

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS



TESIS DOCTORAL

**LUGAR DE UNIÓN PARA ESTANOZOLOL (LUES)
EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO HEPÁTICO:
CARACTERIZACIÓN COMO PROTEÍNA OLIGOMÉRICA
INDUCIDA POR ESTRÓGENOS**

OCTAVIO LUIS PÉREZ LUZARDO

Las Palmas de Gran Canaria, 1999

X

7/1999-00

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Las Palmas de Gran Canaria, a 16 de noviembre de 1999.

El/a Presidente/a: Dr.D. Bonifacio Nicolás Díaz Chico,

El/a Secretario/a: Dr. D. Ricardo Chirino Godoy,

El/a Vocal: Dr.D. Arturo Anadón Navarro.

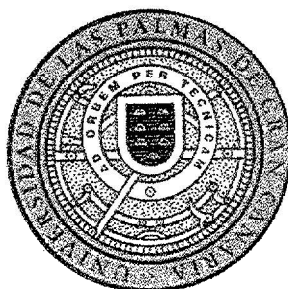
El/a Vocal: Dr.D. Amilcar Flores Morales,

El/a Vocal: Dra. Dña. Pilar Carrero Macías,

El Doctorando: D. Octavio Luis Pérez Luzardo,

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO:
FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA



**LUGAR DE UNIÓN PARA ESTANZOLOL (LUES)
EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO HEPÁTICO:
CARACTERIZACIÓN COMO PROTEÍNA OLIGOMÉRICA
INDUCIDA POR ESTRÓGENOS**

Memoria que para optar al grado de Doctor
en Veterinaria presenta el Licenciado

OCTAVIO LUIS PÉREZ LUZARDO

Director
Dr. Leandro Fernández Pérez
Profesor Titular de Farmacología de la U.L.P.G.C.

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, 1999

D. LEANDRO FERNÁNDEZ PÉREZ, PROFESOR TITULAR DE FARMACOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS, CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“LUGAR DE UNIÓN PARA ESTANOZOLOL (LUES) EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO HEPÁTICO: CARACTERIZACIÓN COMO PROTEÍNA OLIGOMÉRICA INDUCIDA POR ESTRÓGENOS ”**, ha sido realizado por **D. OCTAVIO L. PÉREZ LUZARDO**, en los Departamentos de Ciencias Clínicas y de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, bajo su dirección y asesoramiento técnico, y que una vez revisada la presente Memoria la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a uno de septiembre de mil novecientos noventa y nueve.

Fdo: Leandro Fernández Pérez

FINANCIACIÓN

Ha sido posible realizar el trabajo de esta Tesis Doctoral gracias a la financiación concedida por:

- I. Gobierno Autónomo de Canarias. Beca de Posgrado para Realización de Tesis Doctorales. Convocatoria 1993/1994. Resolución de 29 de Octubre (BOC nº 154 de 6 de Diciembre de 1993).
- II. Beca de Posgrado, Fundación Universitaria de Las Palmas. Convocatoria 1995/1996, concedida por la FAMILIA MEGÍAS.
- III. Beca de Posgrado, Fundación Universitaria de Las Palmas. Convocatoria 1998/1999, concedida por CLÍNICA SAN ROQUE.
- IV. Gobierno Autónomo de Canarias. Consejería de Economía y Hacienda. Resolución B.O.C. nº 90, de 26 de Julio de 1996.
Investigador principal: Bonifacio N. Díaz Chico.
- V. Gobierno Autónomo de Canarias. Dirección General de Universidades e Investigación. Proyecto PI1998/074.
Investigador principal: Leandro Fernández Pérez.

REFERENCIAS PRINCIPALES

Esta Tesis está basada en los siguientes trabajos:

- I. Fernández L, Boada LD, **Luzardo OP**, Zumbado M, Díaz-Chico JC, Díaz-Chico BN, Chirino R. Ethinylestradiol interacts with liver microsomes and induces binding sites for steroid hormones in the male rat liver. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 270 (3): 1121-1126, 1994.
- II. Boada LD, Fernández, Zumbado M, **Luzardo OP**, Chirino R, Díaz-Chico BN. Identification of a specific binding site for the anabolic steroid stanozolol in male rat liver microsomes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 279 (3): 1123-1129, 1996.
- III. **Luzardo OP**, Machín RP, Díaz-Chico BN, Fernández L. Ethinylestradiol induction of the oligomeric [³h]stanozolol binding protein from the male rat liver endoplasmic reticulum. **Enviado a Mol. Pharmacol.** (1999)

A Marimar
A mis Padres
A Matilde

100

100

100

100

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En la elaboración de esta Tesis Doctoral han colaborado muchas personas. Quisiera, con estas líneas, dar testimonio de mi más sincero agradecimiento a todas ellas:

Así debo, en primer lugar, tener un especial reconocimiento para el Director de la Tesis, el Dr. Leandro Fernández Pérez por su dedicación y generosidad en el esfuerzo, por haberme enseñado a investigar con seriedad y rigor científico, y por su empeño constante en que este trabajo tuviera la mayor calidad posible.

Al Dr. Bonifacio N. Díaz Chico, maestro y también amigo, debo agradecerle la confianza ciega que, ya desde la época de estudiante, siempre depositó en mi. También el haber puesto a mi disposición su laboratorio y todos los medios a su alcance para el desarrollo de este trabajo. Ha sabido aconsejarme científica y humanamente siempre que lo he necesitado. Pero sobre todo quiero agradecerle el que, por su talante, haya sido siempre un autentico “motor” para todos los que trabajamos con él.

Al Dr. Ricardo Chirino Godoy por ser el “padre adoptivo” del LUBAG, gracias a cuyo esfuerzo esta línea de investigación tomó impulso y se consolidó, llegando a ocupar un lugar de privilegio dentro de las líneas de investigación que se desarrollan en nuestro laboratorio.

A mis compañeros de la asignatura de Toxicología, Dres. Luis Domínguez Boada y Manuel Zumbado Peña, con quienes me inicié, trabajando codo con codo en el laboratorio, realizando con ellos la ingente cantidad de experimentos que supusieron los “cimientos” de esta Tesis. Con ellos comparto además los avatares diarios de la docencia, y les agradezco que me hayan liberado de bastantes responsabilidades para que pudiera dedicarle tiempo al laboratorio y preparación de este manuscrito. A Manolo debo agradecerle además, el haberme convertido en una persona infinitamente más ordenada y metódica de lo que era (pero aún infinitamente menos de lo que lo es él).

A D. Rubén Pérez Machín, que ha colaborado estrechamente conmigo en la puesta a punto de muchas de las técnicas. Auténtico inventor de artilugios que le ha dedicado a este trabajo muchísimas horas. A D. Ciro Negrín Martínez, infatigable viajero, inagotable fuente de información y buen humor que ha hecho que lo pasáramos muy bien tanto trabajando en el laboratorio, como compartiendo despacho y “ratitos” de ocio en la cafetería.

A mis compañeros de laboratorio Dr. Juan Carlos Díaz Chico, D. Juan Rivero Báez, Dr. Domingo Navarro Bosch, Dr. Antonio López Guerra, Dra. Pilar Fernández Valerón, Dr. José Juan Pestano Brito, Dr. Santiago Torres Curbelo, D^a Pilar Díaz Viera, D^a Patricia Pérez Jiménez, y D^a Cristina Bilbao Sieiro porque han hecho que ir todos los días a trabajar se

convirtiera en un auténtico placer. Todos ellos son, en una u otra forma, partícipes de este trabajo.

A mis compañeros de la Unidad de Farmacología, Dr. Isidoro del Río Lozano, Dra. Pilar Fressen Cansino, Dr. Juan Francisco Loro Ferrer, Dr. Javier Cabrera Oliva, Dr. Félix López Blanco y D. Félix Cabrera Franquiz.

A los responsables del bioterio del Centro de Ciencias de la Salud, D. Antonio Lleó y D. Martín González. A D^a África Jiménez y D^a Carmen Ojeda por la ayuda que me prestaron en la manufactura del texto. A D. Francisco Fumagallo, bibliotecario del Centro de Ciencias de la Salud, por su diligencia y buena disposición para facilitar el acceso, no siempre fácil, a gran parte de la bibliografía necesaria para la elaboración de este trabajo. Al Dr. Germán Gallardo por sus “consejillos” informáticos y por las magníficas ideas que me ha dado para la edición de este volumen.

A mis padres porque a ellos les debo lo que soy, y como soy. Con ellos mantendré una eterna deuda de gratitud.

A mi hermano José Manuel le agradezco muchas cosas, pero en particular, en los últimos tiempos, que me haya regalado su trabajo y saber hacer, así como que aguante estoicamente mis constantes llamadas telefónicas para darle la “paliza” con los asuntos de mi casa. Al resto de mi familia y familia política debo agradecerles el haber estado ahí, apoyándome y animándome siempre. Son unas personas maravillosas y por ellas me siento afortunado.

Por último debo decir que es difícil encontrar las palabras para agradecerle a quien siempre ha estado a mi lado. A M^a del Mar Travieso Aja, mi esposa, pero sobre todo el mejor de mis amigos, le debo este trabajo. A ella se lo dedico. Ella me ha dedicado su vida.

ÍNDICES

	<u>Página</u>
ÍNDICE DE MATERIAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	12
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN - SUMMARY	17
I. INTRODUCCIÓN	21
I.1. ESTEROIDES ANABOLIZANTES (EAA)	21
I.1.1. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS	22
I.1.1.1. Estructura química	22
I.1.1.2. Farmacocinética	23
I.1.1.3. Farmacodinamia	24
I.1.2. USOS DE LOS EAA	24
I.1.2.1. Osteoporosis	24
I.1.2.2. Desórdenes hematopoyéticos	24
I.1.2.3. Edema angioneurótico hereditario	25
I.1.2.4. Coagulación, fibrinólisis, hemofilia	25
I.1.2.5. Alteraciones del crecimiento	25
I.1.2.6. Abuso de los EAA: dopaje	26
I.1.3. EFECTOS ADVERSOS DEL USO DE EAA	27
I.1.3.1. Efectos virilizantes y feminizantes	27
I.1.3.2. Alteraciones endocrinas y de la reproducción	28
I.1.3.3. Alteraciones cardiovasculares	28
I.1.3.4. Alteraciones psíquicas	29
I.1.3.5. Alteraciones respiratorias	29
I.1.3.6. Alteraciones músculo-esqueléticas	29
I.1.3.7. Toxicidad hepática	30
I.2. MECANISMO DE ACCIÓN GENÓMICO DE LAS HORMONAS	
ESTEROIDES	31
I.2.1. DOMINIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES INTRACELULARES PARA HORMONAS ESTEROIDES	31
I.2.2. INTERACCIÓN HORMONA-RECEPTOR	34
I.2.2.1. El receptor en estado inactivo	34

I.2.2.2.	Cambio conformacional del receptor	35
I.2.3.	INTERACCIÓN RECEPTOR-GENOMA (ELEMENTOS DE RESPUESTA HORMONAL)	37
I.2.4.	REGULACIÓN HORMONAL DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA ..	37
I.3.	EFFECTOS NO GENÓMICOS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES	39
I.3.1.	NEUROESTEROIDES	40
I.3.2.	MINERALCORTICOIDES	40
I.3.3.	GLUCOCORTICOIDES	41
I.3.4.	ESTRÓGENOS	41
I.3.5.	PROGESTERONA	42
I.3.6.	ANDRÓGENOS	44
I.3.7.	VITAMINA D ₃ Y T ₃	44
I.4.	LUGARES DE UNIÓN MEMBRANALES PARA HORMONAS ESTEROIDES	46
I.4.1.	ESTRÓGENOS	47
I.4.2.	ANTIESTRÓGENOS (AEBS)	48
I.4.3.	PROGESTERONA	49
I.4.4.	VITAMINA D ₃	50
I.4.5.	TRİYODOTIRONINA (T ₃)	51
I.4.6.	MINERALCORTICOIDES	51
I.4.7.	GLUCOCORTICOIDES	52
I.5.	EL LUGAR DE UNIÓN DE BAJA AFINIDAD PARA GLUCOCORTICOIDES (LUBAG)	53
I.5.1.	REGULACIÓN ENDOCRINA DEL LUBAG	54
I.5.2.	PERFIL FARMACOLÓGICO	55
I.5.3.	INTERACCIÓN DEL ESTANOZOLOL CON EL LUBAG <i>IN VITRO</i> ..	56
I.5.4.	INTERACCIÓN DEL ESTANOZOLOL CON EL LUBAG <i>IN VIVO</i> ..	57
II.	OBJETIVOS	61
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	65
III.1.	ANIMALES	65
III.1.1	CONDICIONES GENERALES	65
III.1.2.	ANESTESIA	65
III.1.3.	MODELOS ENDOCRINOS	65
III.1.4.	ADMINISTRACIÓN DE DROGAS	66
III.2.	REACTIVOS	67

III.3.	PREPARACIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE HÍGADO	67
III.3.1.	OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES MICROSMAL Y CITOSÓLICA	67
III.3.2.	OBTENCIÓN DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO LISO Y RUGOSO	68
III.3.3.	OBTENCIÓN DE MEMBRANA PLASMÁTICA	69
III.3.4.	OBTENCIÓN DE NÚCLEOS PURIFICADOS	70
III.3.5.	OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN MITOCONDRIAS, PEROXISOMAS Y LISOSOMAS	71
III.3.6.	MARCADORES ENZIMÁTICOS DE FRACCIÓN CELULAR	71
III.3.6.1.	NADPH citocromo c reductasa (REL y RER)	72
III.3.6.2.	5'-Nucleotidasa (membrana plasmática)	72
III.4.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	72
III.5.	ENSAYOS DE INTERCAMBIO CON LIGANDO RADIOACTIVO	72
III.5.1.	ENSAYOS REALIZADOS EN CONDICIONES DE EQUILIBRIO ...	73
III.5.1.1.	Curvas de saturación	73
III.5.1.2.	Curvas de competición	73
III.5.2.	ENSAYOS REALIZADOS EN CONDICIONES DE NO-EQUILIBRIO: ESTUDIOS CINÉTICOS	74
III.5.2.1.	Cinética de asociación	74
III.5.2.2.	Cinética de disociación	74
III.5.3.	INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS DE LOS ENSAYOS DE INTERCAMBIO CON LIGANDO RADIOACTIVO	75
III.5.3.1.	Fijación de la hormona con alta afinidad y baja capacidad	75
III.5.3.2.	Especificidad de la unión de la hormona	79
III.5.4.	ANÁLISIS MATEMÁTICO DE LOS PARÁMETROS DE UNIÓN DEL RADIOLIGANDO	80
III.5.4.1.	EBDA Y LIGAND	80
III.5.4.2.	KINETIC	80
III.6.	TRATAMIENTO CON ENZIMAS	81
III.6.1.	PROTEASAS	81
III.6.2.	GLUCOSIDASAS	81
III.6.3.	FOSFOLIPASAS	82
III.7.	TOPOLOGÍA DEL LUES	82
III.7.1.	TRATAMIENTO DE LOS MICROSMAS CON KCl.....	83

III.7.2.	PARTICIÓN DE FASES EN SOLUCIÓN DE TRITÓN X-114	83
III.8.	TRATAMIENTO CON REACTIVOS QUE ACTÚAN SOBRE LOS GRUPOS SULHIDRILO	83
III.8.1.	COINCUBACIÓN	85
III.8.2.	PREINCUBACIÓN	85
III.8.3.	INCUBACIÓN POST-EQUILIBRIO	85
III.9.	SOLUBILIZACIÓN	85
III.9.1.	SELECCIÓN DEL DETERGENTE	85
III.9.2.	SOLUBILIZACIÓN	87
III.10.	PROPIEDADES HIDRODINÁMICAS DEL LUES	87
III.10.1.	CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	88
III.10.2.	ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE LINEAL DE SACAROSA	89
III.10.3.	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS HIDRODINÁMICOS DEL LUES	89
III.11.	CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	90
III.11.1.	SELECCIÓN DEL pH INICIAL	91
III.11.2.	ELECCIÓN DE LA FUERZA IÓNICA DEL TAMPÓN DE ELUCIÓN	92
III.11.3.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	93
III.11.4.	CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	93
III.12.	MARCAJE DE FOTOAFINIDAD DEL [³H]ES UNIDO A LAS PROTEÍNAS SOLUBILIZADAS	93
III.13.	ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	95
III.14.	ESTUDIO ESTADÍSTICO	95
III.15.	REPRESENTACIÓN GRÁFICA	95
IV.	RESULTADOS	99
IV.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE [³H]ES A LOS MICROSOMAS DE HÍGADO DE RATA	99
IV.1.1.	CURVA DE SATURACIÓN DE LA UNIÓN DE [³ H]ES A LOS MICROSOMAS	99
IV.1.2.	CINÉTICA DE ASOCIACIÓN DEL [³ H]ES A LOS MICROSOMAS	102
IV.1.3.	CINÉTICA DE DISOCIACIÓN DEL [³ H]ES DE LOS MICROSOMAS	103

IV.1.4.	ESPECIFICIDAD DE LA UNIÓN DEL [³ H]ES A LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS	104
IV.2.	DISTRIBUCIÓN TISULAR Y SUBCELULAR DEL LUES	107
IV.2.1.	DISTRIBUCIÓN TISULAR DEL LUES	107
IV.2.2.	DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DEL LUES	108
IV.3	DEMOSTRACIÓN DE LA NATURALEZA PROTEICA DEL LUES	110
IV.3.1.	TRATAMIENTO DE LOS MICROSOMAS CON PROTEASAS	110
IV.3.2.	TRATAMIENTO DE LOS MICROSOMAS CON GLUCOSIDASAS	112
IV.3.3.	TRATAMIENTO DE LOS MICROSOMAS CON FOSFOLIPASAS	112
IV.4.	TOPOLOGÍA DEL LUES	114
IV.4.1.	DISRUPCIÓN DE LAS INTERACCIONES HIDROFÍLICAS Y ELECTROSTÁTICAS DE LAS PROTEÍNAS CON LA BICAPA LIPÍDICA	114
IV.4.2.	PARTICIÓN DE FASES CON TRITÓN X-114	114
IV.5.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH SOBRE LA ESTABILIDAD DEL LUES	118
IV.5.1.	ESTABILIDAD TÉRMICA DEL LUES	118
IV.5.2.	ESTABILIDAD DEL LUES A CAMBIOS DE pH	120
IV.6.	PAPEL DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO Y PUENTES DISULFURO EN LA FIJACIÓN ESPECÍFICA DE [³H]ES AL LUES	121
IV.6.1.	EFFECTOS DE LOS AGENTES MODIFICADORES DE GRUPOS SULFHIDRILO MMTS Y NEM	122
IV.6.2.	EFFECTO DE MMTS Y NEM SOBRE EL COMPLEJO [³ H]ES-LUES	123
IV.6.3.	EFFECTO DE AGENTES REDUCTORES	124
IV.7.	SOLUBILIZACIÓN DEL LUES	126
IV.7.1.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CHAPS Y TX100 SOBRE LA SOLUBILIZACIÓN DEL LUES	126
IV.7.2.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE PROTEÍNAS MICROSOMALES EN LA SOLUBILIZACIÓN DE LUES	128
IV.7.3.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA SOBRE LA UNIÓN DEL [³ H]ES A LAS PROTEÍNAS SOLUBILIZADAS	129
IV.7.4.	ESTABILIDAD DEL LUES SOLUBILIZADO	130
IV.8.	CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA UNIÓN DEL [³H]ES AL LUES SOLUBILIZADO	131

IV.8.1.	CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN DEL [³ H]ES CON EL LUES SOLUBILIZADO	131
IV.8.1.1.	Cinética de asociación	131
IV.8.1.2.	Cinética de disociación	132
IV.8.2.	CURVA DE SATURACIÓN Y ANÁLISIS DE SCATCHARD	133
IV.8.3.	ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD DE LA UNIÓN DEL [³ H]ES AL LUES SOLUBILIZADO	135
IV.9.	PROPIEDADES HIDRODINÁMICAS DEL LUES	136
IV.9.1.	CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	137
IV.9.2.	ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE LINEAL DE SACAROSA	139
IV.10.	CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	145
IV.11.	MARCAJE DE FOTOAFINIDAD Y SDS-PAGE DEL LUES	147
IV.11.1.	MARCAJE DE FOTOAFINIDAD	147
IV.11.2.	SDS-PAGE	148
IV.12.	REGULACIÓN HORMONAL DEL LUES	150
IV.12.1.	ONTOGENIA DEL LUES	151
IV.12.2.	LA HIPOFISECTOMÍA DISMINUYE DRÁSTICAMENTE LA CONCENTRACIÓN DE LUES EN LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS	152
IV.12.3.	LA ORQUIDECTOMÍA NO ALTERA LOS NIVELES DE LUES EN MICROSOMAS HEPÁTICOS	153
IV.12.4.	LOS GLUCOCORTICOIDES REGULAN LOS NIVELES DE LUES	154
IV.12.5.	EL HIPOTIROIDISMO NO MODIFICA EL NIVEL DE LUES EN LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS	155
IV.12.6.	EL EE ₂ INDUCE LOS NIVELES DE LUES EN RATAS INMADURAS E HYPOX	156
IV.12.7.	REGULACIÓN FISIOLÓGICA SELECTIVA DE LOS PÉPTIDOS DEL OLIGÓMERO	159
IV.12.8.	EL EE ₂ PRODUCE UNA INDUCCIÓN SELECTIVA DE LOS PÉPTIDOS DE 31 Y 55 kDa DEL OLIGÓMERO	160
V.	DISCUSIÓN	165
V.1.	EL LUGAR DE UNIÓN PARA ESTANOZOLOL (LUES)	165
V.1.1.	El [³ H]ES se une específicamente a una proteína de membrana integrada en el retículo endoplásmico hepático ..	165

V.1.2.	El LUES no es una forma membranal de RA ni una proteína transportadora de esteroides	166
V.1.3.	El LUES presenta cooperativismo positivo	167
V.1.4.	El LUES modula de forma alostérica al LUBAG	166
V.1.5.	El LUES es una proteína que puede ser solubilizada en su forma nativa	168
V.1.6.	El LUES es una proteína oligomérica de 104-120 kDa	169
V.2.	REGULACIÓN ENDOCRINA DEL LUES	171
V.2.1.	La ontogenia y el hipotiroidismo demuestran que LUES están sujetas a diferentes tipos de regulación fisiológica	171
V.2.2.	El LUES está regulado por los glucocorticoides adrenales	172
V.2.3.	Los péptidos que ligan ES están sujetos a una regulación selectiva tanto fisiológica como farmacológica	173
V.3.	POSIBLES PAPELES FISIOLÓGICOS PARA EL LUES	175
VI.	CONCLUSIONES	183
VII.	BIBLIOGRAFÍA	187

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1. Nomenclatura de la molécula básica de los EAA.....	23
Figura 2. Complejo receptor GABA-benzodiacepina-ionóforo Cl^-	27
Figura 3. Comparación esquemática entre varios miembros de la familia de receptores nucleares para hormonas esteroideas	32
Figura 4. Dominios del Receptor de Hormonas Esteroides	33
Figura 5. Receptor nuclear inactivo y su cambio conformacional	36
Figura 6. Papel del receptor en la maquinaria transcripcional	38
Figura 7. Efecto no genómico de la progesterona en la región del acrosoma de la membrana plasmática del espermatozoide humano	43
Figura 8. Escala de afinidades para diferentes proteínas con capacidad para fijar hormonas esteroideas	47
Figura 9. Obtención de RER y REL por el método de Rostchild	69
Figura 10. Obtención de membrana plasmática por el método de Loten	70
Figura 11. Obtención de mitocondrias, peroxisomas y lisosomas	71
Figura 12. Curva de unión de una hormona a su receptor	76
Figura 13. Análisis de Scatchard de unión de una hormona a su receptor	77
Figura 14. Inhibición de la unión específica de un ligando radiactivo a su receptor por la presencia de un competidor en el medio	79
Figura 15. Tratamiento de permeabilización de las membranas microsomal con 0.08% TX100	81
Figura 16. Reacción de Cleland para la ruptura de enlaces disulfuro usando DTT .	84
Figura 17. Determinación del pH óptimo para la fijación del LUES al intercambiador DE-52	91
Figura 18. Determinación de la fuerza iónica del tampón de elución	92
Figura 19. Curva de saturación de $[^3\text{H}]\text{ES}$ a microsomas de hígado de rata	99
Figura 20. Análisis de Scatchard de los datos de la unión específica del $[^3\text{H}]\text{ES}$ a los microsomas	100
Figura 21. Análisis de Hill de los datos de la unión específica del $[^3\text{H}]\text{ES}$ a los microsomas	100
Figura 22. Cinética de asociación del $[^3\text{H}]\text{ES}$ a los microsomas a 0°C	102
Figura 23. Cinética de disociación del $[^3\text{H}]\text{ES}$ de los microsomas provocada por Estanozolol	104

Figura 24.	Inhibición de la fijación específica del [3 H]ES a los microsomas hepáticos provocada por Estanozolol o Danazol	105
Figura 25.	Distribución subcelular de la fijación específica de [3 H]ES	108
Figura 26.	Influencia del pre-tratamiento con proteasas (Proteinasa K y Tripsina) sobre la fijación específica de [3 H]ES al LUES	110
Figura 27.	Efecto de la Cicloheximida (CHX) sobre el LUES	112
Figura 28.	Efecto del tratamiento de los microsomas con glucosidasas y fosfolipasas sobre el LUES	113
Figura 29.	Efecto de concentraciones crecientes de TX114 sobre la solubilización del LUES	115
Figura 30.	Partición de fases de las proteínas solubilizadas con Tritón X-114	116
Figura 31.	Análisis de Scatchard de los datos de las curvas de saturación de la unión específica del [3 H]ES a la Fase Orgánica o Fase Acuosa tras la solubilización con TX114 y posterior partición de fases a 20°C	117
Figura 32.	Efecto del precalentamiento de los microsomas sobre la fijación específica de [3 H]ES	119
Figura 33.	Estabilidad térmica del lugar LUES. Dosis-tiempo y dosis-efecto de la temperatura	120
Figura 34.	Efecto del pH sobre la capacidad de los microsomas para unir de forma específica el [3 H]ES	121
Figura 35.	Efecto dosis-dependiente de los inhibidores de grupos sulfhidrilo MMTS y NEM sobre la fijación específica de [3 H]ES.....	122
Figura 36.	Efecto de MMTS y NEM sobre el complejo [3 H]ES-LUES	123
Figura 37.	Efecto del DTT sobre la capacidad microsomal de fijación de [3 H]ES ...	125
Figura 38.	Efecto de concentraciones crecientes de CHAPS y TX100 en la solubilización del LUES	127
Figura 39.	Efecto de la concentración inicial de proteínas microsomales sobre la solubilización del LUES con 10 mM de CHAPS o 6.6 mM de TX100	128
Figura 40.	Efecto de la concentración de proteínas del extracto soluble sobre la fijación específica de [3 H]ES	130
Figura 41.	Cinética de asociación a 0°C del [3 H]ES (150 nM) a los extractos solubilizados con CHAPS 10 mM	132
Figura 42.	Cinética de disociación a 0°C del [3 H]ES de los extractos solubilizados con CHAPS 10 mM	133

Figura 43.	Análisis de saturación de la fijación específica del [³ H]ES a los microsomas hepáticos y a los extractos solubilizados con CHAPS 10 mM	134
Figura 44.	Análisis de Scatchard de los datos de la fijación específica del [³ H]ES a los microsomas crudos y a los extractos solubilizados con CHAPS 10 mM	134
Figura 45.	Especificidad del LUES solubilizado	136
Figura 46.	Perfil de elución de las proteínas marcadas con [³ H]ES, solubilizadas con CHAPS, cromatografiadas en Sephacryl S-300	137
Figura 47.	Perfil de elución de las proteínas marcadas con [³ H]ES, solubilizadas con TX100 y cromatografiadas en Sephacryl S-300	138
Figura 48.	Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (18-34%), preparado en H ₂ O, de los extractos solubilizados con 10 mM de CHAPS	140
Figura 49.	Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (18-34%), preparado en D ₂ O, de los extractos solubilizados con 10 mM de CHAPS	141
Figura 50.	Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (2-20%), preparado en H ₂ O, de los extractos solubilizados con 6.6 mM de TX100	142
Figura 51.	Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (2-20%), preparado en D ₂ O, de los extractos solubilizados con 6.6 mM de TX100	143
Figura 52.	Cromatografía de intercambio aniónico	146
Figura 53.	Exposición de las proteínas solubilizadas y parcialmente purificadas a una fuente de luz ultravioleta (254 nM)	147
Figura 54.	Análisis mediante SDS-PAGE en gradiente (13-20%) de la preparación marcada covalentemente con [³ H]ES mediante fotoactivación	149
Figura 55.	Análisis mediante SDS-PAGE en gradiente (6-16%) de la preparación marcada covalentemente con [³ H]ES mediante fotoactivación	149
Figura 56.	Ontogenia del LUBAG y LUES de microsomas de rata macho	151
Figura 57.	Efecto de la hipofisectomía sobre el LUBAG y el LUES de microsomas de hígado de rata macho	152
Figura 58.	Efecto de la orquidectomía en la rata adulta sobre los niveles de LUBAG y LUES.	153
Figura 59.	Efecto de la adrenalectomía sobre LUBAG y LUES de microsomas de rata macho	154

Figura 60.	Efecto del hipotiroidismo agudo y crónico sobre el nivel microsomal de LUBAG y LUES	156
Figura 61.	Dosis-respuesta del EE ₂ sobre el LUBAG y el LUES	157
Figura 62.	Efecto dosis-tiempo del EE ₂ sobre LUBAG y LUES	158
Figura 63.	Efecto de la administración de EE ₂ y Mestranol (MT) a ratas HYPOX macho adultas	158
Figura 64.	Regulación fisiológica selectiva de los péptidos del LUES. SDS-PAGE (13-20%) de microsomas procedentes de animales adultos vs. IMT	159
Figura 65.	Regulación fisiológica selectiva de los péptidos del LUES. SDS-PAGE (13-20%) de microsomas procedentes de animales adultos vs. HYPOX	160
Figura 66.	Inducción selectiva del EE ₂ sobre los péptidos de 55 y 31 kDa en ratas HYPOX	161
Figura 67	Inducción selectiva del EE ₂ sobre los péptidos de 55 y 31 KDa en ratas IMT	161
Figura 68	Modelo hipotético del LUES como modulador de la actividad de los esteroides que se unen al LUBAG	179

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
Tabla 1. Propiedades físico-químicas del CHAPS y TX100	86
Tabla 2. Propiedades del CHAPS y TX100 en la solubilización de proteínas de membrana	86
Tabla 3. Artefactos responsables de la apariencia de cooperativismo positivo en los ensayos de intercambio	101
Tabla 4. Análisis de la cinética de asociación de [³ H]ES a los microsomas hepáticos	103
Tabla 5. Análisis matemático de los datos de la cinética de disociación del [³ H]ES de los microsomas	104
Tabla 6. Compuestos incapaces de desplazar al [³ H]ES de su lugar de unión microsomal	106
Tabla 7. Abundancia del lugar de unión para [³ H]ES en los diferentes tejidos de la rata	107
Tabla 8. Correlación entre la fijación específica de [³ H]ES en las fracciones subcelulares y la actividad enzimática de los marcadores específicos de fracción	109
Tabla 9. Perfil Farmacológico de la unión del [³ H]ES a los microsomas y a las proteínas solubilizadas	135
Tabla 10. Parámetros hidrodinámicos del LUES solubilizado a partir de microsomas de rata macho	144
Tabla 11. Purificación parcial del Lugar de Unión para [³ H]ES	146
Tabla 12. Fotomarcage con [³ H]ES seguido de SDS-PAGE de los microsomas solubilizados con CHAPS	148

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- 17 α AA = Andr6genos 17 α alquil derivados de la testosterona
AAs = Amino6cidos
ADN = 6cido desoxirribonucleico
ADNc = 6cido desoxirribonucleico complementario
ADX = Animales adrenalectomizados
AEBS = Lugar de uni6n membranal para antiestr6genos
AMPc = Adenosina monofosfato c6clica
ARN = 6cido ribonucleico
ARNm = 6cido ribonucleico mensajero
B_{max} = M6xima actividad de fijaci6n
BSA = Alb6mina s6rica bovina
CA = Acetato de corticosterona
CHAPS = 6cido 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulf6nico
DEX = Dexametasona
[³H]DEX = Dexametasona tritiada
DA = Danazol
DAG = Diacilglicerol
DCC = Carb6n activo - Dextrano
DHT = Dihidrotestosterona
DPM = Desintegraciones por minuto
DTT = Ditiotreit6l
17 α -E₂ = 17 α -estradiol
17 β -E₂ = 17 β -estradiol
E₃ = Estrona
EAA = Esteroides anabolizantes androg6nicos
EC₅₀ = Concentraci6n de inhibidor que inhibe el 50% de uni6n del radioligando
EDTA = 6cido etilendiamino tetraac6tico
EE₂ = Etinilestradiol
ERH = Elemento de respuesta hormonal
ES = Estanozolol
[³H]ES = Estanozolol tritiado
GABA = 6cido gamma aminobut6rico
GH = Hormona de crecimiento
GMPc = Guanosin monofosfato c6clico
[H] = Concentraci6n de hormona
Hsp = Prote6na "Heat-Shock"

HYPOX = Animales hipofisectomizados
IP₃ = Inositol-1,4,5-trifosfato
K₋₁ = Constante de velocidad de disociación
K₊₁ = Constante de velocidad de asociación
K_d = Constante de disociación del radioligando
K_i = Constante de disociación del inhibidor
LUBAG = Lugar de Unión de Baja Afinidad para Glucocorticoides
LUES = Lugar de Unión para Estanozolol
M_c = Peso molecular
MMTS = Metilmetanotiosulfonato
N_A = Número de Avogadro
NEM = N-etilmaleimida
OX = Animales orquidectomizados
Pg = Progesterona
pI = Punto isoeléctrico
PKC = Proteína quinasa C
PMSF = Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTK = Tirosinaquinasa
PTU = Propiltiouracilo
p.v. = Peso vivo
p:v = Relación peso:volumen
[R] = Concentración de receptor
RA = Receptor de andrógenos
RE = Receptor de Estrógenos
REL = Retículo Endoplásmico Liso
RER = Retículo Endoplásmico Rugoso
RG = Receptor de glucocorticoides
R_s = Radio de Stokes
SDS-PAGE = Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
SHBG = Globulina transportadora de hormonas sexuales
SNC = Sistema nervioso central
T = Testosterona
t_½ = Vida media
T₃ = Triyodotironina
TX = Animales hipotiroides
TX100 = Tritón X-100
TX114 = Tritón X-114

RESUMEN - SUMMARY

RESUMEN

En los últimos años se ha descrito la existencia de numerosas proteínas de membrana que captan esteroides, naturales y sintéticos. Para unas se ha demostrado su papel como auténtico receptor de membrana, mediando efectos no genómicos, mientras que para otras su función aún se desconoce. Todas ellas presentan numerosas diferencias, tanto farmacológicas como bioquímicas, con los receptores clásicos para hormonas esteroideas. Entre estas proteínas de membrana, el Lugar de Unión de Baja Afinidad para Glucocorticoides (LUBAG) fue originalmente identificado en la fracción microsomal hepática de la rata y caracterizado por su capacidad para fijar glucocorticoides, progestágenos, estrógenos sintéticos y esteroides anabolizantes androgénicos (EAA), así como por estar sujeto a una compleja regulación fisiológica por glucocorticoides, hormonas tiroideas, estrógenos y Hormona de Crecimiento. El EAA estanozolol (ES) inhibe la unión de glucocorticoides al LUBAG a través de un alosterismo negativo y con una K_i de 40 nM. Esto sugería la existencia de un lugar de unión para el ES diferente al existente para los glucocorticoides y a través del cual inhibía la unión de estos últimos al LUBAG.

