada. No obstante, la

diferencia en las concentraciones iónicas a las que eluye el pico de radioactividad, correspondiente a los sitios receptores tipo II de ME y HC, es sugestiva, a la luz de las diferencias encontradas en cuanto a la sensibilidad enzimática de estos sitios de unión, de la posibilidad que existen diferencias entre los sitios tipo II de ME y HC. Es interesante ver los resultados de Ghering y col. puesto que encuentra en linfocitos diferentes especies mutantes de sitios receptores que poseen distinta afinidad por ADN-celulosa [159] y tentador correlacionar dichos resultados con éstos. Por ello, tentativamente sugerimos que los receptores tipo II de ME son similares a los llamados nt¹ [159]. Esto no se puede afirmar por el momento pero refuerza la hipótesis de heterogeneidad de función entre los sitios tipo II de ME y HC.

Los mecanismos de acción de la ARNasa han sido debatidos. Mientras algunos autores sostienen que los receptores de hormonas esteroideas son ribonucleoproteínas [69,70,87,144,145,146], implicando que la enzima actúa hidrolíticamente digiriendo ARN asociado al receptor, otros sostienen que la enzima actuaría directamente sobre el receptor regulando sus propiedades [132,162].

Nosotros podemos pensar en dos hipótesis de acción de la enzima sobre los sitios receptores, que concuerden con los resultados alcanzados. Una explicación atribuida a diferencias

entre los mismos sitios receptores tipo II sería que los sitios de ME no contendrían ARN asociado y los sitios de HC sí, esto explica la alta afinidad basal de los sitios tipo II de ME respecto del HC [36,90]. Otra explicación sería con respecto a diferencias tisulares entre ME y HC que causarían los resultados *in vitro* observados. El HC tendría una baja actividad tisular de ribonucleasas, con lo que al aislarlo en el citosol quedaría con ARN asociado al receptor. La ME, a diferencia del HC, tendría una alta actividad de ARNasa que depletaría completamente el ARN asociado a su receptor, antes del aislamiento, siendo finalmente insensible a la enzima.

Por último, los resultados alcanzados: a) heterogeneidad en los sitios de unión de glucocorticoides; b) alta afinidad de los sitios tipo I por (^3H)CORT y c) diferencias entre los sitios de unión tipo II de ME y HC, permiten explicar las diferencias encontradas en la captación nuclear *in vivo* de (^3H)CORT inyectada en dosis trazadoras por vía i.v., descrito en el capítulo anterior [32,36]. Bajo las condiciones del ensayo *in vivo* se inyectaron dosis trazadoras de (^3H)CORT, dada la alta afinidad de esta hormona por sitios tipo I [7,151,161], es razonable suponer que la alta concentración de estos sitios de unión en el HC permitió que captara la hormona uniéndose al sitio I. Por otra parte, la concentración de sitios tipo I en ME es muy baja y por lo tanto

este tejido captó menos hormona y la translocación al núcleo fue menor a la esperada puesto que sólo los sitios tipo I translocaron, ya que eran los únicos ocupados eficientemente en ambos tejidos. La única opción a esta explicación es que no contempla la captación de (³H)CORT medida en el homogenato que concordaba con la esperada dada la concentración de sitios de unión totales medidos. Esto indica casi con seguridad que en la ME la hormona (³H)CORT estaba unida también a sitios tipo II, que son los mayoritarios. La explicación es, entonces, atribuible en forma indirecta a las diferencias encontradas para los sitios de unión tipo II entre ME y HC. Esto llevaría a pensar que los sitios tipo II de ME, ocupados en forma parcial por (³H)CORT, no habrían translocado al núcleo.

En los mecanismos de transformación y translocación de los receptores tipo II estaría la respuesta a estos interrogantes. Finalmente, una comprensión de los fenómenos involucrados en la captación tisular de (³H)CORT puede encontrarse en los próximos capítulos, que aportan otras posibilidades a los resultados aquí presentados.

**Parámetros de Unión
de los Sitios Tipo II
en HC y ME**

CAPITULO IV

INTRODUCCION

El SNC es un conocido tejido blanco para las hormonas esteroideas [8]. En el caso de los esteroides adrenales, se han identificado dos tipos de sitios receptores que, de acuerdo con la terminología propuesta para los receptores de riñón, se los llama sitios tipo I y sitios tipo II [2,7,98,99]. Los sitios tipo I presentan mayor afinidad por esteroides naturales como la CORT y se encuentran concentrados preferentemente en el sistema límbico, más precisamente en el HC, con baja o moderada expresión en otras regiones cerebrales, incluyendo la ME [2,7,98,165]. Los receptores tipo II están más uniformemente distribuidos, entre neuronas y glía, en todo el SNC y muestran preferencia por glucocorticoides sintéticos como la DEX, según se concluye de estudios *in vivo* [8,9,100]. Estos sitios receptores están altamente concentrados en ME [Cap III].

Estudios *in vitro* revelan que el sitio receptor preponderante en ME es el tipo II [Cap III,90]. Este sitio tipo II muestra similitudes pero también sugestivas diferencias respecto del mismo sitio en el HC. Estas diferencias aparecen principalmente cuando se estudia la transformación del receptor inducida por calor, y su regulación [Cap II,36,90]. Datos

preliminares, además, sugieren que los receptores tipo II de ME tienen menor afinidad por DEX que los mismos del HC [60] cuando se utiliza el glucocorticoide puro RU-28362, como competidor, en experiencias que pretendían resolver el sistema de dos tipos de receptores en las zonas del SNC mencionadas.

En el presente capítulo se muestran estudios llevados a cabo para comparar las afinidades del sitio tipo I y tipo II en ambos tejidos, usando RU-28362 y dos protocolos experimentales diferentes, así como también un método no competitivo para resolver los parámetros de ambos sitios receptores con datos de experimentos de saturación. Para seleccionar el protocolo experimental que introduce menos error en la determinación de dichos parámetros empleando al glucocorticoide sintético RU-28362 como competidor, se utilizaron simulaciones por computadora de datos teóricos. Los resultados indican que los sitios tipo I de HC y ME tienen mayor afinidad por (^3H)DEX que los sitios tipo II, contrariamente a resultados publicados de experiencias *in vivo* [2,8,9,100]. Además, los sitios receptores tipo II de ME muestran menor afinidad para DEX tritiada cuando se la compara con la de los mismos receptores en HC.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 200-250 gr de peso. Las mismas se adrenalectomizaron (ADX) por aproximación dorsal, en forma bilateral, 2 a 3 días antes del sacrificio y se mantuvieron durante ese lapso en grupos de 10 animales en jaulas apropiadas donde disponían de alimento balanceado y NaCl 9% *ad libitum*.

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Luego se les extrajo la ME por laminectomía, mientras que el HC se disecó tal como se describió anteriormente [Cap. II].

EXPERIMENTOS DE SATURACION

La ME y el HC fueron homogenizados en buffer TEMGMO (Teflón-vidrio), y al homogenato obtenido se lo centrifugó a 105000xg durante 1h a 0°-4°C. El citosol así obtenido se dividió en alícuotas de 0.2 ml y se incubó con (³H)DEX en un rango de concentraciones de 0.5 a 20 nM con o sin la presencia de RU-28362 [61]. La unión inespecífica se determinó por incubaciones paralelas con DEX 1000x utilizando solamente 4 puntos dentro del rango de concentraciones de la hormona tritiada. Se construyó así una línea recta, característica de la unión no específica,

mediante el método de los cuadrados mínimos, obteniéndose un $r^2 > 0.99$ en todos los casos. Con la curva de calibración inespecífica así construída se calculó la unión específica como la resta de la unión inespecífica, obtenida de la recta, a la unión total, en cada punto experimental.

La incubación se mantuvo durante 20h a 0°C, luego de lo cual se separó la hormona libre de la unida mediante minicolumnas de Sephadex-LH20. Se recogieron los eluidos de las columnas, que contenían la radioactividad de la hormona unida, y se los preparó para la determinación de la radioactividad por centelleo líquido. Los resultados se expresaron como fmol de (^3H)DEX específicamente unido por mg de proteína, determinándose la concentración protéica por el método de Lowry [138].

Los procedimientos para determinar las diferentes subpoblaciones de sitios de unión han sido descriptos en el capítulo anterior, fundamentalmente en lo que respecta a experimentos de puntos únicos [Cap. III]. Brevemente, (^3H)DEX ($\pm 1000\times$ de hormona fría) se incubaba en presencia o ausencia de RU-28362. Sin este último, la hormona marcada se une a los dos sitios de unión, pero con el competidor RU-28362 la (^3H)DEX se une solamente a los sitios receptores tipo I, quedando bloqueados los sitios tipo II. En el caso de experimentos del tipo de

saturación, se utilizaron tres protocolos distintos para determinar los parámetros de unión de los distintos sitios receptores. En el protocolo A, (^3H)DEX se incubó en ausencia del competidor frío, bajo estas condiciones se pueden observar ambos sitios de unión. Los datos obtenidos se ajustaron para dos sitios de unión y se calcularon los parámetros según el método de las pendientes límite de Rodbard y col. [157]. En el protocolo B, uno de los dos que utiliza al competidor no radioactivo, se utilizó al RU-28362 en una concentración fija (500nM) en cada punto del ensayo de saturación. Este método resulta en una relación competidor/ligando variable en cada punto ensayado, pues la concentración del ligando varía en el rango de 0.5-20nM, mientras que la concentración del competidor se mantiene constante; dicha relación varía desde 1000x en el límite inferior del rango mencionado, a 25x, en el extremo superior. El tercer protocolo utilizado, también con el competidor radioinerte, llamado protocolo C, el RU-28362 se agregó a la mezcla de incubación en concentraciones que variaban en paralelo con la concentración del ligando marcado, y la relación competidor/ligando se fijó en un valor de 500x.

CALCULO DE PARAMETROS. ANALISIS ESTADISTICO Y COMPUTACIONAL

Los datos se analizaron de acuerdo con los siguientes tests:

*Análisis "t" de Student.

*Análisis de la varianza de una vía, seguido por comparaciones múltiples.

Los parámetros de unión de los dos tipos de receptores se calcularon, para el caso del protocolo A, por el método de las pendientes límite [157], pues se están observando ambos sitios de unión a la vez ; y cuando se analizan los datos obtenidos con los protocolos B o C se utiliza el método gráfico lineal directo de Cressie y Keightley [158], ya que en estos casos se está en presencia de un solo sitio de unión.

La única fuente de datos para determinar la constante K_{d2} es el protocolo A; este valor se puede determinar de dichos datos, ya sea por el método de las pendientes límite ya mencionado o utilizando los datos combinados de los protocolos A y B o A y C con ayuda de la ecuación Ec1:

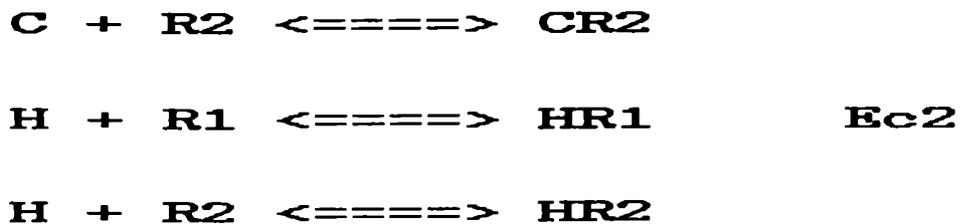
$$K_{d2} = \frac{B_{max2} * F}{B_t - B_{max1} * F} - F \quad Ec1$$

(K_{d1} + F)

donde K_{d1} , K_{d2} , B_{max1} y B_{max2} corresponden a las constantes de disociación y al número máximo de sitios receptores para los

sitios tipo I y II, F corresponde a la concentración de hormona libre y Bt equivale a la hormona marcada unida en forma específica tal como se la calcula del protocolo A. Para calcular Kdz se utilizan los valores de Kd₁ y Bmax₁ obtenidos de los protocolos B o C y Bmax₂ se calcula conociendo Bmax_{total} del protocolo A y Bmax₁. Se informa el valor de Kdz promedio de los datos individuales obtenidos, en un dado experimento, con cada punto experimental conformado por el par de valores Bt,F del protocolo A.

Además, se recurrió a simulaciones por computadora para predecir el comportamiento de los distintos protocolos. Para ello, se alimentó al sistema de cálculo con datos simulados que pretendían imitar situaciones encontradas en los experimentos *in vitro* con la presencia de dos sitios de unión de diferente afinidad, y diferente Bmax, además un ligando marcado y su correspondiente competidor, el cual se une exclusivamente a un solo tipo de receptor. Esta situación está definida por el siguiente conjunto de ecuaciones químicas (Ec2):



donde C representa al competidor que en este caso es el compuesto RU-28362, R1 y R2 son los distintos tipos de receptores, H es la hormona marcada y CR2, HR1 y HR2 son los complejos respectivos. En esta simulación no se contempló la posibilidad de una especie CR1, ya que el RU-28362 tiene afinidad nula por los receptores tipo I [61]. La ecuación que representa la unión de H a ambos receptores en presencia del competidor, teniendo en cuenta los equilibrios químicos ya planteados (Ec2) está representada por Ec3:

$$B_t = \frac{B_{max1} * F}{K_{d1} + F} + \frac{B_{max2} * F}{K_{d2} + K_{d2}/K_{d3} * C_1 + F} \quad Ec3$$

donde B_t es la hormona marcada unida a ambos sitios de unión, C_1 es la concentración del competidor libre (no unido), K_{d3} es la constante de disociación del competidor con el sitio tipo II. B_t es el resultado de la suma de dos grandes términos, el primero representa la unión al sitio tipo I y el segundo término representa la unión al sitio tipo II. De acuerdo con resultados previos la relación K_{d2}/K_{d3} se considera igual a 1.7 [61]. El comportamiento del protocolo B se simuló reemplazando, en Ec3, el término C_1 por la siguiente ecuación (Ec4):

$$C_1 = 500nM - B_{max2} \quad Ec4$$

y el protocolo C se consiguió simular en la computadora cuando se reemplazó, en Ec3, C₁ por lo siguiente (Ec5):

$$C_1 = 500 * F + 500 * B1 - Bmax2 \qquad \text{Ec5}$$

En los gráficos IV.4 y IV.5 se representan valores obtenidos mediante las simulaciones cuando se reemplaza el término constante 500 de las ecuaciones Ec4 y Ec5 por los valores 100, 250, 500 y 1000 según se indica (ver Resultados).

La computadora utilizada fue una Epson Equity II PC compatible, con el programa Lotus 1-2-3 que se alimentó con las ecuaciones antes mencionadas.

RESULTADOS

EXPERIMENTOS DE SATURACION

Utilizando el protocolo A, se incubó citosol de ME y HC con (^3H)DEX en un rango de concentraciones de 0.5 a 20 nM sin el competidor RU-28362. Como se muestra en la figura IV.1, se obtuvieron datos que, graficados según el sistema de Scatchard, [160] se alinean dando un claro perfil curvilíneo, indicando la presencia de sitios de unión con diferente afinidad por el ligando. Este resultado es consistente con el modelo de dos sitios de unión propuesto por distintos autores [2,7]. En este caso, se pueden calcular los parámetros de ambos sitios utilizando el método de las pendientes límite [157]. De esta forma, se observó que el valor de B_{max} para los sitios tipo I era más alto en el HC respecto de la ME ($p < 0.01$ vs ME), mientras que la concentración de sitios tipo II ($B_{\text{max}2}$) era comparable en ambos tejidos, tal lo observado en trabajos previos [90]. Los resultados se resumen en la tabla IV.A. Respecto de las afinidades, se puede notar que (^3H)DEX se une con gran afinidad a ambos sitios pero el K_{d1} fue consistentemente más bajo que el K_{d2} en ambas zonas estudiadas ($p < 0.05$ por ANOVA seguido por comparaciones múltiples). Este resultado se contrapone con observaciones *in vivo* que indicaban que la afinidad de la hormona

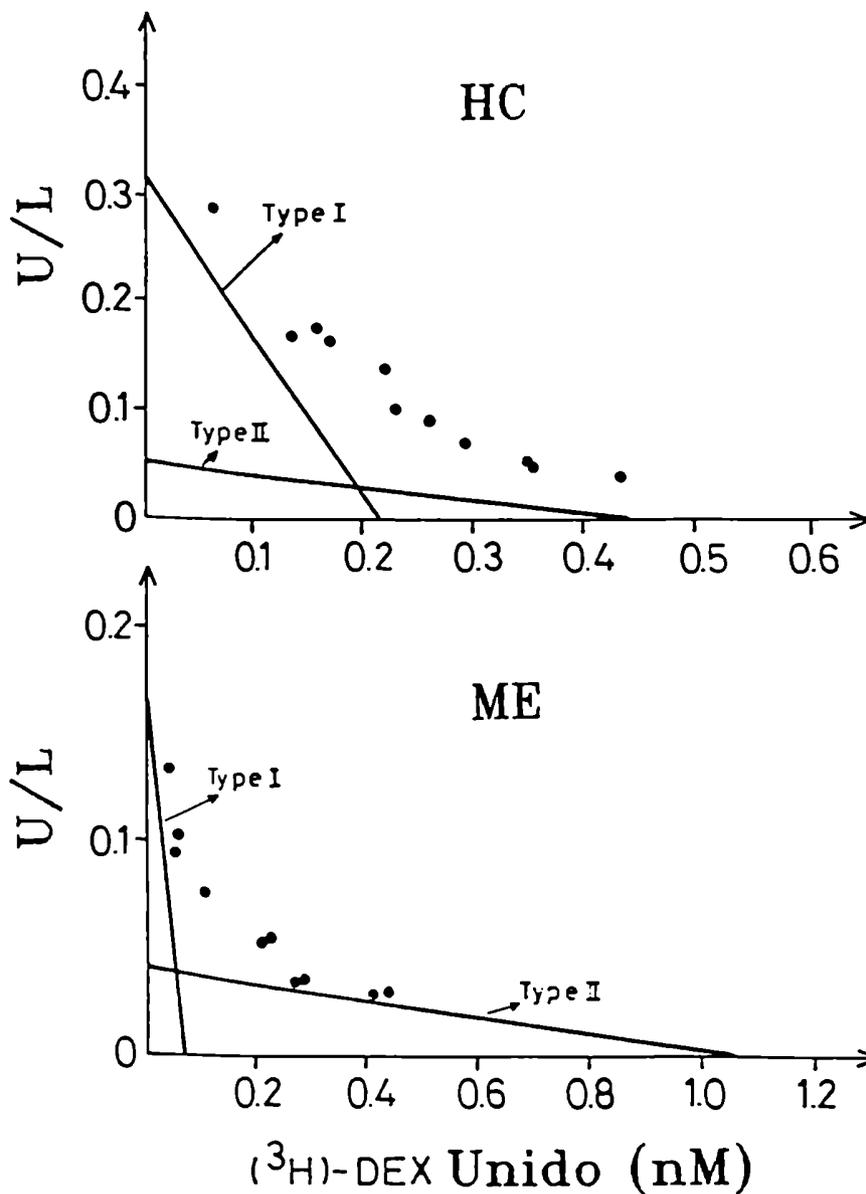


Figura IV.1: Gráfico de Scatchard resultante de experimentos de saturación utilizando $(^3\text{H})\text{DEX}$ en citosoles de HC (panel superior) y ME (panel inferior) de ratas ADX. Los citosoles de los tejidos mencionados fueron incubados en buffer TEMGMO durante 20 h a $0-4^{\circ}\text{C}$ con concentraciones del ligando radioactivo en un rango de 0.5- 20 nM (\pm DEX radioinerte 1000x), condiciones que fueron designadas bajo el nombre de protocolo A. Los parámetros de unión, de los gráficos curvilíneos, se calcularon con el método de las pendientes límite de Rodbard y col. La figura es representativa de 6 experimentos. Para sitios tipo I en el HC, los resultados fueron: $K_{d1}=0.67$ nM y $B_{max1}=73$ fmol/mg prot., mientras que en ME: $K_{d1}=0.44$ nM y $B_{max1}=12.6$ fmol/mg prot. Para sitios tipo II en HC: $K_{d2}= 8.4$ nM y $B_{max2}= 153.1$ fmol/mg prot., mientras que para ME: $K_{d2}= 26$ nM y $B_{max2}= 190$ fmol/mg prot.

Tabla IV.A: Parámetros de unión de los sitios tipo I y tipo II de ME y HC, obtenidos mediante el protocolo A.

| <u>Tejido</u> | <u>Receptores tipo I</u> | | <u>Receptores tipo II</u> | |
|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| | <u>Bmax1</u> <u>(fmol/mg p.)</u> | <u>Kd₁</u> <u>(nM)</u> | <u>Bmax2</u> <u>(fmol/mg p.)</u> | <u>Kd₂</u> <u>(nM)</u> |
| ME | 12±3 ^a | 1.5±0.6 | 120±43 | 17±4 ^b |
| HC | 57±13 | 0.36±0.01 | 165±31 | 5.2±0.9 |

Los citosoles de la ME y el HC fueron incubados con 0.5-20 nM de (³H)DEX con o sin la presencia de 1000x de DEX no radioactivo. Los parámetros de unión de los datos experimentales se obtuvieron por el método de las pendientes límite de Rodbard *et. al.* [157] asumiéndose un modelo de dos sitios de unión (las curvas de Scatchard obtenidas fueron curvilíneas). Los datos representan el promedio± E.S. de n=6 experimentos.

^a p<0.01 vs. Bmax1 de HC.

^b p<0.01 vs. Kd₂ de HC.

(test "t" de Students).

sintética DEX por los sitios tipo II era mayor que la correspondiente a los sitios tipo I [2,8]. Además, estos resultados indican que el K_{d2} en ME es significativamente mayor que la correspondiente constante K_{d2} de HC ($p < 0.01$, Tabla IV.A). Esta diferencia de 3 veces en los valores de K_d observados para los sitios tipo II sugiere una heterogeneidad en lo que respecta a estos sitios receptores, entre los dos tejidos estudiados.

Cuando se utilizó el compuesto RU-28362, para observar un solo sitio de unión, según el protocolo B, se compitió la unión de (3H)DEX a los receptores tipo II con una sola concentración de 500nM, en todos los puntos experimentales. Con este sistema se obtenían puntos que graficados según el sistema de Scatchard se alineaban dentro de una recta (Fig IV.2), pero en contraste con los datos obtenidos del protocolo A, los sitios tipo II mostraron una afinidad similar o mayor que los sitios tipo I, por la DEX tritiada. Esta tendencia fue constante y observada en las dos zonas estudiadas, pero no fue estadísticamente significativa (Tabla IV.B). No importando qué protocolo fuese empleado, los valores de B_{max} hallados fueron coherentes con publicaciones anteriores [60,90], siendo la

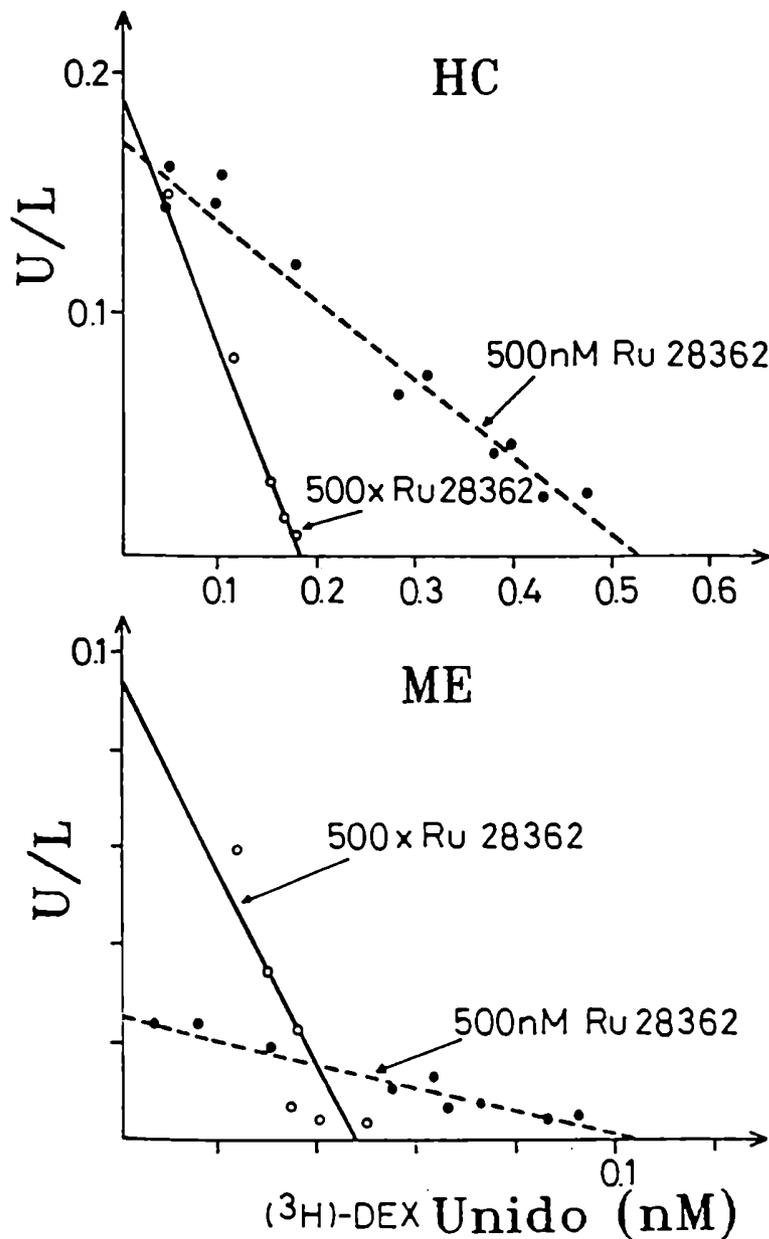


Figura IV.2: Unión de (^3H)DEX en citosoles de HC (panel superior) y ME (panel inferior) en presencia de RU-28362. Las condiciones de incubación y concentraciones utilizadas son similares a las mencionadas en la fig IV.1. Adicionalmente se incubó con RU-28362 500 nM/tubo (protocolo B, línea punteada) o RU-28362 500x/tubo (protocolo C, línea continua). Los parámetros de unión fueron calculados de acuerdo al método gráfico lineal directo de Cressie y Keightley. Los resultados fueron los siguientes: protocolo B, $K_{d1} = 3.1$ nM y $B_{max1} = 180$ fmol/mg prot. para HC, mientras que para ME $K_{d1} = 4.3$ nM y $E_{max1} = 18.7$ fmol/mg prot. Protocolo C, $K_{d1} = 0.9$ nM y $B_{max1} = 54$ fmol/mg prot. para HC, mientras que para ME $K_{d1} = 0.44$ nM y $B_{max1} = 10.5$ fmol/mg prot.

Tabla IV.B: Parámetros de unión de los sitios tipo I y tipo II de ME y HC, obtenidos mediante los protocolos B y C.

| Tej. | Protocolo | <u>Receptores tipo I</u> | | <u>Receptores tipo II</u> | |
|------|-----------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | <u>Bmax1</u> (fmol/mg p.) | <u>Kd₁</u> (nM) | <u>Bmax2</u> (fmol/mg p.) | <u>Kd₂</u> (nM) |
| ME | B | 20±7.9 ^a | 3.9±0.7 | 91±48 | 2.0±1.1 |
| HC | B | 119±35 | 2.0±0.6 | 76±28 | 0.7±0.17 |
| ME | C | 9±1.5 ^b | 0.8±0.16 | 80±17 ^c | 7.0±1.2 ^d |
| HC | C | 55±2.1 | 0.7±0.12 | 145±28 | 4.0±1.4 |

Los citosoles de ME e HC fueron incubados con (³H)DEX 0.5-20 nM (\pm 1000x DEX) en presencia o ausencia de RU-28362. En el protocolo B, se agregó RU-28362 en una concentración de 500nM por tubo, en cambio en el protocolo C la cantidad de competidor agregado variaba en una relación de 500x la concentración del ligando radioactivo utilizado. Los parámetros de unión en cada protocolo, asumiendo un solo sitio de unión marcado, se obtuvieron mediante la técnica de Cressie y Keightley [158] y las ecuaciones mencionadas en Mat. y Mét. Los datos representan el promedio \pm E.S. de n=3 experimentos (protocolo B) o n=4-5 experimentos (protocolo C).

^a p= 0.05 vs. Bmax1 de HC.

^b p<0.001 vs. Bmax1 de HC.

^c p<0.01 vs. Bmax2 de HC.

^d p<0.05 vs. Kd₂ de HC.

concentración de sitios tipo I mayor en el HC que en la ME ($p=0.05$), y la concentración de los sitios tipo II similar en ambas zonas, por lo tanto más uniformemente distribuido (Tabla IV.B). Es interesante mencionar que los B_{max1} calculados por el protocolo B son algo mayores que los hallados por el protocolo A y C (Tablas IV.A y IV.B).

Con el protocolo C, el competidor RU-28362 fue agregado nuevamente para ocupar los sitios tipo II, pero se modificó la técnica respecto del protocolo B en cuanto a que no se agregó una concentración fija en cada punto ensayado, sino que, por el contrario, la concentración del competidor variaba en paralelo con la concentración de (3H)DEX, manteniendo el cociente (RU-28362)/((3H)DEX) constante en 500. Con este procedimiento obtuvimos nuevamente un gráfico de Scatchard lineal, correspondiente a un solo sitio de unión (Figura IV.2). Los datos obtenidos se resumen en la tabla IV.B. Con este protocolo, los sitios tipo I de ME o HC mostraron mayor afinidad por el ligando tritiado que la observada para sitios tipo II. Los valores obtenidos con el protocolo C se acercan más al protocolo A que al B ($p < 0.01$ por ANOVA y comparaciones múltiples). Nuevamente, con esta modalidad de competición se repitieron las diferencias encontradas para los sitios tipo II entre ME y el HC, ya que el valor del K_{d2} para ME fue mayor que el respectivo para HC ($p <$

0.05, Tabla IV.B), aunque estas diferencias no fueron tan pronunciadas como las obtenidas del protocolo A. Los valores calculados para B_{max1} mediante este protocolo, son nuevamente coherentes con los anteriores y con publicaciones previas, ya que B_{max1} es mayor en HC respecto de ME ($p < 0.001$), los valores para B_{max2} obtenidos estaban dentro del límite inferior de los mismos observados en el protocolo A (Tabla IV.A y IV.B), y resultaron un 55% de B_{max2} del HC.

SIMULACIONES POR COMPUTADORA

Las observaciones experimentales indicaban que los valores obtenidos para K_d dependían de alguna forma del protocolo utilizado (B o C). Esto nos hizo especular que cuando se utilizaba el protocolo B con una concentración fija de RU-28362 igual a 500nM, se competían mejor los puntos inferiores del rango ensayado pero sería menos efectivo en los puntos superiores, tal vez informando una sobreestimación del número máximo de sitios tipo I (B_{max1}) y produciendo una subestimación del valor de la afinidad real K_{a1} . Por el contrario, utilizando el protocolo C, existe una buena concentración del competidor en los puntos superiores de la escala (500x20nM) pero en cambio, existe poco competidor en los primeros puntos del mismo rango (500x0.5nM),

siendo la competencia por los sitios tipo II menos efectiva en la parte inferior del rango. Esta situación implica tal vez no una mala estimación de B_{max1} pero sí podría sobreestimarse K_{a1} .

Para confirmar si la explicación anterior era factible, ya que se ajustaba a los hechos observados, y estimar entonces el error intrínseco que cada protocolo introducía en el cálculo de los parámetros de unión de los sitios tipo I y II, se realizaron las simulaciones donde los valores de K_{d1} , K_{d2} , B_{max1} y B_{max2} se predefinieron, para observar cómo cada protocolo los recalculaba y así obtenerse la desviación porcentual de cada método respecto del valor predefinido (teórico). En principio se fijaron los siguientes datos: $K_{d1}=1nM$, $K_{d2}=10nM$, $B_{max1}=B_{max2}=0.2nM$. Para simular el protocolo B se reemplazó en Ec3, C_1 por el contenido de Ec4 y para simular el protocolo C se reemplazó en Ec3, C_1 por el contenido de Ec5.

Los valores recalculados por cada protocolo demostraron que los errores intrínsecos de los ensayos se localizaban ya sea en los primeros puntos del rango para el protocolo C, y en los últimos puntos para el protocolo B, con desviaciones respecto del K_{d1} teórico de 2.5% para el protocolo B con un K_{d1} mayor que el prefijado, mientras que el protocolo C introdujo un error del 0.5% respecto del K_{d1} teórico, siendo el valor calculado menor

que el predefinido. Estos datos confirman que cada protocolo tiene un error intrínseco, y éste en sentidos opuestos, es decir que mientras el método C subestima el K_{d1} , el método B lo sobreestima, pero con mayor error que el protocolo C. Así, se pueden esperar K_{d1} más bajos que el real cuando se utilizan protocolos semejantes al C, mientras que se van a obtener valores más altos de K_{d1} respecto del real cuando se utilizan protocolos parecidos al B.