Esta Tesis profundiza en el conocimiento del Lugar de Unión para ES (LUES) desde el punto de vista bioquímico y farmacológico. Se describe al LUES como una proteína integral del retículo endoplásmico hepático que presenta una afinidad por el ES de 37 nM y una capacidad de fijación de 49 pmol/mg proteína. Posee una elevada especificidad, ya que de entre más de 100 moléculas ensayadas es capaz de unir solamente al ES y a su análogo estructural danazol. La proteína solubilizada mantiene las propiedades farmacológicas de la proteína nativa. El estudio de sus propiedades hidrodinámicas y el marcaje covalente por fotoafinidad con [3 H]ES nos han permitido identificarla como un oligómero de 118 kDa, formado, al menos, por tres subunidades de 55-, 31-, y 22 kDa con capacidad para fijar específicamente el ES. Al igual que sucede para el LUBAG, los glucocorticoides inducen su expresión en el animal adrenalectomizado. Sin embargo y, a diferencia de lo que ocurre con el LUBAG, el LUES se expresa desde el nacimiento y no disminuye en el animal hipotiroideo. Es destacable que, a diferencia de lo que ocurre con el péptido de 22-kDa, los péptidos de 55- y 31-kDa están en muy baja concentración o son indetectables en animales inmaduros (IMT) o hipofisectomizados (HYPOX), respectivamente. Es destacable, por último que el etinilestradiol, que no se une al LUES, es un potente inductor de su actividad tanto en los animales IMT como HYPOX, induciendo los péptidos de 55-, y 31-kDa de forma mucho más eficiente que al de 22-kDa.

Estos datos indican que aunque íntimamente relacionados entre sí, LUES y LUBAG son proteínas distintas y están sometidas a una regulación endocrina diferente. Probablemente, el ES, y otros EAA, son capaces de modular la actividad de otras hormonas esteroideas a través de la regulación alostérica del LUBAG.

SUMMARY

In last years the existence of multiple membrane-binding sites for natural and synthetic steroids has been described. Some has been demonstrated to be authentic membrane-receptors that mediate rapid, non-genomic effects. The rest has still an unknown function. All of them have multiple pharmacological and biochemical differences with classic intracellular steroid receptors. Among all these proteins, the Low Affinity Glucocorticoid Binding Site (LAGS) was originally described in hepatic endoplasmic reticulum and characterized by its capacity for binding glucocorticoids, progestagens, synthetic estrogens and anabolic-androgenic steroids (AAS). LAGS are under multiple hormonal regulation which involves glucocorticoids, thyroid hormones, estrogens and Growth Hormone. The AAS stanozolol (ST) inhibits the binding of glucocorticoids to the LAGS by means of a negative allosteric mechanism and with a K_i of 40 nM. This suggested the existence of an ST binding site, different of that described for glucocorticoids.

In this Thesis we deep into the knowledge of the Binding Site for [3 H]ST (LUES) in a biochemical and pharmacological point of view. We describe the existence of an integral endoplasmic reticulum protein that has an affinity for ST of 37 nM and a capacity of 49 pmol/mg protein. It has also high specificity for ST, being capable of discriminate this steroid and its analog danazol between more than 100 assayed molecules. Solubilized protein retains all the pharmacological properties of native protein. The study of its hydrodynamic properties and photoaffinity labelling with [3 H]ST allowed us to identify it as an oligomeric protein of 118 kDa, with three subunits of 55-, 31-, and 22-kDa with capacity for binding ST. By analogy with LAGS, glucocorticoids induce the activity of the protein in adrenalectomized animals. Unlike LAGS, the LUES is expressed from birth and does not decrease in hypothyroid animals. It is remarkable that unlike the 22-kDa peptide, both the 55- and 31-kDa peptides are very low or undetectable in immature (IMT) and hypophysectomized (HYPOX) male rats, respectively. Finally, ethinylestradiol does not bind to the LUES but it is a potent inductor of its activity both in IMT and HYPOX animals, inducing the 55- and 31-kDa [3 H]ST binding peptides more efficiently than the 22-kDa peptide in these animals.

These data suggest that LAGS AND LUES are closely related but under different endocrine regulation. Our results suggest that ST, and other AAS, play an important role in modulating the activity of other steroid hormones through an allosteric regulation of LAGS.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ESTEROIDES ANABOLIZANTES

Los esteroides anabolizantes androgénicos (EAA) son un tipo de hormonas químicamente similares, que producen efectos anabolizantes (aumento de peso y masa muscular) y androgénicos (masculinización) [1]. Desde un punto de vista estructural todos ellos son análogos de la testosterona (T). Su efecto dominante es incrementar la síntesis proteica en todos los tejidos capaces de crecer. Incluso los efectos clásicamente considerados como androgénicos podrían considerarse como anabólicos ya que, de hecho, se trata de un efecto anabólico que tiene lugar en los órganos sexuales o tejidos sexualmente modulados. La T y otros esteroides endógenos además de cientos de esteroides de síntesis, se ajustan a esta definición. Sin embargo en la actualidad sabemos que los términos “androgénico” y “anabólico” son demasiado simplistas ya que los efectos de estas sustancias no son fácilmente encuadrables en una sola de estas definiciones. De hecho, uno de los factores más desconcertantes de estas hormonas es la multiplicidad y diversidad de efectos biológicos. A pesar de la intensa investigación realizada en los últimos años, ningún EAA ha demostrado ser únicamente anabolizante o androgénico. Aunque el más conocido de todos los EAA es la T, los de mayor interés farmacológico y toxicológico no son los naturales, sino los sintéticos por dos razones fundamentales:

- a. Desde un punto de vista terapéutico, la T resulta ser poco útil, ya que la mayoría de la T exógena administrada sufre en el hígado una intensa metabolización, de forma que los niveles plasmáticos de la hormona prácticamente no se incrementan [1]. Por ello ha sido necesario modificar la molécula de la T o sintetizar compuestos que logren retardar su metabolización, y alcanzar y mantener niveles plasmáticos adecuados.
- b. Los laboratorios farmacéuticos han intentado obtener EAA de síntesis que tengan mayor capacidad anabólica y menor actividad androgénica que la T ya que, en muchas circunstancias, terapéuticas o no, el uso de este tipo de hormonas se ve frenado por la aparición de efectos masculinizantes indeseados [3].

En los últimos 20 años han sido sintetizados más de 120 EAA, quedando la mayoría de ellos sin aplicación clínica real, ya que son sólo 12 los que se utilizan con fines terapéuticos; siendo el más importante del grupo el danazol (DA) [1]. Sin embargo, su importancia desde un punto de vista científico ha aumentado extraordinariamente, de forma paralela al espectacular incremento que ha experimentado el consumo de este tipo de sustancias por parte de los deportistas en general, especialmente culturistas y atletas de alta competición, como agentes dopantes para mejorar su rendimiento atlético.

I.1.1. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS

I.1.1.2. Estructura química

La T, como el resto de los EAA, tienen como base estructural un esqueleto de 17 átomos de carbono que forma tres anillos ciclohexanos y otro ciclopentano, formando un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Existen 3 tipos generales de modificación de la molécula de la T que la hacen farmacológicamente activa [1] (Figura 1):

- a. **Esterificación del grupo 17 β -OH con ácidos carboxílicos.** Esto hace que disminuya la polaridad de la molécula, aumente su solubilidad en los vehículos lipídicos utilizados para su administración parenteral y, por lo tanto, se retarde la liberación del esteroide inyectado hacia la circulación. Cuanto más larga es la cadena carbonada del éster, mayor es la liposolubilidad del esteroide y más larga la duración de su acción. Los derivados más utilizados de este grupo son: decanoato de nandrolona, acetato de metenolona, enantato de metenolona, cipionato de T y propionato de T. Su lenta metabolización permite una administración parenteral semanal.
- b. **La alquilación a nivel de la posición 17 α .** Esta modificación determina la eficacia de los andrógenos por vía oral debido a que los derivados alquílicos (17 α AA) son metabolizados lentamente por el hígado. El grupo alquilo no es separado metabólicamente de la molécula. Los más utilizados son: DA, estanozolol (ES), etilestrenol, metandrostenolona, oxandrolona y oximetolona. Son activos por vía oral y requieren administración diaria. Este tipo de derivados ha demostrado poseer mayor potencia anabolizante que androgénica.
- c. Se han realizado empíricamente **otras alteraciones de la estructura anular**, particularmente la sustitución en los carbonos 1, 2, 9 y 11. En algunos casos, el efecto consiste en retardar el índice de inactivación; en otros se trata de aumentar su potencia, etc. Los más utilizados son: la fluoximesterona, la 19-nortestosterona y la mesterolona. Destacar, por la importancia que tiene en esta Tesis, modificaciones de la molécula como la adición de un grupo fenilpirazólico (p.e. ES) u oxazólico (p.e. DA) en el anillo A. Otros importantes productos con adición de grupos fenilpirazólicos al anillo A son: 1) el antiandrógeno zanoterona, y 2) los glucocorticoides cortivazol, nivazol y nivacortol.

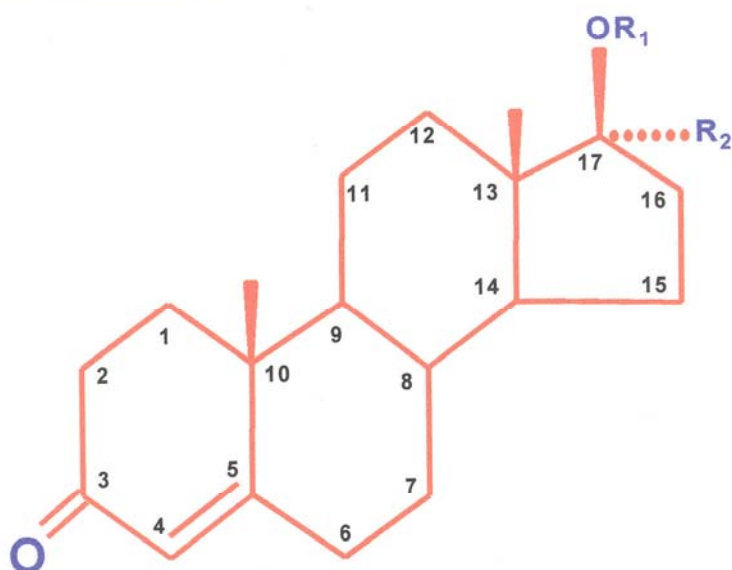


Figura 1. Nomenclatura de la molécula básica de los EAA. Los números hacen referencia a los átomos de carbono. **a.** andrógenos esterificados (sustitución R_1), **b.** 17α AA (sustitución R_2), **c.** andrógenos con otras sustituciones en el anillo esteroide.

I.1.1.2. Farmacocinética

La farmacocinética básica de los EAA de síntesis es muy similar a la de la T. Los EAA se absorben desde el tracto gastrointestinal, mucosas, piel y depósitos intramusculares y subcutáneos (formas "depot"). En circulación, la mayoría de ellos se unen rápidamente a la albúmina plasmática, aunque una pequeña proporción se une a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), permaneciendo libre un pequeño porcentaje. En general, se puede afirmar que los niveles plasmáticos de estas sustancias no se correlacionan con los efectos terapéuticos, por lo cual no es de utilidad la monitorización de los mismos [1,4,5].

La T es inactivada principalmente en el hígado. Varias son las vías metabólicas implicadas: la oxidación del grupo 17-OH va a dar lugar a la formación de androstenediona, mientras que la reducción en posición 5α del anillo A da lugar a androstendiona; por otro lado la reducción del grupo 3-ceto implica la formación de androsterona. A su vez puede ser reducida en posición 5β o sufrir una 3-ceto reducción que dará lugar a la eticolanolona. Así mismo, el principal metabolito activo de la T, la DHT, es metabolizada en el hígado a androsterona, androstenediona y androstanediol. Los ésteres de la T sufren procesos de

hidrólisis que liberan la molécula de la T y son metabolizados como ésta. En cuanto a los 17α AA, se ha demostrado que la presencia de ese grupo alquil retrasa de forma notable la metabolización hepática. Otras modificaciones en la molécula también alteran la metabolización [1,4,5,6].

En cuanto a la excreción de los EAA se puede afirmar, si se toma como guía a la T, que el 90% de su excreción es urinaria (encontrándose en orina metabolitos tales como la androsterona y etiocolanolona), siendo el resto excretados por las heces. La mayor parte de los metabolitos excretados por esta vía lo hacen en forma de glucurónidos y sulfatos [1,4,5,6].

I.1.1.3. Farmacodinamia

El principal mecanismo de acción de los EAA se establece en base a su capacidad de interactuar con el receptor para andrógenos (RA), bien por unión directa de la T o DHT con dicho receptor, o bien por interacción del mismo con los análogos de síntesis. Este mecanismo de acción es similar al de otras hormonas esteroideas, y lo describimos en detalle en el epígrafe I.2. de esta Introducción.

I.1.2. USOS DE LOS EAA

I.1.2.1. Osteoporosis

Los esteroides sexuales ejercen una importante influencia sobre el metabolismo óseo. El uso de EAA podría frenar la osteoporosis mediante un mecanismo directo, a través del RA del hueso (estimulando los osteoblastos o inhibiendo la actividad de los osteoclastos), o bien a nivel renal incrementando la reabsorción de calcio, o también incrementando la absorción del mismo a nivel del intestino. Uno de los EAA más frecuentemente utilizados en el manejo de la osteoporosis tanto en hombres como en mujeres es el ES. No obstante, los datos indican que si bien los EAA pueden incrementar la masa ósea en mujeres osteoporóticas, su eficacia se ve mitigada por los efectos virilizantes y otros efectos adversos, resultando más eficaz en el manejo de estos pacientes el uso de terapias alternativas como estrógenos, calcitonina y calcitriol [1,5,7].

I.1.2.2. Desórdenes hematopoyéticos

Los EAA se han usado durante muchos años en el tratamiento de pacientes con

anemia aplásica, anemia de Fanconi, y la anemia asociada con la enfermedad renal terminal. Aunque con el desarrollo de la Eritropoyetina humana recombinante, los EAA se han dejado de utilizar en la anemia asociada con la enfermedad renal terminal, su uso se mantiene en el tratamiento de la anemia aplásica y cuadros relacionados, con resultados discretamente favorables. Así, el DA se ha mostrado muy útil en el manejo de la anemia hemolítica autoinmune o en la trombocitopenia autoinmune [1,5,8].

I.1.2.3. Edema Angioneurótico Hereditario

El edema angioneurótico hereditario es una rara enfermedad genética, caracterizada por inflamación de las mucosas, dolor abdominal, y un miedo constante del paciente a sufrir una obstrucción de las vías respiratorias superiores, que se debe a una activación indiscriminada del sistema del complemento. La eficacia de los EAA en esta alteración es indiscutible siendo los más eficaces el ES, la metiltesterona, la oximetolona, y principalmente el DA, ya que los pacientes responden a dosis bajas, con unos efectos adversos mínimos [1,9,10].

I.1.2.4. Coagulación, Fibrinólisis y Hemofilia

Los EAA incrementan la actividad fibrinolítica, disminuyen el fibrinógeno, e incrementan el plasminógeno. Recientes publicaciones indican que el DA resulta apropiado y efectivo para el tratamiento de la trombosis inducida por eritropoyetina. Por otro lado el DA incrementa los niveles de factores de coagulación VIII y IX en pacientes con hemofilia de los tipos A y B [1,11].

I.1.2.5. Alteraciones del crecimiento

Tanto los ésteres de la T como los EAA orales han sido utilizados para iniciar y estimular el crecimiento en adolescentes. Este objetivo ha sido alcanzado con dosis bajas de ésteres de T, fluoximesterona y oxandrolona, administrada durante 3, 6 o 12 meses. No obstante este tratamiento no está exento de efectos secundarios, como el que la maduración esquelética sea estimulada en mayor grado que el crecimiento lineal, resultando entonces en una altura final menor que la esperada. También el uso de EAA puede retrasar la progresión de la pubertad debido a la supresión de la secreción de gonadotropinas, requerida para la secreción de T, y la maduración testicular [1,9,12].

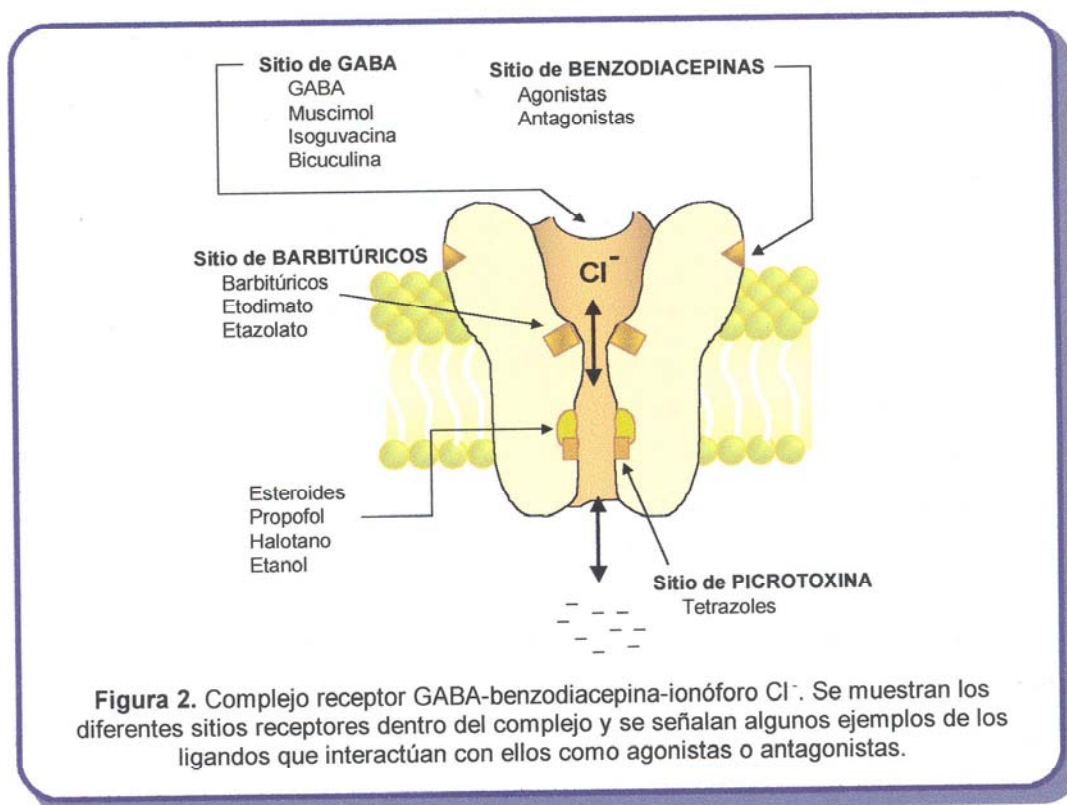
1.1.2.6. Abuso de los EAA: dopaje

A pesar de la falta de datos fiables, resulta cada vez más evidente que los EAA están teniendo un creciente impacto en la práctica deportiva, con el establecimiento de marcas absolutamente increíbles, el aspecto masculino que desarrollan algunas atletas, o el hecho de que deportistas muy conocidos hayan dado positivo en los análisis.

Existen multitud de regímenes y dosificaciones, aunque lo más habitual es que los atletas que se inician en el consumo de estas sustancias lo hagan con preparados orales en dosis que oscilan entre 25 y 500 mg/día, consumidos durante semanas e incluso meses. Entre los productos consumidos habitualmente están la metandienona, ES, oxandrolona, oximetolona y metiltestosterona, pero se llegan a usar fraudulentamente incluso productos de prescripción veterinaria, como la bolderona y mibolerona.

Los estudios de morfometría del músculo y de composición corporal demuestran que, dosis farmacológicas de EAA incrementan el diámetro de la fibra muscular, así como también provocan un aumento global del peso corporal, debido a la hipertrofia muscular pero también a un aumento de la retención de líquidos. Estos efectos se deben, probablemente, a su unión al RA, aunque otra hipótesis alternativa explica el balance de nitrógeno positivo, y el crecimiento muscular, independientemente del RA, por la acción antagonista de los EAA sobre el receptor de glucocorticoides (RG), de forma que se inhibiría la acción catabólica de los glucocorticoides. Posiblemente el efecto anabolizante de estos esteroides puede ser un efecto combinado de ambos mecanismos de acción [1,13,14,15,16].

El empleo de EAA ha demostrado tener efectos psicológicos tanto de forma positiva (euforia, incremento de la energía, incremento de la libido) como de forma negativa (irritabilidad, sentimientos violentos y hostilidad). Recientemente, los investigadores han comenzado a explorar los efectos potenciales de estos compuestos a nivel de SNC, demostrando cambios en la actividad de varios receptores de neurotransmisores tras la exposición crónica a EAA. Así se ha demostrado que la función del receptor GABA_A, el principal receptor de neurotransmisores inhibitorios del S.N.C., está modulada alostéricamente por numerosos compuestos, tanto endógenos como exógenos, entre los que se incluyen numerosos esteroides, agrupados bajo la denominación de neuroesteroides (Figura 2).



Es particularmente interesante la interacción que presenta el ES, ya que parece estabilizar al receptor GABA_A en un estado de moderada afinidad por el GABA. Podría estar actuando de este modo como un bloqueador del canal de cloro asociado al receptor GABA_A [17,18].

1.1.3. EFECTOS ADVERSOS DEL USO DE EAA

1.1.3.1. Efectos virilizantes y feminizantes

En las mujeres se han observado efectos virilizantes adversos que incluyen hirsutismo, acné, voz grave, hipertrofia de clítoris, calvicie con patrón masculino, esterilidad e irregularidades menstruales. Son, en su mayor parte, reversibles una vez se interrumpe la administración de los EAA [1,19]. Si el tratamiento es muy prolongado muchos de estos efectos, incluso la voz grave, se hacen irreversibles. Durante el embarazo pueden provocar una masculinización del feto de sexo femenino. Paradójicamente, en hombres que reciben EAA, pueden aparecer efectos secundarios feminizantes como la ginecomastia, debido principalmente a que los EAA pueden ser convertidos en estradiol y estrona por la enzima aromatasa. Las estructuras de ciertos andrógenos, incluyendo fluoximesterona, mesterolona,

y, probablemente, ES, imposibilitan su aromatización a estrógenos, y es probable que los efectos secundarios feminizantes sean más comunes después de la administración de ésteres de T que de otros andrógenos sintéticos [1,20].

I.1.3.2. Alteraciones endocrinas y de la reproducción

Cuando la concentración de T en plasma se eleva por encima del rango fisiológico, los niveles plasmáticos de LH y FSH se deprimen por la vía clásica de la acción "feedback" de los andrógenos sobre el eje hipotalámico-hipofisiario. Como consecuencia, el volumen testicular disminuye cerca de un 20% y la producción de esperma disminuye uniformemente en un 90% o más, aunque el volumen de eyaculado permanece inalterado. Estas alteraciones son reversibles tras interrumpir el tratamiento. Sin embargo, tras largos períodos de abuso, puede persistir un hipogonadismo relativo durante bastante tiempo después de que las drogas sean interrumpidas, hecho que en parte puede deberse a un estado hipogonadotrópico relativo y en parte debido a una refractariedad testicular a las gonadotropinas. Así mismo, disminuye la tolerancia a la glucosa y se ha observado resistencia a la insulina, efecto que se revierte tras la suspensión del tratamiento [1,21].

I.1.3.3. Alteraciones cardiovasculares

Uno de los efectos adversos más comunes del tratamiento o abuso de los EAA es la disminución de la fracción HDL del colesterol, siendo las fracciones HDL-C2 y A1 las más afectadas. Además, el tratamiento con EAA a menudo produce un incremento de la fracción LDL-C, así que el efecto combinado es un incremento de la relación LDL-C/HDL-C, lo cual representa un incremento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. A pesar de que existen descripciones de casos de infarto de miocardio asociados con el consumo de EAA, no ha podido establecerse una relación causa-efecto clara, probablemente debido a que el uso de regímenes cíclicos, con periodo de abstinencia, mitigue las consecuencias a largo plazo de su uso. Junto a ello se ha descrito la capacidad de los EAA de elevar la tensión sanguínea y aumentar la agregabilidad plaquetaria, así como su capacidad para inducir una reactividad vascular alterada. Todos estos factores se barajan como mecanismos fisiopatológicos causantes de los fallos cardíacos, infartos fundamentalmente, accidentes cerebrovasculares o patologías vasculares periféricas que se han descrito en culturistas y levantadores de pesos que consumían grandes dosis de EAA de forma crónica [1,22,23].

I.1.3.4. Alteraciones psíquicas

Recientemente, ha ido aumentando la importancia de las alteraciones psíquicas que el consumo masivo de EAA produce. En los atletas dopados se objetiva un incremento en la agresividad; en este sentido, se ha sugerido que el efecto beneficioso primario sobre el rendimiento atlético reside en el nivel de motivación o agresividad. Además, se han asociado al consumo masivo de EAA con diferentes patologías psiquiátricas, tales como episodios de depresión, manía, delirio, suicidios y homicidios [24,25]. Tales cuadros se manifiestan, fundamentalmente, durante los periodos de administración de EAA. Informes esporádicos han sugerido una relación directa entre el abuso de EAA y la psicosis aguda en personas susceptibles. Otros autores han sugerido también la inducción de un cuadro de dependencia psicológica en los consumidores habituales de EAA, así como la asociación existente en el consumo de EAA y de otras drogas de abuso, tales como alcohol, hachís, tabaco y cocaína, entre otras [17,18,25,26].

I.1.3.5. Alteraciones respiratorias

Algunos efectos derivados del consumo de EAA se producen por mecanismos desconocidos. La apnea del sueño se produce en hombres que en ocasiones toman grandes cantidades de ésteres de T, posiblemente como consecuencia de un incremento del hematocrito [1,15].

I.1.3.6. Alteraciones músculo-esqueléticas

En niños de ambos sexos los EAA tienen una profunda capacidad para promover el cierre prematuro de las epífisis (lo que dará lugar a una baja estatura). Por otro lado, es frecuente observar en los deportistas sometidos a tratamientos con EAA una gran fragilidad en tendones, que en algunas ocasiones llegan a romperse con facilidad en el curso de los entrenamientos (es posible observar una degeneración histológica del tendón afectado) [1,27,28]. Recientemente Abu-Shakra y colaboradores han demostrado que algunos EAA inducen apoptosis en músculo esquelético diferenciado, músculo esquelético neonatal, y en mioblastos [249].

I.1.3.7. Toxicidad hepática

Entre los efectos adversos a nivel hepático de los EAA se ha descrito la elevación de enzimas hepáticos con producción de ictericia (por colestasis intrahepática), peliosis y tumores hepáticos. Esta hepatotoxicidad es ejercida fundamentalmente por los EAA alquilados en la posición 17α . Por el contrario, la T y sus ésteres no suelen mostrar esta propiedad lesiva sobre el hígado. La hepatotoxicidad parece estar relacionada con la duración del tratamiento y suele revertir tras la suspensión de éste.

La ictericia es una reacción adversa frecuente tras el consumo de 17α AA, y la alteración subyacente es la acumulación de bilis en los conductillos biliares de la porción central de los lobulillos hepáticos, sin obstrucción en los conductos mayores. Las células hepáticas muestran sólo cambios histológicos menores y permanecen viables, mientras que las alteraciones de la función hepática más frecuentes son los aumentos de la concentración plasmática de bilirrubina y de las actividades plasmáticas de GOT y de fosfatasa alcalina, así como menor eliminación de bromosulfoftaleína. En este sentido, la colestasis intrahepática mediada por los EAA puede deberse a una alteración en la secreción hepatocitaria de bilirrubina. Estos efectos son dosis-dependientes aunque en ocasiones la ictericia puede deberse a una reacción de hipersensibilidad y, por tanto, independiente de la dosis [1,29-31].

Las lesiones tumorales hepáticas (benignas o malignas) son comunes en pacientes sometidos a un tratamiento prolongado con 17α AA. En algunos individuos, tales tumores pueden regresar y seguir un curso benigno después de interrumpir las drogas; en otros, el curso es rápidamente mortal [1,31].

Otros cambios en la función hepática inducida por 17α AA incluyen un incremento de algunas proteínas plasmáticas y una disminución en la conjugación de los esteroides adrenales por el hígado [1,31].

Debido a estos efectos hepatotóxicos se ha convertido en práctica común administrar ésteres de la T en lugar de 17α AA en prácticamente todas las situaciones clínicas (excepto en el edema angioneurótico hereditario o en la osteoporosis, en las que el tratamiento de elección son el ES o DA). En particular, el empleo de 17α AA debe evitarse en los pacientes con enfermedad hepática [1,28-31].

I.2. MECANISMO DE ACCIÓN GENÓMICO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

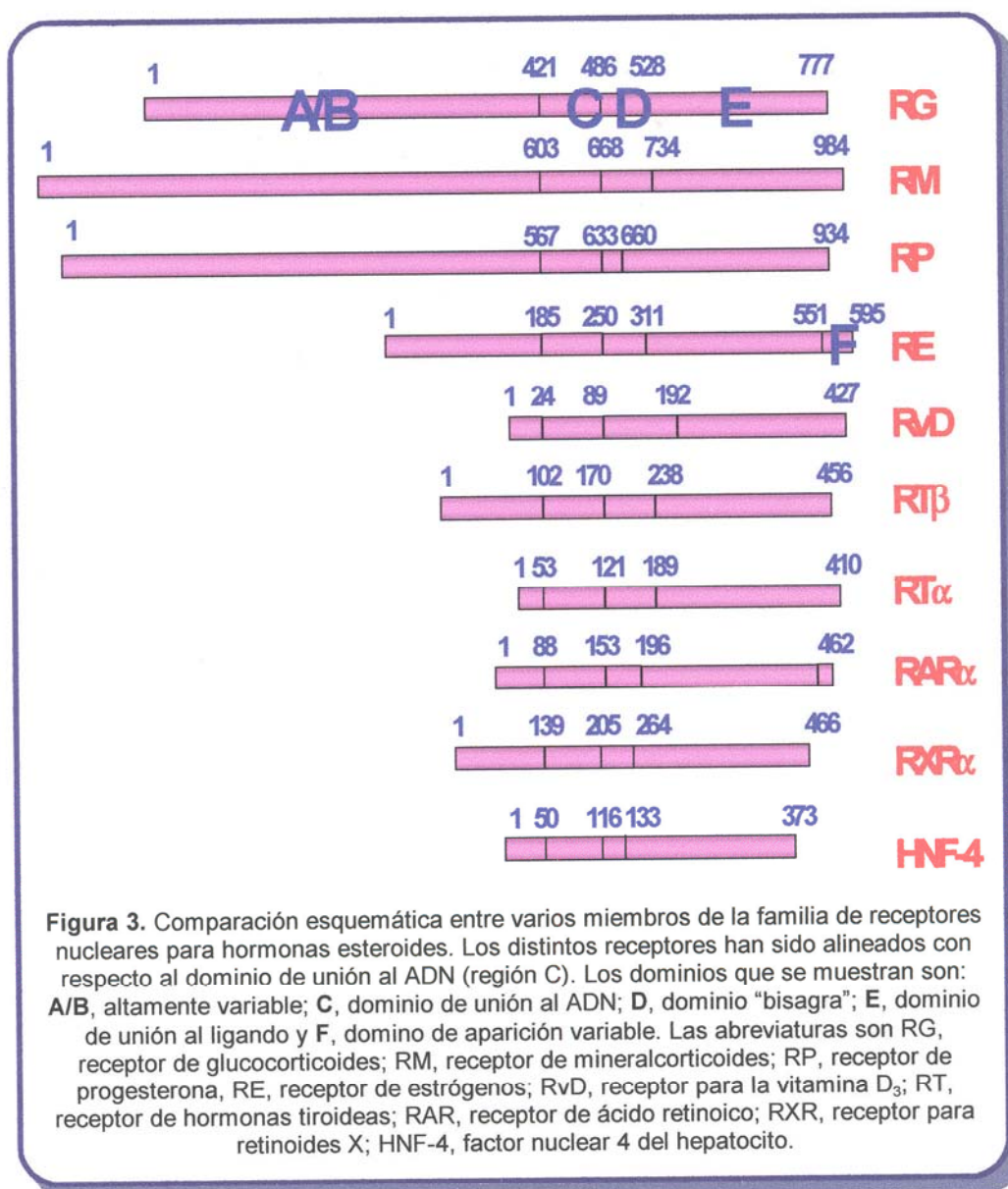
La superfamilia de los receptores para hormonas esteroideas incluye a los receptores para: glucocorticoides, mineralcorticoides, progestágenos, estrógenos, andrógenos, vitamina A y vitamina D₃. Todos los miembros de dicha superfamilia comparten características estructurales y funcionales similares, y tienen los dominios estructurales involucrados en la unión al ADN y al ligando altamente conservados entre sí. La activación de los receptores para hormonas esteroideas regula la actividad transcripcional de genes específicos, mediando de esta forma los denominados efectos clásicos, o genómicos, de los esteroideos [32-36].

Actualmente se acepta la idea de que los receptores para la mayoría de las hormonas esteroideas, incluyendo estrógenos [37-38], andrógenos [39-40], vitamina D [41] y ácido retinoico, están localizados en el núcleo, estén o no ocupados por la hormona. Para el caso de los receptores de progesterona y glucocorticoides existen referencias de localización tanto nuclear como citosólica de la forma libre, no unida a la hormona [42-47].

I.2.1. DOMINIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES INTRACELULARES PARA HORMONAS ESTEROIDES

Los ADNc de la mayoría de los receptores para hormonas esteroideas han sido clonados y secuenciados en los últimos años [48-49]. La idea de que los receptores para las hormonas esteroideas, tiroideas, vitamina D₃, y ácido retinoico pertenecen a una misma familia molecular surgió al constatarse la considerable homología en sus secuencias de aminoácidos [48]. Chambon y sus colaboradores [50-51] desarrollaron una nomenclatura muy útil para los diferentes dominios funcionales del receptor. En la Figura 3 se muestra la comparación entre los distintos miembros de la superfamilia.

El receptor se divide en seis partes, designadas con las letras A (extremo N-terminal) a F (extremo C-terminal). La **región A/B** es la más variable entre los distintos miembros. Existen numerosas evidencias de que este dominio contiene una función de activación capaz de activar la transcripción independientemente de la unión del ligando, pero que es específico de ciertos tipos celulares. Por ejemplo el receptor de estrógenos contiene en este dominio A/B una función denominada TAF-1, que activa constitutivamente la transcripción en fibroblastos embrionarios de pollo, pero no en células HeLa [52].

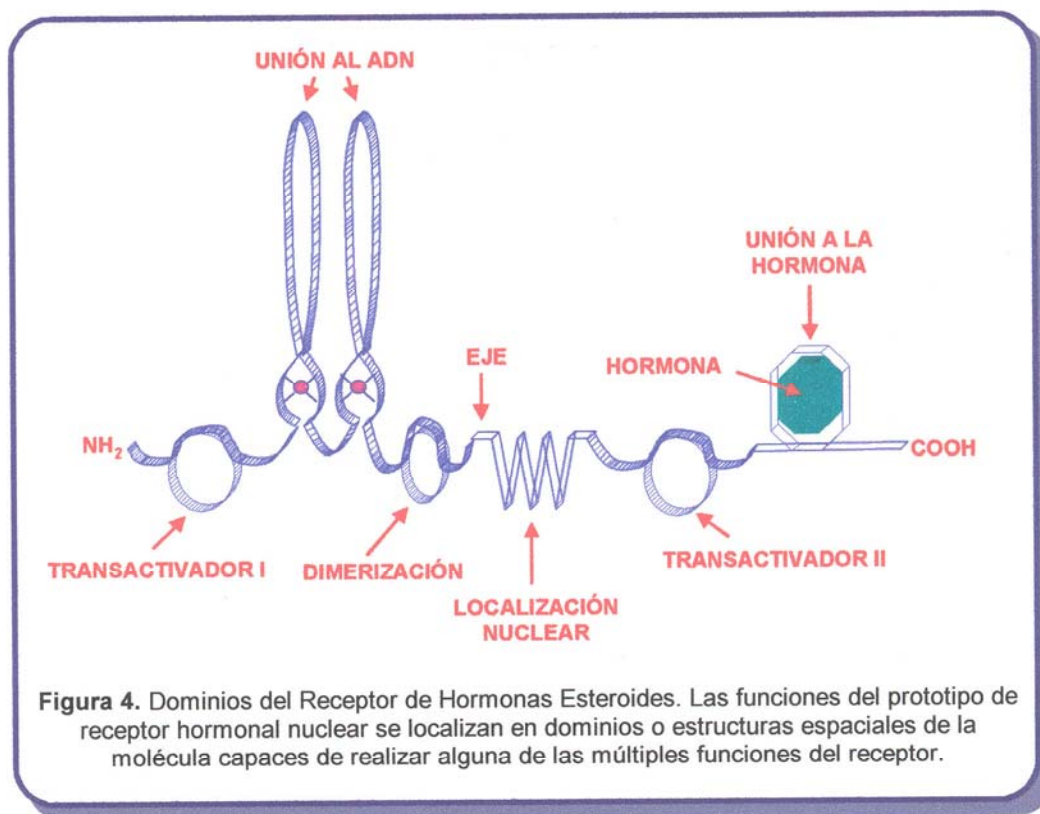


La **región C** es el dominio de unión al ADN. Es una región muy rica en residuos de cisteína, que se caracteriza porque se produce una interacción entre 4 cisteínas próximas con un átomo de zinc. Este átomo estabiliza la estructura mediante 4 enlaces de coordinación, formando lo que se conoce como "dedos de zinc" (2 por receptor) de 18-22 aminoácidos (AAs) separados entre sí por un grupo de 20 AAs espaciadores. El número exacto de AAs, así como la secuencia varía de un tipo de receptor a otro. La secuencia de esta región y, en concreto, de los dos dedos de zinc determina el reconocimiento específico del elemento de respuesta hormonal (ERH). Estos dedos de zinc proporcionan una arquitectura óptima para el reconocimiento entre secuencias específicas de AAs y nucleótidos. En el reconocimiento de cada pentámero del ERH participan dos grupos de AAs, uno de cada dedo de zinc. El primero

de ellos, o grupo proximal (P) de tres AAs localizados en el primer dedo de zinc es necesario para la identificación de la secuencia de nucleótidos primaria del ERH. El segundo, denominado distal (D), participa con otros tres AAs del segundo dedo de zinc y es necesario para el reconocimiento del segmento espaciador entre los dos pentámeros del elemento de respuesta hormonal [53].

La **región D**, hidrofóbica, es de longitud variable, y podría corresponder con una región "bisagra" entre la región C y la subsiguiente región E.

La **región E** es el dominio de unión al ligando propiamente dicho. Determina la especificidad del receptor y tiene que conservar plenamente su integridad para ser funcional [54]. Este dominio no sólo es importante para la unión del ligando, sino que juega un papel importante en la dimerización [55-56] y localización nuclear [57-58]. Es igualmente importante para la transactivación [59-61].



Finalmente, el extremo C-terminal del receptor, o **región F** no tiene una función claramente establecida hasta la fecha, ya que está ausente o bien no ha sido identificada en receptores de la superfamilia distintos del de estrógenos y el del ácido retinoico. En la Figura 4 se muestran de forma esquemática los diferentes dominios de un receptor nuclear tipo para

hormonas esteroideas.

En los últimos años la familia de los receptores para hormonas esteroideas se ha visto incrementada con la descripción de numerosas proteínas cuya estructura presenta un alto grado de homología en las distintas regiones que acabamos de describir. Estas proteínas se conocen con el nombre genérico de **receptores huérfanos** ya que no se conocen sus ligandos endógenos. El mayor grado de homología con la familia de receptores que acabamos de describir lo presentan en la región C, lo que indica claramente que son capaces de unirse al ADN. Otras regiones con un elevado grado de homología han sido identificados en la región E, lo cual sugiere que son capaces de unir ligandos, aunque estos no sean conocidos. Son numerosas las proteínas incluidas en este grupo, llegando a superar las 50 [62]. alguna de ellas, como el factor nuclear hepático 4 (HNF-4), denominada así por su elevada presencia en el hígado [63], es imprescindible para la transcripción de numerosos genes, como el de la apolipoproteína CIII [64], o la apolipoproteína de muy baja densidad [65].

1.2.2. INTERACCIÓN HORMONA-RECEPTOR

Las hormonas esteroideas entran en la célula diana por difusión pasiva a través de la membrana plasmática y se unen con elevada afinidad al receptor nuclear o citosólico. El receptor es entonces inducido a sufrir una transformación de forma que sea capaz de translocarse al núcleo y unirse específicamente a elementos específicos de ADN, localizados en los genes, que subsiguientemente activan los mecanismos de transcripción. La secuencia que acabamos de explicar es un mecanismo general válido para casi todos los miembros de la superfamilia [49,51,53]. No obstante se han encontrado diferencias significativas entre los distintos miembros. A continuación veremos someramente cada una de las etapas que siguen a la unión del esteroide al receptor.

1.2.2.1. El receptor en estado inactivo

La mayoría de los receptores para hormonas esteroideas que se encuentran en el interior de la célula están en forma inactiva con un coeficiente de sedimentación de 8-10S. Estos receptores son incapaces de unirse al ADN. La unión de la hormona transforma este complejo 8-10S inactivo, en una forma activa 4S (capaz de unirse al ADN). Mediante diversas manipulaciones *in vitro* (adición de hormona, tratamiento con concentraciones altas de sal, etc), es posible forzar esta transformación del complejo a la forma 4S del receptor. Es conocido el hecho de que en el complejo oligomérico 8-10S, el receptor está asociado con

varias proteínas como las denominadas genéricamente “Heat-Shock” (hsp), que incluyen distintos tipos: una de 90 kDa (hsp90) [66-67], otra de 70 kDa (hsp70) [68]; o la inmunofilina de 59 kDa denominada p59 [69-70]. Diversos estudios han permitido conocer que la estructura de los receptores de glucocorticoides, progestágenos y estrógenos es idéntica: una molécula de receptor, dos de hsp90, y una de p59 [71], mientras que en complejos 8-10S de otros receptores de hormonas esteroides ha sido posible la identificación *in vitro* de la hsp70 [72].

La unión de la hormona transforma el receptor, de forma que se libera de las proteínas que le acompañan, disminuyendo entonces el coeficiente de sedimentación hasta 4S, que corresponde con el monómero de receptor [72].

De lo expuesto anteriormente se deduce que la desmantelación de la estructura del receptor nativo que se produce tras la unión del esteroide al complejo es un paso necesario para que el receptor pueda unirse al ADN, probablemente debido a que las proteínas acompañantes enmascaran las regiones de unión al ADN del receptor. Durante años se pensó que el principal papel del esteroide en la activación del receptor era la disociación de las proteínas acompañantes del complejo nativo. Trabajos como el de Bagchi [73] en el que el receptor de progesterona liberado *in vitro* de las proteínas acompañantes, era incapaz de unirse al ADN en ausencia de la hormona demostraron que debía haber otros mecanismos adicionales por los que el receptor nativo se convierte en una forma competente tras la unión de la hormona, como la fosforilación del receptor ADN-dependiente [74-75] o la disociación de proteínas inhibitoras adicionales [76].

1.2.2.2. Cambio conformacional del receptor

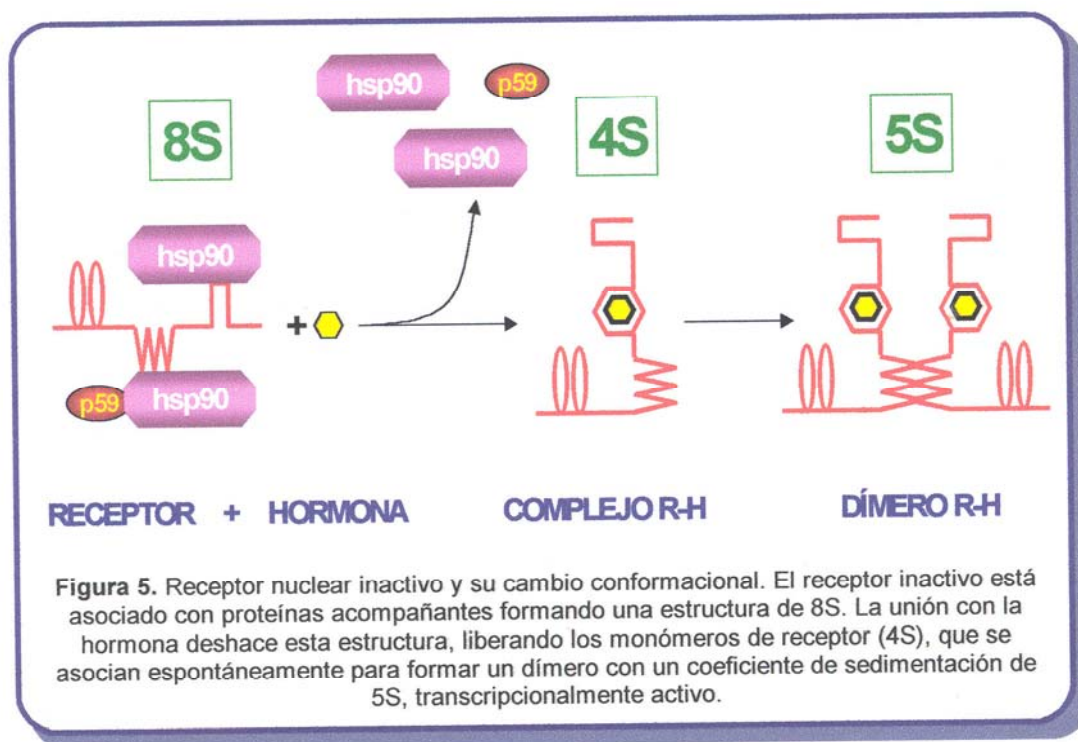
Experimentos de digestión con proteasas del receptor de progesterona en presencia o ausencia de la hormona demostraron que existe un cambio conformacional en la estructura del receptor tras la unión del ligando, que le permite unirse al ADN [77]. La existencia de este cambio conformacional fue demostrada también para los receptores de glucocorticoides, hormona tiroidea, ácido retinoico y estrógenos. En todos estos casos, tras su unión con el ligando, el receptor mostró una elevada resistencia al tratamiento con proteasas, lo que sugiere que la unión con la hormona hace que el receptor adopte una estructura compacta que protege el dominio de unión, cosa que no ocurre en ausencia del ligando. Este cambio de conformación puede ser responsable de la liberación de las proteínas acompañantes así como de facilitar la unión al ADN, desenmascarando el dominio de unión al mismo.

Otra característica común de los receptores de hormonas esteroides es la de formar

estructuras diméricas (5S). La formación de dímeros de receptor es un proceso que facilita la fijación de otros componentes de la maquinaria transcripcional, y la iniciación de la transcripción. La unión de la hormona al receptor es necesaria para que se produzca esta dimerización, probablemente debida también al cambio conformacional, de forma que se exponen los dominios de dimerización.

El cambio de conformación estructural del receptor tras la unión del ligando también se produce cuando se unen antagonistas hormonales. En este caso es posible la unión del complejo al ADN, pero la disposición del extremo C-terminal, impide la activación génica, y por consiguiente el inicio de la transcripción [78-79].

En la Figura 5 se esquematiza el cambio conformacional del receptor y su dimerización (Modificado de Díaz-Chico y Navarro [53]).



I.2.3. INTERACCIÓN RECEPTOR-GENOMA (Elementos de Respuesta Hormonal)

Como ya hemos comentado, los receptores de hormonas esteroides, en ausencia de hormona, tienen una escasa afinidad por las estructuras nucleares. Tras la unión de la hormona al receptor, seguida de la activación del mismo, el complejo hormona-receptor puede unirse a regiones específicas del ADN, designadas genéricamente como elementos de respuesta hormonal (ERHs). La mayoría de estas regiones del ADN consisten en secuencias palindrómicas, constituidas por una repetición invertida de dos semi-sitios separados por un espaciador de 1-3 nucleótidos. Los receptores de glucocorticoides, mineralcorticoides, andrógenos, y progesterona reconocen las repeticiones TGTTCT [80-81], formando la subfamilia del receptor de glucocorticoides. Los receptores de estrógenos, hormona tiroidea, ácido retinoico, retinoide X, y vitamina D, forman la subfamilia estrógeno-tiroidea, que reconoce el palíndromo formado por AGGTCA [82].

I.2.4. REGULACIÓN HORMONAL DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA

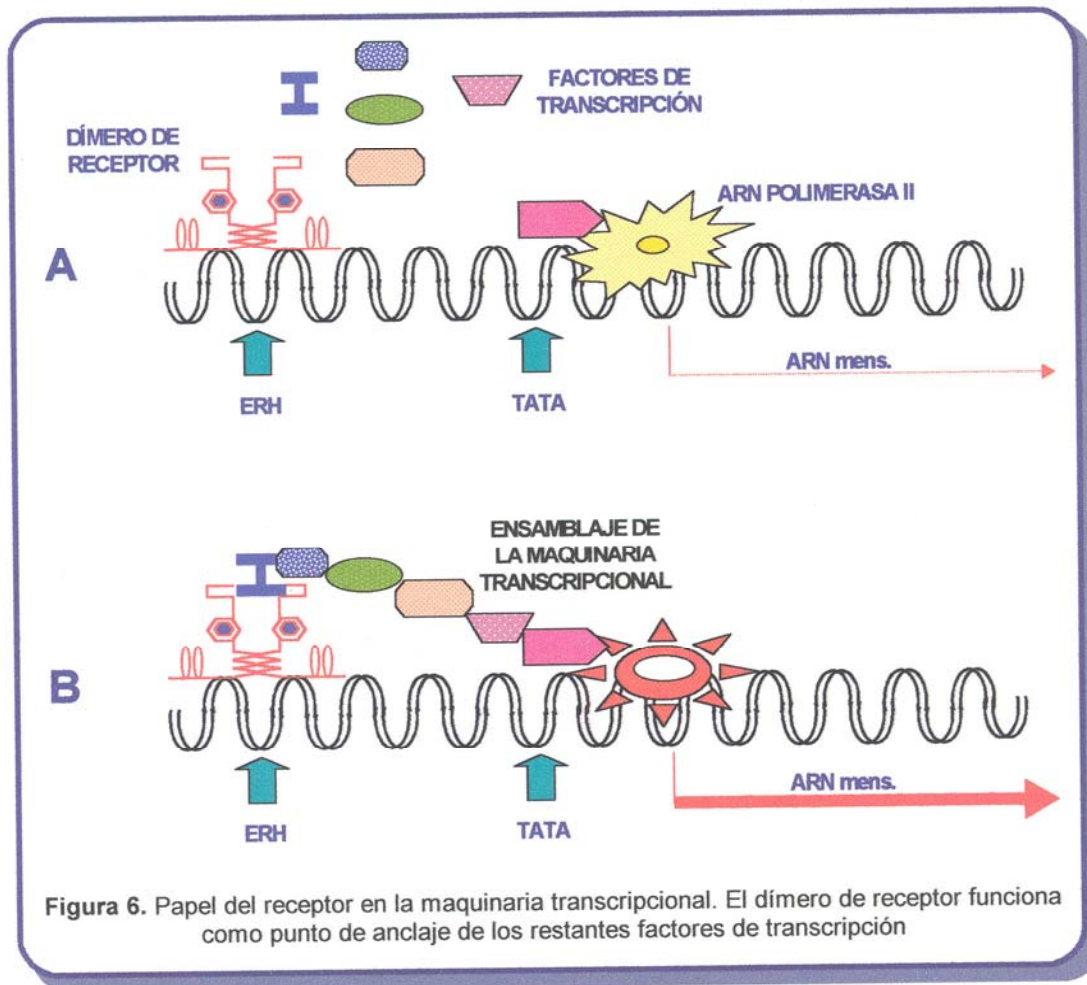
La etapa final de la acción de las hormonas esteroides estriba en la modificación de la transcripción génica. La participación de los receptores nucleares tiene lugar mediante dominios específicos de la molécula de receptor conocidas como **transactivadores** (abreviatura de activadores de la transcripción). Estos dominios están constituidos por secuencias específicas de aminoácidos que interactúan mediante contacto proteína-proteína con los factores de transcripción [53]. Existen para la mayoría de los miembros de la superfamilia, al menos dos de estas regiones de transactivación (Figura 4): un dominio constitutivo localizado en la región A/B, independiente de la unión a la hormona, y un dominio inducido por ligando en la región E.

Cuando el complejo hormona-receptor encuentra su ERH se forma una unión con una afinidad muy alta, y se inicia una serie muy rápida de acontecimientos: la unión del dímero de receptor-hormona al ADN, provoca una curvatura del mismo, lo cual facilita la unión de la ARN polimerasa II, que accede a una secuencia del ADN, rica en TATA que siempre se encuentra a menos de 100 nucleótidos del ERH. La ARN polimerasa II atrae algunos factores de transcripción, y forma el complejo pre-iniciador de la transcripción, sobre la secuencia TATA [83]. El dímero de receptor, asociado al ERH, también atrae factores de transcripción con los que se une mediante interacción proteína-proteína, con lo que se produce el ensamblaje correcto de la maquinaria de transcripción génica.

Existen evidencias recientes de que existe algún factor represor de la transcripción

génica, que es liberado de su unión al ADN cuando el complejo dímero de receptor-hormona se une a su ERH, permitiendo así la unión correcta de los factores de transcripción al receptor, formando la cadena que conduce al inicio de la transcripción del gen.

En la Figura 6 se esquematiza el proceso de inicio de la transcripción (Modificado de Díaz-Chico y Navarro [53]).



I.3. EFECTOS NO GENÓMICOS DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Una larga serie de experimentos llevados a cabo en distintos sistemas celulares han sugerido la existencia de efectos de los esteroides que no pueden ser explicados por el modelo clásico de interacción del esteroide con el tipo de receptor nuclear que acabamos de ver. Estos efectos pueden ser explicados por la existencia de receptores generadores de señal localizados en las membranas celulares, y han recibido el nombre genérico de **efectos no genómicos de las hormonas esteroides**. En general estos efectos no genómicos tienen las siguientes características [84]:

1. Son demasiado rápidos (de segundos a minutos) como para ser compatibles con la síntesis de ARNm y de nuevas proteínas.
2. Pueden ser observados en células muy especializadas, que no involucran la síntesis de ARNm y proteínas (p.e. espermatozoides), o en clones celulares con pérdida de los receptores nucleares para hormonas esteroides.
3. Se manifiestan incluso en presencia de esteroides que han sido acoplados con moléculas de alto peso molecular que los inhabilitan para pasar a través de la membrana, y por consiguiente no penetran en la célula .
4. No son inhibidos por tratamientos con inhibidores de la síntesis de ARNm (p.e. actinomicina D) o de la síntesis proteica (p.e. cicloheximida).
5. No son inhibidos por antagonistas de los receptores clásicos (genómicos) de las hormonas esteroides.
6. Son altamente específicos, como lo demuestra el hecho de que esteroides con estructuras químicas semejantes, pero no idénticas, los ejerzan con distintos grados de potencia.

Las hormonas esteroides a dosis suprafisiológicas (farmacológicas) también poseen ciertos efectos no genómicos inespecíficos, debidos probablemente a interacción de dichos esteroides con proteínas inespecíficas y/o lípidos de membrana [85-86], pero no nos referiremos a ellos en esta Introducción. En la actualidad se han imputado numerosos efectos no genómicos a todos los grupos de esteroides. Veremos a continuación los principales efectos no genómicos que han sido atribuidos a los distintos grupos de esteroides y moléculas relacionadas con esta superfamilia de hormonas.

1.3.1. NEUROESTEROIDES

El término *neuroesteroide* ha sido acuñado para moléculas como el 5 α -pregnan-3 α ,21-diol-20-ona, o la pregnenolona provistos de ciertos efectos neurológicos como la liberación de GnRH tras su aplicación local [87]. El neuroesteroide 5 α -pregnan-3 α ,21-diol-20-ona aplicado en preparaciones *in vitro* de neuronas piramidales de neocortex de rata, produce un incremento del potencial inhibitor postsináptico temprano mediado por GABA_A en más de un 700%, mientras que la excitación sináptica y los parámetros de excitabilidad eléctrica permanecen inalterables [88]. Los antagonistas de la progesterona que interfieren con la unión de la hormona con sus receptores intracelulares (p.e., mifepristona) no bloquean estos efectos [88].

Por otro lado, también son conocidos los efectos analgésicos de algunos esteroides, como por ejemplo la progesterona, que parecen estar mediados por el complejo del receptor GABA_A. Este efecto podría implicar a un lugar de unión específico para esteroides en el receptor de GABA_A [158], que potenciaría el efecto del GABA, por un mecanismo de cooperativismo positivo [89].

1.3.2. MINERALCORTICOIDES

Diferentes efectos no genómicos (insensibles al efecto de la actinomicina D o la cicloheximida) han sido atribuidos a la aldosterona: incremento en el flujo de sodio en el músculo liso arterial de rata [90,94]; incremento rápido de calcio intracelular en vejiga de sapo [91] o en linfocitos [92] y cambios del pH intracelular en el túbulo distal del riñón de sapo [93]. Estos efectos ha sido atribuidos a un incremento de actividad de la bomba de protones, ya que son eficientemente bloqueados por la amilorida. La aldosterona (o algunos análogos suyos como la fludrocortisona) además produce cambios en la concentración intracelular de electrolitos, volumen celular o activación de la bomba de protones en diferentes sistemas celulares: leucocitos mononucleares humanos en sólo 1-2 minutos de incubación [92] o en células endoteliales de aorta porcina [95,96].

Muchos de estos efectos rápidos de la aldosterona y sus análogos parecen estar mediados por la hidrólisis de fosfatidilinosítoles, que generan inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) como importantes segundos mensajeros.

I.3.3. GLUCOCORTICOIDES

En el caso de los glucocorticoides también se han descrito numerosos efectos no genómicos, como la rápida supresión de la liberación de prolactina en la pituitaria de cíclidos, atribuida al efecto del cortisol sobre los niveles de AMPc y calcio intracelular [97]. También han sido descritos algunos cambios rápidos en el comportamiento del anfibio *Taricha granulosa*, probablemente como consecuencia de la interacción de la corticosterona con un receptor localizado en la membrana neuronal [98-99].

El mecanismo por el que altas dosis de glucocorticoides tienen un efecto anti-anafiláctico no ha sido bien definido, pero es probable que sea otro efecto no genómico, ya que ocurre en pocos minutos y es resistente a la actinomicina D. No obstante también es posible que se trate de un efecto inespecífico.

I.3.4. ESTRÓGENOS

Cada vez hay más evidencias que indican que los estrógenos inducen numerosos efectos fisiológicos sobre distintos tipos celulares de tejidos reproductivos y no reproductivos, que son demasiado rápidos como para ser mediados por la activación genómica. Entre los efectos sobre tejidos no reproductivos más importantes cabe destacar la relajación aguda que producen el $17\alpha\text{-E}_2$ ($17\alpha\text{-E}_2$) o el Etinilestradiol (EE_2) sobre las arterias coronarias humanas o de cerdo in vivo [100].

En los tejidos reproductivos son más numerosas las referencias de efectos no genómicos de los estrógenos. Así en las células de la granulosa la Estrona (E_3) o el $17\alpha\text{-E}_2$ provocan un aumento de 4-8 veces en la concentración intracelular de calcio. Este efecto que se produce en menos de 5 segundos no se ve afectado por la presencia de antagonistas de receptor de estrógenos (RE) como el tamoxifeno o por bloqueantes de la síntesis proteica como la cicloheximida o del ARNm, como la actinomicina D [101]. Este aumento de la concentración del calcio intracelular parece ser debido a la liberación del mismo a partir de los compartimentos intracelulares, vía IP_3 tras una hidrólisis de fosfatidilinositoles presentes en la superficie celular [102] mediada por el receptor de estrógenos (RE). Este aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células de la granulosa mediado por estrógenos pudiera ser un importante mecanismo regulador, capaz de afectar la secreción de factores autocrinos o paracrinos sensibles al Ca^{2+} (como el $\text{TGF-}\alpha$), estimular la proliferación celular, modular la función de proteínas señalizadoras como la calmodulina, etc.

En las células endometriales, el $17\beta\text{-E}_2$ estimula también la entrada de Ca^{2+} [103], pero produce además cambios morfológicos muy rápidos (< 1 minuto), como un incremento en la longitud y densidad de las microvellosidades [104] parecido al que se produce bajo la acción de factores de crecimiento peptídicos tras la interacción con sus receptores en la superficie celular.

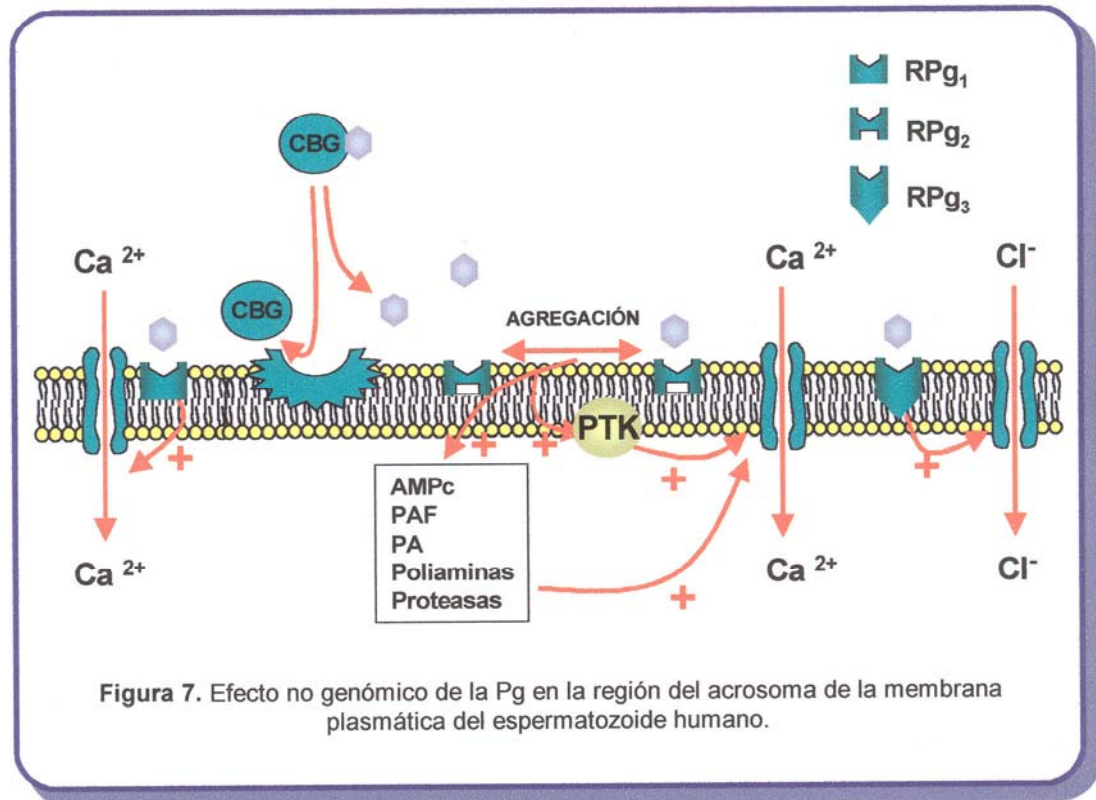
También hay abundantes referencias en la literatura acerca de efectos no genómicos de los estrógenos sobre los gametos. Así bajo la acción del $17\beta\text{-E}_2$ conjugado con BSA (incapaz de atravesar la membrana), los oocitos en el estadio de vesícula germinal experimentan una mejor maduración citoplasmática que hace que cuando son inseminados *in vitro* exista un mayor número y mejor desarrollo de los embriones resultantes [105]. Por su lado, los espermatozoides, en presencia de ese mismo estrógeno, incrementan su motilidad, el consumo de oxígeno, la producción de lactato, y la metabolización de numerosos substratos [106-108], efectos todos ellos considerados como no genómicos, dado que el ADN de los espermatozoides está densamente empaquetado lo que permite una síntesis de proteínas muy pobre y limitada a las mitocondrias.

1.3.5. PROGESTERONA

Quizás se trata de la hormona esteroide a la que se atribuyen mayor número de acciones no genómicas, o al menos mejor relacionadas con efectos fisiológicos concretos. Ejemplos de estos efectos fisiológicos claramente establecidos de la progesterona (Pg) son el efecto sobre la maduración del oocito [109] o en la reacción del acrosoma del espermatozoide [110], células ambas provistas de receptores específicos de membrana para dicho esteroide [111]. La acción de la Pg sobre la maduración del oocito ha sido catalogada como no genómica en relación con sus efectos sobre el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la entrada de cloro en la célula [109]. No obstante el mecanismo exacto por el que se produce la salida del oocito del estado de profase no se conoce, pero parece estar implicada la inactivación de una proteína quinasa dependiente de AMPc, cuyos niveles disminuyen rápidamente en el interior del oocito tras la adición *in vitro* de Pg (por inhibición selectiva de una adenilato-ciclase unida a membrana) [112].

La membrana del espermatozoide es capaz de unir Pg y esta acción ha sido relacionada con la reacción del acrosoma, ya que la distribución de receptores para dicha hormona parece estar limitada a la región acrosomal de la membrana, según se ha constatado por microscopía de fluorescencia [113]. Este rápido efecto del esteroide parece estar mediado por un triple mecanismo: activación directa de un canal de Ca^{2+} (presuntamente un canal

dependiente de receptor, similar al que se describe para los efectos rápidos, extragenómicos de la aldosterona), una estimulación directa de una tirosina quinasa (PTK) en la membrana plasmática del espermatozoide acoplada con otro canal de Ca^{2+} , y la apertura de un canal de Cl^- [84]. Los datos experimentales sugieren la existencia de tres tipos distintos de receptor para Pg en la membrana del espermatozoide (Figura 7).