SIMULANDO VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DEL COMPETIDOR

Cuando se investiga qué sucede con la unión del ligando marcado a los sitios tipo II en estas simulaciones que recrean situaciones "idealizadas", es decir que no se tiene en cuenta la unión inespecífica ni el error experimental y que se supone que el competidor interacciona únicamente con un solo sitio receptor, obtenemos resultados que se muestran en la figura IV.3. Con el protocolo B obtenemos una unión creciente del ligando marcado a los sitios tipo II, que supuestamente no se deberían medir. En el análisis de los resultados experimentales, estos sitios "adicionales", se toman como sitios tipo I, lo que implica una sobreestimación del valor de B_{max1} mediante el uso de este protocolo, y por lo tanto una fuente adicional de error. En el caso del protocolo C, existe unión del ligando tritiado a los

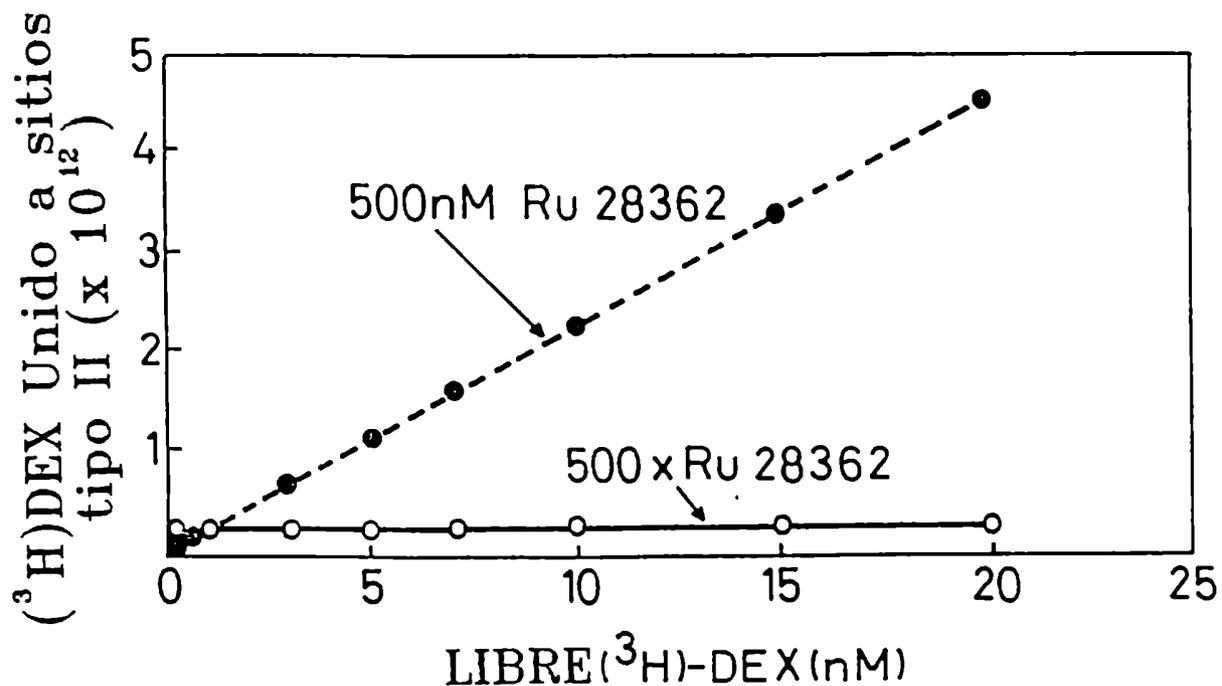


Figura IV.3: Representación gráfica, obtenida por computadora, de la unión de (³H)DEX a sitios tipo II que permanecen libres luego del agregado del competidor RU-28362, según el protocolo B (línea punteada) o el protocolo C (línea continua). Las condiciones de la simulación fueron indicadas en Mat. y Met. y en la fig IV.2. Se obtuvo un error constante y bajo cuando se simuló el protocolo C, mientras que en el caso del protocolo B se muestra cómo se está introduciendo una fuente de error variable cuando se pretende calcular los parámetros de unión del sitio tipo I utilizando este protocolo.

sitios tipo II pero es de un valor constante y pequeño hacia los puntos altos del rango de concentraciones de (³H)DEX utilizados, siendo este protocolo más exacto en la estimación del parámetro Bmax1.

Las afirmaciones del párrafo anterior se pueden observar gráficamente en el figura IV.4, donde se representa la variación de los valores de Bmax1 calculados por ambos protocolos respecto del valor predefinido. En esta figura se realizaron las simulaciones con valores predefinidos diferentes de los anteriores. Los valores de Kd₁, Kd₂, Bmax1 y Bmax2 que se tomaron como teóricos o predefinidos, sobre los que se corre la simulación, fueron datos obtenidos de dichos parámetros en el protocolo experimental A (Tabla IV.A). En la figura IV.4, el panel I corresponde a los datos teóricos provenientes de los calculados por el protocolo A para ME, mientras que el panel II corresponde a los datos predefinidos provenientes del HC. Esta modalidad para elegir los grupos de parámetros predefinidos asegura simulaciones lo más cercanas a la realidad experimental posibles. Los diferentes grupos de barras en la figura IV.4 corresponden a diferentes concentraciones del competidor, ya sea en el protocolo B donde varían entre 100nM a 1000nM, como para el protocolo C, donde la relación de concentraciones Competidor/Ligando varía entre 100x a 1000x. Como podemos ver en

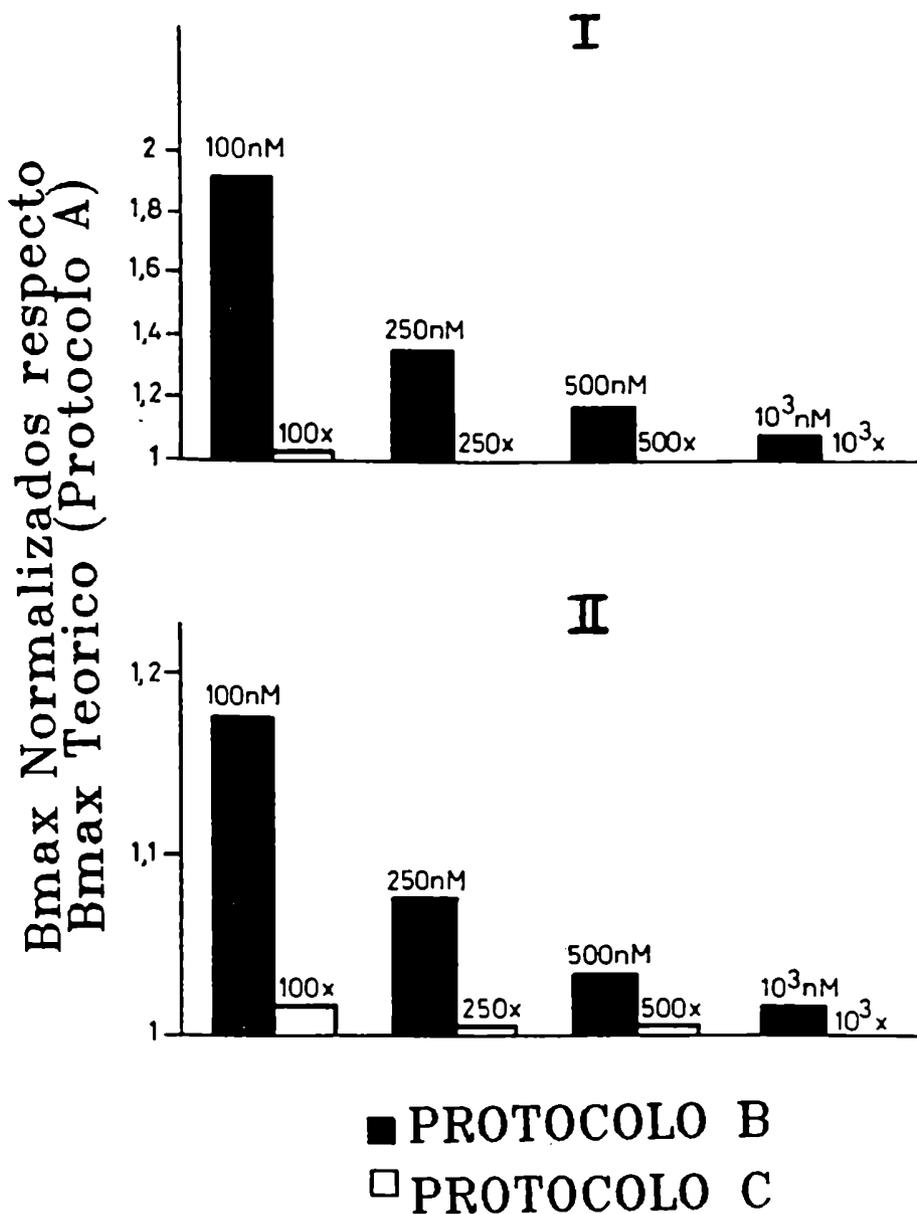


Figura IV.4: Variación de los valores de B_{max1} , respecto de un valor predefinido, obtenido por simulaciones en computadora utilizando las ecuaciones mencionadas en Mat. y Met. Los valores predefinidos corresponden a los calculados mediante el protocolo experimental A, ya sea de la ME (panel I) o del HC (panel II). Dichos valores sirvieron para alimentar las ecuaciones mencionadas y así determinar los errores de cálculo que cometen los protocolos B y C cuando se estima B_{max1} , para ello se normalizaron los valores predefinidos haciéndolos igual a 1. Las Barras representan cuán alejados están los valores calculados por los distintos protocolos del valor predefinido y normalizado. Se simularon diferentes concentraciones del competidor RU-28362 cuyos valores se representan en la parte superior de las barras correspondientes, dentro del rango 100nM-1000nM para protocolo B y 100x-1000x para protocolo C.

esta figura, los dos protocolos sobreestiman B_{max1} , pero el protocolo B es el que comete más error en todas las concentraciones del competidor estudiadas. El protocolo C con relaciones Competidor/Ligando de 250x o más, en la ME, estima B_{max1} con errores indetectables por la escala usada, mientras que en HC los errores en la sobreestimación son menores al 2.5% en todos los casos. Es importante destacar que no importando qué protocolo se emplee, a medida que se aumenta la concentración del competidor, ambos confluyen al valor teórico, aunque el protocolo C llega más precozmente.

La figura IV.5 representa, como la fig IV.4, resultados obtenidos de simulaciones con valores teóricos provenientes de los calculados por el protocolo A para ME (panel I) e HC (panel II). En este caso se grafica la variación, respecto del valor predefinido, en el cálculo del K_{d1} por parte del protocolo B y el C, cuando se varía las concentraciones del competidor tal como se explicó para la fig IV.4. Como se afirmó anteriormente, los protocolos B y C estiman los valores de K_{d1} con errores que van en direcciones opuestas. Entonces, mientras el protocolo B brinda valores para la constante de afinidad menores que el teórico, el protocolo C estima valores, para la misma constante, mayores que el real. No obstante, el protocolo C es más exacto que el B en todo el rango de concentraciones del competidor ensayadas. En la

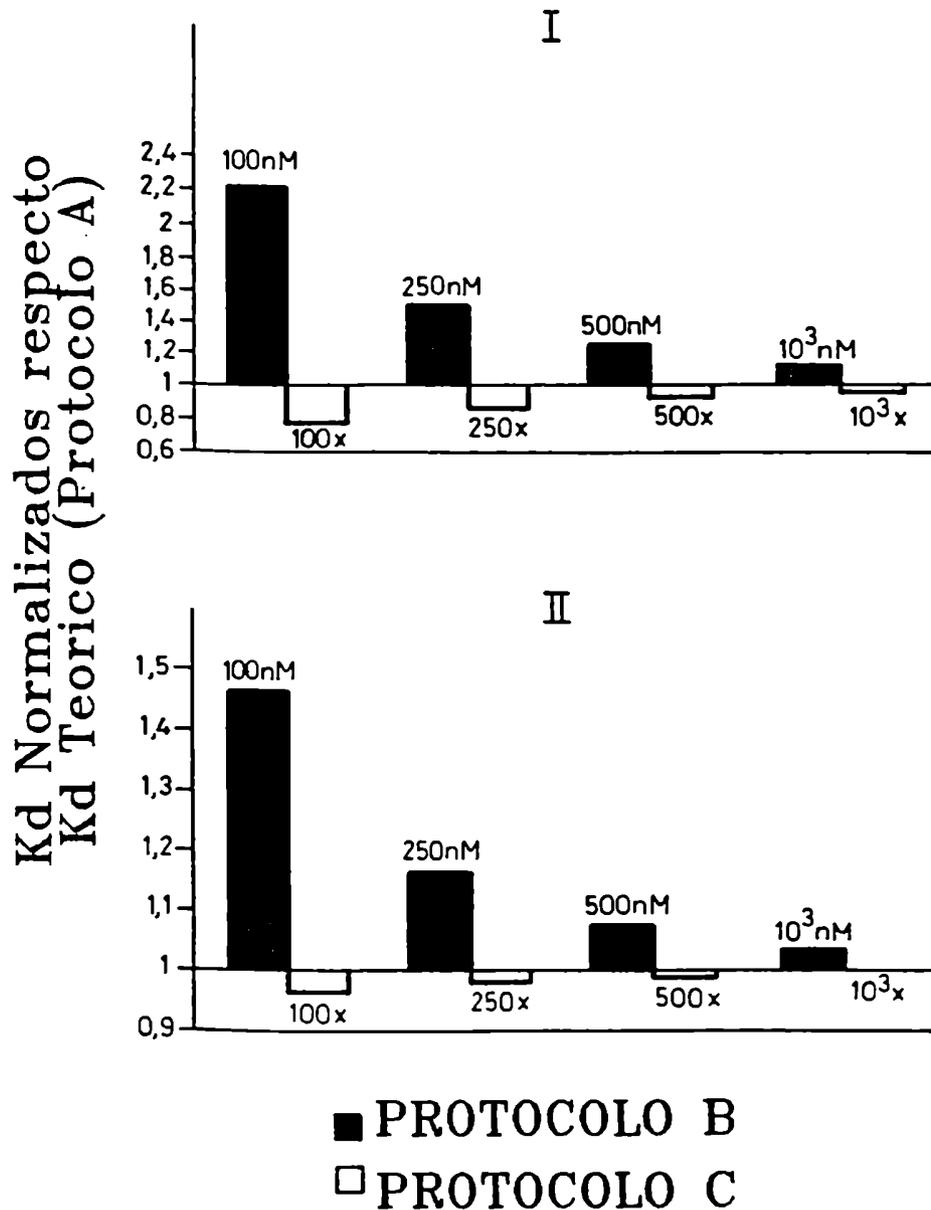


Figura IV.5: Variación de los valores de K_{d1} , respecto de un valor predefinido, obtenido por simulaciones en computadora utilizando las ecuaciones mencionadas en Mat. y Met. Los valores predefinidos corresponden a los calculados mediante el protocolo experimental A, ya sea de la ME (panel I) o del HC (panel II). Dichos valores sirvieron para alimentar las ecuaciones mencionadas y así determinar los errores de cálculo que cometen los protocolos B y C cuando se estima K_{d1} , para ello se normalizaron los valores predefinidos haciéndolos igual a 1. Las Barras representan cuán alejados están, en uno u otro sentido, los valores calculados por los distintos protocolos del valor predefinido y normalizado. Se simularon diferentes concentraciones del competidor RU-28362 cuyos valores se representan en la parte superior de las barras correspondientes, dentro del rango 100nM-1000nM para protocolo B y 100x-1000x para protocolo C.

ME, la variación es más importante, y el error mayor, porque existen bajos niveles de sitios tipo I y concentraciones altas de sitios tipo II que son difíciles de anular eficientemente; dada esta situación es razonable suponer que las estimaciones de los parámetros de unión en ME conllevan más error que en el HC, donde los niveles de sitios tipo I son más altos.

Finalmente, cuando se comparan los dos protocolos de competición utilizados, se puede resumir que el protocolo C es más exacto que el protocolo B en la estimación del B_{max1} y también comete menos error, cuando usamos RU-28362 500x, en la estimación de la constante K_{d1} . Además, si se tiene en cuenta que, según la ecuación E_{c1} , el cálculo de K_{d2} deriva de las estimaciones de los parámetros del sitio tipo I, éste conlleva menos error si se calcula con parámetros derivados del uso del protocolo C. Se concluye de este estudio que es más conveniente la utilización de un protocolo del tipo C cuando se necesita realizar experimentos de saturación con competidores no radioactivos.

DISCUSION

En este capítulo se contestan dos preguntas: primero, averiguar las constantes de afinidad de los receptores del SNC para (³H)DEX, y segundo, con estos datos disponibles discriminar si los receptores tipo II de la ME y el HC poseen diferente K_{d2}, como lo sugieren resultados preliminares [60]. Un tercer interrogante contestado por los estudios realizados en el presente capítulo, que no se había formulado previamente sino que surgió durante el desarrollo de la parte experimental, fue la mejor manera para analizar parámetros de unión de un sitio receptor, estando presente un segundo sitio de unión bloqueado específicamente por un competidor radioinerte.