El mecanismo de acción de la Pg en la reacción del acrosoma parece implicarlos a los tres. La Pg llega a las inmediaciones de la membrana del espermatozoide unida a CBG, donde es liberada bajo la acción de un enzima anclado en la membrana. De esta forma aumenta mucho la concentración local de esteroide que se une a sus receptores específicos. Por un lado actúa directamente sobre un canal de Ca^{2+} independiente de voltaje, tras unirse al receptor de Pg tipo 1 (RPg_1). Esta interacción Pg- RPg_1 provoca una rápida entrada (segundos) de Ca^{2+} . Esta cantidad de Ca^{2+} no es suficiente como para iniciar la reacción del acrosoma. No obstante, al mismo tiempo la Pg reacciona con un segundo tipo de receptor de membrana (RPg_2), que tras la unión del ligando sufre una agregación y estimula una PTK que permite la apertura de un canal de Ca^{2+} -PTK dependiente, tanto de forma directa, como mediante la activación de una cascada de señalización que involucra distintos tipos de mensajeros intracelulares (Figura 7). La activación simultánea de estos dos tipos de canales

de Ca^{2+} sí que es capaz de iniciar la exocitosis del acrosoma. Un tercer tipo de receptor (RPg_3), acoplado con un canal de Cl^- , parece mediar la entrada de Cl^- que tiene lugar durante la reacción del acrosoma [84].

Otros efectos no genómicos de la progesterona incluyen el control del comportamiento de apareo en hembras de hamster [114], efectos sobre el flujo de calcio y potasio en hepatocitos de rata [115], etc.

I.3.6. ANDRÓGENOS

La T cuando es aplicada in vitro a cultivos de osteoblastos de rata produce un rápido incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, incrementando la entrada de Ca^{2+} en el interior de la célula y aumentando la liberación del mismo desde los compartimentos intracelulares [116]. Además produce un incremento en la formación de IP_3 y DAG. Este efecto se observa también con T conjugada con BSA así como en presencia de un antagonista del receptor de andrógenos como la ciproterona acetato. Todas estas evidencias sugieren un mecanismo de acción no genómico mediado por la existencia en los osteoblastos de receptores de membrana para la T que podrían estar acoplados a una fosfolipasa C, vía proteína G [116].

En células de Sertoli recién aisladas se comprueba un incremento similar en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, IP_3 , y DAG como respuesta rápida (20-40 segundos) a la T y 5α -DHT. Este efecto, sin embargo, es inhibido por preincubación con el antiandrógeno no esteroide hidroxiflutamida, o el inhibidor de 5α -reductasa finasterida [117], indicando que la T ejerce su efecto mediado por receptor al menos en parte tras ser convertida a 5α -DHT. Sin embargo, el hecho de que la T conjugada con BSA, continúe teniendo un efecto claro sobre el incremento rápido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sugiere que el efecto de T y 5α -DHT puede estar mediado por los receptores de la membrana plasmática [117].

I.3.7. VITAMINA D_3 Y T_3

Tanto la vitamina D_3 como la triyodotironina (T_3) actúan a nivel genómico mediante receptores que como ya hemos visto pertenecen a la superfamilia de los receptores intracelulares para esteroides, pero también en este caso existen acciones rápidas, no genómicas, en varios tipos celulares.

La principal acción no genómica atribuida directamente a la vitamina D_3 es el

incremento de $[Ca^{2+}]_i$, ya sea por aumento de la entrada y/o de la liberación del mismo desde compartimentos intracelulares, dependiendo del tipo celular [118]. En los mioblastos de pollo, este efecto parece estar mediado por el aumento de los niveles de IP_3 y DAG [119], mientras que en los fibroblastos humanos se ha comprobado un rápido incremento de GMPc [120]. Por otro lado, distintos experimentos llevados a cabo en cultivos de células pancreáticas beta, usando inhibidores selectivos de canales de Ca^{2+} , han permitido formular la hipótesis de que existe un receptor de membrana para Vitamina D_3 , que está acoplado a un canal de Ca^{2+} [121].

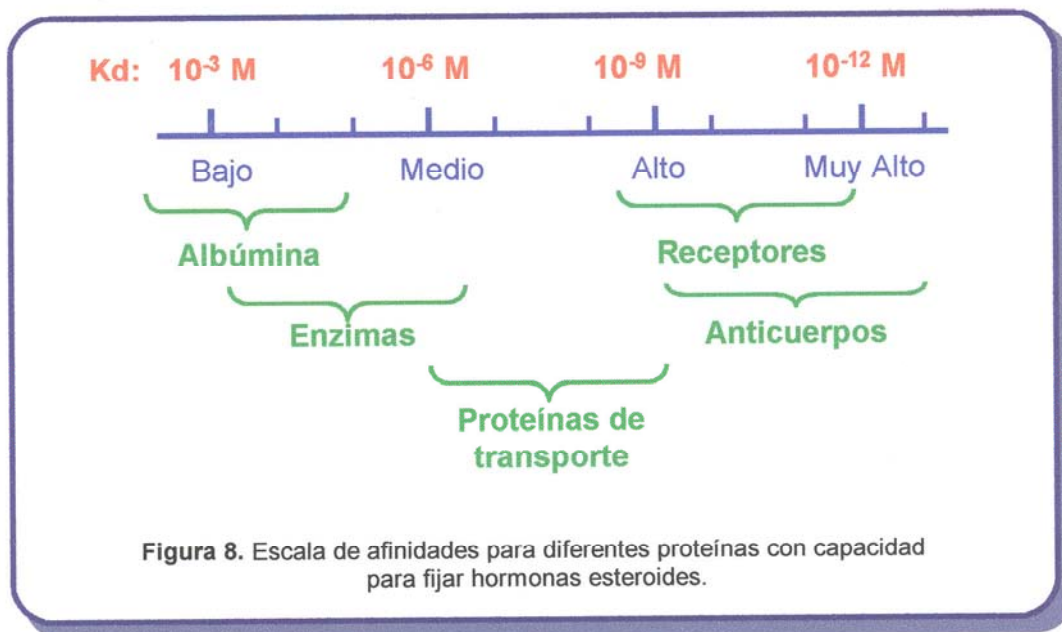
Por otro lado, la T_3 también promueve un rápido incremento del $[Ca^{2+}]_i$ en varios tipos celulares: timocitos [122], hepatocitos de rata [123], o miocitos de rata [124] entre otros.

I.4. LUGARES DE UNIÓN MEMBRANALES PARA HORMONAS ESTEROIDES

Como acabamos de ver los efectos rápidos que se producen en los diferentes tejidos como respuesta a la acción de las hormonas esteroideas, difieren en gran medida de los efectos clásicos de estas hormonas, mediados por los receptores intracelulares. La existencia de fijación específica de hormonas esteroideas a las membranas celulares nos indica que puedan existir receptores específicos para estas hormonas que explicarían los efectos extragenómicos que acabamos de describir. No obstante, el papel de estas proteínas de membrana fijadoras de esteroideas no ha sido claramente establecido, y su función podría responder a varias hipótesis:

- a. Estas proteínas fijadoras de esteroideas podrían ser una forma intermedia o “naciente” del receptor, y su presencia en la fracción microsomal se relacionaría con la síntesis proteica que se lleva a cabo a este nivel [125].
- b. Proteínas transportadoras de esteroideas a través de la membrana. Como se observa en la Figura 8, la afinidad que muestran las hormonas esteroideas por estas proteínas de membrana (K_d entre 10 y 100 nM), entra dentro del rango de afinidad de las proteínas transportadoras por las hormonas esteroideas [126]. El lugar de unión para corticosterona ha sido caracterizado por el grupo de Trueba y colaboradores como una de estas proteínas transportadoras [218,250,251].
- c. Enzimas que participan en el metabolismo de las hormonas esteroideas, tales como las isoenzimas del citocromo P450, las sulfatasas o las sulfotransferasas. No obstante, la afinidad de estas enzimas por sus sustratos esteroideas es del orden micromolar (Figura 8), muy inferior a la que muestran las hormonas esteroideas por las proteínas de membrana [126,127]
- d. Finalmente, la hipótesis más atractiva, y que más fuerza ha tomado en los últimos años, es que efectivamente pudiera tratarse de verdaderos receptores de membrana que mediarían los efectos rápidos (no genómicos) de las hormonas esteroideas. Para demostrar esta posibilidad, es necesario encontrar para cada uno de estos receptores una señal intracelular, desencadenada por la unión del ligando. Como acabamos de describir en el apartado anterior, cada vez hay más evidencias que apoyan esta hipótesis, y mayor número de estas señales intracelulares desencadenadas rápidamente por la hormona.

Quizás los casos más claros, sean los del receptor de membrana para la vitamina D₃, que por mediación de una proteína G, activa la apertura de canales de Ca²⁺ [120,121,128], o en la reacción acrosómica que se desencadena tras la unión de la Pg a sus receptores de membrana en el espermatozoide humano que activan la apertura de distintos canales de Ca²⁺ y Cl⁻ [84].



Se han descrito lugares de unión membranales para casi todos los grupos de hormonas esteroides. No obstante, la clonación de la primera proteína de este tipo aún no se ha conseguido, y sigue siendo el gran objetivo pendiente en este campo de investigación. Este hecho permitiría a los investigadores conocer los agonistas, buscar los antagonistas, y estudiar los mecanismos de señalización intracelular que se desencadenan, de forma que se puedan validar las hipótesis que se han formulado partiendo de los datos obtenidos por el método tradicional del ensayo de intercambio con ligando radiactivo, y de la fisiología celular. A continuación describimos los principales lugares de unión de membrana que han sido caracterizados para los distintos grupos de hormonas esteroides.

1.4.1. LUGAR DE UNIÓN MEMBRANAL PARA ESTRÓGENOS

Existen desde hace varios años numerosas evidencias de fijación específica de los estrógenos a la membrana plasmática de distintos tejidos diana (miometrio, hígado, células

MCF-7, espermatozoides humanos) con una K_d en torno a 1 nM [129-132], o más recientemente en membrana plasmática de pituitaria o en neuronas hipotalámicas (K_d de 0.04-0.4 nM) [133]. Precisamente en líneas celulares de tumor de pituitaria de rata se ha demostrado, usando anticuerpos frente a la región "eje" del receptor nuclear de estrógenos, la existencia de proteínas análogas a dicho receptor [134], pero de localización membranaral. La localización membranaral fue caracterizada usando conjugados fluorescentes estrógeno-BSA [131].

En nuestro grupo hemos caracterizado la existencia de una proteína microsomal que capta específicamente 17α -EE₂ y otros estrógenos sintéticos pero no estrógenos naturales ni antiestrógenos [135]. Estos estrógenos sintéticos tienen a nivel hepático efectos muy diferentes de los que han sido descritos para los estrógenos naturales, entre los que se incluyen la inducción de adenomas hepatocelulares o la capacidad de modificar la expresión de ciertos isoenzimas del citocromo P450 [136-137]. Precisamente este último dato, así como evidencias publicadas por otros autores de que el 17α -EE₂ interactúa con las enzimas microsomales dependientes del citocromo P450 [138-139], podrían hacer pensar que la proteína microsomal que nosotros describimos podría ser uno de estos enzimas metabolizadores. Sin embargo, ni las propiedades de fijación del ligando, ni la ontogenia, ni los datos de la regulación endocrina que nosotros hemos obtenido [135, 140-141], coinciden con los anteriormente publicados para cualquiera de los enzimas dependientes del citocromo P450 [142]. Por otro lado, dosis farmacológicas de 17α -EE₂ reducen la actividad general del citocromo P450 [137], mientras que en este caso el tratamiento con el esteroide produce una inducción del propio lugar de unión [135, 143-144]. Todos estos datos sugieren que el 17α -EE₂ podría ejercer sus acciones no sólo mediante su unión al RE, sino que quizá estas otras proteínas modularían sus efectos bien a nivel genómico o mediante alguno de los mecanismos no genómicos que describimos en esta introducción [135].

I.4.2. LUGARES DE UNIÓN MEMBRANALES PARA ANTIESTRÓGENOS (AEBS)

Los antiestrógenos, como el tamoxifeno, son ampliamente usados en el tratamiento del cáncer de mama. El mecanismo de acción de estos antiestrógenos tradicionalmente se ha atribuido a su interacción con el RE [145]. No obstante, existen evidencias de procesos independientes del RE llevados a cabo por altas dosis de antiestrógenos, como la detención de las células tumorales en la fase G₁ del ciclo celular [146], el antagonismo que ejercen sobre la calmodulina [147], o el efecto inhibitorio que tienen sobre la PKC [148].

Aparte de su unión con el RE, los antiestrógenos se unen con alta afinidad a otro tipo

de lugar de unión, incapaz de fijar estrógenos: los lugares de unión para antiestrógenos o AEBS (*Antiestrogen Binding Sites*) [149-150]. Los AEBS son proteínas ancladas en la membrana de la fracción microsomal de numerosos tejidos, siendo particularmente elevada su concentración en hígado [151-152]. En dicho tejido se ha descrito la existencia de un ligando endógeno para este lugar de unión, aunque no se conoce ni su naturaleza ni su función biológica [153].

A pesar de que son numerosos los datos que se tienen acerca de los AEBS, su papel fisiológico no ha podido ser claramente establecido, aunque es posible que interfieran con el tratamiento del cáncer de mama mediante “secuestro” del tamoxifeno administrado o de sus metabolitos activos [154].

1.4.3. LUGARES DE UNIÓN DE MEMBRANA PARA PROGESTERONA

La fijación específica de Pg a la membrana de los oocitos de *X. laevis* fue una de las primeras en describirse, habiéndose identificado en dichas membranas lugares de unión específicos, así como incremento de varios segundos mensajeros (AMPc y $[Ca^{2+}]_i$) como respuesta rápida al efecto de la Pg en estas células, y todo esto se ha relacionado con un efecto fisiológico como ya hemos descrito: la maduración del oocito [155, 109].

En los gametos masculinos también se han identificado lugares de unión específicos para Pg en la membrana. Como ya hemos visto han sido descritos al menos tres lugares de unión diferentes mediante el uso Pg-iodinada conjugada con BSA [111, 156], que parecen mediar incrementos de los niveles de varios segundos mensajeros, y a los que también se ha atribuido un papel fisiológico en la reacción del acrosoma [84].

Pero no sólo en los tejidos reproductivos han sido identificados lugares de unión de membrana para la Pg o progestágenos en general. Ya hablamos en el apartado anterior de los efectos no genómicos de algunos progestágenos que recibían el nombre genérico de *neuroesteroides* por sus efectos específicos a nivel del S.N.C. [87-88]. Diversos trabajos han identificado lugares de unión membranales para Pg en tejidos del S.N.C. Büküsoglu y colaboradores [157] identifican 4 bandas marcadas con un análogo de la Pg en membranas de cerebro de ratón, con pesos moleculares en el rango de 29 a 64 KDa. Por otro lado la fijación específica de la pregnenolona a las membranas cerebrales de rata ha sido explicada, como ya vimos, como interacción del ligando con un lugar específico en el receptor GABA_A [158].

En el año 1982, Yamada y colaboradores demostraron la existencia de una proteína presente en los microsomas de tejido hepático de rata que fija Pg con alta afinidad y alta capacidad [159]. Esta proteína, que no es detectada en el citosol, presenta además una alta especificidad, según se demostró en un trabajo posterior en el que era capaz de unir tan sólo a 6 moléculas análogas a la Pg, de entre más de 100 competidores ensayados [160]. También en microsomas hepáticos de cerdo se ha detectado un lugar de unión específico para Pg, que el grupo de Wehling en 1996 consiguió solubilizar en estado funcional, purificar y secuenciar parcialmente [161]. La secuencia aminoacídica que obtuvieron no presentó analogía con ningún otro receptor de membrana conocido, y desde luego es un avance muy prometedor de cara a la clonación del gen que codifica para este receptor [161].

Por otro lado se ha demostrado que determinados esteroides, pero en particular la Pg, se une también con alta afinidad a los denominados receptores *sigma* [162]. Estos receptores se caracterizan por su capacidad de unir con alta afinidad varias drogas no relacionadas químicamente [163], y se ha propuesto la existencia de al menos dos subtipos, habiéndose sugerido que la Pg pudiera ser el ligando endógeno para uno de ellos [164]. Estos receptores *sigma* han sido localizados en numerosos tejidos, como el cerebro de cobaya o en el bazo, pero son particularmente abundantes en la fracción microsomal del hígado de rata adulta [165]. Aunque recientemente se ha conseguido purificar, clonar y expresar estos receptores, su papel fisiológico no ha podido ser establecido [166]. Lo que sí ha podido ser demostrado es que ambos lugares, el receptor *sigma* y el lugar de unión específico microsomal para Pg, son estructuras muy relacionadas, y ha quedado descartado que puedan ser isoformas del citocromo P450, o de otras enzimas metabolizadoras de drogas o de esteroides [167]

I.4.4. LUGARES DE UNIÓN DE MEMBRANA PARA VITAMINA D₃

Han sido descritos lugares de membrana específicos para la vitamina D₃ en epitelio intestinal de pollo [168], y en osteoblastos ROS 24/1 [169] y existe una correlación convincente entre la unión de análogos de vitamina D₃ a estas proteínas solubilizadas y una rápida estimulación del transporte de Ca²⁺. La lista de efectos no genómicos relacionada con estas hormonas es bastante amplia [118-121, 170-173] y aunque no han podido ser identificados salvo en unos pocos casos, todo parece sugerir la existencia de receptores de membrana específicos para la vitamina D₃ y su análogos.

I.4.5. LUGARES DE UNIÓN MEMBRANALES PARA TRIYODOTIRONINA (T_3)

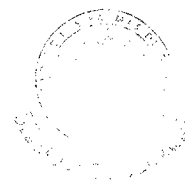
Existen numerosas evidencias de acciones no-genómicas de las hormonas tiroideas descritas a nivel de la membrana plasmática, citoesqueleto, citoplasma, y orgánulos celulares [174-176]. Por otro lado en la membrana placentaria humana y en membranas de hígado de rata se han descrito lugares de alta afinidad para T_3 [177-178], que tienen propiedades compatibles con su participación en los efectos rápidos, no genómicos, de la T_3 sobre el transporte de electrolitos. Estos lugares de unión han sido eficientemente solubilizados en el caso de la placenta caracterizándose dos lugares: uno de alta afinidad y baja capacidad ($K_d = 2$ nM; $B_{max} = 320$ fmol/mg proteína) y otro de baja afinidad y alta capacidad ($K_d = 18.5$ μ M; $B_{max} = 2.2$ pmol/mg proteína), siendo en ambos casos altamente específicos para T_3 , sin que esta hormona pudiera ser desplazada eficazmente por otros análogos.

I.4.6. LUGARES DE UNIÓN MEMBRANALES PARA MINERALCORTICOIDES

Se han encontrado lugares de unión de membrana específicos para aldosterona en monocitos humanos y en riñón de cerdo usando un análogo yodado de la aldosterona, con un afinidad muy alta ($K_d = 0.1$ nM). Estos lugares son incapaces de unir cortisol, y para otros mineralcorticoides (fludrocortisona y desoxicorticosterona) tienen una actividad intermedia. Este lugar es, por tanto, específico para los mineralcorticoides, y en particular para la aldosterona, y su descripción es compatible con los hallazgos funcionales obtenidos en estos mismos tejidos [179,180]. En el caso concreto de este lugar de unión ha podido ser estimado su peso molecular mediante técnicas de marcaje de fotoafinidad con aldosterona yodada y SDS-PAGE, localizándose la mayor parte de la fijación específica en la banda de 59 KDa [181].

Además, usando [3 H]aldosterona se han caracterizado al menos dos lugares de unión específicos en la fracción microsomal de hígado de cerdo con distintas afinidades: $K_{d1}=11$ nM y $K_{d2}=118$ nM y una capacidad máxima de unión de unos 700 fmol/mg proteína. La unión del ligando a estas proteínas demostró ser termolábil, sensible a cambios de pH, y al tratamiento con tripsina [182].

Todos estos datos cinéticos, e importantes propiedades farmacológicas de los lugares de unión de membrana para la aldosterona, así como los rápidos efectos de esta hormona sobre el transporte de electrolitos, el volumen celular y el incremento de segundos mensajeros en los diferentes tejidos en los que se han descrito son bastante similares y todo parece apuntar a que se trata de auténticos receptores de membrana que mediarían los



efectos rápidos de esta hormona. Quizá en este caso cobre una mayor relevancia esta hipótesis ya que tanto la afinidad del lugar de unión, como los valores de EC_{50} para los efectos rápidos de la aldosterona están alrededor de 0.1 nM, cifra totalmente compatible con los niveles séricos de aldosterona en humano (0.1 nM) y rata (0.2 nM)

1.4.7. LUGARES DE UNIÓN MEMBRANALES PARA GLUCOCORTICOIDES

Para el último grupo de hormonas esteroides que nos queda por comentar, los glucocorticoides, existen lugares de unión membranales en el sistema nervioso central. En concreto la presencia de receptores de membrana para corticosterona en neuronas de cerebro de anfibio se ha relacionado con una rápida modificación del comportamiento reproductivo [183-184]. La potencial relevancia fisiológica de estos lugares de unión es reforzada por la alta afinidad que presentan por el ligando ($K_d = 0.5$ nM)

Desde finales de los años 60, Litwack demostró por primera vez la existencia de un lugar de unión para el cortisol, que presentaba una afinidad por este esteroide mucho menor que la del RG, y que estaba localizado en la fracción microsomal de hígado de rata, siendo especialmente abundantes en el retículo endoplásmico liso [185]. Posteriormente Partchman, en el año 1978, describió un lugar de unión de baja afinidad para glucocorticoides en la envuelta nuclear [186]. Desde entonces otros autores han estudiado estos lugares de unión para glucocorticoides (microsomales y nucleares), que al contrario de lo que sucede con los lugares de unión localizados en el sistema nervioso, presentan una muy baja afinidad por el ligando [187-191].

Hemos dejado intencionadamente la mención de los Lugares de Unión de Baja Afinidad para Glucocorticoides (LUBAG, también conocidos por sus siglas inglesas LAGS [143]) para el final de este capítulo, ya que en su estudio y caracterización se ha centrado el trabajo de nuestro grupo de investigación en los últimos años. Dedicaremos el último epígrafe de esta introducción a la descripción detallada de la caracterización de este lugar de unión, ya que los conocimientos actuales que se tienen acerca de él han servido como punto de partida para desarrollar el trabajo original de investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral.

1.5. EL LUGAR DE UNIÓN DE BAJA AFINIDAD PARA GLUCOCORTICOIDES

Como ya señalamos, el LUBAG fue descrito muy temprano en las fracciones microsomal [185] y nuclear de hígado de rata [186]. Partchman, en el año 1978, comenzó a plantearse que en realidad el LUBAG que había descrito en la envuelta nuclear de hepatocito [186] no guardaba relación con el verdadero receptor basándose en varios argumentos. En primer lugar, el LUBAG presentaba una ontogenia muy diferente de la del RG. Así, mientras el RG ya es expresado desde la etapa fetal y sufre pocos cambios a lo largo de la vida extrauterina [192], el LUBAG era indetectable durante las cuatro primeras semanas de vida, para luego ir aumentando y alcanzar su máxima concentración durante la época postpuberal y, luego disminuir nuevamente durante el resto de la vida adulta. Por otro lado, demostró que la mayor parte de la radiactividad podía ser eliminada del núcleo mediante el tratamiento con detergentes (TX100), lo que sugería que dicha radiactividad estaba localizada en la envuelta nuclear y no en la cromatina. Sin embargo, cuando administraba *in vivo* acetónido de triamcinolona y/o dexametasona (DEX) marcadas radiactivamente, dicha radiactividad se acumulaba nuevamente en el núcleo, pero asociada a la cromatina y no a la envuelta nuclear. Como conclusión de estos resultados postuló que en el núcleo había dos lugares de unión para glucocorticoides: uno asociado a la cromatina, que podría tratarse del RG clásico; y otro asociado a la envuelta nuclear, el LUBAG, de significación desconocida. Otro autor, Kaufmann, en 1984, corroboró todos estos hallazgos [188].

En el año 1983, Omrani y cols [187] demostraron que una vez alcanzada la máxima concentración de LUBAG, tras la pubertad del animal, esta se reducía drásticamente tras la adrenalectomía, pero recuperaba sus niveles normales de expresión tras la administración de cortisol. En este mismo trabajo se planteó por primera vez la posibilidad de que los lugares de unión microsomal y nuclear eran en realidad la misma entidad, extremo que fue posteriormente confirmado por Lefebvre [191,193] usando dexametasona mesilato, ligando que tiene la propiedad de unirse covalentemente al RG. Este ligando marcaba una proteína de localización microsomal de 45 KDa que disminuía drásticamente tras la adrenalectomía, por lo que podía suponerse que se trataba del LUBAG. Además esta proteína no reaccionaba con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el RG, lo cual indica que ambas proteínas no guardan relación entre sí.

Nuestro grupo ha profundizado en el estudio del LUBAG en microsomas hepáticos de rata macho, usando [3 H]Dexametasona ([3 H]DEX) para su caracterización ($K_d = 100 \pm 6$ nM; $B_{max} = 13 \pm 1$; Hill = 1 ± 0.06).

I.5.1. REGULACIÓN ENDOCRINA DEL LUBAG

Nuestro grupo ha sido pionero en el estudio de la compleja regulación endocrina a la que está sujeto LUBAG [140,141,143,144]. Los datos recogidos en la literatura demostraban que, al menos, los glucocorticoides están implicados en la regulación de este lugar. Sin embargo, el hecho de que la adrenalectomía tan sólo redujera su concentración al 50% [187], abría la posibilidad de que otras hormonas estuvieran implicadas. En los animales hipofisectomizados la concentración de LUBAG estaba reducida de forma drástica hasta ser prácticamente indetectable. Resultaba evidente, pues, que la expresión del LUBAG estaba completamente bajo control hipofisario. Este control sería ejercido a través de la regulación de la secreción de glucocorticoides. Sin embargo, el efecto de la adrenalectomía sólo era parcial, mientras que el de la ablación de la hipófisis era total. Por ello, parecía evidente que otras hormonas, bien producidas por la propia hipófisis o bien bajo control hipofisario, deberían ejercer una influencia en el control de la expresión del LUBAG. La castración no modificó la concentración de LUBAG, por lo que parecía plausible concluir que los andrógenos no participan en su regulación. El hipotiroidismo inducido con propiltiouracilo (PTU) provocó una drástica caída en la concentración de LUBAG hasta un 10% del control, siendo este efecto revertido por la administración de T_3 . En ratas hipofisectomizadas, la única hormona hipofisaria que se mostró capaz de aumentar la concentración de LUBAG, si bien no completamente, fue la GH. También se sabe que la administración de dosis farmacológicas de E_2 a las ratas es capaz de inducir la expresión del LUBAG [135,143]. La administración de dosis fisiológicas de E_2 , sin embargo, produce el efecto contrario al de las dosis farmacológicas, inhibiendo de forma espectacular la expresión del LUBAG [244]. Por otro lado, los trabajos de Wright y colaboradores [245] han demostrado que el LUBAG, además, está regulado por la vitamina A, ya que las ratas alimentadas con una dieta deficiente en retinoides no lo expresan, pero cuando se les administra acetato de retinol durante 7 días recuperan los niveles normales de expresión. En estos trabajos se sugiere que la deficiencia de vitamina A podría afectar a la expresión del LUBAG actuando sobre el eje hipotálamo-pituitaria-glándulas suprarrenales [245].

De todos estos resultados podemos concluir que el LUBAG es una proteína sujeta a una delicada regulación hormonal con la participación de glucocorticoides, hormonas tiroideas, GH, E_2 y vitamina A. Existen numerosas referencias bibliográficas que demuestran que la regulación multihormonal aquí descrita no es un hecho aislado ni insólito, sino que la expresión de otras proteínas hepáticas, como por ejemplo el RE, también está condicionada a la acción conjunta de varias hormonas [194].

Además de la regulación fisiológica multihormonal comentada, es muy interesante

destacar que el LUBAG puede ser inducido por dosis farmacológicas de E_2 [144,244] y de EE_2 [144], de forma independiente del estatus endocrino del animal.

I.5.2. PERFIL FARMACOLÓGICO

El LUBAG presenta un amplio perfil farmacológico [143], muy diferente del descrito para el RG. Presenta capacidad de unión de moléculas pertenecientes a cuatro grupos de hormonas esteroideas de diferente actividad fisiológica, con una afinidad relativamente alta (K_d = 20-300 nM):

Glucocorticoides: todos los *glucocorticoides* ensayados son capaces de desplazar eficientemente a la [3H]DEX de su unión con los microsomas, pero hay que destacar que el LUBAG carece de afinidad por el acetónido de triamcinolona, que es uno de los mejores ligandos para el RG.

Progestágenos: La *progesterona* resultó ser un potente ligando para el LUBAG, y también lo es el *R5020*, pero con menor afinidad.

Estrógenos: Ninguno de los *estrógenos naturales* se mostró eficaz para desplazar a la [3H]DEX de su lugar de unión, pero sin embargo los estrógenos sintéticos 17α -alquílicos, como el *mestranol* o el EE_2 , sí lo hicieron.

Andrógenos: Ni el andrógeno natural *T*, ni el sintético *R1881* se unían al LUBAG. Sin embargo, varios 17α AA eran capaces de competir intensamente con la [3H]DEX, en especial dos de ellos el ES y el DA, que presentan una afinidad mayor que la [3H]DEX por el LUBAG.

El hecho de que estos andrógenos sintéticos fueran capaces de interactuar tan claramente con una proteína de membrana, como el LUBAG, nos llamó poderosamente la atención ya que, si bien se sabe desde hace tiempo que los andrógenos actúan directamente en el hígado uniéndose al RA [196], se han descrito efectos de los 17α AA como el incremento de determinadas glucoproteínas plasmáticas, o del inhibidor del primer componente del complemento, que no son ejercidos por la T o sus ésteres. Este hecho diferenciador sugiere que al menos estos efectos descritos no deben estar mediados por el RA [197-200]. Además el uso de estos compuestos, como el ES, se asocia frecuentemente con signos de hepatotoxicidad. El mecanismo por el que los 17α AA ejercen sus acciones a nivel hepático es hasta la fecha desconocido [201].

Los datos del desplazamiento de la [3 H]DEX por el ES y DA, indicaban la existencia de una interacción compleja con el LUBAG. Los valores de Pseudo-Hill significativamente superiores a la unidad y el análisis de Hofstee de los resultados de las curvas de desplazamiento de varias concentraciones de ES y DA mostraron que esta interacción sigue un patrón de cooperativismo positivo. Sin embargo, otros 17α AA, como la fluoximesterona o la mestalina, muestran un Pseudo-Hill significativamente inferior a la unidad, lo que sugiere un patrón de cooperativismo negativo [202].

La importancia farmacológica y toxicológica de los 17α AA, así como el desconocimiento que se tiene de los mecanismos implicados en sus acciones, unido a la compleja interacción que parecen tener estos compuestos con el LUBAG, fueron los condicionantes que nos animaron a estudiar con mayor profundidad los mecanismos implicados en dicha interacción, ya que los efectos diferenciadores de estos compuestos en relación con los de los andrógenos naturales, pudieran estar mediados por su unión a algún receptor membranal para hormonas esteroideas, de los que hemos hablado extensamente en esta Introducción.

1.5.3. INTERACCIÓN DEL ESTANOZOLOL CON EL LUBAG *IN VITRO*

Las curvas de saturación con [3 H]DEX realizadas en presencia de concentraciones crecientes de ES y DA evidenciaron cambios en las características de la unión de dicho ligando al LUBAG: disminución de la K_d y de la B_{max} . La disminución observada en la afinidad podía ser debida a que el ES y DA compitieran por el sitio de unión de la [3 H]DEX. Sin embargo, el que además existiera una disminución de la B_{max} sugería un tipo de inhibición no competitiva y la existencia de un sitio de unión propio para estos andrógenos, diferente del de la [3 H]DEX [202].

Todos los 17α AA ensayados, y en especial el ES y DA, incrementaron significativamente la constante de disociación (K_{d1}) de la [3 H]DEX, lo cual concordaba con la existencia de un lugar de unión diferente del de la [3 H]DEX para estos 17α AA. Este tipo de andrógenos a través de su unión a un segundo lugar microsomal, cambiaría la conformación del complejo formado por la [3 H]DEX con su lugar de unión, reduciendo su afinidad (alosterismo negativo) [202].

La preincubación con ES inhibía parcialmente la unión específica de [3 H]DEX. Este efecto se observaba también, aunque en menor medida con el DA. Esta modulación del LUBAG ocurría de forma muy rápida (segundos), lo que sugería que la interacción del ES o

DA podía ser de naturaleza irreversible [203]. La irreversibilidad de esta inhibición fue demostrada *in vitro*, mediante un experimento en el que los microsomas eran preincubados con DEX no tritiada, con el fin de encontrar si la unión del ligando era capaz de proteger del efecto inhibitorio provocado por el ES o DA. Los resultados, tras la incubación de los microsomas con estos 17α AA fueron similares a los obtenidos sin preincubar con DEX, indicando que el efecto inhibitor provocado por el ES o DA era realmente irreversible [202].

I.5.4. INTERACCIÓN DEL ESTANOZOLOL CON EL LUBAG *IN VIVO*

El efecto inhibitorio del ES sobre la unión de la DEX al LUBAG resultó ser de tipo irreversible también *in vivo*, como demostraron los experimentos dosis-respuesta realizados *in vivo*. La recuperación de los niveles normales de actividad del LUBAG no se recuperaban hasta 8 horas después, y esta recuperación era dependiente de la síntesis de nuevas proteínas como lo demostraron los experimentos con CHX [202].

Estos mismos protocolos de experimentación fueron usados para otras hormonas esteroides, incluidos los andrógenos, pero este efecto inhibitor parece ser exclusivo del ES, ya que no se pudo comprobar con otros esteroides como: DA, mibolerona, DHT, propionato de T, mestanolona, DEX, cortisol, o prednisolona [204].

II. OBJETIVOS

El hecho de que determinados andrógenos, como los 17α AA interactúen con el LUBAG, uniéndose a un lugar distinto del de la [3 H]DEX, proporciona la primera evidencia experimental de la existencia de un lugar de unión anclado en la membrana para andrógenos.