Como ya se había mencionado, numerosos estudios en el campo de los receptores del SNC reconocen la existencia de al menos dos sitios de unión para CORT: un receptor de alta afinidad (tipo I) y un receptor de baja afinidad o sitio tipo II [2,7,8]. Esta hipótesis se originó luego de considerar el grado de ocupación de los receptores por parte de hormonas adrenales circulantes; mientras que bajos niveles de CORT circulante ocupa receptores tipo I, los sitios de unión tipo II necesitan niveles más altos de hormona circulante para poder ser ocupados [7,8]. En cambio, por estudios de captación hormonal *in vivo*, la afinidad

"relativamente" mas baja por los sitios tipo II. Estas observaciones están de acuerdo con los estudios mencionados en el presente capítulo e implican que la dificultad de la DEX para ocupar sitios tipo I en experimentos *in vivo* no se debe a una menor afinidad por este tipo de receptores, sino a otros mecanismos que deberían ser explorados para explicar la acción de la DEX en el SNC mediada por los diferentes subtipos de receptores.

En nuestro trabajo, los resultados de aplicar el método de las pendientes límite para estimar los parámetros de unión de ambos sitios receptores (protocolo A), muestran que los sitios de unión tipo I tienen más afinidad por (³H)DEX. Además, la constante K_{d2} para el HC fue 3.5 veces más baja que la misma, medida en ME. Estos resultados confirman datos preliminares, presentados en el capítulo anterior, que muestran que ME expresa un sitio receptor tipo II de baja afinidad, diferente del que expresa el HC [60]. El método empleado para los cálculos y la fase experimental en el protocolo A posee ventajas y desventajas. Una ventaja importante está dada por el hecho de que no se agrega competidor alguno, permitiendo la observación del sistema sin demasiadas interferencias o malas interpretaciones debido a artificios de técnica, introducidos potencialmente por propiedades desconocidas de los competidores utilizados. La

desventaja principal reside en los errores introducidos al interpretar un gráfico de Scatchard curvilíneo, por un método matemático determinado (en nuestro caso el método de las pendientes límite). En este sentido, la utilización de competidores sería más confiable, por el hecho de simplificar considerablemente el sistema en estudio evitando la utilización de la técnica de Scatchard para interpretar sistemas de receptores con más de un sitio de unión [170]. Los datos obtenidos utilizando ambas metodologías reducen los errores aportados por las mismas individualmente. Con esta idea en mente realizamos la parte experimental pero observamos que los datos obtenidos dependían del método de utilización del competidor RU-28362 (protocolos B y C). El agregado del mismo en forma proporcional a la concentración de ligando (protocolo C) o la utilización del competidor en concentración fija (protocolo B) mostraron discrepancias respecto de los valores de K_d . El protocolo C daba resultados que se aproximaban con los del protocolo A. Este solo hecho le daba más confiabilidad al protocolo C respecto del B pero se necesitaban pruebas adicionales, por lo que se desarrolló la simulación de ambos métodos por computadora. De todos modos, ambos protocolos demostraron que B_{max1} es mayor en el HC, mientras que B_{max2} tenía valores más comparables en ambos tejidos.

Inicialmente, el protocolo C se configuraba con el agregado del competidor RU-28362 100x en lugar de 500x, obteniéndose datos similares en ambos casos (datos no presentados). Luego de que las simulaciones por computadora sugirieron que los errores se reducían considerablemente elevando la proporción del competidor a 500x (figuras IV.4 y IV.5), se realizaron los experimentos correspondientes y encontramos nuevamente excelente concordancia con los resultados del protocolo A, esto es, que el Kd_1 de ambas zonas estudiadas era menor que el Kd_2 . También, el protocolo C con RU-28362 500x, al igual que el protocolo A, mostraban que el valor de Kd_2 de los receptores tipo II, pero no los de tipo I de ME, eran más altos que los semejantes en el HC. Este último resultado sugiere que la sensibilidad de ambas regiones del SNC a los esteroides circulantes, podría ser diferente, asumiendo que los Kd se relacionan con la ocupación de los receptores *in vivo*, hecho que se ve confirmado por resultados que muestran una gran sensibilidad el HC a los GC circulantes [2].

Los resultados obtenidos respecto de los diferentes valores de Kd_2 para ME e HC resultan interesantes a la hora de reaver datos de trabajos anteriores [capítulo II, 36] donde se manifestaba una captación diferencial de la hormona (3H)CORT inyectada i.v., por parte de los núcleos celulares de ME e HC. Si

sumamos la mayor afinidad que poseen los receptores tipo I hacia la CORT tritiada respecto de los sitios tipo II, los primeros están en baja concentración en la ME, y que los receptores tipo II de la ME tienen aún más baja afinidad que los mismos en el HC, entonces la combinación de estos dos factores justificaría la baja captación nuclear de (³H)CORT por parte de la ME.

En este punto sería interesante considerar si las propiedades de los receptores tipo II tejido-dependientes, cumplen alguna función que justifique la diferencias encontradas. En el caso del HC, ha sido sugerido que los sitios tipo I y tal vez los tipo II son mediadores de efectos continuos y discontinuos de los glucocorticoides en el eje SNC-Hipofiso-Adrenal [2,7,103]. Los mecanismos de retroalimentación, en particular la retroalimentación fina, serían de responsabilidad del HC [2,8,47,165]. Además, la alta sensibilidad del HC a los esteroides circulantes, se correlaciona con cambios de función y población celular, tal como se verifica en la pérdida neuronal en ratas ancianas; un fenómeno que se puede prevenir por adrenalectomía previa [50,171]. La administración de altas dosis de glucocorticoides a roedores no sólo induce "down regulation" de los receptores, principalmente en el HC, sino que también lleva a la pérdida neuronal en las zonas CA₂ y CA₃ del mismo HC [2,121]. Esta manifiesta neurotoxicidad podría ser exclusiva del

HC, debido a la concentración de los receptores tipo I y a la particular expresión fenotípica de los receptores tipo II, que dan a esta zona del SNC una especial sensibilidad a los niveles de esteroides adrenales circulantes [2].

En la médula espinal, los glucocorticoides regulan una serie de funciones, algunas de ellas similares a las manifestadas en el HC, como la inducción de las enzimas glicerol-fosfato deshidrogenasa y ornitina descarboxilasa, ambas reconocidas en células gliales [27]. Hall *et al* demostró efectos de los glucocorticoides sobre la transmisión sináptica, neuroexcitabilidad, contenido dopaminérgico, reducción de la peroxidación de lípidos y acortamiento en el tiempo de recuperación luego de injurias en ME [25,38,43,172]. Normalmente, estas acciones de los esteroides requieren dosis altas, en el rango farmacológico [43,173,174], que implicaría acción a través de receptores tipo II. Contrariamente al HC, no hay informes de pérdida de neuronas en la ME, luego de una exposición prolongada a corticoides adrenales, ya que tratamientos prolongados con estas hormonas resultan en una rápida mejoría de lesiones en la ME y recuperación clínica de pacientes con síndromes degenerativos de la misma [174,175].

En trabajos anteriores hemos demostrado que los receptores tipo II de la ME y el HC comparten algunas propiedades

fisicoquímicas y bioquímicas [32,36,90]. Pero las diferencias se hacen evidentes cuando se analizan los complejos tipo II-hormona y su asociación a ADN-celulosa. Primero, los receptores de la ME muestran una alta afinidad, cuando son transformados con calor, por ADN-celulosa al comparar la misma en el HC [36]. Segundo, los receptores de la ME muestran resistencia a la acción de las enzimas ARNasa del tipo A, las cuales aumentan la afinidad de los complejos Hormona-Receptor a ADN-celulosa, esto último en el caso de los receptores del HC [36,90]. Tercero, el agregado del quelante EDTA, el cual reduce la unión de los complejos H-R a ADN-celulosa por secuestro de Zn^{++} del medio, produce una mayor inhibición sobre los receptores tipo II del HC respecto de los receptores de similares características de la ME (ver Cap. V) [datos no publicados]. Los metales de transición son necesarios para la conformación de los "metal-fingers", responsables de la unión a ADN [81,82,83], por lo tanto la diferencia en la sensibilidad al EDTA hablaría de diferentes requerimientos, o diferente accesibilidad de estos metales por parte de las estructuras protéicas que conforman los receptores del tipo II en HC y ME. Entonces, se podría suponer que las estructuras de los receptores tipo II de la ME y el HC serían diferentes, e incluso se podría hablar de una diferencia funcional. La aparición de subclases de receptores para glucocorticoides, con

características generales de tipo II, podría ser común a otros tejidos, tal como formas de diferente peso molecular observadas en células de melanoma [176], tejidos bovinos [177], núcleos de hígado de rata [178], y células HeLa S3 [179]. No obstante, la relación entre estos subtipos de receptores permanece desconocida.

Finalmente, hay razones que justifican la presencia de receptores tipo II de alta afinidad en el HC, considerandó el acoplamiento positivo de la regulación de los sitios tipo I y tipo II [2]. Una hipótesis atractiva sería la regulación positiva de los receptores tipo II luego de la ocupación de los sitios tipo I. Este mecanismo podría ser exclusivo del HC , debido a la relación estequiométrica existente entre los sitios tipo I y tipo II en este tejido, a diferencia del resto del SNC.

**Acción de Quelantes
de Metales de Transición
sobre la Transformación
de los receptores de GC
en HC y ME**

CAPITULO V

INTRODUCCION

En los capítulos anteriores analizamos los sitios receptores de la ME y HC, desde los puntos de vista bioquímico y molecular, al comparar los parámetros de unión de las poblaciones de receptores existentes, y también el proceso de transformación a través de la interacción con ADN-celulosa.

Un aspecto que corresponde estudiar se refiere a los mecanismos de unión de los complejos Hormona-Receptor (H-R) a ADN. *In vivo*, el complejo se une a elementos específicos de la cadena de ADN (GRE) activando la transcripción de determinados genes específicos [54,83]. El mecanismo de unión a ADN involucraría la presencia de regiones ricas en cisteína e histidina [83,181], los cuales se han propuesto como presentes en el dominio de unión a ADN. La región mencionada, correspondiente a receptores de glucocorticoides, es homóloga a la de otros receptores de hormonas esteroideas y además está presente en el producto del gen v-erb A [52]. Estas zonas ricas en cisteína e histidina, presentes en distintas proteínas regulatorias [81], serían dominios de unión de Zn^{++} . En el caso de la familia de hormonas esteroideas dichos dominios estarían formados por regiones altamente conservadas, ricas en cisteínas [181].

El hecho de haber descripto secuencias de aminoácidos, los cuales unirían Zn^{++} , formando zonas de interacción con el ADN, sugiere que los receptores para glucocorticoides serían metaloproteínas [82,83,182,183]. La interacción con el ADN y por ende la unión a ADN-celulosa estaría influenciada por la disponibilidad de Zn para formar las estructuras necesarias para la unión. En el presente capítulo analizamos la influencia de dicha disponibilidad, por medio del uso de diferentes quelantes de metales de transición, en la capacidad de unión a ADN-celulosa de los receptores tipo I y tipo II de ME y HC.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 200-250 gr de peso. Las mismas se adrenalectomizaron (ADX) por aproximación dorsal, en forma bilateral, 2 a 3 días antes del sacrificio y se mantuvieron durante ese lapso de tiempo en grupos de a 10 animales en jaulas apropiadas donde disponían de alimento balanceado y NaCl 9% ad libitum.

Los animales fueron sacrificados por decapitación para luego extraerles el hipocampo (HC) y la médula espinal (ME), los que se utilizaron en los distintos experimentos.

MARCACION DE SITIOS RECEPTORES EN SNC

El HC y la ME se homogenizaron en 2-3 volúmenes de buffer TMG, equivalente a buffer TEMG pero sin el agregado de EDTA, y luego se centrifugó durante 1h a 105000g. Se tomaron alícuotas de 0.5 ml del citosol obtenido y se agregaron a tubos que contenían concentraciones constantes saturantes del ligando (6,7-³H)DEX (45.8 Ci/mmol) con o sin la presencia de DEX no radioactiva para evaluar la unión inespecífica. Cuando se miden los sitios tipo II se incubaba, además de la hormona radioactiva,

con el glucocorticoide sintético RU-26752 [90] que se une específicamente a los sitios receptores tipo I, dejando libres para ser marcados los sitios tipo II.

Además del ligando radioactivo se agregaba, en el buffer de incubación, distintas concentraciones de EDTA o 1,10 O-fenantrolina, en sendos tubos de incubación. Una vez conformada la mezcla que contenía citosol, buffer sin EDTA, (^3H)DEX±DEX y diferentes concentraciones del quelante indicado, se procedía a incubar durante 3.5 hs a 0°C. Transcurrido dicho lapso de tiempo se procedió a la transformación de los receptores calentando a 20 °C durante 30 min. [180] para luego medir en una alícuota (200µl) la unión a ADN-celulosa. Otra porción de la mezcla de incubación (150µl) se utilizó para medir la unión total mediante el filtrado en minicolumnas de Sephadex-LH20.

DETERMINACION DE LA UNION DEL COMPLEJO HR A ADN-CELULOSA

Luego del período de incubación y transformación por calentamiento, una alícuota de 200 µl se sembró en columnas de ADN-celulosa, luego de lo cual se lavó la columna con buffer adecuado (4ml) y finalmente la fracción unida se eluyó con 2ml de NaCl 0.3M. Los resultados fueron expresados en fmol/mg prot., y

como porcentaje del unido total que quedó retenido por las columnas de ADN-celulosa luego de la transformación inducida por calor.

TRATAMIENTO ESTADISTICO

Se utilizó ANOVA de una vía y comparaciones múltiples para el análisis de los datos expuestos en este capítulo.

RESULTADOS

INFLUENCIA DEL EDTA EN LA UNIÓN DE RECEPTORES TOTALES A ADN-CELULOSA

En una primera etapa realizamos experimentos con receptores totales y un rango de concentraciones de EDTA, para así observar cómo variaba la unión a ADN-celulosa de los complejos hormona receptor con el agregado del quelante. La fig V.1 muestra los resultados obtenidos luego de la unión de receptores totales (tipo I + II) a ADN-celulosa. Se utilizó un rango de concentraciones de EDTA de 0mM a 3mM. Dentro de este rango la capacidad de unión a ADN-celulosa de los receptores totales transformados del HC no tuvo grandes variaciones (24% sin EDTA, 21% con EDTA 0.5mM, 22% con EDTA 1mM y 25% con EDTA 1.5mM) salvo con la concentración máxima de EDTA ensayada donde se alcanzó el mínimo de unión al polianión (8% para EDTA 3mM), mientras que la capacidad de unión de los mismos en ME aumentó de 30 % a 38 % con una concentración de EDTA de 0.5mM, y luego decayó a 15% (EDTA 3mM), permaneciendo de todos modos con valores superiores de unión a ADN respecto de HC (8%). Este gráfico muestra que frente a diferentes concentraciones de EDTA los receptores totales de HC se comportan en forma diferente respecto de los mismos en ME, además del hecho ya descripto de la mayor

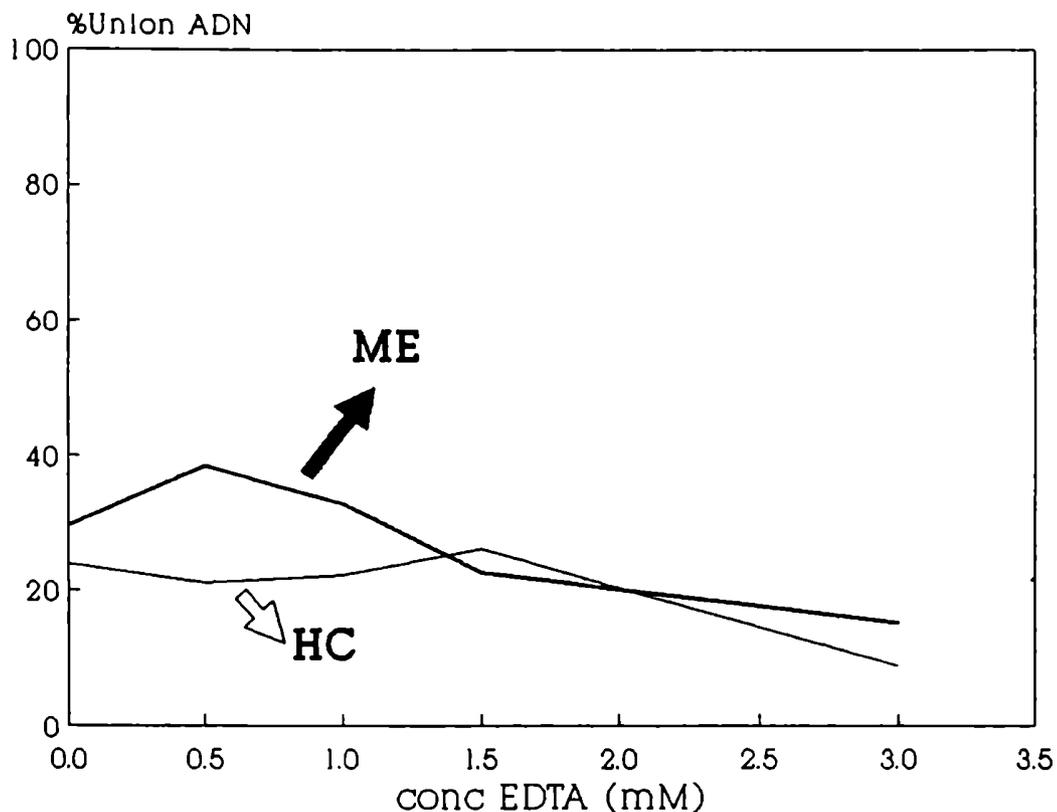


Figura V.1: Influencia de la concentración del quelante EDTA en la unión de los receptores totales de ME e HC a ADN-celulosa. Alicuotas de los citosoles de ME e HC, se incubaron con $(^3\text{H})\text{DEX}$ 20 nM \pm DEX no radioactivo, para estimar unión inespecífica, durante 3.5 h a 0°C, con buffer TMG y distintas concentraciones de EDTA que se indican en la figura. Luego de la incubación a 0°C, se procedió a transformar los receptores cargados con hormona, incubando a 20°C durante 30 min.. Una alícuota se sembró en columnas de ADN-cel. y se eluyó la radioactividad unida con una solución 300mM de NaCl en buffer. Otra alícuota se utilizó para medir la unión total. Se expresa el % de unión a ADN-cel. en función de la concentración de EDTA (mM).

capacidad de unión de los receptores totales de ME respecto de los de HC en condiciones basales *in vitro*. El pico de unión al ADN con EDTA 0.5mM está presente únicamente en ME y no en HC.

INFLUENCIA DE LA O-FENANTROLINA EN LA UNION A ADN-CELULOSA

La siguiente etapa fue comprobar el comportamiento de los complejos hormona-receptor transformados frente al ADN con variaciones en la concentración de otro quelante, o-fenantrolina. Los resultados se observan en la fig V.2, donde se aprecia la reducción de la unión con el aumento de la concentración del reactivo utilizado de 0mM a 3mM. En este caso los receptores totales de ambos tejidos se comportaron de forma similar.

ACCION DEL EDTA SOBRE LA UNION DE SITIOS TIPO II A ADN-CEL.

Una vez observado el comportamiento de los sitios receptores a diferentes concentraciones de los quelantes utilizados, decidimos investigar los sitios receptores tipo II, los que presentaron propiedades distintas entre HC y ME, no así los sitios tipo I [capítulo III]. Para ello utilizamos una concentración máxima de EDTA, ya que fue la única que mostró diferencias entre los tejidos investigados (3mM), y los controles sin el quelante. En la fig V.3 se muestran los resultados experimentales con y sin agregado de EDTA. En ausencia de EDTA,

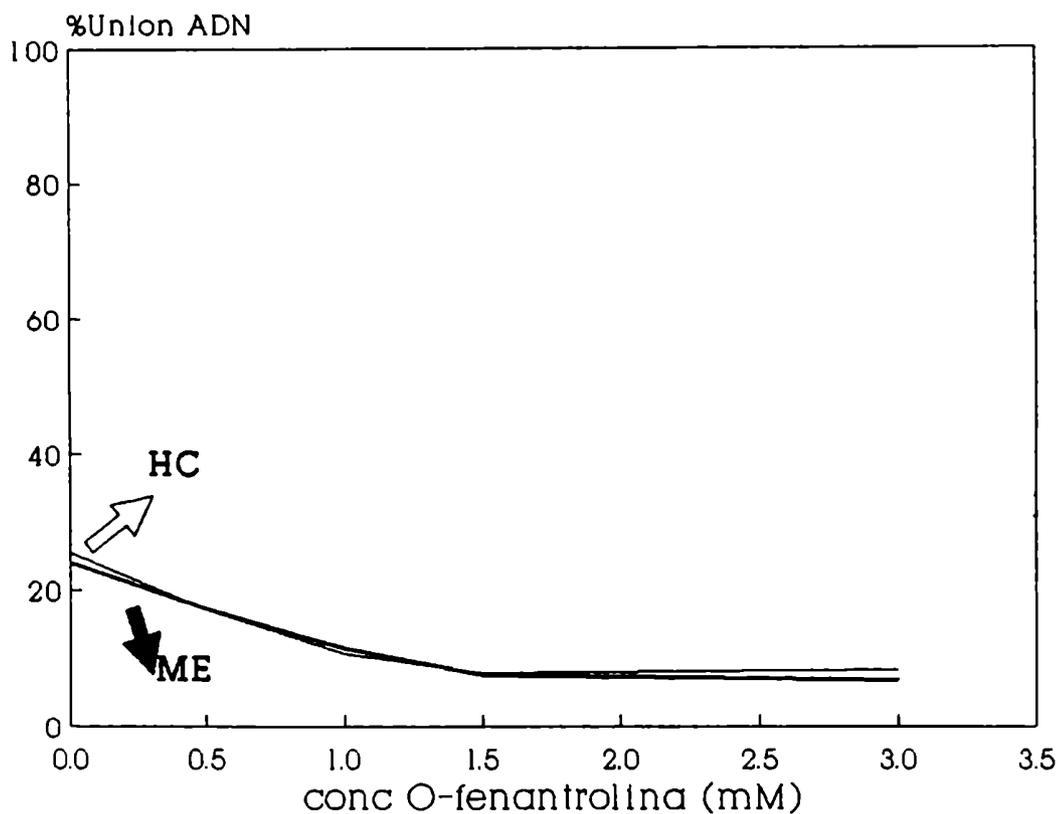


Figura V.2: Influencia de la concentración del quelante o-fenantrolina en la unión de los receptores totales de ME e HC a ADN-celulosa. Los métodos son similares a los enunciados en la fig. V.1. Se expresa el % de unión a ADN-cel. en función de la concentración de o-fenantrolina (mM).

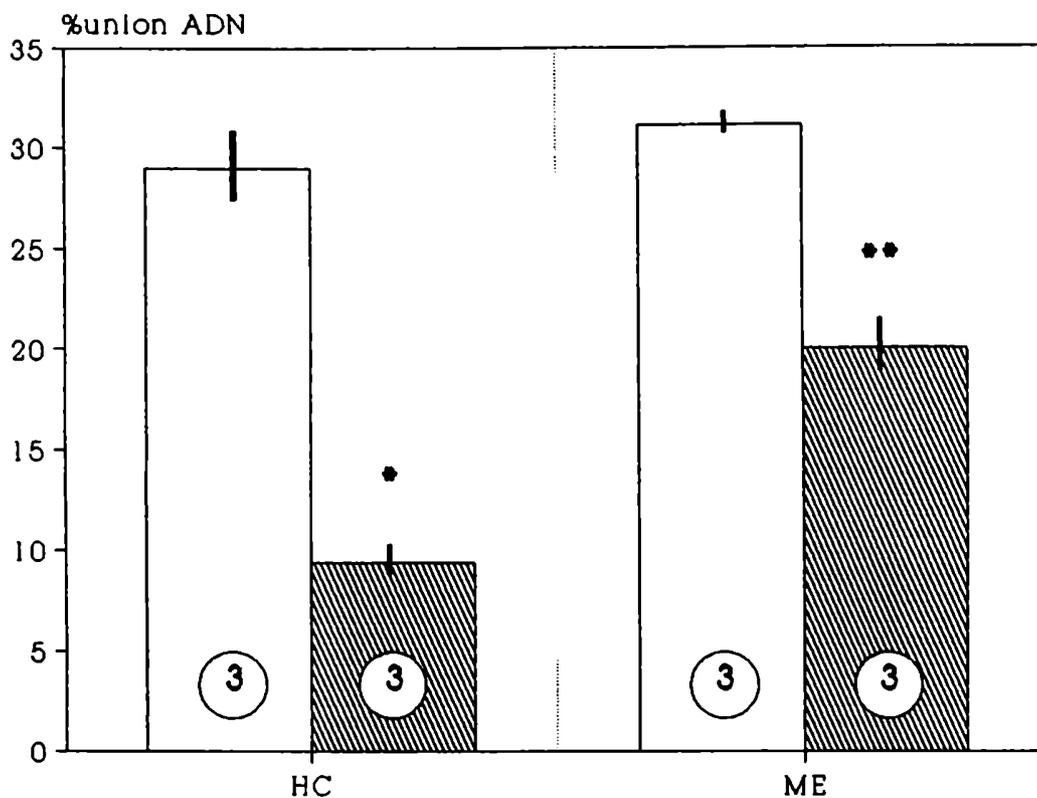


Figura V.3: Acción de EDTA 3mM en la unión de sitios tipo II de HC y ME a ADN-celulosa. La metodología es similar a la enunciada en la figura V.1 salvo que se incubó en ausencia (barras vacías) o en presencia (barras rayadas) de EDTA 3mM y además con el agregado, en todos los casos, de RU-26752, que bloquea los sitios tipo I para así marcar los sitios tipo II. Los resultados se expresan como % promedio de la unión a ADN-celulosa \pm E.S. de sitios tipo II (3 experimentos).

(*) $p < 0.005$ vs HC (EDTA 0mM). $p < 0.005$ vs ME (EDTA 3mM).

(**) $p < 0.0025$ vs ME (EDTA 0mM).

no se observaron diferencias significativas entre HC y ME (29%±1.7% para HC y 31.1%±0.5% para ME; 3exp.). En presencia de EDTA 3mM la unión a ADN disminuyó en ambos tejidos (9.4%±0.7% en HC y 20%±1.2% en ME) siendo el descenso significativo en las dos zonas respecto de control (EDTA 0mM) con un valor de $p < 0.005$ en HC y $p < 0.025$ en ME. Al analizar los datos obtenidos con 3 mM de EDTA, y comparando HC con ME, resulta interesante ver que se repite lo encontrado anteriormente, es decir que los sitios tipo II de ME resultan menos sensibles a la acción de EDTA, al descender la unión a sólo el 20%, mientras que en el HC los mismos sitios receptores descienden su unión a ADN por acción del EDTA a 9.4%. Esta diferencia es significativa con $p < 0.005$ HC vs ME. Marcando todos los tipos receptores resulta también en una diferencia significativa de los sitios totales en HC respecto de los de ME en presencia de EDTA 3mM (Fig V.4).

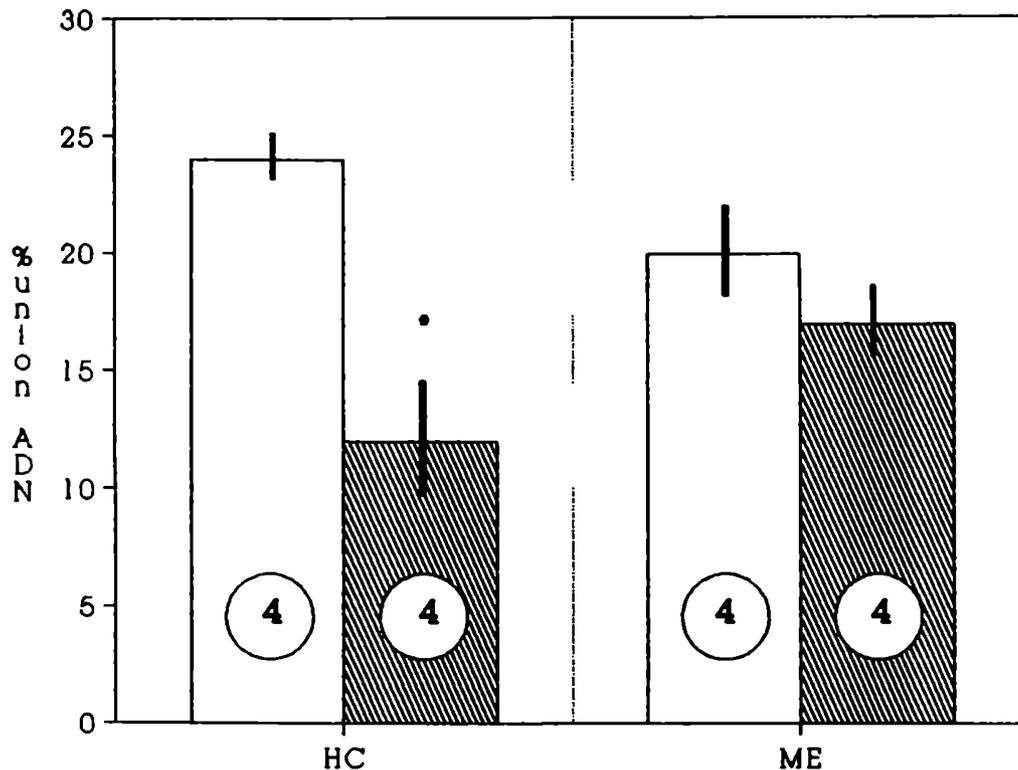


Figura V.4: Acción de EDTA 3mM en la unión de sitios totales (tipo II + tipo I) de HC y ME a ADN-celulosa. La metodología es similar a la enunciada en la figura V.1 salvo que se incubó en ausencia (barras vacías) o en presencia (barras rayadas) de EDTA 3mM. Los resultados se expresan como % promedio de la unión de sitios totales a ADN-celulosa \pm E.S. (4 experimentos).

(*) $p < 0.005$ vs HC (EDTA 0mM). $p < 0.05$ vs ME (EDTA 3mM).

DISCUSION

Numerosas publicaciones indican que los receptores de esteroides serían metaloproteínas [82,83]. Asimismo, se ha demostrado la influencia de diferentes quelantes sobre la unión de complejos hormona-receptor a ADN [83,184]. Por otra parte, se ha sugerido que las estructuras dentro de los receptores de esteroides, capaces de captar metales, serían las responsables de la unión de dichos sitios receptores a ADN, una vez transformados y en el núcleo celular [81,181]. Se ha podido demostrar que dichas estructuras son regiones ubicadas dentro del dominio de unión al ADN, y además ricas en cisteínas [52,81,181]. Adicionalmente, se ha publicado que en la zona del receptor responsable de la unión a ADN debe haber grupos sulfidrilo (SH) libres para que haya unión a genoma [79].

Los experimentos presentados en este capítulo confirman que la unión a ADN-celulosa depende de la concentración de quelantes, pero además muestran el comportamiento diferente de los receptores de la ME y el HC, ya sea al marcar todos los subtipos de receptores o solamente los sitios tipo II, que como vimos en capítulos anteriores presentan diferencias entre los correspondientes a la ME y el HC.

Cuando se empleó O-fenantrolina no se observaron comportamientos diferenciales entre los receptores de ambas zonas estudiadas (fig.V.2). En cambio, EDTA en concentraciones variables produjo comportamientos diferentes entre ambos tejidos, como ser un pico de unión a ADN por parte de los receptores de la ME con EDTA 0.5 mM (Fig.V.1). Los receptores del HC no presentan dicho pico y el mínimo de unión con concentraciones de EDTA 3mM es menor que el obtenido en receptores de ME. Esta diferencia se hace notable en el gráfico V.4 donde se estudia únicamente una sola concentración de EDTA (3mM) o sin agregado del quelante, siendo la misma significativa con $p < 0.05$ para HC vs ME utilizando EDTA. Al analizar únicamente los sitios tipo II, el comportamiento diferencial se hace más importante (Fig. V.3), siendo las diferencias significativas.

Los resultados presentados sugieren que el mecanismo de transformación, estudiado a través de la unión del receptor tipo II a ADN-celulosa, es diferente entre ME e HC. Es posible que la estructura del receptor difiera a nivel del "dedo" que une Zn y es el responsable de unirse a ADN [81,181]. Así, la mayor sensibilidad del receptor tipo II del HC al EDTA podría deberse a un mayor contenido en Zn de esta metaloproteína, con respecto al receptor homólogo de la ME. En combinación con las diferencias mencionadas en capítulos anteriores, todo hace pensar que estamos

en presencia de dos receptores tipo II diferentes en su estructura o función, como sugerimos en trabajos anteriores de nuestro laboratorio [60]. Esta hipótesis puede reforzarse mediante diversos estudios sobre la afinidad de los sitios receptores por el ADN, si fuera posible revertir el efecto del EDTA mediante el tratamiento con Zn u otros metales de transición.