Bajo esta premisa se inició este trabajo, que ha intentado alcanzar los siguientes objetivos generales:

1. Caracterizar la interacción del [3 H]ES con los microsomas de hígado de rata macho, así como las principales propiedades del LUES (naturaleza proteica, distribución subcelular y tisular, topología de membrana, etc...)
2. Extraer la proteína de la membrana, solubilizándola en su forma activa, como requisito previo para la purificación de la misma.
3. Acometer la purificación parcial del LUES, determinando simultáneamente las propiedades hidrodinámicas de la proteína solubilizada.
4. Proveernos de una potente herramienta en el estudio de esta proteína como es el marcaje covalente con su ligando ([3 H]ES) mediante fotomarcaje de afinidad.
5. Determinar el peso molecular del LUES.
6. Estudiar la ontogenia, regulación endocrina y posibilidad de inducción de la proteína bajo varios tratamientos hormonales.

Todo este trabajo representa una aproximación al estudio de un lugar de unión de membrana similar al que se ha seguido en la caracterización de los receptores de membrana descritos para otros grupos de hormonas esteroideas, tales como estrógenos o progesterona. Todo ello se vincula con el objetivo final de ampliar nuestro conocimiento actual acerca de la naturaleza y función fisiológica de los lugares de unión de membrana para las hormonas esteroideas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ANIMALES

III.1.1. CONDICIONES GENERALES

Se utilizaron ratas macho adultas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza Sprague-Dawley (Mollegard, Dinamarca). Los animales fueron separados de sus madres a los 22 días de edad. A partir de esa fecha se alimentaron con dieta especial para ratas (PanLab, Barcelona) y agua *ad libitum*. Las ratas se mantuvieron en condiciones controladas, tanto de temperatura (22°C) como de luz (ciclos de 12 horas luz-oscuridad).

Las ratas fueron usadas para experimentación en diferentes estadios de su vida, clasificándose en grupos según su edad en el momento de comenzar los diferentes experimentos. Todo el trabajo de caracterización de la unión de [³H]ES a los microsomas, así como la caracterización de la proteína (LUES), la solubilización, purificación y marcaje de fotoafinidad se realizó con muestras de hígado procedentes de ratas macho de 60-70 días de edad.

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación. En el caso de los tratamientos con esteroides el sacrificio se realizó 24 horas después de la última inyección. Entonces el hígado fue perfundido vía vena porta con solución salina helada (NaCl, 0.9%), y tras esta operación fue rápidamente extraído y lavado con tampón helado, en el que fue mantenido hasta su uso. Cuando no se usaba inmediatamente, se troceaba, congelaba en nitrógeno líquido y se almacenaba a -80°C. En algunos experimentos se necesitaron otros órganos. Estos casos se detallan en el apartado de "Resultados".

III.1.2. ANESTESIA

Cuando se realizó alguna intervención quirúrgica en animales de 10 o más días de edad, éstos fueron anestesiados bajo una atmósfera saturada de éter dietílico. En animales de menos de 10 días la anestesia se llevó a cabo mediante hipotermia sobre una superficie de hielo.

III.1.3. MODELOS ENDOCRINOS

El estado hipotiroideo agudo (TX) fue logrado mediante administración en el agua de bebida de propiltiouracilo (PTU) al 0.05% durante al menos 21 días. El hipotiroidismo

crónico se consiguió administrando Metimazol al 0.02% en agua de bebida a las madres gestantes y posteriormente a los recién hasta el momento de ser utilizados para experimentación. El agua de bebida se renovaba cada tres días.

La adrenalectomía (ADX) se realizó por la ruta dorsal, haciendo una incisión transversal en la piel de la espalda por debajo de la última costilla para, a continuación, hacer un corte en el músculo a ambos lados de la columna vertebral. De esta forma quedan expuestos ambos riñones. Cerca del extremo craneal de los mismos se encuentran las glándulas suprarrenales, que son extirpadas. Los animales adrenalectomizados recibieron para beber solución salina (0.9% NaCl) en lugar de agua.

La orquidectomía (OX) fue realizada por la vía escrotal. En primer lugar se corta el escroto y a continuación el peritoneo, y mediante una ligera presión sobre el abdomen los testículos salen al exterior por el lugar del corte. A continuación, la arteria y vena espermáticas y el conducto deferente son ligados y cortados por su extremo testicular, con lo que el testículo y el epidídimo quedan separados y se retiran. El cierre se realiza por planos, primero se cierra el peritoneo con catgut y a continuación la piel del escroto con sutura reabsorbible.

Los animales hipofisectomizados de 225-250 gr p.v. (HYPOX) fueron comprados a Mollegard (Dinamarca)). Fueron acondicionados en el Bioterio del Centro de Ciencias de la Salud durante 21-28 días, antes de ser sacrificados. Durante ese tiempo recibieron para beber una solución conteniendo 2.03 gr de cloruro sódico, 83.3 mg de cloruro potásico, 2.1 mg cloruro cálcico, 16.7 mg de cloruro magnésico y 50 gr de glucosa por litro de agua. La eficacia de la HYPOX se controló mediante pesadas y mediciones de los animales cada 72 horas.

III.1.4. ADMINISTRACIÓN DE DROGAS

Las drogas se administraron por vía subcutánea, salvo en el caso de la cicloheximida (CHX), que se hizo por vía intraperitoneal. La pauta de administración y la duración de los tratamientos se especifica en el apartado de "Resultados". Los esteroides se disolvieron en aceite de maíz (Sigma). La T_3 fue disuelta en 0.1 N de NaOH a una concentración de 2 mg/ml, y en el momento de la inyección se diluyó con solución salina. Los animales control recibieron el correspondiente vehículo (aceite de maíz o solución salina).

III.2. REACTIVOS

En la mayor parte de los experimentos de este trabajo se utilizó [³H]ES (Actividad específica 25 Ci/mmol), que fue encargado a SibTech, Inc (Elmsford, Nueva York). La [³H]DEX fue suministrada por New England Nuclear (Boston, MA). Otros isótopos usados fueron los [¹⁴C] patrones proteicos de peso molecular para electroforesis y el agua pesada (óxido de deuterio, D₂O) que fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Para el conteo de la radiactividad se utilizó el líquido de centelleo Multiphase HS II (LKB, Pharmacia).

Los esteroides metiltrienolona (R-1881), la promegestona (R-5020) y la mibolerona fueron suministrados por New England Nuclear (Boston, EE.UU.). El Tamoxifeno y el 4-OH Tamoxifeno nos fueron amablemente donados por Imperial Chemical Industries PLC (Macclesfield, Gran Bretaña). Los enzimas empleados, excepto la Tripsina y la β -Galactosidasa fueron suministrados por Boehringer-Mannheim (Barcelona, España).

Para la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa se utilizaron tubos Ultra-Clear de 11 x 60 mm (Beckman Instruments Inc.). Para la cromatografía de intercambio iónico se utilizó la dietilaminoetil celulosa DE-52 de Whatman Biosystems Ltd (Maidstone, Inglaterra). El resto de material para cromatografía fue suministrado por Bio-Rad (California, EE.UU.). El gel Sephacryl S-300, igual que el resto de productos citados en este trabajo fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, EE.UU.). Todos los productos anteriormente descritos eran de grado analítico.

III.3. PREPARACIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES DE HÍGADO

III.3.1. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES MICROSOMAL Y CITOSÓLICA

Los microsomas se describen operativamente como la fracción particulada que se obtiene a partir del homogenizado de un tejido, una vez que las fracciones nuclear y mitocondrial han sido eliminadas mediante centrifugación a baja velocidad.

Todos los pasos fueron realizados a 4°C según el procedimiento descrito previamente [143]. El hígado (o cualquier otro órgano) lavado en tampón TMMDSI (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de molibdato sódico, 5 mM de cloruro magnésico, 2 mM de ditiotreitol, 250 mM de sacarosa, 1 mM de PMSF, 1 mM de EDTA, y 1 µg/ml de inhibidor de tripsina de la soja, pH 7.5), era finamente troceado (2 mm) y homogenizado (1:5, p:v) en TMMDSI usando para ello un homogenizador mecánico del tipo Potter-Elvehjem teflón-vidrio (B. Braun, Melsungen,

Alemania).

Los homogenizados crudos fueron filtrados a través de una malla estéril de nylon de 50 μm (Maissa Industrial, Barcelona), y el material filtrado fue centrifugado a 13.000 x g durante 15 minutos (Sorvall RC-5, rotor SE-12) para sedimentar los núcleos y las mitocondrias. Los sobrenadantes fueron ultracentrifugados a 105.000 x g durante 60 minutos (Beckman L-7, rotor 70.1 Ti). Una vez retirada la capa grasa superficial los sobrenadantes se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones y fueron utilizados como **fracción citosólica**.

Los sedimentos anteriores, resuspendidos, y re-centrifugados bajo las mismas condiciones eran ajustados a una concentración proteica final de 2 mg/ml y utilizados como **fracción microsomal** tanto para los ensayos de intercambio con hormona radiactiva, como para la solubilización del LUES. Cuando no se utilizaron inmediatamente, los microsomas fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de su uso.

III.3.2. OBTENCIÓN DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO LISO Y RUGOSO

La microscopía electrónica ha demostrado que los microsomas que se obtienen a partir del sobrenadante post-mitocondrial están constituidos principalmente por sáculos cerrados de membranas denominadas vesículas. La mayoría de estas vesículas derivan de los retículos endoplásmicos liso (REL) y rugoso (RER). Si bien membranas de otros orgánulos como el aparato de Golgi, peroxisomas, lisosomas, y endosomas también están presentes, éstas constituyen sólo un pequeño porcentaje del total de membranas microsomales. El incremento de densidad media que le confieren los ribosomas (1.6 S) al RER con respecto al REL nos permite obtener ambas fracciones por separado en el proceso de obtención de los microsomas mediante la inclusión de un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa. Nosotros seguimos el método de Rostchild modificado [205] que aplica este principio. El sobrenadante post-mitocondrial es diluido 1:6 en TMMDSI conteniendo suficiente cantidad de sacarosa para lograr una concentración final de 0.15M. Alícuotas (7.5 ml) del volumen obtenido fueron depositadas cuidadosamente sobre "colchones" (2 ml) de TMMDSI-1.31 M Sacarosa. Los tubos fueron entonces centrifugados 100 minutos a 320.000 x g (rotor Beckman 90 Ti). Tras este paso recuperamos el RER como un sedimento en el fondo del tubo, y el REL, formando una banda en la interfase del gradiente, fue recuperado, diluido 1:3 con TMMDSI helado, y sedimentado a 105.000 x g durante 90 minutos (Figura 9).



Obtuvimos fracciones de membrana plasmática purificada mediante el método descrito por Loten [206]. El sedimento obtenido tras la centrifugación del homogenizado hepático a 1500 x g durante 15 minutos era diluido con TMMDSI (75 ml, volumen final), y se le añadían 10.1 ml de Percoll y 1.45 ml de sacarosa 2 M. Esta mezcla era centrifugada a 30000 x g durante 20 minutos, tras lo cual obteníamos una banda muy fácil de capturar usando una pipeta Pasteur (Figura 10A).

- 69 -

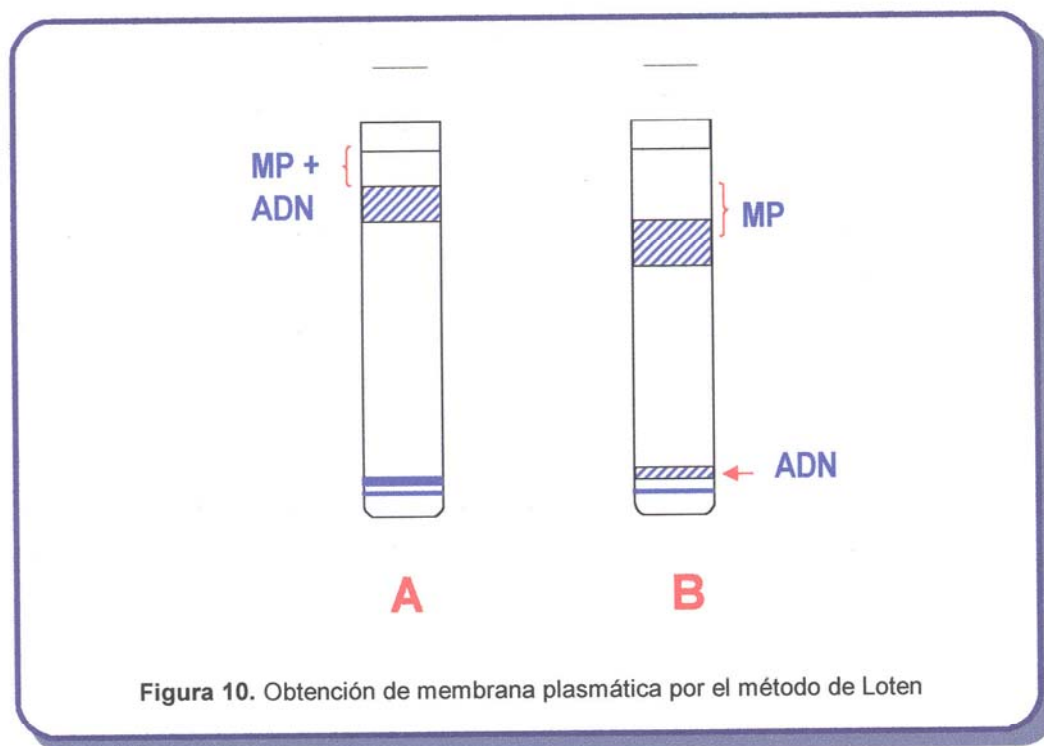


Figura 10. Obtención de membrana plasmática por el método de Loten

III.3.4. OBTENCIÓN DE NÚCLEOS PURIFICADOS

De todos los orgánulos de los hepatocitos los núcleos son los más grandes y densos (1.3 gr/cm^3). De esta forma es relativamente fácil aislarlos con alta pureza y alta concentración. Uno de los métodos más empleados [207] consiste en una homogenización de los hígados en tampón isosmótico de sacarosa seguido de centrifugación en gradiente isopícnico a través de una barrera de densidad. También en este caso partimos del sedimento de $1500 \times g$ durante 15 minutos, que fue llevado mediante dilución 1:3 en tampón a una concentración final de 1.6M de sacarosa. Esta solución fue depositada cuidadosamente en tubos que contenían 3.2 ml de TMMDSI-2.3 M Sacarosa y centrifugados a $124000 \times g$ durante 25 minutos (rotor Beckman SW 40.1Ti). Tras la centrifugación, los núcleos, que formaban un precipitado blanquecino en el fondo de los tubos, fueron resuspendidos en TMMDSI, y lavados ($1500 \times g$, 10 minutos).

III.3.5. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN MITOCONDRIAS, PEROXISOMAS Y LISOSOMAS

Como se esquematiza en la Figura 11, el sobrenadante de la centrifugación a 1500 x g durante 15 minutos fue centrifugado ahora a 10.000 g durante 15 minutos. La parte media del sedimento obtenido se resuspendió y se depositó sobre una solución isosmótica de Percoll ($\rho \approx 1.08 \text{ g/cm}^3$) en una proporción 1:6. Esta solución fue entonces centrifugada a 63.000 g durante 45 minutos (rotor Beckman 70.1Ti), obteniéndose de esta forma tres fracciones: una en la parte media superior del tubo (Fracción enriquecida en peroxisomas, $\rho < 1.070 \text{ g/cm}^3$); otra en la parte media inferior del tubo (fracción enriquecida en mitocondrias, $1.070 \leq \rho < 1.128 \text{ g/cm}^3$); y otra prácticamente adyacente al fondo del tubo (fracción enriquecida en lisosomas, $\rho \approx 1.128 \text{ g/cm}^3$). Cada fracción fue recogida por separado mediante punción del fondo del tubo, lavándose posteriormente con TMMDSI (16000 x g, 20 min).

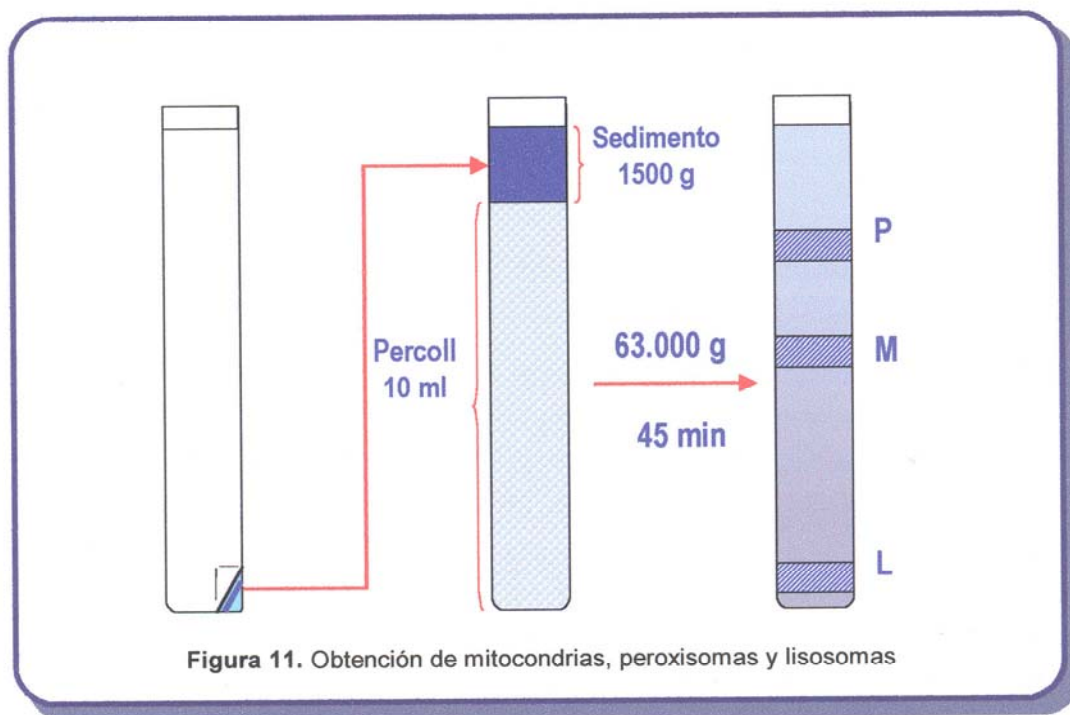


Figura 11. Obtención de mitocondrias, peroxisomas y lisosomas

III.3.6. MARCADORES ENZIMÁTICOS DE FRACCIÓN CELULAR

Para comprobar la pureza de las fracciones subcelulares que presentaban fijación específica para [^3H]ES ensayamos los siguientes marcadores enzimáticos:

III.3.6.1. NADPH citocromo c reductasa (*REL* y *RER*)

Seguimos una adaptación del método de Williams y Kamin [208]. La mezcla de ensayo contenía 50mM de tampón fosfato (pH 7.7), Citocromo c, y EDTA en la proporción 90:5:1 (v/v/v). 10-20 μ l de muestra fueron llevados hasta 1 ml con la mezcla de ensayo en un cubeta, y se midió la A_{550} . Una vez se estabilizó la absorbancia se añadió 0.1 ml de NADPH y se continuó la medición de A_{550} , calculándose el incremento en el valor de absorbancia (coeficiente de extinción molar del Citocromo c reducido es 27.000).

III.3.6.2. 5'-Nucleotidasa (*Membrana plasmática*)

Seguimos un procedimiento adaptado del de Widnell [208], en el que 50-200 μ g de proteína fueron diluidos con tampón de ensayo, logrando una concentración final de 0.1 M Tris-HCl, 10 mM AMP, 10 mM $MgCl_2$, pH 8.5, y fueron luego preincubados a 37°C durante 20 min. Al término de esta incubación ($t = 0$) transferimos 0.3 ml de la mezcla a los tubos de ensayo de fosfato (dos tubos por ensayo, conteniendo 0.7 ml de una mezcla de 1 parte de ácido ascórbico y 6 partes de molibdato amónico en 1 N H_2SO_4). Estos tubos fueron incubados a 45°C durante 20 minutos, tras lo cual se midió la A_{820} .

III.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Dado que gran parte de los experimentos se realizaron en presencia de detergentes, seleccionamos para la determinación de la concentración de proteínas el método Bio-Rad D_c (Detergent compatible) Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, California, EE.UU.). Este método es una modificación del ensayo colorimétrico de Lowry [255] en el que se determina la A_{655} en un lector de microplacas de 96 pocillos, modelo 550 de Bio-Rad. Como estándar se utilizó BSA.

III.5. ENSAYOS DE INTERCAMBIO CON LIGANDO RADIOACTIVO

Los ensayos de intercambio fueron realizados siguiendo la misma metodología tanto en la caracterización del LUES hecha en microsomas como posteriormente en la caracterización de la especie solubilizada, así que en los ensayos que a continuación describimos denominaremos genéricamente como *muestra* a ambas fracciones.

III.5.1. ENSAYOS REALIZADOS EN CONDICIONES DE EQUILIBRIO

III.5.1.1. Curvas de saturación

Se incubaban alícuotas de muestra (100 μ l) a una concentración proteica de 2 mg/ml con [3 H]ES durante 12-14 horas a una temperatura de 0-4°C. La concentración final de radioligando era de 5 a 500 nM. En estos tubos se medía la unión total del ligando a la muestra. De forma paralela se incubaban series que contenían, además del esteroide tritiado, un exceso de 200 veces de ES no marcado. En estos tubos se determinaba la unión inespecífica. En ambos casos (total e inespecífica) la medición se determinaba por triplicado para cada concentración.

En el caso de que a los animales se les hubiera administrado alguna droga se hizo un tratamiento previo de la muestra con DCC con el fin de disminuir la concentración de ésta en la incubación, evitando de esta forma que se produjeran interferencias con el ensayo de intercambio.

La incubación se finalizaba añadiendo a cada tubo 200 μ l de una suspensión de Carbón activo-Dextrano T70 preparado en tampón TMMDSI frío (DCC; 0.8-0.08%, concentración final). Los tubos, una vez agitados, e incubados 10 minutos eran centrifugados 10 minutos a 3000 x g (rotor HS-4) para sedimentar el DCC. Alícuotas de 100 μ l del sobrenadante mezcladas con 1 ml de líquido de centelleo eran usadas para la determinación de la radiactividad, medida en Desintegraciones Por Minuto (DPM) usando un Contador de Centelleo (Liquid Scintillation Analysis, Packard, 2500 TR). A la concentración de DCC empleada, la fijación inespecífica representaba menos de un 10% de la fijación total para todo el rango de concentraciones utilizado ($r = 0.98 \pm 0.08$). El uso de concentraciones mayores de DCC no demostró mayor eficacia.

En el medio de incubación el etanol (vehículo del esteroide) así como BSA estaban presentes a una concentración final del 1-5%, y 1.5 mg/ml respectivamente, sin que mostrara ningún efecto sobre la fijación específica.

III.5.1.2. Curvas de competición

Para estudiar el perfil farmacológico del LUES se añadía a todos los tubos [3 H]ES para lograr una concentración final de 25 nM. Entonces hacíamos dos tipos de experimentos: 1) añadíamos el competidor no radiactivo a una concentración fija 1000 veces superior a la

del [^3H]ES. Este experimento servía para seleccionar, de la amplísima batería de productos ensayados, sólo aquellos que podían ser capaces de inhibir la unión específica del [^3H]ES; 2) Con los productos seleccionados realizábamos la curva de competición completa (0-50 μM). En ambos tipos de experimentos la incubación se iniciaba a 4°C, añadiendo la muestra a todos los tubos, y se finalizaba 12 horas después por el método del DCC. Del sobrenadante se tomaban alícuotas para contar la radiactividad.

III.5.2. ENSAYOS REALIZADOS EN CONDICIONES DE NO-EQUILIBRIO: ESTUDIOS CINÉTICOS

III.5.2.1. Cinética de asociación

Para este tipo de experimento la fijación total se obtuvo en tubos que contenían sólo [^3H]ES para lograr una concentración final de 150 nM. Paralelamente se midió la fijación inespecífica en tubos que además del radioligando contenían el esteroide no marcado en un exceso de 200 veces. La cinética de asociación se comenzó añadiendo a los tubos el volumen de muestra necesario para mantener la concentración final de ligando deseada. A continuación se tomaban sucesivas alícuotas a intervalos de tiempo crecientes, durante 24 horas, que eran depositadas sobre un sedimento de DCC, preparado para lograr una concentración final igual a la utilizada en los ensayos en equilibrio. Estos tubos se agitaban para lograr una suspensión homogénea del DCC, y tras un reposo de 5 minutos eran centrifugados 2 minutos a 7.000 rpm (Beckman GS 15R, rotor vasculante S4180). Se tomaba una alícuota del sobrenadante y se contaba.

III.5.2.2. Cinética de disociación

Para los experimentos de disociación se necesitaba hacer una incubación previa de la muestra con [^3H]ES en presencia o ausencia de 200 veces de exceso de ES, durante 8-10 horas, con el fin de asegurarnos que la reacción estaba en equilibrio. En este momento se comenzaba la cinética de disociación. El fin era provocar la disociación del ligando de la proteína y para ello se añadía a la muestra un exceso de 500 veces de ligando no radioactivo. A continuación, se procedía igual que en la cinética de asociación, es decir, se tomaban alícuotas a distintos tiempos (0-24) horas, se paraba la incubación con DCC y, tras la agitación y el reposo de 5 minutos, se centrifugaban, y se tomaba el sobrenadante. Una vez mezcladas con el cóctel de centelleo, se contaba la radioactividad.

III.5.3. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS DE LOS ENSAYOS DE INTERCAMBIO CON LIGANDO RADIATIVO

Para que una célula responda al estímulo de una hormona debe poseer receptores específicos que la reconozcan y que la unan selectivamente. No obstante, para poder llamar a una molécula receptor para una hormona, no es suficiente el hecho de que sea capaz de reconocerla y unirla selectivamente, sino que debe cumplir al menos tres características [233-240]:

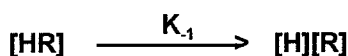
1. *Alta afinidad:* debe ser capaz de unir una cantidad razonable de ligando, aún en presencia de una concentración relativamente baja de éste.
2. *Alta especificidad:* debe ser capaz de reconocer a un ligando de entre el considerable número de moléculas similares que haya a su alrededor.
3. *Baja capacidad:* Los receptores son proteínas que se encuentran en una baja concentración en la célula; por consiguiente, su capacidad para fijar ligando es limitada.

III.5.3.1. Fijación de la hormona con alta afinidad y baja capacidad

Las moléculas de hormona se unen a receptores que están en la membrana celular, o bien están en el interior de las células del tejido diana. Las hormonas generalmente circulan a concentraciones relativamente bajas (10^{-10} a 10^{-8} M), así que los receptores deben tener una alta afinidad por ellas. Con el fin de profundizar en el concepto de *afinidad* de forma cuantitativa examinaremos la siguiente ecuación:

$$[HR] = K_{+1}[H][R]$$

donde observamos como la hormona (H) y el receptor (R) interaccionan para formar el complejo hormona-receptor (HR) a una velocidad que viene condicionada por la concentración de H y de R, y dicha velocidad se representa por la constante K_{+1} . Habitualmente esta interacción hormona-receptor es de tipo reversible y no covalente, por lo que el complejo puede disociarse a una velocidad que viene determinada por la constante K_{-1}



En el equilibrio ambas reacciones ocurren a la misma velocidad, por lo que:

$$K_{+1}[H][R] = K_{-1}[HR]$$

o bien

$$[H][R]/[HR] = k_{-1}/k_{+1} = K_d \text{ (Ecuación a)}$$

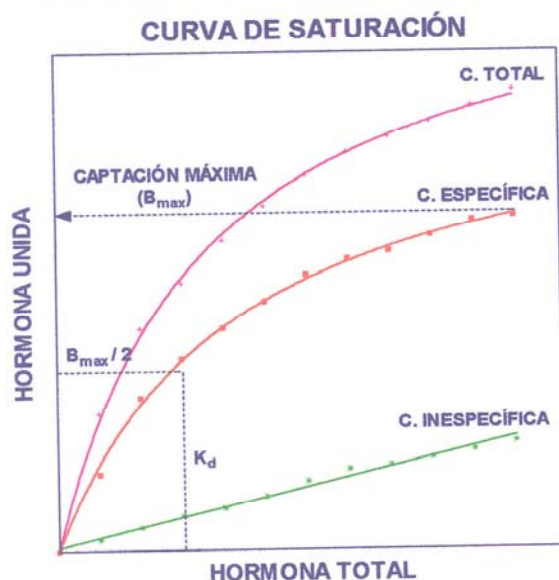


Figura 12. Curva de unión de una hormona a su receptor

La representación hiperbólica puede ser descrita por la **Ecuación de Michaelis-Menten**:

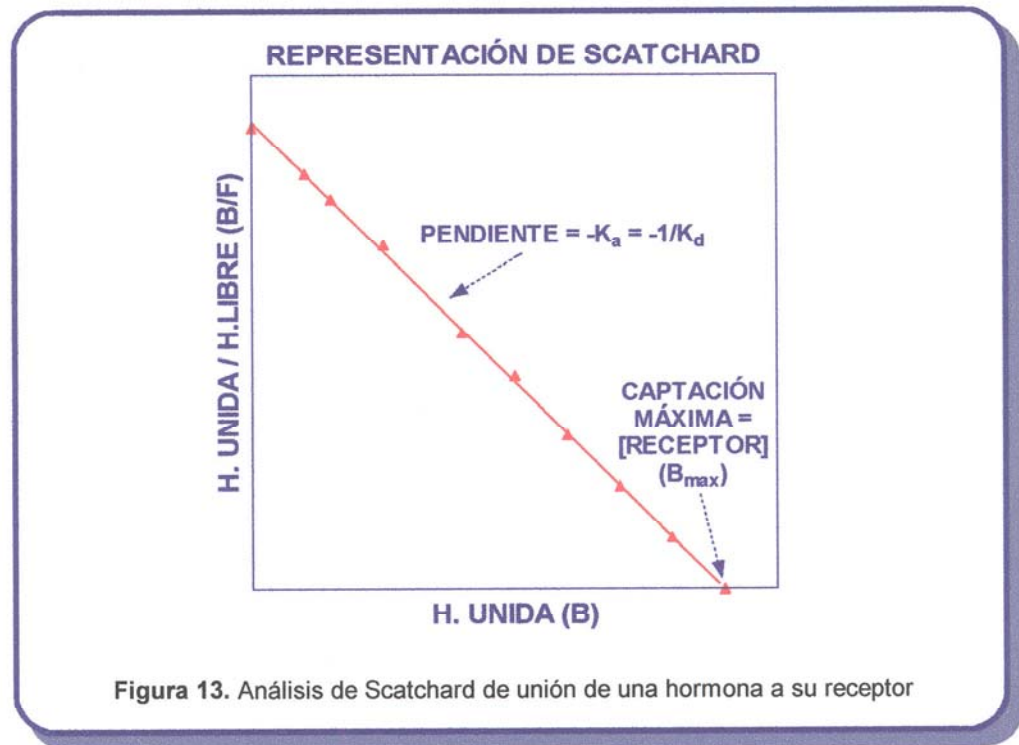
$$[HR] = ([HR] + [R]) \cdot [H] / K_d + [H]$$

Cuando la mitad de los receptores están ocupados por la hormona, $[HR] = \frac{1}{2}([HR] + [R])$, entonces $K_d = [H]$ (Figura 12), por lo que la K_d *equivale a la concentración de ligando necesaria para saturar la mitad de los receptores*. Según esto cuanto menor sea la K_d , menor será la concentración de hormona necesaria para saturar el 50% de los receptores y, por consiguiente, mayor será la afinidad.

De la anterior ecuación obtenemos la constante de disociación del equilibrio (K_d). La K_d da una estimación operativa de la afinidad de un receptor por una hormona determinada, pues se expresa en unidades de concentración.

Una representación simple de la curva de unión de una hormona a su receptor se

muestra en la Figura 12. Este es un método directo para la determinación de la K_d . No obstante la determinación de la K_d a partir de la curva no es el método más preciso. Uno de los métodos más exactos para la determinación de la concentración total de receptor y de la K_d es el análisis de Scatchard [241], que lineariza los datos de la curva de saturación, haciendo fácil determinar ambos parámetros (Figura 13).



A la concentración total de receptor se la denomina habitualmente B_{max} , siendo:

$$B_{max} = [HR] + [R]$$

o bien:

$$[R] = B_{max} - [HR] \text{ (Ecuación b)}$$

Si denominamos B (*Bound*) a la concentración de hormona unida al receptor y F (*Free*) a la concentración de hormona libre, sustituyendo en la Ecuación a tenemos:

$$F[R]/B = K_d ; F/B = K_d/[R] ; B/F = [R]/K_d$$

y sustituyendo [R] en la Ecuación b

$$B/F = B_{max} - B/K_d$$

o bien:

$$B/F = (-B/K_d) + (B_{max}/K_d)$$

que es la denominada **Ecuación de Scatchard**. Esta ecuación describe habitualmente una línea recta ($y = mx + b$), donde la pendiente (m) equivale a $-1/K_d$. Por lo tanto la $K_d = -1/m$. Cuando $B/F = 0$, entonces $B = B_{max}$, y este valor vendrá dado por el punto en el que la recta corta con el eje de abscisas (Figura 13).

La representación rectilínea del análisis de Scatchard nos indica que el ligando interactúa con un sólo tipo de receptor. Cuando la morfología que presenta es curvilínea, puede indicar o bien que el ligando interactúa con dos o más lugares de unión que exhiben diferentes afinidades por el ligando, o bien que existe un cooperativismo. Este último extremo puede ser demostrado por la ecuación de Hill.