CONCLUSIONES

CAPITULO VI

CONCLUSIONES FINALES

Los trabajos presentados en los capítulos anteriores representan un estudio comparativo entre los sitios receptores del HC y la ME. El primero, como ya mencionamos, es una zona del SNC extremadamente sensible a las hormonas corticoadrenales sanguíneas por su elevada concentración de sitios de unión para GC y MC, convirtiéndolo en un tejido blanco importante, y muy estudiado, dentro del SN [2]. Las condiciones mencionadas lo convierten en una zona de referencia obligada para estudios comparativos de receptores de hormonas corticoadrenales en distintas zonas del SN, como ser la ME.

Por otra parte la ME representa, por varias razones, un sistema único para el estudio de los mecanismos de acción de las hormonas adrenales. La primera de ellas recae en la simpleza de la ME respecto de otras zonas del SN, con lo que se puede obtener mucha información sobre los mecanismos de acción de los GC con diseños experimentales relativamente sencillos. Segundo, la neuroanatomía de la ME permite localizar los efectos hormonales en regiones específicas, algo más complejo de realizar en el encéfalo. Tercero, los GC tienen una acción directa en la fisiología de la ME, tal como fue mencionado en la introducción

[185]. Estas razones justificaron el comienzo de las investigaciones en la ME, en una primera etapa a cargo del Dr. Ortí [32], por parte de nuestro laboratorio.

Resultados previos observados en nuestro laboratorio, los cuales no distinguen entre las distintas poblaciones de receptores, mostraron que no había diferencias significativas entre los sitios de unión de la ME y el HC en cuanto a los parámetros fisico-químicos y la cinética de los receptores [32]. La única diferencia encontrada fue sobre la captación nuclear *in vivo* de (³H)CORT, que resultó anormalmente baja en los núcleos purificados de la ME [36]. Hallar el porqué de esta diferencia llevó a la concreción de los trabajos aquí presentados y a una descripción más detallada de los sitios de unión de GC en la ME.

En la primera serie de trabajos experimentales, comentados en el capítulo II, se pretendió investigar una serie de hipótesis que podrían explicar el comportamiento diferencial encontrado entre los sitios de unión de la ME y el HC. Las hipótesis planteadas eran esencialmente dos, la primera involucraba diferentes afinidades de los sitios receptores *in vivo*, la segunda planteaba problemas en la transformación/translocación de los receptores de la ME que impedirían su detección en la fracción nuclear. Los resultados de las

mediciones de afinidad *in vivo*, reflejados en los valores de los ID_{50} , no mostraron diferencias entre las dos zonas, en concordancia con los experimentos *in vitro* [32]. Las posibles diferencias en la transformación/ translocación fueron investigadas desde dos ópticas diferentes. Una aproximación planteaba la existencia de inhibidores de dichos procesos en la ME, habida cuenta de distintas publicaciones que mencionaban la existencia de dichas sustancias en tejidos sensibles a hormonas esteroideas [91,127]. La presencia de dichos inhibidores fué confirmada por nuestros resultados experimentales, pero la concentración de esta/s sustancia/s era similar tanto en ME como en HC. Por otra parte, se estudió la sensibilidad del proceso de transformación a la acción de ribonucleasas, dado que numerosas publicaciones involucraban a moléculas de ARN relacionadas con dicho proceso [67,87,89]. Los resultados muestran cómo los sitios receptores del HC son sensibles a la enzima, en cuanto al proceso de transformación, respecto de los sitios de ME.

Los experimentos diseñados con el fin de encontrar posibles causas de la diferente captación nuclear de CORT tritiada por parte de la ME y el HC, dieron lugar a la observación de otro comportamiento diferencial relacionado con los sitios receptores de ambas zonas, como fue la distinta sensibilidad a la enzima ARNasa A. Los experimentos enumerados en

el capítulo II sólo permiten establecer un enlace indirecto entre las dos diferencias halladas en el comportamiento de los sitios receptores de la ME respecto del HC, por lo que, con los resultados hasta aquí presentados, la menor captación de hormona radiactiva por parte de núcleos de ME podría estar relacionado con diferencias en los procesos de transformación/ translocación, ya que, como se mencionó anteriormente, moléculas de ARN podrían estar involucradas en ambos procesos [69,71,87].

Por otra parte, eran numerosas las publicaciones que demostraban la heterogeneidad de sitios de unión para GC en el SN [2,7,8]. Estas publicaciones indicaban la existencia de al menos dos sitios de unión intracelulares, los sitios tipo I y tipo II, a semejanza de la nomenclatura utilizada por Funder y col. en riñón [99]. Nosotros investigamos la presencia de mas de un sitio de unión y la eventual distribución de dichos sitios en la ME [cap III], utilizando (³H)DEX, (³H)CORT y la presencia de competidores específicos de los distintos sitios de unión como el RU-28362. Los datos obtenidos por experimentos de competencia y de saturación de sitios indicaban la existencia de heterogeneidad tanto en la ME como en el HC, y además que la distribución de sitios era diferente. Mientras que en el HC la concentración de sitios tipo I y tipo II es similar y la relación sitios I/sitios II se encuentra cercana a la unidad, en la ME la situación es

totalmente diferente ya que la concentración de sitios I es muy baja. La gran concentración de sitios tipo I en HC respecto de otras áreas del SN es una observación ya publicada anteriormente [2].

Cuando se investigó el comportamiento de los distintos sitios de unión de la ME y el HC frente a la enzima ARNasa y la unión a ADN-celulosa, también encontramos diferencias. Mientras que en el HC ambos sitios de unión fueron sensibles a la acción de la enzima, en la ME sorprendentemente los sitios tipo I también fueron sensibles a la acción de la ribonucleasa, pero los sitios tipo II permanecieron inmutables. Estudios posteriores utilizando cromatografías en columnas de ADN-celulosa y gradientes de KCl para la elución de los receptores transformados, insinúan un comportamiento diferente en cuanto a la concentración necesaria de KCl para eluir los sitios tipo II transformados de ME respecto de los mismos en el HC. Esta diferencia en el comportamiento en una columna de ADN-celulosa eluída con un gradiente de concentración de KCl coincide con los resultados encontrados por Ghering y col. [159,186], que describen la existencia de diversas formas mutantes de los receptores de GC en linfocitos, unos del tipo normal llamados *wild type* o *wt*, otros con gran afinidad por ADN llamados *nt*⁺ y finalmente otros con afinidad reducida por ADN llamados *nt*⁻, y

que poseen diferente capacidad de translocación nuclear y unión a ADN. En conclusión, los sitios tipo II de la ME resultaron de comportamiento diferente a los sitios tipo II del HC, frente a columnas de ADN-celulosa. Esta última frase podría implicar que las diferencias de comportamiento del HC respecto de la ME en cuanto a los receptores, se debería sólo a las diferencias entre los sitios tipo II de ambas zonas. Esta hipótesis de una heterogeneidad de función de los sitios tipo II de ME respecto de los mismos del HC se encuentra apoyada por trabajos previos de Ghering [159,186], y podrían corresponder a distintas clases de receptores encontradas por este autor en linfocitos.

Por lo tanto, podemos puntualizar los resultados alcanzados hasta aquí de la siguiente manera: a) heterogeneidad en los sitios de unión de glucocorticoides; b) alta afinidad de los sitios tipo I por (^3H)CORT [cap III] y c) diferencias entre los sitios de unión tipo II de ME y HC. Estos hallazgos permiten explicar las diferencias encontradas en la captación nuclear *in vivo* de (^3H)CORT inyectada en dosis trazadoras por vía i.v., descrito en el capítulo II [32,36]. Bajo las condiciones del ensayo *in vivo* se inyectaron dosis trazadoras de (^3H)CORT, dada la alta afinidad de esta hormona por sitios tipo I [7,151,161], es razonable suponer que la alta concentración de estos sitios de unión en el HC permitió que captara la hormona uniéndose al sitio

I. Por otra parte, la concentración de sitios tipo I en ME es muy baja y por lo tanto este tejido captó menos hormona y la translocación al núcleo fue menor a la esperada puesto que sólo los sitios tipo I translocaron, ya que eran los únicos ocupados eficientemente en ambos tejidos. La única opción a esta explicación es que no contempla la captación de (^3H)CORT determinada en el homogenato que concordaba con la esperada dada la concentración de sitios de unión totales medidos. Esto indica casi con seguridad que en la ME la hormona (^3H)CORT estaba unida también a sitios tipo II, que son los mayoritarios. La explicación a esta nueva opción, es atribuible en forma indirecta a las diferencias encontradas para los sitios de unión tipo II entre ME y HC (comentadas en el párrafo anterior). Esto llevaría a pensar que los sitios tipo II de ME, ocupados en forma parcial por (^3H)CORT, no habrían translocado al núcleo o lo hicieron en forma deficiente.

La hipótesis de la translocación deficiente de los sitios tipo II de ME al núcleo podría estar apoyada por los trabajos experimentales desarrollados y comentados en el Capítulo V. Los mecanismos por los cuales los sitios receptores de hormonas esteroides se unen al ADN nuclear, han sido descritos por numerosas publicaciones [81,77,103]. En ellas se muestra la existencia de estructuras llamadas **Zn Fingers** o dedos de zinc,

que serían las zonas encargadas de la unión a ADN [cap I y V]. Los resultados obtenidos en el laboratorio muestran que existe un comportamiento diferente de los sitios tipo II de ME e HC respecto de la afinidad a ADN a diferentes concentraciones de EDTA, un conocido quelante de metales de transición. Estos resultados parciales indicarían que existiría alguna diferencia estructural en el dominio de unión a ADN de los sitios receptores tipo II de ME respecto de HC, y tal vez ésto justificaría una translocación deficiente de los sitios correspondientes a ME. Finalmente, estos resultados se agregan al conjunto de evidencias que, sin ser concluyentes, indican la existencia de sitios tipo II diferentes en la ME respecto de los mismos en el HC.

Durante el desarrollo del trabajo experimental para determinar los parámetros de unión de los sitios tipo I y tipo II de la ME y el HC, encontramos otro dato diferencial entre los sitios tipo II de las dos zonas estudiadas [cap IV]. La afinidad de los sitios tipo II de la ME por (^3H)DEX es menor que la que poseen los sitios tipo II del HC. Este dato se contrapone con los resultados obtenidos por el Dr Ortí [32], pero hay que tener en cuenta que fueron realizados tomando a los sitios receptores en conjunto y no diferenciados en subtipos I y II como es nuestro caso. No sería correcto decir que los receptores de GC en ME

poseen la misma afinidad *in vitro* que los receptores de GC en HC como se mencionó en el cap II, a la luz de los datos expuestos en el cap IV.

Un resultado inesperado se encontró cuando se estudiaron las afinidades de los sitios tipo I y tipo II por (³H)DEX en HC y ME. Trabajos publicados anteriormente mencionaban que dicho ligando radioactivo poseía más afinidad por los sitios tipo II que por los sitios tipo I [2,9,100]. Bajo las condiciones experimentales utilizadas en nuestro laboratorio [cap IV], encontramos que la hormona (³H)DEX posee más afinidad por los sitios tipo I que por los tipo II, y además, que dicho resultado dependía del método experimental utilizado para la determinación de la afinidad. Trabajos publicados recientemente por Luttge y col. confirman los resultados mencionados [101]. Adicionalmente se realizó un estudio para determinar las posibles causas de la influencia de la metodología empleada para la determinación de los parámetros de unión de los sitios receptores.

Para finalizar, podemos concluir que hemos profundizado en la descripción de los sitios receptores de la ME y el HC. Encontramos que existía heterogeneidad en los sitios de unión de GC en ME, que la concentración de los diferentes sitios

receptores (tipo I y II) en ME era distinta a la concentración en HC y además hemos hallado una serie de sugestivas diferencias, todas ellas encontradas en los sitios tipo II, a saber:

- a) Insensibilidad de los sitios de la ME a la acción de la enzima ARNasa.
- b) Posible comportamiento diferencial en la elución de columnas de ADN- celulosa.
- c) Menor afinidad de los sitios receptores de ME por la hormona (^3H)DEX.
- d) Comportamiento diferencial respecto de la acción del quelante EDTA en su acción frente a la unión de los sitios receptores transformados a ADN- celulosa.

este último ítem podría significar una diferencia estructural en el dominio de unión a ADN, de los receptores tipo II de la ME respecto de los mismos en el HC. Faltan experimentos de confirmación de estos últimos resultados, pero es posible sugerir que frente a las diferencias encontradas estamos en presencia de sitios tipo II en ME diferentes a los sitios tipo II de HC, lo que podría llamarse una heterogeneidad tisular de los sitios receptores. Sugerimos que la ME expresa una variante de los

sitios tipo II, aunque al momento actual se desconoce si las diferencias con el HC se deben a distintos genes, a cambios transcripcionales o post-transcripcionales del ARNm del receptor, o a variaciones de la proteína receptora, debido al microambiente presente en la ME, que podría ser diferente al del HC.

Alejandro Tashiro

Daniel Caser

BIBLIOGRAFIA

- [1] Calvo J.C., Torres M., Charreau E.H.: Hormonas, receptores y segundos mensajeros. En: *Endocrinología molecular*. Calandra, R.S. y De Nicola, A.F. Eds. (El Ateneo, Bs.As.), pp.:1-19 (1985).
- [2] Mc Ewen B.S., Brinton R.E., Chao H.M., Coirini H., Gannon M.N., Gould E., O'Callaghan J., Spencer R., Sakai R.: The hippocampus: a site for modulatory interactions between steroid hormones neurotransmitters and neuropeptides. En: *Neurocrine perspectives Vol. III* Muller E. y MacLeod R.M. Eds. (Springer-Verlag, Berlín) (1990).
- [3] Stumpf W.E.: The brain: an endocrine gland and hormone target. En: *Anatomical neuroendocrinology based on the international conference on neurobiology of CNS-hormone interactions*. Stumpf W.E., Grant L. Eds. (Chapel Hill), pp.: 2-8 (1974).
- [4] Lantos C.P.: Endocrinología molecular de la función mineralocorticoidea. En: *Endocrinología molecular*, Calandra, R.S. y De Nicola, A.F. Eds. (El Ateneo, Bs.As.). pp.:220-237 (1985).
- [5] De Nicola A.F.: Efectos moleculares de los glucocorticoides. En: *Endocrinología Molecular*, Calandra R.S. y De Nicola, A.F. Eds. (El Ateneo, Bs.As.) pp.:199-219 (1985).
- [6] Wesphal U.: Steroid protein interactions. En: *Monographs in endocrinology*, Gross F.; Labhart A.; Mann T.; Samuels L.T. y Zande J. Eds. (Springer-Verlag, Berlin) (1971).
- [7] Reul J.M.H.M., De Kloet E.R.: Two receptor system for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511 (1985).
- [8] Mc Ewen B.S., De Kloet E.R., Rostenc W.: Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.* 66: 1121-1188 (1986).

- [9] Funder J.W., Sheppard K.: Adrenocortical steroids and the brain. *Ann.Rev.Physiol.* 49: 397-411 (1987).
- [10] Munck A., Guyre P.M., Holbrook N.J.: Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews* 5: 25-44 (1984).
- [11] Whalley L.J., Borthwick N., Copolov D., Dick M., Christie J.E., Fink G.: Glucocorticoid receptors and depression. *British Medical J.* 292: 859-861 (1986).
- [12] Meyer J.S.: Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol. Rev.* 65: 946-1015 (1985).
- [13] Mc Ewen B.S., Weiss J., Schwartz L.: Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220: 911-912 (1968).
- [14] Pardridge W.H., Mietus J.: Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin bound hormone. *J. Clin. Invest.* 64: 145-154 (1979).
- [15] Howard E.: Hormonal effects on the growth and DNA content of the developing brain. En: *Biochemistry of the developing brain.* Mimwich W. Ed.(Dekker, New York). Vol.2 pp.:1-68 (1979).
- [16] Kovacs S.: The role of thyroid and adrenocortical hormones in the biochemical maturation of the rat brain. En: *Hormones and brain function.* Lissak K. Ed.(Plenum, New York) pp.:53-67 (1973).
- [17] Howard E., Benjamins J.A.: DNA, ganglioside and sulfatide in brains of rats given corticosterone in infancy with an estimate of cell loss during development. *Brain Res.* 92: 73-87 (1975).
- [18] Bonn M.C.: Effect of hydrocortisone on neurogenesis in the neonatal rat brain: a morphological and autoradiographic study. *PHD disertation Univ. of Connecticut* (1985).
- [19] Schapiro S., Vukovich K., Globus A.: Effects of neonatal thyroxine and hydrocortisone administration on the development of dendritic spines in the visual cortex of rats. *Exp. Neurol.* 40: 286-296 (1973).