La **Ecuación de Hill** nos permite cuantificar el tipo de unión que presenta una determinada interacción ligando-receptor:

$$B = B_{max} \cdot F^n / K_d + F^n$$

Donde n = número de lugares de unión para ese ligando. Para cuantificar la ecuación de Hill se recurre a la representación gráfica mediante su conversión logarítmica:

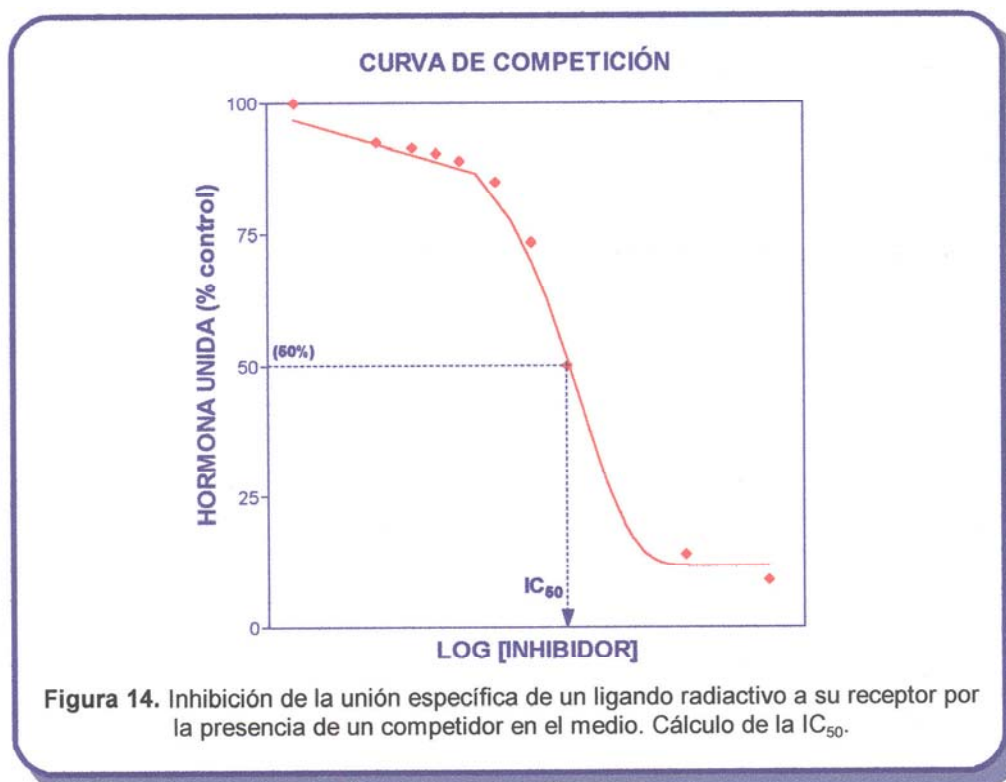
$$\log (\text{fracción ocupada}) / (1 - \text{fracción ocupada}) = n_H \cdot \log L$$

Siendo n_H el coeficiente de Hill. Representando en el eje de ordenadas el primer miembro de la ecuación (en forma de porcentajes) para cada valor de $[H]$ y en el eje de abscisas el segundo miembro de la ecuación ($\log [H]$), obtendremos una recta cuya pendiente es el coeficiente de Hill, y nos indica si los lugares a los que se une de forma específica el ligando interactúan o no entre ellos.

Si el coeficiente de Hill es igual a la unidad nos indica que el ligando se une a un sólo receptor o a varios con idéntica afinidad. Si dicho coeficiente es mayor que la unidad nos habla de la existencia de una interacción o cooperativismo positivo entre los lugares de unión. Sin embargo, si el coeficiente es significativamente inferior a la unidad, nos indica que lo que existe es un cooperativismo negativo, o bien que existen múltiples sitios de unión diferentes para este ligando.

III.5.3.2. Especificidad de la unión de la hormona

La especificidad para fijar una hormona determinada define si un tejido o un tipo de células puede ser considerado "diana" para ella o no. Los receptores son capaces de discriminar entre varias hormonas, uniéndose sólo aquella/-s por la que presenta elevada afinidad. La especificidad podemos conocerla mediante los experimentos de competición que consisten, básicamente, en añadir varias concentraciones de ligandos no radiactivos al medio en el cual se está produciendo la formación del complejo hormona-receptor, y observar cuál es el comportamiento de la hormona (marcada radioactivamente) en estas circunstancias. Este tipo de estudio se utiliza para conocer el perfil farmacológico de un receptor.



La concentración de un competidor que inhibe al 50% la fijación específica del radioligando es llamada IC_{50} , y es la concentración a la cual la mitad de los receptores originariamente ocupados por el radioligando son ocupados por el ligando no marcado. Para el cálculo de la IC_{50} se recurre a la representación gráfica del porcentaje de unión específica frente al Logaritmo de la concentración del inhibidor (Log [i]), obteniéndose una curva sigmoidea (Figura 14).

La afinidad del competidor por el receptor (denominada K_i), puede ser estimada a partir del dato experimental de la IC_{50} mediante la **Ecuación de Cheng-Prusoff**

$$K_i = IC_{50} / (1 + [H^*] / K_d^*)$$

donde $[H^*]$ y K_d^* son la concentración y la constante de disociación del ligando radioactivo.

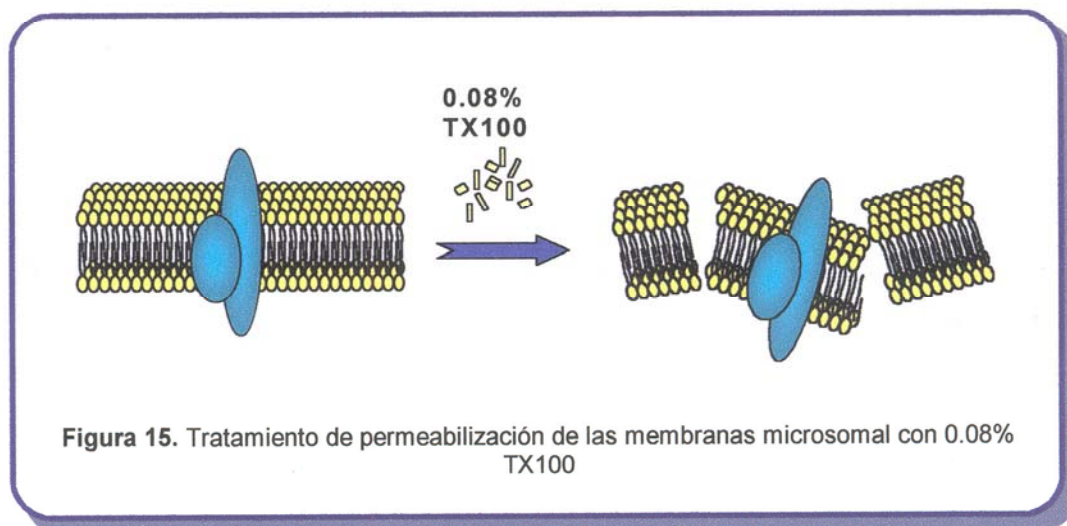
III.5.4. ANÁLISIS MATEMÁTICO DE LOS PARÁMETROS DE UNIÓN DEL RADIOLIGANDO A LOS MICROSOMAS

Para el análisis matemático de los experimentos de ensayo de intercambio se utilizó una colección de programas para PC (BIOSOFT):

- III.5.4.1. **EBDA y LIGAND**, utilizados para el cálculo de los parámetros de unión en condiciones de equilibrio:
 - a. *Curvas de saturación*: B_{max} , K_d , y coeficiente de Hill.
 - b. *Curvas de competición*: IC_{50} , y K_i .
- III.5.4.2. **KINETIC**, utilizado para el cálculo de los parámetros de unión en condiciones dinámicas (no equilibrio)
 - a. *Cinética de asociación*: K_{obs} .
 - b. *Cinética de disociación*: K_{-1} .

III.6. TRATAMIENTOS CON ENZIMAS

Con el fin de permeabilizar las membranas microsomales para hacer posible el acceso de los enzimas a través de ellas, incubamos los microsomas crudos con 0.08% de Tritón X100 (TX100) (0.5 mg proteína/ml) a 2°C durante 10 minutos (Figura 15).



Finalizamos el tratamiento con dos ultracentrifugaciones consecutivas a 105000 x g durante 30 minutos cada una, para finalmente resuspender la muestra en los tampones apropiados para los tratamientos enzimáticos.

III.6.1. PROTEASAS

Las muestras fueron resuspendidas en TMMDSI o tampón de ensayo de tripsina (20 mM CaCl_2 , 25 mM Tris-HCl, pH 7.3) en ausencia o en presencia de proteinasa K (Boehringer-Manheim) o tripsina (Sigma, tipo I: 11,000 BAEE/mg; Páncreas bovino, precipitada con etanol) a 10, 50, y 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min a 30°C en un volumen final de 1ml.

III.6.2. GLUCOSIDASAS

Las muestras fueron incubadas en tampón de ensayo enzimático (Neuraminidasa: 150mM NaCl, 4mM CaCl_2 , pH 5.5; β -Galactosidasa: 50%glicerol, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl_2 , pH 7.3; Lisozima: 50mM acetato sódico, 100mM NaCl, pH 6.0) en ausencia o en

presencia de glucosidasas (Neuraminidasa tipo V de *Chlostridium perfringens*; β -Galactosidasa tipo VI de *Escherichia coli*; y Lisozima de clara de huevo de gallina, todas ellas de Boehringer-Manheim) a 0.1, 1, y 10U durante 30 minutos a 30°C.

III.6.3. FOSFOLIPASAS

Ensayamos las fosfolipasas A₂, C, y D. Las muestras fueron diluidas hasta una concentración final de 500µg/ml en el tampón de ensayo enzimático apropiado (20mM HEPES, 1mM CaCl₂, pH 7.4 para fosfolipasa A₂; 20mM HEPES, 5mM MgSO₄, pH 7.4 para fosfolipasa C; y 20mM HEPES, 10mM MgSO₄, 0.2mM CaCl₂, pH 7.4 para fosfolipasa D). La incubación fue desarrollada en presencia o ausencia de 0.1, 1, or 10 U de enzima (Fosfolipasa A₂ de veneno de abeja [*Apis mellifera*], Fosfolipasa C tipo IV de *Bacillus cereus*, y Fosfolipasa D tipo I de col).

En todos los tratamientos enzimáticos la reacción fue detenida pasando los tubos a 0°C. En el caso de los tratamientos con proteasas también añadimos inhibidores específicos de proteasas (proteínasa K: 2 mM de PMSF; tripsina: inhibidor de tripsina de la soja, 500µg/ml). Todos los tubos fueron entonces centrifugados a 105,000 x g durante 1 hora a 0-4°C. El sobrenadante de esta centrifugación (conteniendo la enzima) fue desechado y los sedimentos (resuspendidos y lavados mediante centrifugación bajo las mismas condiciones), fueron usados para el ensayo de intercambio.

III.7. TOPOLOGÍA DEL LUES

Las proteínas asociadas con membranas pueden ser periféricas o integrales de la misma. Las proteínas periféricas están unidas a la membrana principalmente por asociación con otras proteínas mediante interacciones hidrofílicas y electrostáticas. La unión de las proteínas integrales, sin embargo, es debida a interacciones de tipo hidrofóbico con la bicapa lipídica, bien mediante uno o varios dominios peptídicos transmembranales, o bien mediante la posesión de un anclaje carboxi-terminal a un glicosil-fosfatidilinositol de membrana [217]. Con el objetivo de conocer el tipo de interacción que tenía el LUES con la membrana se realizaron dos tipos de experimentos:

III.7.1. TRATAMIENTO DE LOS MICROSOMAS CON CLORURO POTÁSICO

Con el fin de romper las interacciones hidrofílicas y electrostáticas de las proteínas con la bicapa lipídica los microsomas fueron preincubados con concentraciones crecientes de KCl (de 0.1 a 1.5 M) durante 60 minutos a 4°C en agitación suave. Después se sedimentaban a 105.000 x g durante 60 minutos y se reconstituían en tampón TMMDSI nuevo y frío, y se usaban para ensayo de intercambio con [³H]ES [217].

III.7.2. PARTICIÓN DE FASES EN SOLUCIÓN DE TRITÓN X-114

Para separar las proteínas integrales de membrana del resto de proteínas asociadas con la bicapa lipídica seguimos el procedimiento descrito por Bordier [209], que aprovecha las particulares características de condensación a temperatura ambiente del Tritón X-114 (TX114), que “atrapa” a las proteínas altamente hidrofóbicas (integrales de membrana) en la fase del detergente.

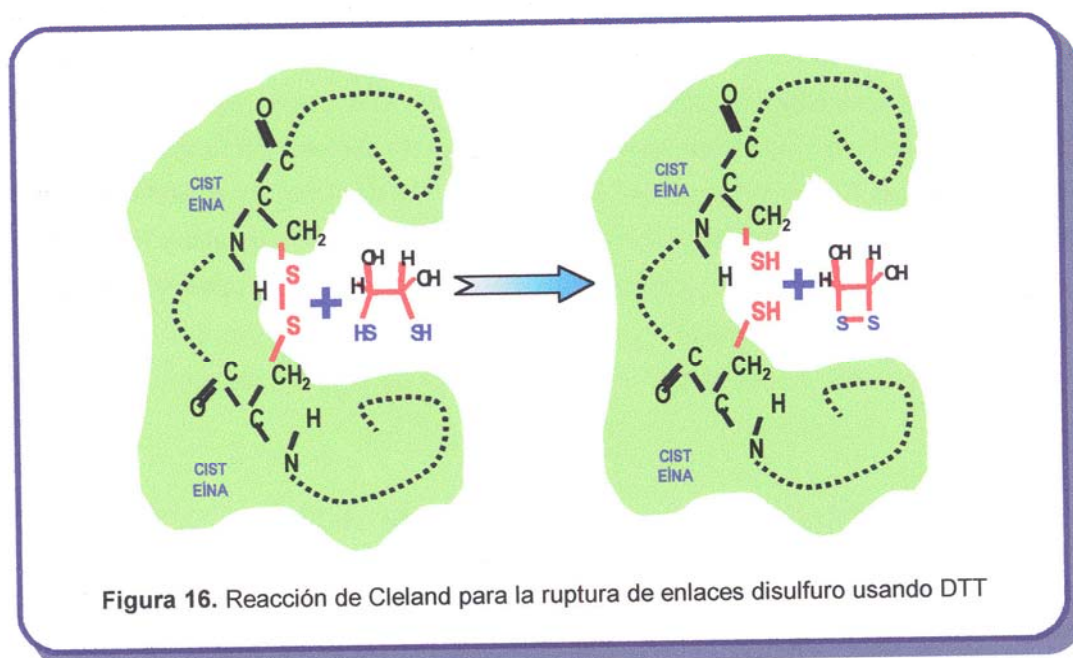
De esta forma, las muestras microsomales fueron preparadas en 500 µl de tampón TMMDSI, conteniendo 5 mM TX114 (0.3%). Para la separación de las proteínas se depositó un “colchón” (500µl) de sacarosa 6% (w/v) preparado en TMMDSI-0.03% TX114 en el fondo de un tubo cónico de 1.5 ml. La muestra fue cuidadosamente depositada en la superficie de este “colchón” e incubada 3 minutos a 30°C, para producir la condensación de la solución. El tubo fue entonces centrifugado a 300 g durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación la fase de detergente apareció como una gota oleosa en el fondo del tubo. La fase superior acuosa fue retirada y recibió un 0.3% de Tritón X114 fresco, siendo sometida a una segunda partición bajo las mismas condiciones. Tras la separación se añadió tanto TX114 como tampón a ambas fases, la acuosa y la orgánica, con el fin de obtener volúmenes equivalentes de sal y de surfactante en ambas muestras. Alícuotas de las dos fases fueron analizadas por separado mediante ensayo de intercambio con ligando radiactivo.

III.8. TRATAMIENTO CON REACTIVOS QUE ACTÚAN SOBRE LOS GRUPOS SULFHIDRILO

La modificación química de los grupos funcionales de las proteínas es una técnica ampliamente utilizada en los estudios para determinar la estructura y la función de las mismas. El azufre está presente en las proteínas en el grupo sulfhidrido de la cisteína, los puentes disulfuro de la cistina, en el grupo tioeter de la metionina, etc. Desde el punto de vista

funcional de las proteínas quizás los más interesantes sean los grupos sulfhidrilo y los puentes disulfuro. En concreto, el papel que tienen los grupos sulfhidrilo en muchos aspectos tanto funcionales como estructurales de los receptores para hormonas esteroideas están bien documentados en la literatura científica. En este sentido, el uso de reactivos que modifiquen químicamente estos dominios pueden aportarnos interesantes datos acerca de la estructura y acercarnos al papel funcional del lugar de unión para $[^3\text{H}]\text{ES}$. Como **bloqueantes de los grupos sulfhidrilo** nosotros estudiamos el efecto del metil-metanotiosulfonato (MMTS), un modificador reversible y temporal de los grupos sulfhidrilo que actúa específicamente sobre los residuos de cisteína [210]. También estudiamos el efecto de la N-etilmaleimida (NEM), que bloquea irreversiblemente los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína mediante una reacción de alquilación [211].

Por otro lado, los puentes disulfuro juegan un papel importante en el mantenimiento de la conformación estructural de muchas proteínas. El método más ampliamente utilizado para la ruptura de este tipo de enlaces es el intercambio de los grupos tiol- por grupos disulfuro. Los donadores de grupos disulfuro mas comunes son el mercaptoetanol y el ditioneitol (DTT). En nuestro caso en concreto como **bloqueante de enlaces disulfuro** usamos el DTT que reduce dichos enlaces mediante la reacción de Cleland [212] como se muestra en la Figura 16.



III.8.1. COINCUBACIÓN

Los microsomas fueron preincubados con MMTS (0-10 mM), NEM (0-10 mM), o DTT (0-50 mM) durante 1 hora a 4°C. Tras este periodo, y sin retirar dichos reactivos del medio, se llevó a cabo el ensayo de intercambio con [³H]ES durante 12 horas, y tras parar la incubación por el método del DCC, se tomaron alícuotas del sobrenadante para la medición de la radioactividad. Los ensayos control no contenían reactivo.

III.8.2. PREINCUBACIÓN

Los microsomas fueron incubados en presencia o ausencia de 10 mM de MMTS, 5 mM de NEM, o DTT (0-50 mM) durante 1 hora a 4°C. Las membranas fueron entonces sedimentadas por centrifugación a 105000 x g durante 1 hora y tras ser resuspendidas en TMMDSI fueron re-centrifugadas bajo las mismas condiciones antes de realizar el ensayo de intercambio con [³H]ES.

III.8.3. INCUBACIÓN POST-EQUILIBRIO

Se llevó a cabo el ensayo de intercambio en condiciones estándar y tras al menos 8 horas de incubación fue añadido al medio el MMTS o NEM concentrado en una pequeña alícuota (25 µl) para lograr una concentración final de 10 y 5 mM, respectivamente. Paralelamente se hicieron dos controles: al primero se le añadió el mismo volumen (25 µl) del vehículo, y en el segundo se provocó la disociación del [³H]ES del LUES mediante la adición de 200 veces de exceso de ES. La incubación en todos los casos fue detenida a diferentes tiempos (0-150 minutos) tomando alícuotas de 100 µl de la incubación que eran depositadas sobre sedimentos de DCC (0.8-0.08%, concentración final).

III.9. SOLUBILIZACIÓN

III.9.1. SELECCIÓN DEL DETERGENTE

El éxito de la solubilización y subsiguiente purificación de una proteína de membrana viene a menudo determinado por la elección de un detergente apropiado. Dicha elección puede convertirse en una tarea complicada dada la enorme lista de productos comerciales disponibles, siendo muchos de ellos idénticos pero comercializados bajo distintos

nombres. Ninguno de ellos ha destacado como la mejor elección para todos los casos. Por lo tanto, la elección del detergente está basada en la existencia de precedentes y en factores de tipo empírico más que en principios científicos.

En nuestro caso estudiamos la solubilización del LUES usando dos de los detergentes más ampliamente recogidos en la literatura: el ácido 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfónico (CHAPS), y el TX100. En las Tablas 1 y 2 se resumen las principales características de estos dos detergentes.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del CHAPS y TX100

Detergente	Peso Molecular Monómero	Peso Molecular Micela	C.M.C.	
			% (w/v)	mM
CHAPS	615	6150	49	14
TX100	650	90000	21	3

Tabla 2. Propiedades del CHAPS y TX100 en la solubilización de proteínas de membrana

Propiedad	CHAPS	TX100
Fuertemente desnaturizante	-	-
Dializable	+	-
Intercambio iónico	-	-
Forma complejos con los iones	-	+/-
Fuerte absorbancia A_{280}	-	+
Interferencia con los ensayos	-	+/-
Precipita en frío	-	-
Elevado coste económico	+	+
Toxicidad	-	-
Composición química definida	+	-
Autooxidación	-	+

III.9.2. SOLUBILIZACIÓN

En condiciones estándar y salvo que se indique lo contrario, la extracción de proteínas microsomales fue realizada incubando suspensiones microsomales a 4°C en presencia de 10 mM de CHAPS, o bien 6.6 mM de TX100 en tampón TMMDSI-0.1 M de KCl, durante 2 horas en agitación suave. Tras esta incubación el material insoluble fue retirado mediante ultracentrifugación de la muestra a 105.000 x g durante 60 minutos, desechando el sedimento resultante. El sobrenadante de esta ultracentrifugación, conteniendo las proteínas solubles fue además sometido a filtración a través de filtros estériles Millex-GS de 0.22 µm (Millipore S.A., Molsheim, Francia).

Las proteínas periféricas, débilmente adheridas a las membranas microsomales, fueron extraídas mediante tratamiento de las suspensiones microsomales con 0.75 M de KCl en tampón TMMDSI durante 30 minutos a 4°C sometidos a agitación suave. Después los microsomas fueron recuperados mediante ultracentrifugación y solubilizados de la forma descrita arriba.

III.10. PROPIEDADES HIDRODINÁMICAS DEL LUES

Las propiedades hidrodinámicas de una molécula tales como tamaño, densidad, coeficiente de sedimentación, coeficiente de fricción o el peso molecular es posible determinarlas mediante la combinación de dos técnicas: cromatografía de exclusión molecular y ultracentrifugación en gradiente de sacarosa [213].

En líneas generales podemos decir que la combinación de ambas técnicas nos proporciona una valiosa información acerca de dos aspectos fundamentales. En primer lugar, nos proporcionan un criterio operativo muy fiable de la solubilidad de la proteína con la que estamos trabajando. Como vimos en el apartado III.9., cuando tratamos las membranas con detergentes podemos obtener diferentes productos: fragmentos de membrana, agregados inespecíficos de detergente con otros componentes de membrana, complejos bien definidos de componentes específicos de las membranas, o moléculas independientes segregadas de componentes membranales más complejos. La recuperación de proteínas en el sobrenadante de una centrifugación de 60 minutos a 105.000 x g seguido de filtración a través de 0.22 µm es un criterio convencional de solubilidad. No obstante, el análisis de filtración en gel (cromatografía de exclusión molecular), o la ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa nos proporcionan criterios mucho más fiables. La mayor parte de la actividad de la proteína debe recogerse dentro del gel o del gradiente, correspondiendo la actividad recogida en el

volumen vacío (V_0) o en el fondo del gradiente a agregados de proteína o material mal solubilizado.

Por otro lado, la combinación de la cromatografía de exclusión molecular y ultracentrifugación en gradientes de sacarosa hechos en H_2O y D_2O nos proporcionan una estimación del peso molecular de las proteínas solubles.

III.10.1. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Las proteínas solubilizadas con CHAPS o TX100 (2-3 mg proteína/ml) fueron cromatografiadas en una columna de Sephacryl S-300 (50 x 1.5 cm), equilibrada y eluídas con tampón TMMDI (sin sacarosa) pH 7.5, conteniendo 1 M KCl y bien 10 mM de CHAPS o 6.6 mM de TX100. Recogimos fracciones de 1 ml a un flujo de 0.3 ml/minuto (18 ml/h). La fijación específica de [3H]ES fue determinada como ya se ha descrito.

Dos tipos de experimentos adicionales fueron también llevados a cabo: 1) Los extractos de CHAPS o TX100 (2-3 mg proteína/ml) fueron primero incubados con [3H]ES en ausencia o presencia de 10 μM de ES durante 8 horas a 0°C, y el sobrenadante obtenido tras la separación del esteroide libre por el método del DCC fue aplicado en la columna de Sephacryl S-300 en las mismas condiciones descritas arriba; 2) Los microsomas fueron primero sometidos a ensayo de intercambio con [3H]ES en presencia o ausencia de 10 μM de ES no marcado. La incubación fue detenida depositándola sobre sedimentos de DCC y entonces es cuando fue solubilizada en las condiciones anteriores. Los extractos filtrados de dicha solubilización son los que fueron sometidos a cromatografía en gel Sephacryl S-300.

Bajo idénticas condiciones, la columna fue calibrada siguiendo el método descrito por Ackers [213], utilizando para ello proteínas de radio de Stokes conocido: apoferritina (6.1 nm), alcohol deshidrogenasa (4.75 nm), albúmina sérica bovina (3.55 nm), y anhidrasa carbónica (1.6 nm). La relación entre el radio de Stokes de proteínas marcadoras y una función del coeficiente de partición ($1-K_{av}$), se representó como una regresión lineal, donde asumimos que la fase estacionaria es la totalidad del gel empaquetado.

El volumen vacío (V_0) y el volumen total (V_t) de la columna fueron determinados usando azul dextrano 2000 y $K_3Fe(SCN)_6$, respectivamente. Los volúmenes de elución de las proteínas solubilizadas y de las proteínas marcadoras fueron expresados en términos de coeficiente de partición, $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, donde V_e es el volumen de elución de la proteína considerada. El radio de Stokes de los complejos proteína-detergente fue determinado

por interpolación a partir de las rectas de calibración.

III.10.2. ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE LINEAL DE SACAROSA

El coeficiente de sedimentación aparente ($S_{20,w}$) del LUES solubilizado fue determinado mediante ultracentrifugación de la muestra previamente incubada con [^3H]ST, tal y como se describió para la cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-300.

Los gradientes lineales de sacarosa (4 ml) fueron preparados a partir de soluciones de sacarosa del 2% y 20% en TMMDI preparadas con H_2O y D_2O (98% D_2O) conteniendo 6.6 mM TX100; o soluciones de sacarosa del 14% y 34% en TMMDI preparadas con H_2O o D_2O (98% D_2O) conteniendo CHAPS (10 mM). Las muestras (0.1 ml) fueron depositadas cuidadosamente en la superficie del gradiente y las centrifugamos a 4°C (rotor Beckman SW40) durante 16 horas a 50000 o 61000 rpm para los gradientes en H_2O y D_2O respectivamente.

Las curvas para la determinación de los coeficientes de sedimentación aparentes fueron construidas a partir de gradientes paralelos, en la mismas condiciones de centrifugación, en los que se sedimentaron proteínas marcadoras: Citocromo C ($S_{20,w} = 1.17$), anhidrasa carbónica ($S_{20,w} = 2.75$), BSA ($S_{20,w} = 4.3$), y alcohol deshidrogenasa ($S_{20,w} = 7.4$). Una vez completa la centrifugación, tomamos fracciones de 150 μl por punción del fondo del tubo. La migración de las proteínas estándar fue medida mediante la determinación de la concentración proteica en cada una de las fracciones.

III.10.3. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS HIDRODINÁMICOS DEL LUES

La densidad de cada fracción fue determinada mediante pesada directa de volúmenes fijos de muestra. El coeficiente de sedimentación, $S_{20,w}$, del LUES fue calculado a partir de los coeficientes de sedimentación aparentes obtenidos en H_2O y D_2O de acuerdo con el método de Clarke [214] asumiendo que el volumen específico parcial de componente proteico del complejo proteína-detergente es $0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$ y que la misma cantidad de detergente está unida a la proteína en ambos solventes [214].

El peso molecular del lugar de unión para [^3H]ES (M_c) fue calculado a partir de su radio de Stokes (R_s), volumen específico parcial (v_c), y coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) usando la ecuación de Svedberg,

$$M_c = \frac{S_{20,w} R_s N_A 6 \pi \eta_{20,w}}{1 - v_c \rho_{20,w}}$$

Donde N_A es el número de Avogadro, $\eta_{20,w}$ es la viscosidad del H_2O a $20^\circ C$ (0.01002 g/cm·s), y $\rho_{20,w}$ es la densidad del agua a $20^\circ C$ (0.99823 g/ml). Mientras que el coeficiente de fricción f/f_0 fue calculado asumiendo una hidratación de 0.2 g/g de proteína de la siguiente forma,

$$f/f_0 = \alpha (4 \pi N_A / 3 M_c (v_c + 0.2))^{1/3}$$

III.11. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Como paso adicional en la purificación y aislamiento de la proteína que estamos caracterizando del resto de componentes solubilizados, decidimos realizar la cromatografía de intercambio iónico de las fracciones obtenidas a partir de la filtración en gel.

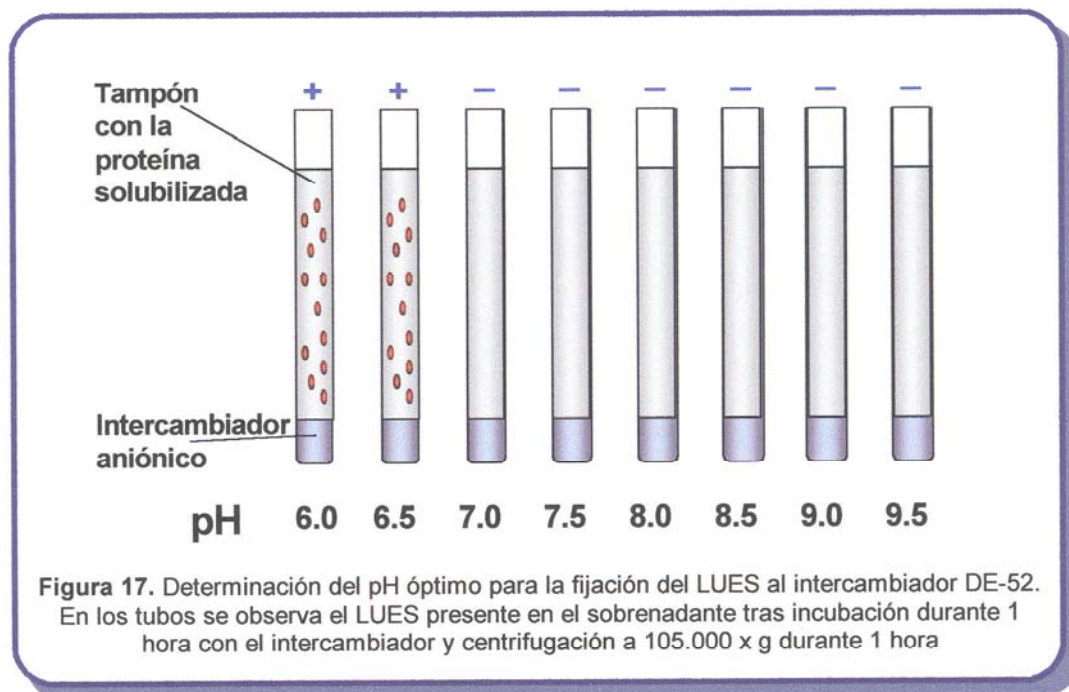
En la cromatografía de intercambio iónico se escogen el pH, la concentración de sal y el intercambiador iónico de modo que favorezcan la inmovilización de la proteína de interés sobre la resina. Bajo un conjunto de condiciones determinado, es probable que muchas proteínas se unan a un intercambiador iónico. Si la cromatografía se realiza en columna gravitatoria, las proteínas que no se adhieren al intercambiador son eliminadas simplemente dejando abierto el flujo continuo a través de dicha columna. La proteína que interesa puede ser separada del intercambiador iónico eluyendo a través de la columna un tampón de un pH y una concentración de sal que reduzca la afinidad de la proteína por la resina de intercambio iónico. Por supuesto, es probable que también se separen otras proteínas en estas condiciones. Así que de lo dicho se deduce que el primer paso para abordar con éxito la cromatografía de intercambio iónico debe ser el establecimiento de las condiciones de trabajo (pH, fuerza iónica, elección del intercambiador iónico, etc)

III.11.1. SELECCIÓN DEL pH INICIAL

Las proteínas son moléculas anfotéricas, es decir que son portadoras tanto de cargas positivas como negativas. La carga neta que poseen estas moléculas dependerá del pH del medio. Existirá para cada proteína un determinado valor de pH al cual la carga neta de la proteína será 0. A ese valor de pH se le conoce como punto isoeléctrico (pI). Cuando el pH del medio es igual al pI de la proteína, esta será incapaz de unirse al intercambiador. La elección del pH del tampón inicial determinará la carga neta de la proteína durante el experimento, y condicionará la elección de la resina de intercambio (aniónico o catiónico).

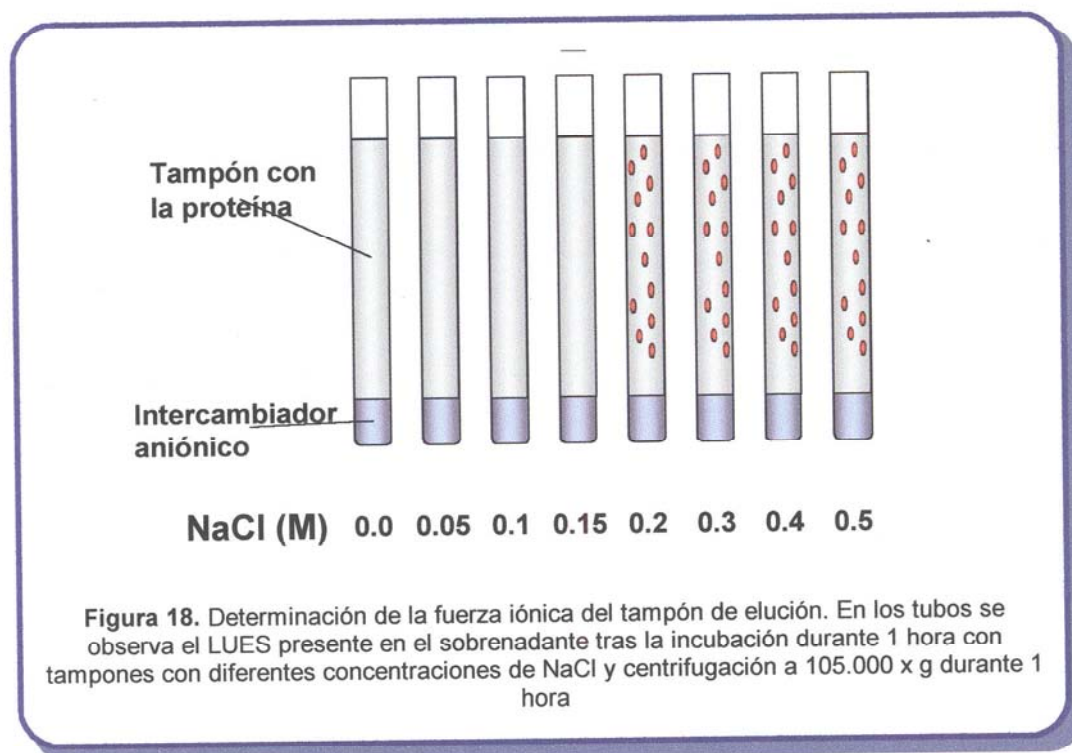
Nosotros determinamos el pH inicial del tampón en un experimento realizado en tubos de ensayo con una resina de intercambio aniónico (DE-52, Whatman) que fue incubada con proteínas solubilizadas previamente marcadas con [^3H]ES y ajustadas a diferentes valores de pH dentro del rango de estabilidad de la proteína (6 - 9.5). El desarrollo experimental se ajustó al esquema representado en la Figura 17.

En la figura se observa como la proteína se unió al intercambiador aniónico a un pH entre 6.5 y 7.0, por lo que el pH seleccionado para el tampón inicial fue de 7.5.



III.11..2. ELECCIÓN DE LA FUERZA IÓNICA DEL TAMPÓN DE ELUCIÓN

Una vez determinadas las condiciones en las que el LUES permanecía unido al intercambiador iónico, debíamos determinar en qué condiciones lo íbamos a separar del mismo. De la Figura 17 se deduce que la primera condición que debe cumplir el tampón de elución es tener un pH menor de 6.5. No obstante existen formas más selectivas de eluir las proteínas, como por ejemplo la variación (lineal o en etapas) de la fuerza iónica del tampón de elución. Con el fin de determinar la concentración de sal (NaCl) necesaria para liberar a la proteína de su unión con el intercambiador iónico planteamos el experimento que aparece esquematizado en la Figura 18. En él incubamos una pequeña cantidad de resina DE-52 en tubos de ensayo con proteínas solubilizadas a pH 7.5 de forma que nos asegurábamos la completa unión del LUES a la misma. A continuación los tubos se centrifugaban $105000 \times g$ durante 1 hora y la resina era expuesta a tampones de diferentes fuerzas iónicas.



Observamos como con 0.2 M de NaCl, obteníamos toda la actividad nuevamente en el sobrenadante, es decir que liberábamos a la proteína de su unión con el intercambiador iónico.

III.11.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para poder realizar la cromatografía de intercambio iónico debíamos previamente concentrar la muestra, ya que si no obtendríamos muy poca cantidad de proteína total en un volumen muy grande al unir el total de las fracciones que conformaban los picos de la filtración en gel. La concentración se realizó mediante ultrafiltración de la muestra a través de una membrana anisotrópica (Centriplus, Amicon). De un volumen de 15 ml (fracciones 35-50 de la filtración en gel) conteniendo un total de 2.3 mg, se recuperaron el 90% de las proteínas en un volumen final de 1 ml de tampón TDE (50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 250 mM Sacarosa, pH 7.5) conteniendo 10 mM de CHAPS. Esta operación se repitió con los picos procedente de 4 cromatografías de exclusión molecular, de tal forma que al final obtuvimos unos 8 mg de proteínas en un volumen total de 4 ml (≈ 2 mg/ml).

III.11.4. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La muestra concentrada fue cromatografiada en una columna de intercambio aniónico de DEAE celulosa (DE-52, Whatman) de 50 x 1.5 cm, previamente equilibrada con tres volúmenes del tampón de baja fuerza iónica TDE-CHAPS (10 mM). La elución la hicimos en pasos consecutivos usando el mismo tampón de equilibrado al que se añadieron cantidades crecientes de NaCl hasta una concentración final de 0M - 0.05 M - 0.2 M - 0.5M - 1 M. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 18-20 ml/h, y el colector automático se ajustó para recoger fracciones de 3.75 ml. La fijación específica de [3 H]ES fue determinada como ya se ha descrito.

III.12. MARCAJE DE FOTOAFINIDAD DEL [3 H]ES UNIDO A LAS PROTEÍNAS SOLUBILIZADAS

Uno de los principales problemas de los estudios de funcionalidad de las hormonas esteroides es la naturaleza reversible de la interacción ligando-receptor. De esta forma, la especificidad y selectividad de dicha interacción es a menudo la única forma de identificar a un polipéptido como receptor para dicho ligando. Resulta obvio que la identificación inequívoca del receptor para hormonas esteroides es un requisito básico para la determinación *in vitro* de la acción hormonal, la purificación del receptor, o la clonación de los genes del mismo.

En este sentido las técnicas de marcaje de afinidad han significado una potente herramienta de investigación en facetas tan importantes como: a) identificación de receptores,

b) comparación estructural entre las distintas variantes del receptor, c) identificación del dominio de unión del ligando, d) purificación de los receptores, e) generación de anticuerpos contra el receptor, f) identificación de los genes del receptor para hormonas esteroides, etc...

El **marcaje de fotoafinidad** es una variante de la técnica de afinidad en la que se usa un ligando fotoactivado. La muestra es incubada con el ligando que forma complejo con la proteína receptora, y el exceso de esteroide libre es retirado del medio. Entonces la muestra es irradiada durante un tiempo y a una longitud de onda que viene definida por la fotoquímica del grupo fotoactivable del ligando. Con este procedimiento forzamos la formación de una especie altamente reactiva que será capaz de formar un enlace covalente con la proteína receptora.

Así, los microsomas o extractos solubilizados fueron marcados *in vitro* con 300 nM de [3 H]ES durante 2 horas a 25°C en ausencia o presencia de un exceso de 200 veces de ligando no radiactivo. Los microsomas o extractos solubles marcados fueron divididos en fracciones de 350 μ l que fueron repartidos en placas de cultivo de 24 pocillos (15 mm de diámetro). En los experimentos que se presentan en esta Tesis Doctoral, las placas fueron depositadas debajo de una fuente de luz ultravioleta (transiluminador de 254 nm a una distancia de 100 mm sobre la placa; iluminado durante 18 minutos a 0-4°C). El procedimiento era escalable.

Aunque se obtenía un marcaje similar a 254 nm con tiempos mayores de exposición, esto no era conveniente, debido a que dichas variaciones provocaban un mayor daño en las proteínas.

Las muestras marcadas eran precipitadas con ácido tricloroacético (0.5%). Los precipitados fotomarcados eran entonces resuspendidos y disueltos en 150 μ l de tampón 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, conteniendo 10% (v/v) de glicerol, 2% (w/v) de SDS, y 0.001% (w/v) de azul de bromofenol, y conteniendo o no 100 mM de DTT. Tras calentar 5 minutos a 100°C la muestra fue sometida a electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

III.13. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Las muestras fotomarcadas fueron sometidas a electroforesis en presencia de SDS en geles de 20 cm. de longitud por el método de Laemli [215]. Todos los extractos fotomarcados contenían aproximadamente 100 µg de proteínas y fueron cargados en un gel separador de poliacrilamida en gradiente (12-20% o 6-16%), usando un gel concentrador al 4% de acrilamida/bis-acrilamida. Los geles fueron calibrados usando patrones marcados con ^{14}C para SDS-PAGE (Fosforilasa B (97.4 kDa), Albúmina Sérica Bovina (66.2 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa Carbónica (31 kDa), Inhibidor de Tripsina (21.5 kDa), y Lisozima (14.4 kDa)).

Una vez terminada la electroforesis los geles fueron fijados y teñidos con Azul Coomassie Brillante, seguido de destinción con metanol al 45% y ácido acético al 7%, y posterior rehidratación con metanol al 5% y ácido acético al 7%. Los geles fueron entonces cortados en calles y cada calle fue a su vez cortada en porciones de 2 mm, que fueron digeridas >12 horas a 50°C con 900 µl de H_2O_2 . Tras la digestión se le añadió a cada vial el líquido de centelleo (20 ml) y se midió la radiactividad en el contador de centelleo.

El rendimiento del fotomarcaje fue calculado a partir de la radioactividad total del pico (DPM) a la que se restó la línea basal, y se expresó como porcentaje del lugar de unión para $[^3\text{H}]\text{ES}$ total presente en la muestra inicial no fotomarcada, que previamente había sido determinado.

III.14. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante análisis de la varianza (test de ANOVA). Las comparaciones entre dos muestras, a partir de los resultados obtenidos con el test de ANOVA, se realizaron mediante el test de Neumann-Keuls. Cuando sólo se comparaban los resultados de dos muestras se usaba el test t de Student.

III.15. REPRESENTACIÓN GRÁFICA

Las gráficas de este trabajo fueron realizadas con el programa GraphPad Prism (Graph Pad Software, Inc.).

IV. RESULTADOS

IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE $[^3\text{H}]\text{ES}$ A LOS MICROSOMAS DE HÍGADO DE RATA

La caracterización de la unión del ES a los microsomas de hígado de rata se llevó a cabo, usando para ello $[^3\text{H}]\text{ES}$ como ligando [242].

IV.1.1. CURVA DE SATURACIÓN DE LA UNIÓN DEL $[^3\text{H}]\text{ES}$ A LOS MICROSOMAS

El primer paso en la experimentación con $[^3\text{H}]\text{ES}$ fue dilucidar si este ligando se unía a un lugar específico de unión. Previamente, habíamos determinado que la unión del $[^3\text{H}]\text{ES}$ (150 nM) a los microsomas en función de la concentración de proteína microsomal (de 0.05 a 6 mg/ml) era un proceso lineal en el rango de 1 a 3.5 mg/ml. Según esto decidimos realizar los ensayos de intercambio a una concentración proteica fija de 2 mg/ml, claramente dentro del rango de linealidad (datos no mostrados).

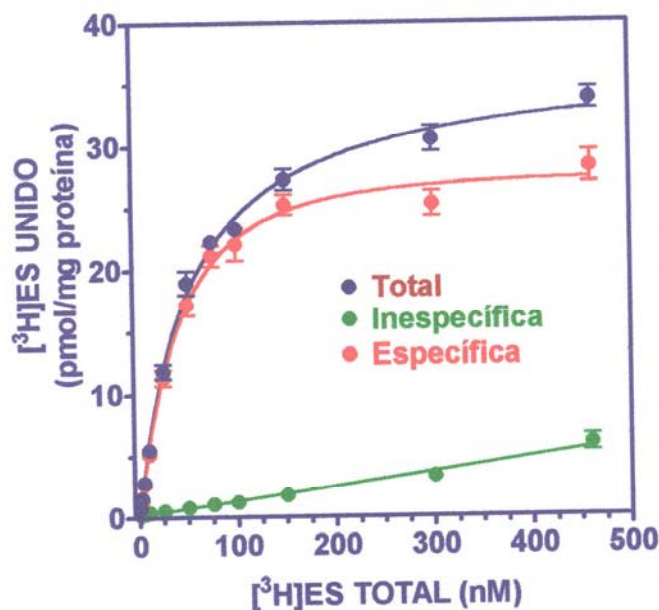


Figura 19. Curva de saturación de $[^3\text{H}]\text{ES}$ a microsomas de hígado de rata. Se incubaron alícuotas de microsomas con concentraciones crecientes de radioligando para calcular la unión total. Paralelamente se incubaron tubos que, además del radioligando, contenían un exceso de 200 veces de ES, con lo que obtuvimos la unión inespecífica. De la diferencia entre ambos valores se obtuvo la unión específica

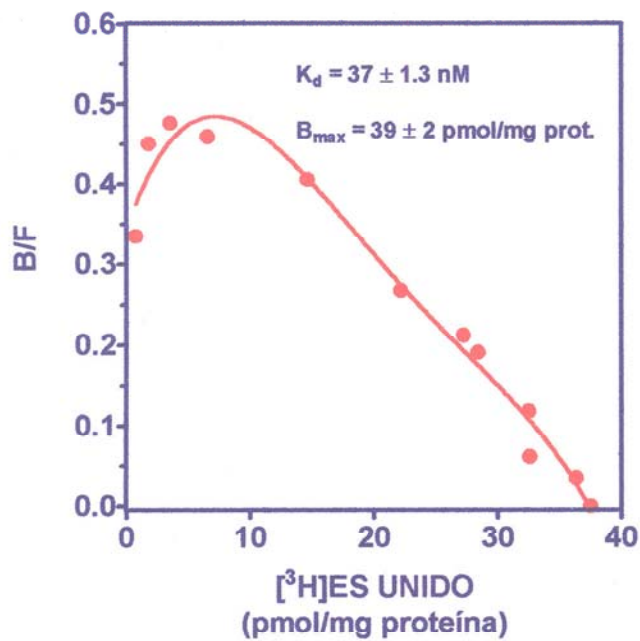


Figura 20. Análisis de Scatchard de los datos de la unión específica representados en la Figura 19

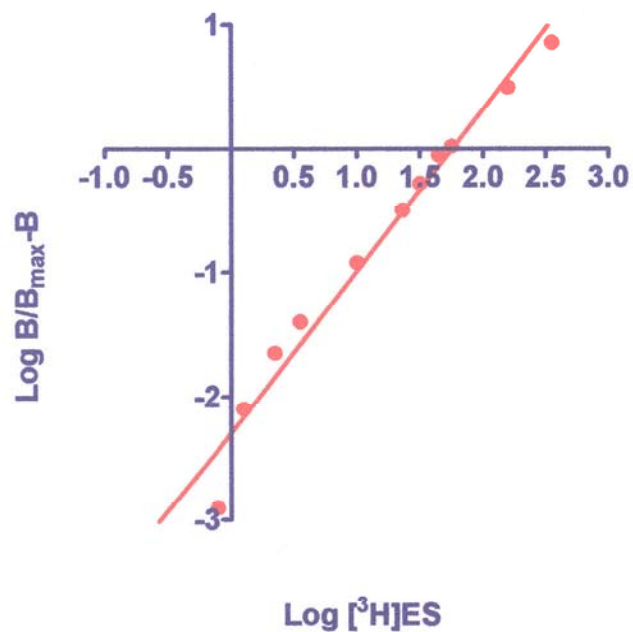


Figura 21. Análisis de Hill de los datos de la unión específica del $[^3\text{H}]\text{ES}$ a los microsomas

Cuando los datos de la unión específica de [3 H]ES a los microsomas se sometieron al análisis de Hill, el coeficiente obtenido (n_H) fue de 1.8 ± 0.02 a una B_{max} mayor de 28 ± 4 pmol/mg proteína (Figura 21), lo cual sugería la existencia de un cooperativismo positivo entre los sitios de unión de [3 H]ES, mediante el cual la afinidad de este lugar de unión por el esteroide aumentaría conforme aumenta su ocupación por el mismo.

Como hemos señalado, tanto la morfología convexa de la representación de Scatchard como el coeficiente de Hill revelan que la interacción del [3 H]ES con los microsomas es compleja y sugieren un cooperativismo positivo. No obstante, existen varios artefactos experimentales que pueden alterar un ensayo de intercambio y, en consecuencia, producir morfologías curvilíneas sugerentes de cooperativismo positivo en el análisis de Scatchard. Por lo tanto la realización de una serie de experimentos para descartar que dicha morfología fuera debida a artefactos experimentales se hacía necesaria. En la Tabla 3 se resumen los posibles artefactos que pueden dar lugar a cooperativismo positivo, y el método que hemos utilizado para descartarlo.

Tabla 3. Artefactos responsables de la apariencia de cooperativismo positivo en los ensayos de intercambio

CAUSAS	DETECCIÓN Y SOLUCIÓN
1. Metabolización del ligando	TLC
2. Impureza del ligando	TLC
3. Destrucción de los lugares de unión específica	Inhibidores de proteasas Disminuir la temperatura
4. Sobreestimación de la actividad inespecífica	DCC vs SM-2 vs Filtración 0.22 μ m
5. Inestabilidad del complejo ligando-proteína	Cinética de asociación
6. No-equilibrio del complejo ligando-proteína	Cinética de asociación
7. Adsorción del ligando	Añadir albúmina

Con estos experimentos pudimos descartar todas las posibles causas de artefacto. Por un lado concluimos que no existía sobreestimación de la fijación inespecífica ya que observábamos dicho cooperativismo positivo tanto si usábamos el método descrito del DCC para la separación del exceso de esteroide libre, como si usábamos métodos alternativos de separación como el uso de filtros de 0.22 μ m (Millex de Millipore), o la adsorción del esteroide libre a resinas lipofílicas como la BioBeads SM-2 (BioRad).

También descartamos la posibilidad de que existiera metabolización o impureza del [3 H]ES, ya que cuando éste fue incubado durante 24 horas con microsomas hepáticos a 0°C

y posteriormente sometido a cromatografía en capa fina, más del 95% de la radiactividad fue recuperada con el estándar de ES.

Ensayamos diferentes variaciones sobre el tampón, con el fin de comprobar su posible influencia sobre los parámetros obtenidos del ensayo de intercambio, sin que obtuviéramos variaciones significativas con respecto a las ya descritas, así como tampoco se detectaron cambios en dichos parámetros por la adición de inhibidores de la proteólisis o de albúmina (0.1%) al tampón estándar.

IV.1.2. CINÉTICA DE ASOCIACIÓN DEL [3 H]ES A LOS MICROSOMAS

La caracterización de la interacción ligando-proteína debe ser estudiada desde un punto de vista cinético. Nosotros estudiamos la cinética de asociación específica del [3 H]ES a los microsomas siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos.

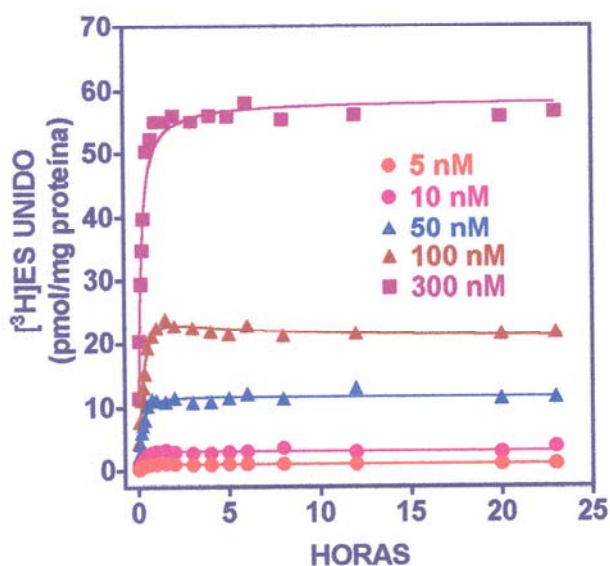


Figura 22. Cinética de asociación del [3 H]ES a los microsomas a 0°C: efecto de la concentración de radioligando

Los resultados de los experimentos de asociación pusieron de manifiesto que la unión del [3 H]ES a los microsomas es particularmente rápida, ya que a los 20 minutos de incubación observábamos una fijación específica del 65%. No obstante, para alcanzar el estado de equilibrio fueron necesarias al menos 6 horas de incubación. Dicho equilibrio, una vez alcanzado, permanecía estable al menos 24 horas. En la Figura 22 se muestra como la

cinética de asociación, independientemente de la concentración de ligando utilizado (de 5 a 300 nM), sigue una función bi-exponencial, que pudo en cada uno de los casos resolverse en un componente rápido y otro componente lento.

Los datos correspondientes al análisis de esta función bi-exponencial para cada concentración se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de la cinética de asociación de [³H]ES a los microsomas hepáticos

Concentración (nM)	Componente rápido		Componente lento	
	$t_{1/2}$ (min)	Sitios (%)	$t_{1/2}$ (min)	Sitios (%)
5	2.99 ± 0.9	48 ± 2	48.8 ± 32.5	52 ± 4
10	2.71 ± 0.6	55 ± 8	40.9 ± 10.5	45 ± 6
50	2.11 ± 0.6	43 ± 7	31.7 ± 11.7	57 ± 8
100	3.94 ± 0.4	28 ± 6	65.4 ± 1.6	72 ± 9
300	1.95 ± 0.3	59 ± 9	122 ± 33.9	41 ± 9

IV.1.3. CINÉTICA DE DISOCIACIÓN DEL [³H]ES DE LOS MICROSOMAS

La cinética de disociación fue llevada a cabo a 0°C bajo las mismas condiciones descritas para la cinética de asociación.

Tras 8 horas de preincubación de los microsomas con [³H]ES, se provocó la disociación de éste mediante la adición de ES o DA, según el procedimiento descrito en Material y Métodos. La actividad específica de la unión de [³H]ES a los microsomas fue completamente revertida por la adición de dichas hormonas (ES y DA) tal y como se muestra en la Figura 23.

Al igual que vimos en la cinética de asociación, los datos se ajustan mejor a una función bi-exponencial, cuyo análisis matemático nos permitió resolverla en dos componentes muy bien definidos: un componente de disociación rápida y un segundo componente de disociación lenta, según se muestra en la Tabla 5.

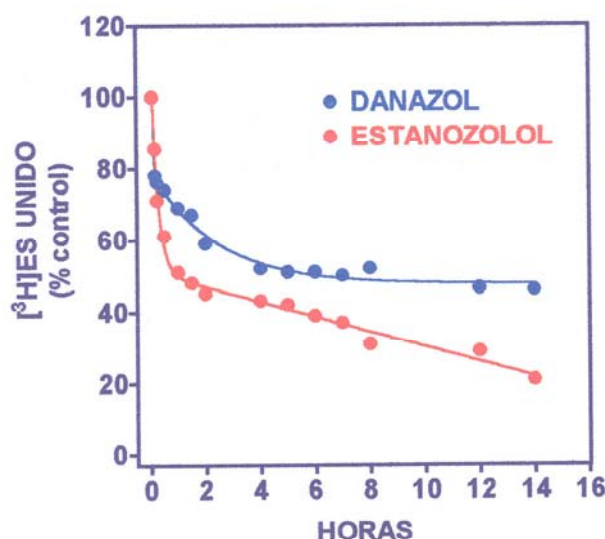


Figura 23. Cinética de disociación del $[^3\text{H}]\text{ES}$ de los microsomas provocada por Estanozolol o Danazol.

Tabla 5. Análisis matemático de los datos de la cinética de disociación del $[^3\text{H}]\text{ES}$ de los microsomas

Inhibidor	Componente rápido		Componente lento	
	$t_{1/2}$ (min)	Sitios (%)	$t_{1/2}$ (min)	Sitios (%)
ESTANOZOLOL	39 ± 9	36 ± 4	530 ± 92	64 ± 7
DANAZOL	86 ± 5	26 ± 1	3281 ± 101	74 ± 1

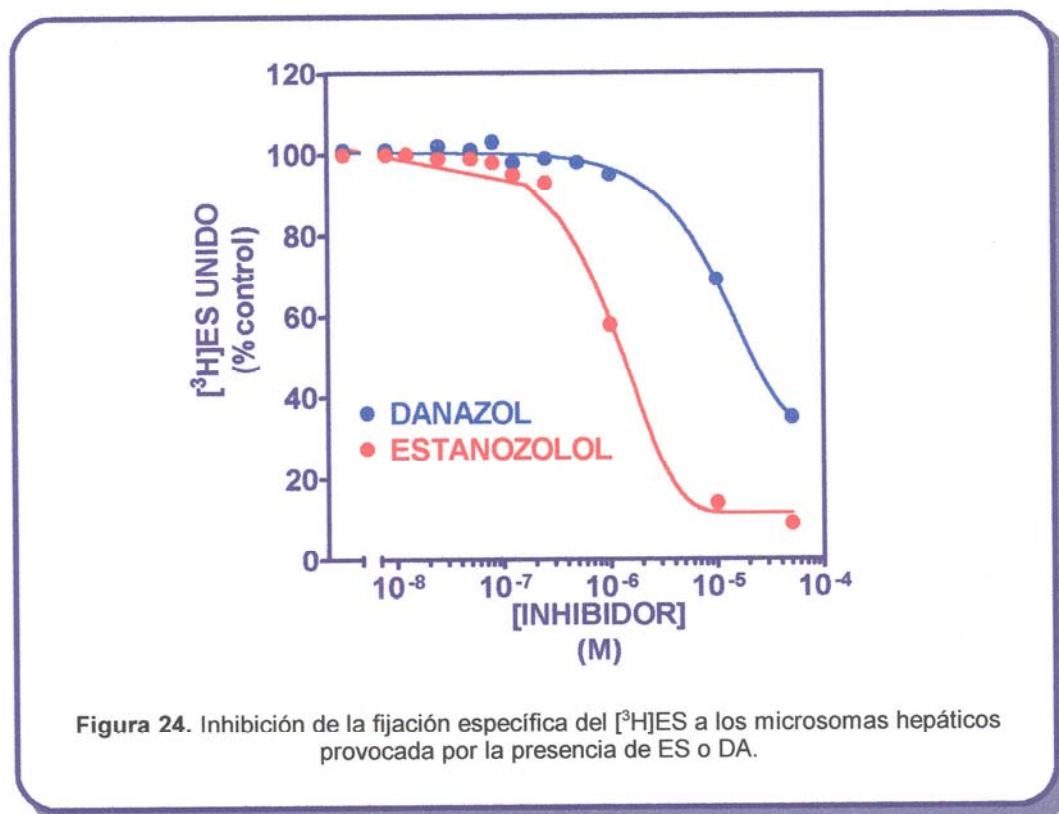
Estos datos revelan la existencia de dos estados de afinidad diferentes del complejo $[^3\text{H}]\text{ES}$ -proteína microsomal. El comportamiento bifásico tanto de la cinética de asociación como de la cinética de disociación es consistente con el modelo de cooperativismo positivo que el análisis de Scatchard y el coeficiente de Hill cercano a 2 sugerían.

IV.1.4. ESPECIFICIDAD DE LA UNIÓN DEL $[^3\text{H}]\text{ES}$ A LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS.

La especificidad de la unión del $[^3\text{H}]\text{ES}$ a los microsomas hepáticos fue determinada usando un amplísimo rango de fármacos de naturaleza esteroide o no. Se realizaron experimentos de competición dosis-respuesta de la forma señalada en Material y Métodos, en los que se añadieron concentraciones crecientes (de 0 a 50 μM) de esteroide al medio de incubación. De la curva de desplazamiento obtenida para cada esteroide, se calculó su valor

de IC_{50} , tomando el valor de fijación específica del $[^3H]ES$ sin competidores como el 100%.

Como se muestra en la Figura 24 y Tabla 6, de los cerca de 100 compuestos ensayados (incluyendo un buen número de andrógenos de síntesis y antiandrógenos), tan sólo el propio ES y su análogo estructural el DA, fueron capaces de competir eficientemente con el $[^3H]ES$ por su unión a los microsomas.



La mayor afinidad por el lugar de unión microsomal para $[^3H]ES$, la presentó el propio ES ($IC_{50} = 0.51 \pm 0.1 \mu M$), seguido, con mucha menor afinidad, por su análogo estructural, el DA ($IC_{50} = 9.81 \pm 0.9 \mu M$). En la tabla 6 se relaciona el resto de productos ensayados, los cuales fueron incapaces de inhibir la unión de $[^3H]ES$ a los microsomas hepáticos.

Tabla 6. Compuestos incapaces de inhibir la unión [³H]ES al LUES

Andrógenos y antiandrógenos	Esteroides sulfatados
Androstenediona	Dehidroisoandrosterona (sulfato)
Bolasterona	Epiandrosterona (sulfato)
Ciproterona	Estradiol (sulfato)
Ciproterona (acetato)	Estriol (sulfato)
4-Clorotestosterona 17-acetato	Estrona (sulfato)
5α-Dihidrotestosterona	
Etisterona	Progestágenos y antiprogestágenos
Fluoximesterona	Levonorgestrel
Flutamida	Mifepristona (RU 486)
Mestalina	Noretindrona
Mestanolona	Noretinodrel
Metandriol (dipropionato)	Pregnenolona carbonitrilo
Metandrostenolona	Progesterona
17α-Metiltestosterona	Promegestona (R 5020)
Metiltrienolona (R-1881)	
Mibolerona	Inhibidores de Citocromo P450
Nandrolona	Aminoglutetimida
Oximetolona	Cimetidina
Testosterona	Clofibrato
Zanoterona	Cloranfenicol
	Clotrimazol
	Ferricianuro potásico
Glucocorticoides	Metirapona
Cortisol	Miconazol
Cortisona	α-Naftoflavona
Corticosterona	Proadifeno (SKF-525A)
Dexametasona	
Dexametasona (21-mesilato)	Inductores de Citocromo P450
Hidro cortisona	Espironolactona
Prenisolona	Lindano
Triamcinolona	β-Naftoflavona
Triamcinolona (acetónido)	Pregnenolona (16α-carbonitrilo)
Nivazol	Troleandromicina
Nivacortol	
	Otros
Estrógenos y antiestrógenos	Aldosterona
Clomifeno	Anilina (hidrocloruro)
Dietilestilbestrol	Bromosulfoptaleina
17α-Estradiol	Cianuro potásico
17β-Estradiol	Colesterol
Estriol	Digoxigenina
Estriol-3-metil éter	Imidazol
Estrona	Haloperidol
Estrona-3-metil éter	Metilpiridil propanona
Etinilestradiol	Pirazol
Mestranol	Triptamina (hidrocloruro)
Tamoxifen	Verapamil
4-OH-Tamoxifen	Vinblastina
	Vincristina

IV.2. DISTRIBUCIÓN TISULAR Y SUBCELULAR DEL LUES

Con el fin de optimizar el proceso de caracterización y purificación procedimos a estudiar la distribución tisular así como la localización subcelular del LUES. De esta forma podríamos elegir para dicha caracterización aquel tejido y aquella fracción celular que mayor concentración presentara.

IV.2.1. DISTRIBUCIÓN TISULAR DEL LUGAR DE UNIÓN PARA [³H]ES

Los experimentos que condujeron a la descripción del LUES fueron desde el principio realizados en tejido hepático ya que es en dicho tejido donde habíamos previamente descrito y caracterizado los LUBAG, como ha quedado claramente expuesto en el apartado de "Introducción".

Tabla 7. Abundancia del lugar de unión para [³H]ES en los diferentes tejidos de la rata

TEJIDO	Fijación específica de [³ H]ES
	(pmol/mg proteína)
HÍGADO	40.20 ± 6.00
RIÑÓN	1.12 ± 0.27
BAZO	0.87 ± 0.59
PULMÓN	0.52 ± 0.07
ESÓFAGO	0.42 ± 0.13
SUPRARRENALES	0.48 ± 0.16
CEREBRO	0.40 ± 0.11
COLON	0.46 ± 0.09
MÚSCULO ESQUELÉTICO	0.40 ± 0.22
INTESTINO DELGADO	0.31 ± 0.03
PRÓSTATA	0.36 ± 0.03
ÚTERO	0.34 ± 0.14
OVARIO	0.33 ± 0.13
TESTÍCULOS	0.16 ± 0.03
SUERO	0.06 ± 0.01
CORAZÓN	0.02 ± 0.02

No obstante, quisimos conocer si este lugar de unión estaba presente en algún otro tejido de la rata, tanto en el macho como en la hembra. Para ello obtuvimos, de forma independiente, microsomas de cada uno de los tejidos usando para ello el sobrenadante post-mitocondrial de la forma descrita en Material y Métodos. Dichos microsomas fueron incubados

durante 12 horas con [^3H]ES a 0°C de la forma habitual. Aunque la presencia del lugar de unión se detectó en la práctica totalidad de los tejidos investigados (tabla 7), fue el tejido hepático el que mayor concentración presentó, siendo ésta del orden de 40-2000 veces superior a la del resto de los tejidos. Por lo tanto en lo sucesivo elegimos proseguir la caracterización del LUES usando microsomas de hígado.

IV.2.2. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DEL LUGAR DE UNIÓN PARA [^3H]ES

Los experimentos realizados hasta el momento indican que el lugar de unión para [^3H]ES está localizado en la fracción microsomal, asociado aparentemente con el retículo endoplásmico, que es, según se ha demostrado por microscopía electrónica, el componente mayoritario de dicha fracción. Dichos hallazgos fueron confirmados mediante la obtención de fracciones celulares puras a partir de hígado de rata usando para ello las diferentes técnicas detalladas en Material y Métodos. Una vez obtenidas las distintas fracciones se realizó en ellas el ensayo de intercambio con [^3H]ES (150 nM), obteniéndose los resultados que aparecen reflejados en la Figura 25.

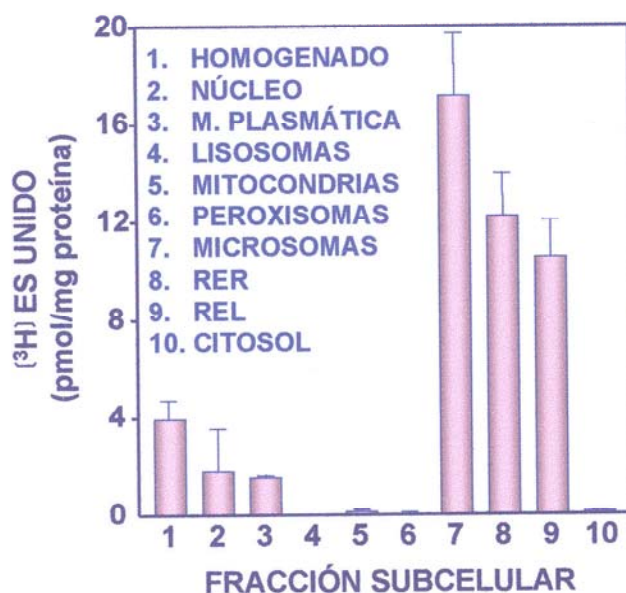


Figura 25. Distribución subcelular de la fijación específica de [^3H]ES

Observamos un enriquecimiento de 4-5 veces en la fracción microsomal, distribuyéndose dicha actividad de forma equitativa entre el retículo endoplásmico liso y rugoso. También observamos fijación específica de [³H]ES, aunque no enriquecimiento, en las fracciones de membrana plasmática y nuclear. El resto de fracciones (mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, citosol) no presentaban fijación específica significativa.