- [20] Salas M.,Schapiro S.: Hormonal influences upon the maturation of the rat brain's responsiveness to sensorial stimulus. *Physiol. Behav.* 5: 7-11 (1970).
- [21] Schapiro S.,Salas M.,Vukovich K.: Hormonal effects on ontogeny of swimming ability in the rat: assessment of central nervous system development. *Science* 168: 147-151 (1970).
- [22] Howard E.,Olton D.S.,Taylor M.M.: Polydipsia in adult mice and rats given corticosterone in infancy: accentuation by variable interval food reinforcement. *J.Comp.Physiol.Psychol.* 87: 120-125 (1974).
- [23] Taylor M.M.,Howard E.: Impaired glucose homeostasis in adult rats after corticosterone treatment in infancy. *Endocrinology* 88: 1190-1202 (1971).
- [24] Tank A.W.,Weiner N.: Induction of tyrosine hydroxylase by GC in mouse neuroblastoma cells. Enhancement of the induction by cyclic AMP. *Mol.Pharmacol.* 22: 421-430 (1982).
- [25] Hall E.D.: Glucocorticoid effects on central nervous excitability and synaptic transmission. *International Review of Neurobiology* 23: 165-195 (1982).
- [26] Bau D.,Vernadakis A.: Effects of corticosterone on brain cholinergic enzymes in chick embryos. *Neurochem.Res.* 7: 821-829 (1982).
- [27] Ortí E.,Moses D.F.,Grillo C.,De Nicola A.F.: Glucocorticoid regulation of glycerol phosphate-dehydrogenase and ornithine decarboxylase activities in the spinal cord of the rat. *J. Neurochem.* 48: 425-431 (1987).
- [28] Hansson E.: Regulation of glutamine synthetase synthesis and activity by glucocorticoids and adrenoreceptor activation in astroglial cells. *Neurochem.Research.* 14: 585-587 (1989).
- [29] Autelitano D.J.,Lundblad J.R.,Blum M.,Roberts J.L.: Hormonal regulation of POMC gene expression. *Ann.Rev.Physiol.* 51: 715-726 (1989).

- [30] Levin P., Shinsako J., Dallonan M.F.: Corticosterone acts on the brain to inhibit. Adrenalectomy-induced adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology* 122: 694-201 (1988).
- [31] Magariños A. M.: Tesis Doctoral, Facultad de Bioquímica, U.E.A. (1988).
- [32] Ortí E.: Tesis Doctoral, F.C.E.y N., U.B.A. (1985).
- [33] Morrell T.D., Wolinsky M.S., Krieger M.S., Pfaff D.W.: Autoradiographic identification of steroid-concentrating cells in the spinal cord of the female rat. *Exp. Brain Res.* 45: 144-150 (1982).
- [34] Maclusky N.J., Clark C.R., Shenabrough M., Naftolin F.: Metabolism and binding of androgens in the spinal cord of the rat. *Brain Research* 422: 83-91 (1987).
- [35] Weill C.L.: Characterization of androgen receptors in embryonic chick spinal cord. *Develop. Brain Res.* 24:127-132 (1986).
- [36] Moses D.F., Ortí E., De Nicola A.F.: A comparison of the glucocorticoid receptors system in the spinal cord and hippocampus. *Brain Research* 408: 118-124 (1987).
- [37] Stansty F., Lisy V., Sedlacek J., Hajkova B.: The effect of cortisol on gamma-glutamyl transpeptidase activity in the glucogen body and lumbosacral segments of developing chick spinal cord. *Int. J. Devl. Neurosc.* 3: 19-22 (1985).
- [38] Hall E.D., Mc Ginley P.A.: Effects of a single intravenous glucocorticoid dose on biogenic amine levels in cat lumbar spinal cord. *J. Neurochem.* 39:1787-1790 (1982).
- [39] Riker W.F., Baker T., Sastre A.: Electrophysiologic and clinical aspects of glucocorticoids on certain neural systems. En: *Adrenal actions on brain.* Ganton, D. and Pfaff, D. Eds. (Springer-Verlag, Berlin), pp.:69 (1982).
- [40] Wikstrom A., Bakke O., Okret S., Bronnegard M., Gustafsson J-A.: Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization. *Endocrinology* 120: 1232-1242 (1987).

- [41] Tator C.H., Rivlin A.S., Lewis A.J., Schmoll B.: Effect of acute spinal cord injury on axonal counts in the pyramidal tract of the rat. *J. Neurosurg.* 61: 118-123 (1984).
- [42] Faden A.I., Jacobs T.P., Smith G.P., Green B., Zivin J.A.: Neuropeptides in spinal cord injury: comparative experimental models. *Peptides* 4: 631-634 (1983).
- [43] Hall E.D., Wolf D.L., Braughler J.M.: Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. *J. Neurosurg.* 60: 712-717 (1984).
- [44] Faden A.I., Jacobs T.P., Patrick D.M., Smith M.T.: Megadose corticosteroid therapy following experimental traumatic spinal injury. *J. Neurosurg.* 60: 712-717 (1984).
- [45] Borgens R.B., Blight A.R., Murphy D.J.: Axonal regeneration in spinal cord injury: a perspective and new technique. *J. Comp. Neurol.* 250: 157-167 (1986).
- [46] Braughler J.M.: Lipid peroxidation induced inhibition of gamma-amino butyric acid uptake in rat brain synaptosomes: protection by glucocorticoids. *J. Neurochem.* 44: 1282-1288 (1985).
- [47] Magariños A., Somoza G., De Nicola A.: Glucocorticoid negative feedback and glucocorticoid receptors after hippocampectomy in rats. *Horm. Metab. Res.* 19: 105-109 (1987).
- [48] Herman J.P., Schafer M.K.M., Young E.A., Thompson R., Duglass J., Akil H., Watson S.J.: Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J. Neurosc.* 9: 3072-3082 (1989).
- [49] Sapolsky R.M.: Glucocorticoids, hippocampal damage and the glutamatergic synapse. *Prog. Br. Res.* in press (1990).
- [50] Sapolsky R.M., Krey L.C., Mc Ewen B.S.: The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr. Rev.* 7: 284-301 (1986).

- [51] Delean M.J., Mc Rae T., Tsai J.R., George A.E., Marcos D.L., Freedman M., Wolf A., Mc Ewen B.S.: Abnormal cortisol response in Alzheimer's disease linked to hippocampal atrophy. *Lancet* Vol. II : 391-392 (1988).
- [52] Distelhorst C.W.: Recent insight into the structure and function of the glucocorticoid receptor. *J. Lab. Clin. Medicine* 113: 404-412 (1989).
- [53] Munck A., Brinck-Johnsen T.: Specific and non specific physiochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 243: 5556-5565 (1968).
- [54] Gustafsson J-A., Carlsted-Duke J., Poellinger L., Okret S., Wikstrom A., Bronnegard M., Gillner M., Dong Y., Fuxe K.: Biochemistry, molecular biology and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endoc. Rev.* 8: 185-234 (1987).
- [55] Ortí E., Mendel D.B., Smith L.I., Bodwell J.E., Munck A.: A dynamic model of glucocorticoid receptor phosphorylation and cycling in intact cells. *J. Steroid Biochem.*, in press (1990).
- [56] Carlsted-Duke J., Wrange O., Okret S., Gustafsson J-A.: The glucocorticoid receptor in rat liver. *Biochemical Pharm.* 33: 913-916 (1984).
- [57] Rories C., Spelsbery C.: Ovarian steroid action on gene expression: mechanisms and models. *Ann. Rev. Physiol.* 51: 653-681 (1989).
- [58] Harrison T.W., Fairfield S., Orth D.N.: Evidence for glucocorticoid transport through the target cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61: 1262 (1974).
- [59] Spencer R.L., Young E.H., Choo P., Mc Ewen B.S.: Adrenal steroid type I and type II receptor binding: estimates of *in vivo* receptor number, occupancy and activation with varying level of steroid. *Brain Research* 514: 37-48 (1990).
- [60] De Nicola A.F., Moses D.F., González S., Ortí E.: Adrenocorticoid action in the spinal cord: some unique molecular properties of glucocorticoid receptors. *Cell. Moll. Neurobiol.* 9: 179-192 (1989).

- [61] Coirini H., Magariños A.M., De Nicola A.F., Rainbow T.C., Mc Ewen B.S.: Further studies of brain aldosterone binding sites employing new mineralocorticoid and glucocorticoid receptors markers *in vitro*. *Brain Research* 361: 212-216 (1985).
- [62] Ortí E., Coirini H., De Nicola A.F.: Properties and distribution of glucocorticoid binding sites in cytosol of the spinal cord. *Neuroendocrinology* 40: 225-231 (1985).
- [63] Kovacs W.J., Griffin J.E., Wilson J.D.: Transformation of human androgen receptors to the deoxyribonucleic acid-binding-state. *Endocrinology* 113: 1574-1581 (1983).
- [64] Grady W.W., Schrader W.T., O'Malley B.W.: Activation, transformation and subunit structure of steroid hormone receptor. *Endoc. Rev.* 3: 141-163 (1982).
- [65] Miesfeld R.L.: The structure and function of steroid receptor proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Biology.* (1989)
- [66] Picard D., Yamamoto K.R.: Two signals mediate hormone dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6: 3333-3340 (1987).
- [67] Dingwall C., Laskey R.A.: Protein import into the cell nucleus. *Ann.Rev.Cell Biol.* 2: 367-390 (1986).
- [68] Lamb D.J., Kima P.E., Bullock D.W.: Occurrence of a 6S intermediate form of the progesterone receptor that is sensitive to ribonuclease. *Moll.Cell.Biochem.* 73: 77-84 (1987).
- [69] Liao S., Liang T., Tymoczko J.L. *Nature New Biology* 241: 211-213 (1973).
- [70] Ali M., Vedeckis W.V.: The glucocorticoid receptor protein binds to tRNA. *Science* 235: 467-470 (1987).
- [71] Firgaria F.A., Hendrich J.P., Kalousek F., Krans J.P., Rosenberg L.E.: RNA Required for import of precursor proteins into mitochondria. *Science* 226: 1319-1322 (1985).
- [72] Pratt W.B., Sanchez E.B., Bresnick E.M., Mesinchi S., Schener L.C., Dalmon F.C., Welsh M.J.: Interaction of the

- glucocorticoid receptor with the Mr 90.000 heat shock protein: an evolving model of ligand-mediated receptor transformation and traslocation. *Cancer Research (suppl.)* 49: 2222-2229 (1989).
- [73] Munck A., Mendel D.B., Smith L.I., Ortí E.: Glucocorticoid receptors and actions. En: *American Review of Resp. Deseases* (1990) in press.
- [74] Beato M.: Gene regulation by steroid hormone. *Cell* 56: 335-344 (1989).
- [75] Carlsted-Duke J., Sromsted P.E., Wrangé O., Bergman T., Gustafsson J-A., Jornvall H.: Domain structure of the glucocorticoid receptor protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 84: 4437-4440 (1987).
- [76] Miesfeld R., Rusconi S., Godowski P.J.: Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor DNA. *Cell* 46: 389-399 (1986).
- [77] Danielsen M., Northrop J.P., Rongold G.M.: The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing an expression of wild-type and mutant receptor proteins. *EMBO J.* 5: 2513-2522 (1986).
- [78] Gruol D.J., Wolfe K.A.: Transformed glucocorticoid receptor consist on multiple subspecies with differing capacities to bind DNA-cellulose. *Biochem.* 28: 2929-2936 (1989).
- [79] Bodwell I.E., Halbrook I.N., Munck A.: Evidence for distinct solfhydryl groups associated with steroid- and DNA-binding domains of rat thymus glucocorticoid receptor. *Biochem.* 23: 4237-4242 (1984).
- [80] Evans R.M.: Molecular characterization of the glucocorticoid receptor. *Rec. Prog. Horm. Res* 45: 1-27 (1989).
- [81] Berg J.M.: More metal-binding fingers. *Nature* 319: 264-265 (1986).
- [82] Colvarel D.S., Wilson E.M.: Zn potentiation of androgen receptor binding to nuclei *in vitro*. *Biochem.* 23: 3471-3478 (1984).

- [83] Sabbah M.,Redevilh G.,Secco C,Bauliew E.E.: The binding activity of estrogen receptor to DNA and heat shock protein 90 is dependent on receptor-bound metal. J.Biol.Chem. 262: 8631-8635 (1987).
- [84] Carson-Jurica W.T.,Schraer V.W.,O'Maley W.: Steroid hormone receptors. Endoc. Rev. 11: 201-220 (1990).
- [85] Burnstein K.L.,Cidlowski J.A.: Regulation of gene expression bu glucocorticoids. Ann.Rev.Physiol. 51: 683-699 (1989).
- [86] Vedeckis W.V.,Kovacic-Milovojevic,La Pointe M.C.,Reker C.E.: Alterations in mouse glucocorticoid receptors structure: Effects of various hydrolitic enzymes. En: Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action: Recent advances. Moudgil V.K. Ed.(Walter de Gruyter, New York),pp:23-32 (1985).
- [87] Rossini G.P.: Molybdate inhibits glucocorticoid receptor complex binding to RNA. Moll.Cell.Endocrinol. 49: 129-135 (1987).
- [88] Liang T.,Liao S.. J. Biol. Chem. 249:4671-4678 (1974).
- [89] Gambiagi N.,Pasqualini J.R.: RNA-induced transformation of the estrogen receptor detected by monoclonal antibody wich recognizes the activated receptor. Life Sciences 44: 2067-2074 (1989).
- [90] Moses D.F.,González S.,Ortí E.,De Nicola A.F.: Heterogeneity and properties of transformation of corticosteroid receptor in spinal cord and hippocampus. Brain Research 481: 317-324 (1989).
- [91] Schmidt T.J.,Banett C.A.,Litwack G.: Activation of the glucocorticoid receptor complex. J. Cell. Biochem. 20: 15-27 (1982).
- [92] Schmidt T.J.,Litwack G.: Activation of the glucocorticoid-receptor complex. Physiol. Review 62: 1131-1192 (1982).
- [93] Mousley P.R.,Grippio J.F.,Dahmer H.K.,Pratt W.B.: Inactivation, activation and stabilization of glucocorticoid receptors. En: Biochemical actions of hormones, vol. XI, pp.: 347-375 (1984).

- [94] Clark C.R., Maclusky N.J., Naftolin F.: Glucocorticoid receptors in the spinal cord. *Brain Res.* 217: 412-415 (1981).
- [95] Stumpf W.E., Sar M.: Steroid hormone target cells in the extrahypothalamic brain system and cervical spinal cord: neuroendocrine significance. *J. Steroid Biochem.* 11: 801-807 (1979).
- [96] Duncan C.E., Stumpf W.E.: Target neurons for (³H)-corticosterone in the rat spinal cord. *Brain Res.* 307: 321-326 (1984).
- [97] Birmingham M.K., Sar M., Stumpf W.E.: Localization of aldosterone and corticosterone in the central nervous system, assessed by quantitative autoradiography. *Neurochem. Res.* 9: 333-350 (1984).
- [98] Reul J.M.H.M., De Kloet E.R.: Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with *in vitro* autoradiography and computerized image analysis. *J. Steroid Biochem.* 24: 269-272 (1986).
- [99] Funder J., Feldman D., Edelman I.: The roles of plasma binding and receptor specificity in the mineralocorticoid action of aldosterone. *Endocrinology* 92: 994-1004 (1973).
- [100] Luttge W.G., Emadian S.M.: Further chemical differentiation of corticosteroid receptors in mouse brain cytosol: evidence for a new class of glucocorticoid receptors. *Brain Research* 453: 41-50 (1988).
- [101] Luttge W.G., Dauda M.M., Rupp M.E., Kary C.G.: High affinity binding and regulatory actions of dexamethasone-type I receptors complexes in mouse brain. *Endocrinology* 125: 1194-1203 (1989).
- [102] Moses D.F., González S., Mc Ewen B.S., De Nicola A.F.: Glucocorticoid type II receptors of spinal cord show lower affinity than hippocampal type II receptors: binding parameters obtained with different experimental protocols. *J. Steroid Biochem.* Enviado a publicación.
- [103] Evans R.M., Arriza J.L.: A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron* 2: 1105-1112 (1989).

- [104] Fregly M.S., Waters M.J.: Effects of mineralocorticoids on spontaneous sodium chloride appetite of adrenalectomized rats. *Physiol.Behav.* 1: 65-74 (1966).
- [105] Rundle S.E., Funder J.W., Lakshmi V., Monder C.: The intrarenal localization of mineralocorticoid receptors and 11- β dehydrogenase: immunocytochemical studies. *Endocrinology* 125: 1700-1704 (1989).
- [106] Stevens C.F.: La neurona. En: *El cerebro, libros de investigacion y ciencia*. Editorial Labor (Barcelona). pp.: 25-32 (1980).
- [107] Bowsler D.: *Introduccion a la anatomia y fisiologia del Sistema Nervioso*. Editorial EUDEBA, Bs. As. (1981).
- [108] Carpenter M.B.: *Neuroanatomia humana*. Editorial El Ateneo, Bs.As.(1978).
- [109] Iversen LL.: *Quimica del cerebro*. En: *El cerebro, libros de Investigacion y Ciencia*. Editorial Labor, Barcelona pp.: 85-96 (1980).
- [110] Hebel R., Stromberg M.W.: *Anatomy and embriology of the lab rat*. Editorial Biomed. Verlag (1986).
- [111] Guyton A.C.: *Textbook of medical physiology*. W.B.Saunders Ed., Philadelphia (1976).
- [112] Beraldo W.T.: *Fisiologia, vol.II-* Imprenta de UFMG, Belo Horizonte (1970).
- [113] Elliot-Smith G.: Some problems relating to the evolution of the brain. *Arris and Gale lectures. Lancet* 1:1-6, 147-153, 221-227 (1910).
- [114] Johnston J.B.: Further contributions to the study of the evolution of the brain. *J.Comp.Neurol.* 36: 143-192 (1923).
- [115] Pribram K.M., Kruger L.: Functions of the "olfactory brain". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 58: 109-138 (1954).
- [116] Deutsch J.A.: Higher nervous functions: the physiological basis of memory. *Ann.Rev.Physiol.* 24: 259-286 (1962).

- [117] Galambos R.,Morgan C.T.: The neural basis of learning. En: "Handbook of physiology: I- Neurophysiology", Field, J.; Magoun, M.; Hall, V.E. (Eds.) "Williams and Wilkins". Baltimore (1960), Vol.3, pp.: 1471-1499.
- [118] Fridman O.,Foglia V.G.,De Nicola A.F.: Reduction in (³H)-corticosterone binding to cytoplasmic receptor in the brain of diabetic rats. J.Steroid Biochem. 9: 609-614 (1978).
- [119] Tornello S.,Fridman O.,Weisenberg L.,Coirini H.,De Nicola A.F.: Differences in corticosterone binding by regions of the central nervous system in normal and diabetic rats. J.Steroid Biochem. 14: 77-81 (1981).
- [120] Tornello S.,Coirini H.,De Nicola A.F.: Effects of experimental diabetes on the concentration of corticosterone in central nervous system, serum and adrenal glands. J.Steroid Biochem. 14: 1279-1284 (1981).
- [121] Tornello S.,Ortí E.,De Nicola A.F.,Rainbow T.C.,Mc Ewen B.S.: Regulation of glucocorticoid receptors in brain by corticosterone treatment of adrenalectomized rats. Neuroendocrinology 35: 411-417 (1982).
- [122] Mc Ewen B.S.: Glucocorticoids and hippocampus: receptors in search of a function. En: D.Ganter and D.Pfaff (Eds.). Current topics in neuroendocrinology: adrenal action on brain. Springer-Verlag, Berlín, pp.: 1-22 (1988).
- [123] Mc Ewen B.S.,Biegon A.,Davis P.G.,Krey L.C.,Luine V.N.,Mc Ginnis M.Y.Pader C.M.,Parsons B.,Rainbow T.C.: Steroid hormones: humoral signals wich alter brain cell properties and functions. Rec.Progr.Horm.Res. 38: 41-83 (1982).
- [124] Ortí E.,Tornello S.,De Nicola A.F.: Dynamic aspects of glucocorticoid receptors in the spinal cord of the rat. J.Neurochem. 45: 1699-1707 (1985).
- [125] Ortí E.,Magariños A.M.,De Nicola A.F.: Evidence of high affinity, stereoselective binding sites for (³H)-aldosterone in the spinal cord. Neuroendocrinology 43: 404-409 (1986).

- [126] Meyer J.S.,Leveille P.J.,De Vellis J.,Gerlach J.L.,Mc Ewen B.S.: Evidence for glucocorticoid target cells in the rat optic nerve. Hormonal binding and glycerol phosphate dehydrogenase induction. *J.Neurochem.* 39: 423-434 (1982).
- [127] Dahmer M.K.,Mousley P.R.,Pratt W.B.: Effects of molybdate and endogenous inhibitors on steroid-receptor inactivation, transformation and translocation. *Ann.Rev.Physiol.* 46: 67-81 (1984).
- [128] Densomore C.L.,Luttge W.G.,Emadian S.M.: Interaction of nucleic acids with unoccupied glucocorticoid receptors in brain cytosol: effects on thermal stability. *IRCS Med. Sc.* 12: 709-710 (1984).
- [129] Economidis I.V.,Rousseau G.G.: Association of the glucocorticoid hormone receptor with ribonucleic acid. *FEBS* 181: 47-52 (1985).
- [130] Feldman M.,Kallos J.,Holander V.P.: RNA inhibits estrogen receptor binding to DNA. *J.Biol.Chem.* 256: 1145-1148 (1981).
- [131] Hutches T.W.,Markland F.S.,Hawkins E.F.: RNA induced reversal of glucocorticoid receptor activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*105: 20-27 (1982).
- [132] Rossini G.P.: RNase effects on sedimentation dexamethasone-receptor complexes from HeLa cell cytosol. *J.Steroid Biochem.* 22: 47-56 (1985).
- [133] Rossini G.P.,Barbiroli B.: RNase-sensitive glucocorticoid receptor complexes from Hela cell nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 113: 876-882 (1983).
- [134] Coirini H.: Tesis doctoral, F.C.E.y N., U.B.A. (1984).
- [135] Mc Ewen B.S.,Zigmond R.E.: Isolation of brain cell nuclei. En: N.Marks y R.Rodnight (Eds.) *Research methods in neurochemistry, Vol.1.* Plenum Press New York pp:140-161 (1972).
- [136] Burton K.: A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem.J.* 62: 315-323 (1956).

- [137] Ginsburg M., Greenstein B.D., Maclusky N.J., Morris I.D., Thomas P.J.: An improved method for the study of high affinity steroid binding: Oestradiol binding in brain and pituitary. *Steroids* 23: 773-792 (1974).
- [138] Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).
- [139] Liu S.L.H., Webb T.E.: Elevated concentration of a dexamethasone-receptor-translocation inhibitor in novikoff hepatoma cells. *Cancer Res.* 37: 1763-1777 (1977).
- [140] Le Fevre B., Bailly A., Sallas N., Milgrom E.: Activated steroid-receptor complex comparison of assay using DNA-cellulose or homologous nuclei. *Biochem. Biophys. Acta* 585: 266-272 (1979).
- [141] Munck A., Wira C., Young D.A., Mosher K.M., Kallahan C., Bell P.A.: The action of glucocorticoids on thymus cells. *J. Steroid Biochem.* 3: 567-578 (1972).
- [142] Dahmer M.K., Tienrungroj W., Pratt W.B.: Purification and preliminary characterization of a macromolecular inhibitor of glucocorticoid receptor binding to DNA. *J. Biol. Chem.* 260: 7705-7715 (1985).
- [143] Chong M.T., Lippman M.E.: Effects of RNA and ribonuclease on the binding of estrogen and glucocorticoid receptors from MCF-7 cells to DNA-cellulose. *J. Biol. Chem.* 257: 2996-3002 (1982).
- [144] Tymoczko J.L., Phillips M.M.: The effects of ribonuclease on rat given dexamethasone receptor: increased affinity for deoxyribonucleic acid and altered sedimentation profile. *Endocrinology* 112: 142-149 (1983).
- [145] Anderson E.E., Tymoczko J.L.: Stabilization of glucocorticoid receptor association with RNA by a low molecular weight factor from rat liver cytosol. *J. Steroid Biochem.* 23: 299-306 (1985).
- [146] Tymoczko J.L., Lee J.M.: Chymotrypsin treatment of glucocorticoid receptor attenuates RNA-dependent inhibition of DNA-binding. Evidence for a distinct RNA-binding site. *Biochem. Biophys. Acta* 846: 193-199 (1985).

- [147] Tymoczko J.L., Shapiro J., Simenstad D.J., Nish A.D.: The effects of polyribonucleotides on the binding of dexamethasone-receptor complex to DNA. *J.Steroid.Biochem.* 16: 595-598 (1982).
- [148] Sheridan P.J.: Androgen receptors in the brain: what are we measuring?. *Endocrine Rev.* 4: 171-178 (1983).
- [149] Emadian S.M., Luttge W.G., Densmore C.L.: Chemical differentiation of type I and type II receptors for adrenal steroids in brain cytosol. *J.Steroid Biochem.* 24: 953-961 (1986).
- [150] Veldhuis H.D., Van Kopper C., Van Ittersum M., De Kloet E.R.: Specificity of adrenal steroid receptor system in rat hippocampus. *Endocrinology* 110: 2044-2051 (1982).
- [151] Reul J.H., Van Den Bosch F.R., De Kloet E.R.: Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to change in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 45: 407-412 (1987).
- [152] Philibert D., Moguilewsky M.: RU-28362, a useful tool for the characterization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *The Endocr. Soc. 65th Ann. Meet Abstract* 1018 (1983).
- [153] Torelli V., Hardy M., Nedelec L., Tourmine C., Deraedt R., Philibert D.: 7 α -alkyl steroidal spirolactones as potent aldosterone antagonists. *Comunicación de Roussel Uclaf* (1983).
- [154] De Kloet E.R., Reul J.M.H.M., De Ronde F.S.W., Bloemers M., Ratka A.: Function and plasticity of brain corticosteroid receptor systems: action of neuropeptides. *J.Steroid Biochem.* 25: 723-731 (1986).
- [155] Beamont K., Fanestil D.D.: Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. *Endocrinology* 113: 2043-2051 (1983).
- [156] De Kloet E.R., Veldhuis H.D., Wagenaaais J.L., Bergink E.W.: Relative binding affinity of steroids for the corticosterone receptor system in the rat hippocampus. *J.Steroid Biochem.* 21: 173-178 (1984).

- [157] Rodbard D., Munson P.J., Thakur A.K.: Quantitative characterization of hormone receptors. *Cancer* 46: 2502-2511 (1980).
- [158] Cressie N.A.C., Keightley D.D.: The underlying structure of the direct linear plot with applications to the analysis of hormone receptor interactions. *J. Steroid Biochem.* 11: 1173-1180 (1979).
- [159] Gehring U., Hotz A.: Photoaffinity labeling and partial proteolysis of wild-type and variant glucocorticoid receptor. *Biochemistry* 22: 4013-4018 (1983).
- [160] Scatchard G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660-672 (1949).
- [161] Lutge W.G., Kong C.G., Rupp M.E., Emadian S.M.: Treatment of mouse brain cytosol with DCC and high salt does not reveal a new glucocorticoid binder. *Brain Research* 493: 190-193 (1989).
- [162] Lar N.C., Kwin N., Nguyer T., Weisz A., Birnbaum M.J., Eberhardt N.L., Baxter J.D.: Mechanism of glucocorticoid hormone action. *J. Steroid Biochem.* 20: 77-88 (1984).
- [163] Sanchez E.R., Toft D.O., Schlesinger M.J., Pratt W.B.: Evidence that the 90 KDa phosphoprotein associated with the untransformed L cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 260: 12398-1240 (1985).
- [164] Gehring U., Segnitz B.: Modulation of DNA binding of glucocorticoid receptors. *Moll. Cell. Endocrinol.* 56: 245-254 (1988).
- [165] Magariños A.M., Ferrini M., De Nicola A.F.: Corticosteroid receptors and glucocorticoid content in microdissected brain regions: correlative aspects. *Neuroendocrinology* 50: 673-678 (1989).
- [166] De Kloet E.R., Wallach G., Mc Ewen B.S.: Differences in corticosterone and dexamethasone binding to rat brain and pituitary. *Endocrinology* 96: 598-609 (1975).

- [167] Brinton R.E., Mc Ewen B.S.: Regional distinctions in the regulation of type I and type II adrenal steroid receptors in the central nervous system. *Neurosc. Res. Comm.* 2: 37-45 (1988).
- [168] Luttge W.G., Rupp M.E., Dauda M.M.: Aldosterone-stimulated down-regulation of both type I and type II adrenocorticosteroid receptors in mouse brain is mediated via type I receptors. *Endocrinology* 125: 817-824 (1989).
- [169] Allen B.D., Sutano W., Jones M.T.: A correlative study of RU 38486 biopotency and competition with (³H)- dexamethasone for receptors in the rat central nervous system. *J. Steroid Biochem.* 30: 411-415 (1988).
- [170] Burgisser E.: Radioligand-receptor binding studies: what's wrong with the Scatchard analysis?. *Trends Pharmacol. Sci.* : 142-144 (1984).
- [171] Lanfield P., Waymire J., Lynch G.: Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlation. *Science* 214: 581-584 (1978).
- [172] Hall E.D., Braughler T.: Acute effects of intravenous glucocorticoid pretreatment on the *in vitro* peroxidation of cat spinal cord tissue. *Exp. Neurol.* 73: 321-324 (1981).
- [173] Demopoulos H.B., Famm E.S., Seligman M.L., Pietronigro D.D., Tomasula J., De Crescito V.: Further studies on free radical pathology in the major central nervous system disorders: effect of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology and chemistry of experimental cord. *J. Physiol. Pharmacol* 60: 1415-1424 (1982).
- [174] Young W., Flamm E.D.: Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. *J. Neurosurg.* 57: 667-673 (1982).
- [175] Trotter J.L., Garvey W.F.: Prolonged effects of large-dose methylprednisolone infusion in multiple sclerosis. *Neurology* 30: 702-708 (1980).

- [176] Hutchens T.W., Markland F.S., Hawkins E.F.: Physicochemical analysis of reversible molybdate effects on different molecular forms of glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 103: 60-67 (1981).
- [177] Do Y.L., Loose D.S., Feldman D.: Heterogeneity of glucocorticoid binders: a unique and a classical dexamethasone binding sites in bovine tissues. *Endocrinology* 105: 1055-1063 (1979).
- [178] Kaufmann S.H., Shaper J.H.: Binding of dexamethasone to rat liver nuclei in vivo and *in vitro*. Evidence for two distinct binding sites. *J. Steroid. Biochem.* 20: 699-708 (1984).
- [179] Currie R.A., Cidlowsky J.A.: Identification of modified forms of human glucocorticoid receptors during the cell cycle. *Endocrinology* 110: 2192-2194 (1982).
- [180] Denis M., Poellinger L., Wikstrom A-C., Gustafsson J-A.: Requirement of hormone for thermal conversion of the glucocorticoid receptor to a DNA-binding state. *Nature* 333: 686-688 (1988).
- [181] Umesono K., Evans R.M.: Determinants of target gene specificity for steroid thyroid hormone receptors. *Cell* 57: 1139-1146 (1989).
- [182] Denison M.S., Deal R.M.: The binding of transformed aromatic hydrocarbon (Ah) receptor to its DNA recognition site is not affected by metal depletion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 69: 51-57 (1990).
- [183] Mesinchi S., Pratt W.B.: Evidence that removal of an endogenous metal that stabilizes the untransformed glucocorticoid-receptor in cytosol allows ligand independent receptor transformation. *J. Steroid Biochem* 34: 315-317 (1989).
- [184] Schmidt T.J., Sekula B.C., Litwack G.: The effects of 1,10 o-fenantroline on the binding of activated rat hepatic glucocorticoid-receptor complexes to DNA-cellulose. *Endocrinology* 109: 803-812 (1981).

- [185] De Nicola A.F., Ortí E., Moses D.F., Magariños A.M., Coirini H.: Functions and disfunctions of receptors for adrenal corticoids in the Central Nervous System. J. Steroid Biochem. 27: 599-607 (1987).
- [186] Gehring U.: Genetics of glucocorticoid receptors. Moll. Cell. Endocrinol. 48: 89-96 (1986).

TRABAJOS PUBLICADOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS

- Moses D.F., Ortí E., De Nicola A.F.: A comparison of the glucocorticoid receptor system in the spinal cord and hippocampus. Brain Research, **408**: 118-124, 1987.
- Moses D.F., González S., Ortí E., De Nicola A.F.: Heterogeneity and properties of transformation of corticosteroid receptors in spinal cord and hippocampus. Brain Research, **481**: 317-324, 1989.
- Moses D.F., González S., Mc Ewen B.S., De Nicola A.F.: Glucocorticoid type II receptors of spinal cord show lower affinity than hippocampal type II receptors: binding parameters obtained with different experimental protocols. J. Steroid Biochem. ~~Enviado a publicación.~~

En Prensa