En las fracciones que mostraron fijación específica de [³H]ES se comparó el enriquecimiento de la fijación específica en cada fracción individual con la distribución de los marcadores enzimáticos específicos de la fracción (Tabla 8)

Tabla 8. Correlación entre la fijación específica de [³H]ES en las fracciones subcelulares y la actividad enzimática de los marcadores específicos de fracción

	[³ H]ES unido (pmol/mg proteína)	[³ H]ES unido relativo (%)	NADPH cit c reductasa (nmol/min/mg proteína)	5'-nucleotidasa (nmol/min/mg proteína)
Homogenado	3.9 ± 0.7	100	100	100
Microsomas	17.2 ± 2.5	441	335 ± 76	127 ± 6
RE liso	12.2 ± 1.7	313	367 ± 102	186 ± 18
RE rugoso	10.4 ± 1.5	266	267 ± 27	20 ± 2
Membrana plasmática	1.6 ± 0.1	41	84 ± 5	587 ± 76
Núcleo	1.8 ± 1.7	46	78 ± 11	52 ± 15

De los resultados que se muestran en la Tabla 8 se deduce que parte de la actividad encontrada en la membrana plasmática y en la fracción nuclear pueden ser debida a una contaminación con membranas procedentes del retículo endoplásmico, como lo demuestra el hecho de la elevada actividad de NADPH citocromo c reductasa que presentan.

De este modo los datos demuestran que la fijación específica de [³H]ES se concentra principalmente en el retículo endoplásmico. No obstante, a juzgar por la actividad de 5'-nucleotidasa, dicha fracción parece estar contaminada por membrana plasmática. Por lo tanto, no podemos descartar la existencia de una pequeña concentración de lugares de unión para [³H]ES asociada a la membrana plasmática.

IV.3. DEMOSTRACIÓN DE LA NATURALEZA PROTEICA DEL LUES

Un apartado clásico en la caracterización de un lugar de unión es la determinación de la naturaleza biológica de la molécula. El tratamiento de los microsomas con diferentes enzimas proteolíticas, así como experimentos *in vivo* con inhibidores de la síntesis de proteínas nos informan acerca de la naturaleza proteica de la molécula. Por otro lado, el tratamiento de los microsomas con enzimas hidrolíticos como glucosidasas o fosfolipasas, nos aportan información sobre el papel que juegan los residuos de ácido siálico o los fosfolípidos de membrana en la fijación específica del [3 H]ES. Los resultados de estos experimentos son los que a continuación detallamos

IV.3.1. TRATAMIENTO DE LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS CON PROTEASAS

La sensibilidad del LUES fue estudiada mediante la preincubación de los microsomas hepáticos (0.5 mg/ml) con concentraciones crecientes (1-1000 μ g/ml) tripsina o proteinasa K, durante 2 horas a 37°C tal y como se describe en Material y Métodos, antes de realizar el ensayo de intercambio con [3 H]ES. En la Figura 26 se muestran los resultados de este experimento y podemos observar como el LUES es sensible a la acción de las proteasas.

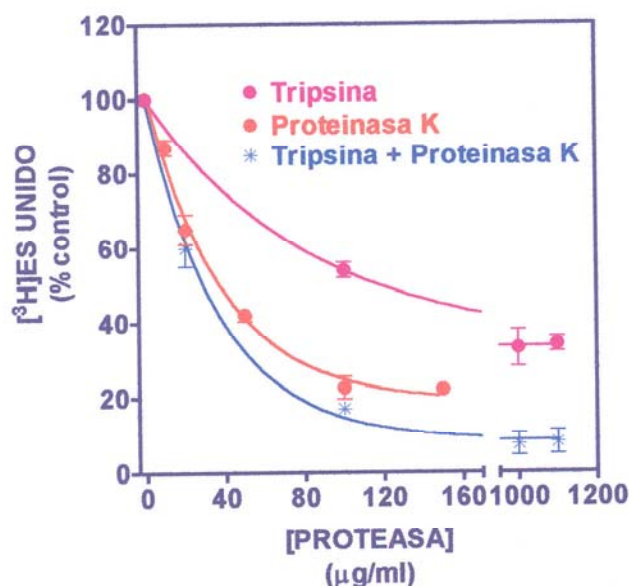


Figura 26. Influencia del pre-tratamiento con proteasas (Proteinasa K y Tripsina) sobre la fijación específica de [3 H]ES al LUES.

Los datos muestran una mayor sensibilidad del lugar de unión a la proteinasa K, ya que en estas condiciones con sólo 100 µg/ml se eliminaba el 80% de la fijación específica de [³H]ES con respecto al control, mientras que en el caso de la tripsina, para eliminar el 70% de la actividad específica es necesaria una concentración de 1mg/ml. En cualquier caso, el mayor efecto se observó en microsomas que eran preincubados con tripsina y posteriormente incubados con proteinasa K.

Los hallazgos de estos experimentos aportan claras evidencias de que el LUES es de naturaleza proteica, pero también que el locus de unión del [³H]ES presenta una sensibilidad diferente a las enzimas proteolíticas ensayada.

Los microsomas, según se ha demostrado con microscopía electrónica, están compuestos mayoritariamente por membranas derivadas del RE, pero también aparato de Golgi, peroxisomas, endosomas, etc., que por su naturaleza hidrofóbica adoptan forma de “sacos” completamente cerrados y de forma esférica. Por lo tanto, cuando los microsomas son sometidos a la acción de enzimas proteolíticos, estos sólo pueden acceder a las proteínas localizadas, total o parcialmente, en la parte exterior de los mismos. Por esta razón previamente al tratamiento de los microsomas con los enzimas los sometimos a una permeabilización con TX100 (0.08%) como vimos en Material y Métodos. Cuando los microsomas no eran sometidos al tratamiento de permeabilización (datos no mostrados en esta tesis) la disminución de la fijación específica provocada por las proteasas era mucho menos evidente (30-40%).

Si tomamos estos datos en conjunto podemos aseverar que esta proteína tiene una porción extramembranal que es importante para la unión del [3H]ES. Por otro lado, también podemos afirmar que la proteína tiene un lugar de anclaje en la membrana, y que en ese lugar de anclaje, o bien en una porción luminal, existe actividad de fijación específica para [³H]ES, que sólo desaparece cuando permeabilizamos los microsomas y las proteasas pueden acceder al interior de los mismos.

Experimentos *in vivo* en los que se administró a los animales CHX, un potente inhibidor de la síntesis de proteínas, nos proporcionaron la confirmación de que el LUES es de naturaleza proteica. Ratas macho Sprague-Dawley adultas fueron inyectadas con una dosis de 2 mg/kg p.v. de CHX cada 8 horas, durante 24 horas. Los animales fueron sacrificados a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, ó 24 horas después de haber recibido la primera dosis. La Figura 27 muestra como tras una administración de CHX de 24 horas la fijación específica de [³H]ES cae hasta un 60% del control. Es decir, que el mantenimiento de los niveles normales de fijación microsomal específica de [³H]ES es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas. Además,

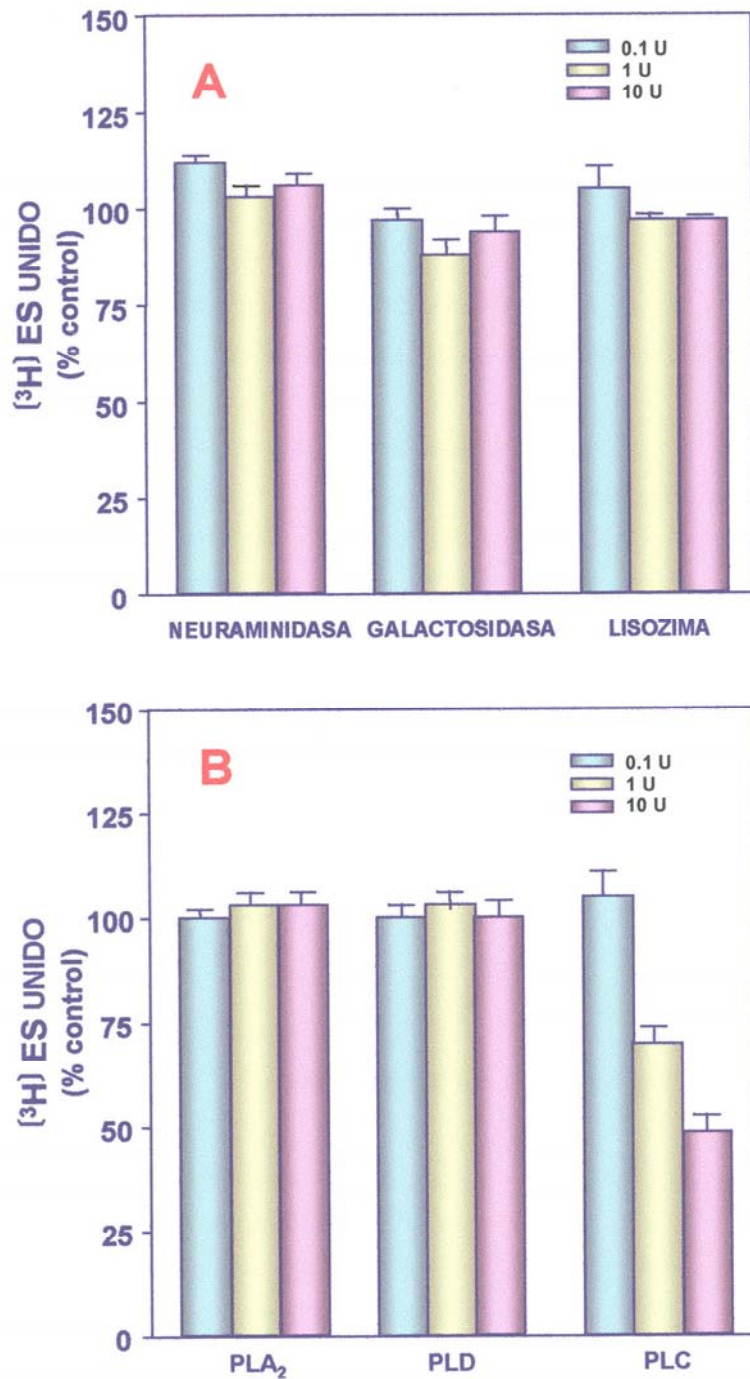


Figura 28. Efecto del tratamiento de los microsomas con glucosidasas (panel A) o fosfolipasas (panel B) sobre los LUES.

IV.4. TOPOLOGÍA DEL LUES

Como hemos visto en apartados anteriores, el LUES es una proteína asociada con la bicapa lipídica del retículo endoplásmico. Ahora bien, las proteínas asociadas con membranas pueden ser periféricas o integrales de la misma. Con el objetivo de conocer el tipo de interacción que tiene el LUES con la bicapa lipídica se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

IV.4.1. DISRUPCIÓN DE LAS INTERACCIONES HIDROFÍLICAS Y ELECTROSTÁTICAS DE LAS PROTEÍNAS CON LA BICAPA LIPÍDICA

Las proteínas periféricas de membrana pueden ser solubilizadas bajo condiciones que rompen las interacciones hidrofílicas, como por ejemplo el uso de elevadas concentraciones salinas (>0.15 M), condiciones extremas de pH (pH 3-5; pH 8-12); o quelación de metales. Con esta finalidad, se preincubaron los microsomas con concentraciones crecientes de KCl (de 0.1 a 1.5 M) tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados obtenidos muestran que ninguna de las concentraciones ensayadas fue capaz de eliminar, o ni tan siquiera disminuir, la fijación microsomal específica de [3 H]ES con respecto al control no tratado, a pesar de que la concentración de proteínas en la fracción solubilizada (sobrenadante) fue máxima con una concentración de 1 M de KCl.

Estos datos sugieren que el LUES está fuertemente unido a la bicapa lipídica del retículo endoplásmico.

IV.4.2. PARTICIÓN DE FASES CON TRITÓN X-114

Una forma muy útil de separar las proteínas integrales de las periféricas es usar las propiedades de partición de fases que posee el detergente no-iónico Tritón X-114 (TX114). Dicho detergente, a temperaturas superiores a 20°C sufre una partición en dos fases: una fase orgánica rica en detergente; y una fase sobrenadante acuosa (con una concentración muy baja de detergente). Cuando se solubilizan las proteínas de membrana con este detergente y se somete la muestra a temperaturas superiores a 20°C, las proteínas integrales (hidrofóbicas) pasan a la fase orgánica, mientras que las periféricas (hidrofílicas) se quedan en la fase acuosa.

Siguiendo este criterio, los microsomas hepáticos fueron sometidos a una

solubilización previa con 1M de KCl con el fin de descartar todas las proteínas periféricas de membrana junto con el sobrenadante. Los microsomas resultantes fueron solubilizados con TX114 de la forma descrita en Material y Métodos.

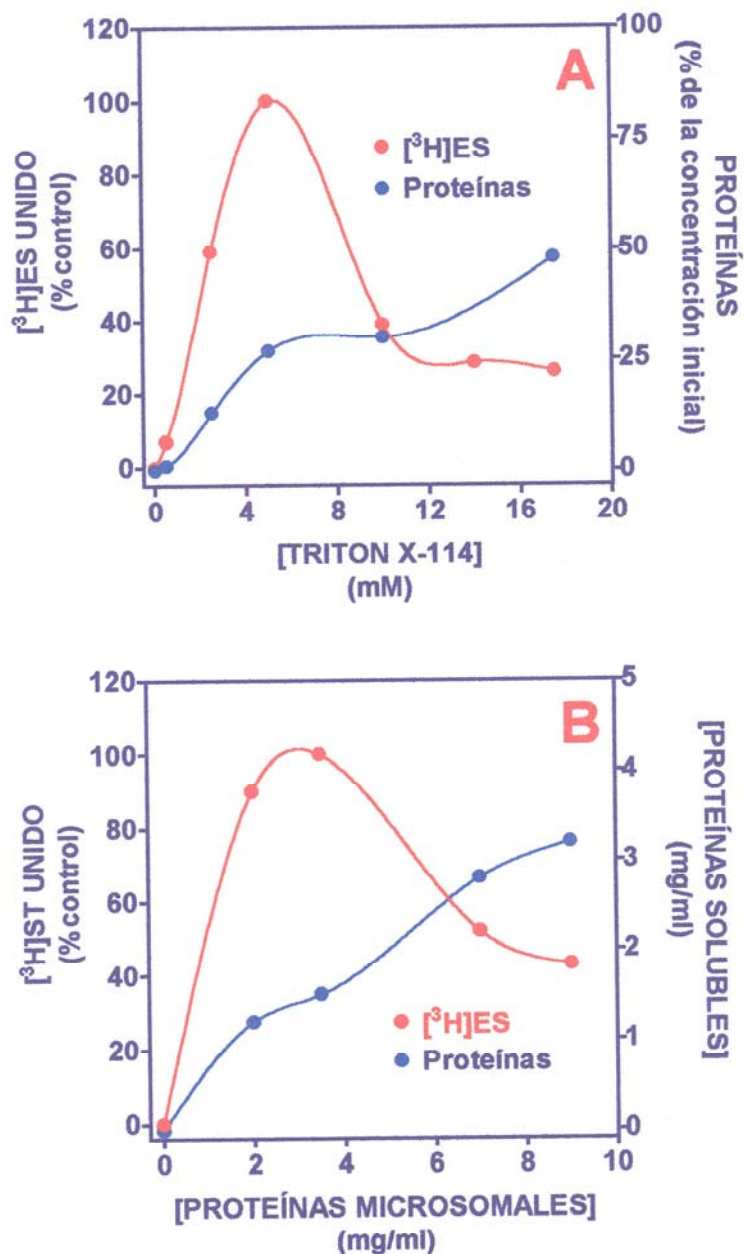


Figura 29. Arriba: efecto de concentraciones crecientes de TX114 sobre la solubilización del LUES. Abajo: efecto de la concentración de proteínas microsomales en la solubilización del LUES con 6 mM de TX114

Para comprobar cuáles eran las condiciones de solubilización óptimas (máxima capacidad de fijación específica de [^3H]ES) se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. En el primero, partiendo de una concentración fija de proteína microsomal en torno a 5 mg/ml, se determinó la capacidad de diferentes concentraciones de TX114 para solubilizar el LUES (Figura 29, *Panel superior*). Seleccionamos 6 mM como concentración ideal ya que proporcionaba la mejor relación actividad/recuperación de proteínas.

No obstante teníamos que determinar en un segundo experimento cuál debía de ser la concentración de proteínas microsomales de partida (Figura 29, *Panel inferior*). Dicha concentración quedó fijada en 2-3 mg/ml.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de solubilización con el detergente, ya estábamos en condiciones de realizar la partición de fases. Los resultados que obtuvimos los reflejamos en la Figura 30, en la que observamos como la mayor parte de la fijación específica de [^3H]ES (>98%) fue detectada en la fase orgánica (FO).

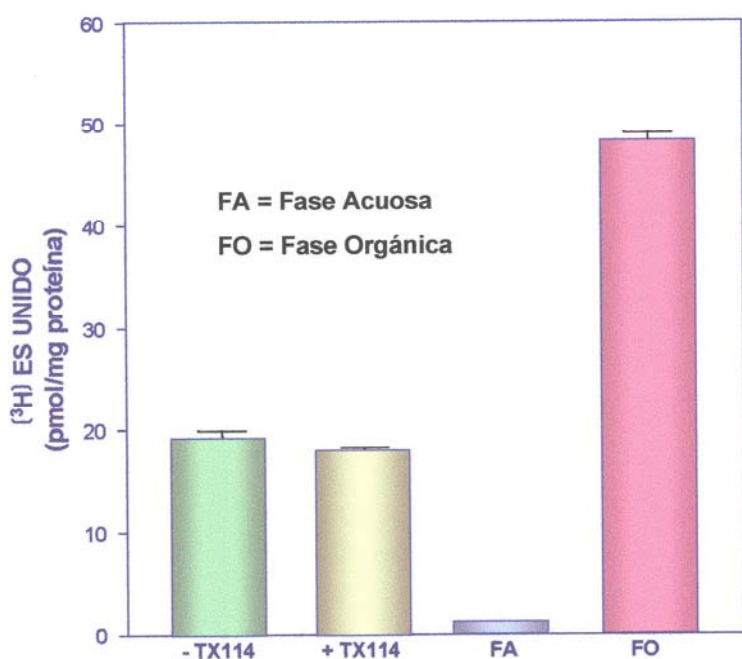


Figura 30. Partición de fases de las proteínas solubilizadas con TX114.

Estos resultados sugieren muy claramente que el [^3H]ES se une de forma específica a una proteína hidrofóbica, y por tanto integral de membrana. El procedimiento descrito en este apartado puede ser escalado y por consiguiente ser utilizado como etapa preparativa en la purificación del lugar de unión para [^3H]ES.

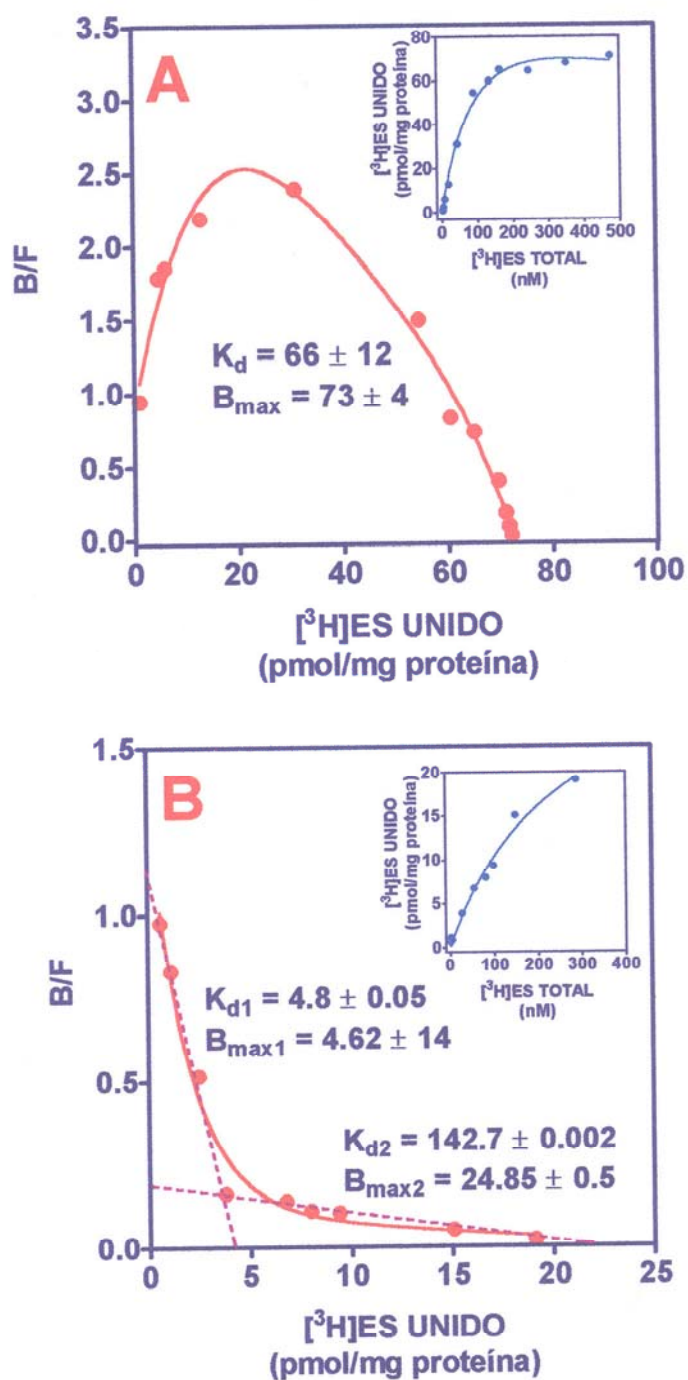


Figura 31. Análisis de Scatchard de los datos de las curvas de saturación de la unión específica del $[^3\text{H}]$ ES a la Fase Orgánica (A) o Fase Acuosa (B) tras la solubilización con TX114 y posterior partición de fases a 20°C

Como comprobación de que la especie solubilizada correspondía con la previamente caracterizada en los microsomas, procedimos a realizar una curva de saturación con [3 H]ES (0 - 500 nM), usando como muestra tanto las proteínas obtenidas en la fase del detergente como en la fase acuosa. Los resultados que obtuvimos los presentamos en la Figura 31 como representación de Scatchard.

Como puede observarse en el gráfico, el análisis de Scatchard de la fijación específica del [3 H]ES a las proteínas hidrofóbicas (Figura 31 A) presenta una morfología muy similar a la descrita previamente en los microsomas crudos, pero presentando una afinidad ligeramente menor ($K_d = 66 \pm 12$) y una concentración total de lugares ocupados (B_{max}) de 74 ± 6 pmol/mg de proteína, cifra que prácticamente duplica a la que habíamos observado para los microsomas crudos.

Por otro lado, en la fase acuosa obtuvimos un Scatchard completamente diferente, que presentaba una morfología cóncava, pero que pudimos ajustar fácilmente a dos líneas rectas (Figura 31 B). Este análisis refleja dos estados de afinidad diferentes ($K_{d1} = 5 \pm 0.05$ nM; $K_{d2} = 143 \pm 0.002$ nM). En cualquier caso la fijación específica del [3 H]ES detectada en la fase acuosa representó menos del 2% del total.

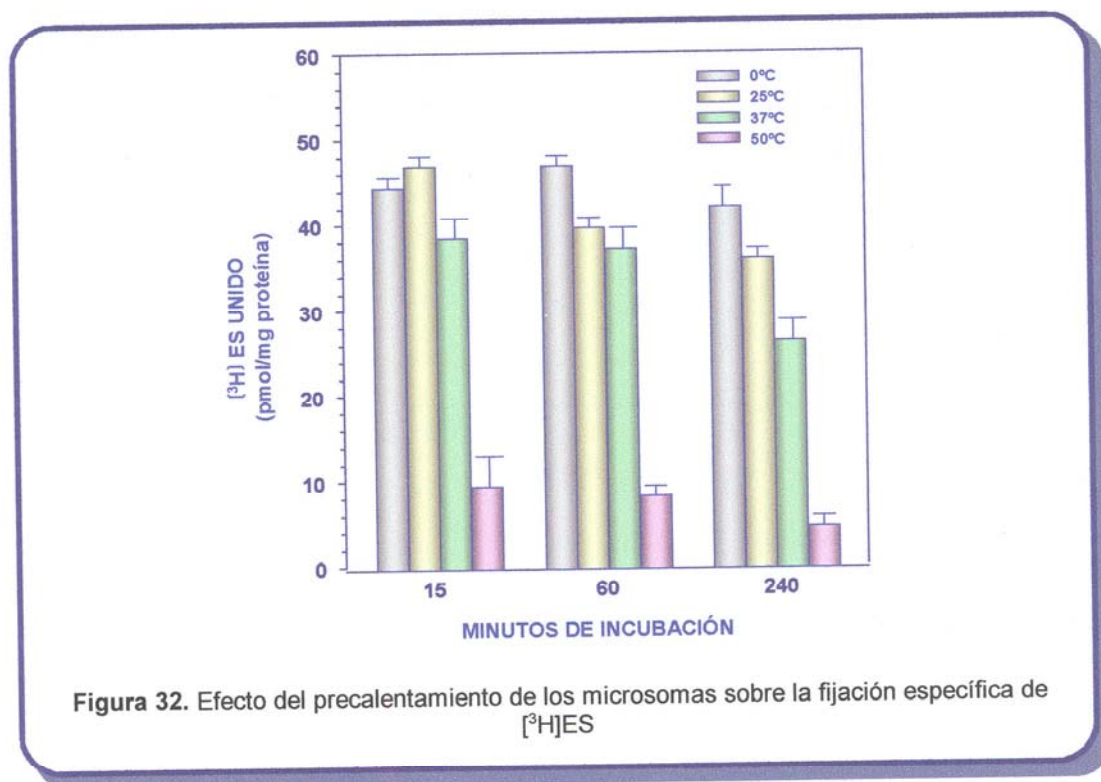
IV.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH SOBRE LA ESTABILIDAD DEL LUES

En la caracterización de una proteína de membrana es importante establecer sus límites de estabilidad en solución. Es pues necesario conocer su estabilidad frente a variaciones de temperatura o de pH del medio. Esta información es particularmente relevante de cara a la purificación de la proteína, ya que las distintas etapas de dicho proceso implican, a menudo, variaciones en la composición del tampón.

IV.5.1. ESTABILIDAD TÉRMICA DEL LUGAR DE UNIÓN MICROSOMAL PARA [3 H]ES

La sensibilidad del LUES fue determinada incubando alícuotas de microsomas a diferentes temperaturas (de 0 a 60°C). A su vez, para cada una de las temperaturas se ensayaron diferentes tiempos de incubación, en el rango de 5 a 240 minutos. Los microsomas incubados en estas condiciones fueron sedimentados mediante ultracentrifugación a 105.000 x g durante 1 hora, y resuspendidos en un volumen apropiado de tampón de forma que la concentración final de proteínas fuera de 2 mg/ml. En los microsomas así obtenidos se

cuantificó la presencia de LUES mediante ensayo de intercambio con [3 H]ES realizado a 0°C, comprobándose como dicho lugar de unión es sensible a temperaturas superiores a 25°C (Figura 32).



Con el fin de comprobar esta sensibilidad se llevó a cabo otro experimento en el que los microsomas eran incubados durante al menos 8 horas a 0°C con [3 H]ES con lo que nos asegurábamos que la asociación del [3 H]ES estaba en equilibrio y en los valores de capacidad de unión máxima. Una vez alcanzado el estado de equilibrio los microsomas fueron incubados a diferentes temperaturas y tiempos. Tras el periodo de incubación los microsomas fueron tratados con DCC con el fin de retirar el exceso de esteroide que se hubiera dissociado, y se cuantificó la cantidad de lugares de unión remanentes. La Figura 33 muestra los resultados de este experimento. Se observa claramente como a 0 y 25°C la disociación del esteroide es prácticamente inexistente. Dicha disociación comienza a ser muy evidente a partir de los 37°C y es completa a los 30 minutos de incubación a 60°C, lo cual implica una destrucción total del LUES a esta temperatura.

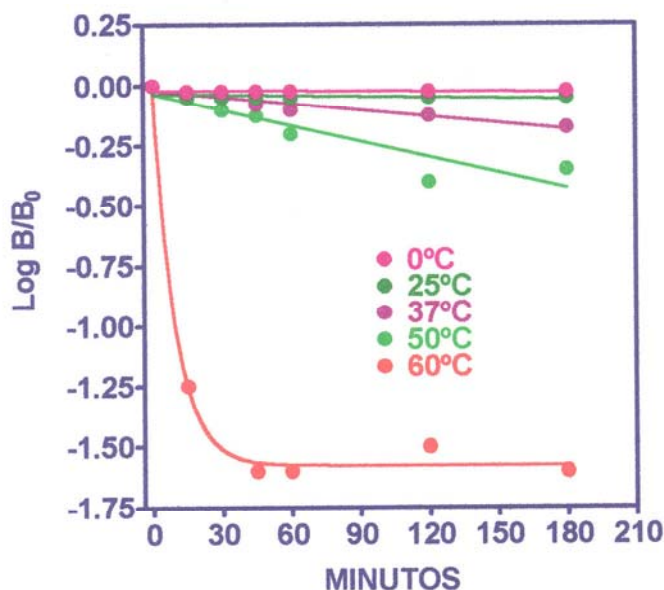


Figura 33. Estabilidad térmica del lugar de unión para $[^3\text{H}]\text{ES}$. Dosis-tiempo y dosis-efecto de la temperatura

En el otro extremo de la escala térmica, cuando los microsomas hepáticos se almacenaban a temperaturas de -20° ó -70°C durante periodos de hasta 1 año, no se observaba pérdida significativa de la capacidad de fijación específica (no se muestran estos datos).

IV.5.2. ESTABILIDAD DEL LUES A CAMBIOS DE pH

Para determinar el pH óptimo de interacción del $[^3\text{H}]\text{ES}$ con el LUES, resuspendimos los microsomas en sistemas tampones, que fueron ajustados a 0°C a valores de pH en el rango de 5 a 11. Los tampones utilizados fueron bis-Tris (pH de 5 a 6.5); Tris-HCl, (pH de 7 a 9); y el ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico (CAPS, pH de 10 a 11). El resto de componentes del tampón fueron habitualmente utilizados y aparecen descritos en el apartado de Material y Métodos.

Una vez alcanzado el pH deseado en las muestras, realizamos el ensayo de intercambio con $[^3\text{H}]\text{ES}$ durante 12 horas a 0°C . Tras retirar el exceso de esteroide por el método del DCC se cuantificó la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{ES}$ a los microsomas.

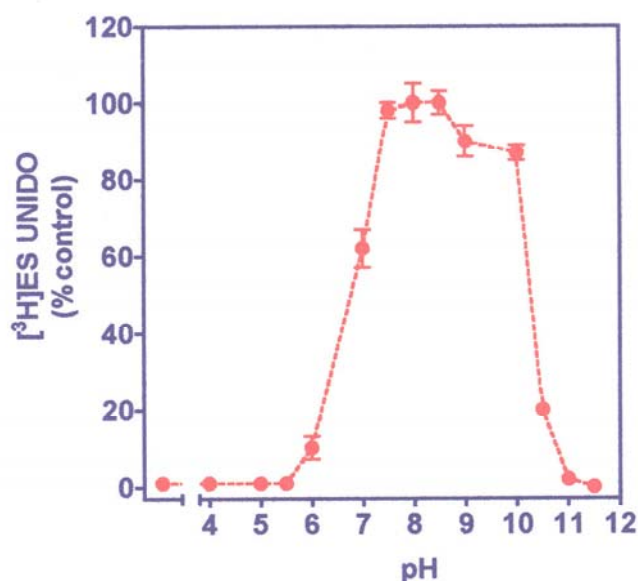


Figura 34. Efecto del pH sobre la capacidad de los microsomas para unir de forma específica el [³H]ES

En la Figura 34 se muestra como la actividad de fijación de [³H]ES a los microsomas resultó ser dependiente del pH de la incubación. El pH óptimo para el ensayo rutinario de intercambio fue fijado en un valor cercano a 7.5. Disminuciones de tan sólo 0.5 unidades por debajo de este valor dan lugar a una rápida pérdida de la capacidad de fijación específica de [³H]ES. No obstante, la estabilidad del complejo no se pierde hasta que no se superan valores de pH de 9.5-10.

IV.6. PAPEL DE LOS GRUPOS SULFHIDRIL Y PUENTES DISULFURO EN LA FIJACIÓN ESPECÍFICA DE [³H]ES AL LUES

Los puentes disulfuro juegan un importante papel en la conformación estructural de muchas proteínas. Por otro lado, el papel que tienen los grupos sulfhidrilo en muchos aspectos tanto funcionales como estructurales de los receptores para hormonas esteroideas es bien conocido [210-212, 233, 239]. Por otro lado, En este sentido la modificación química de unos y otros grupos que implican al azufre, pueden aportarnos interesantes datos acerca de la estructura, así como acercarnos al conocimiento del papel funcional del LUES.

IV.6.1. EFECTO DE LOS AGENTES MODIFICADORES DE GRUPOS SULFIDRILLO METIL-METANOTIOSULFONATO (MMTS) Y N-ETILMALEIMIDA (NEM)

Estudiamos el efecto del MMTS, un modificador reversible de los grupos sulfhidrilo que actúa específicamente sobre los residuos de cisteína [210]. Se midió la capacidad de los microsomas de unir [^3H]ES tras un tratamiento de 1 hora a 4°C con MMTS. En la Figura 35 se observa que la inhibición de la fijación específica de [^3H]ES a los microsomas es dosis-dependiente. Con una concentración de MMTS de tan sólo 0.5 mM la fijación específica disminuía hasta un 40% del control.

En este experimento también estudiamos el efecto de un inhibidor irreversible de grupos sulfhidrilo, como es la NEM, que bloquea dichos dominios mediante una reacción de alquilación [211]. En la Figura 35 se muestra que también produce una disminución importante en la capacidad microsomal para fijar [^3H]ES, pero en menor grado que el MMTS.

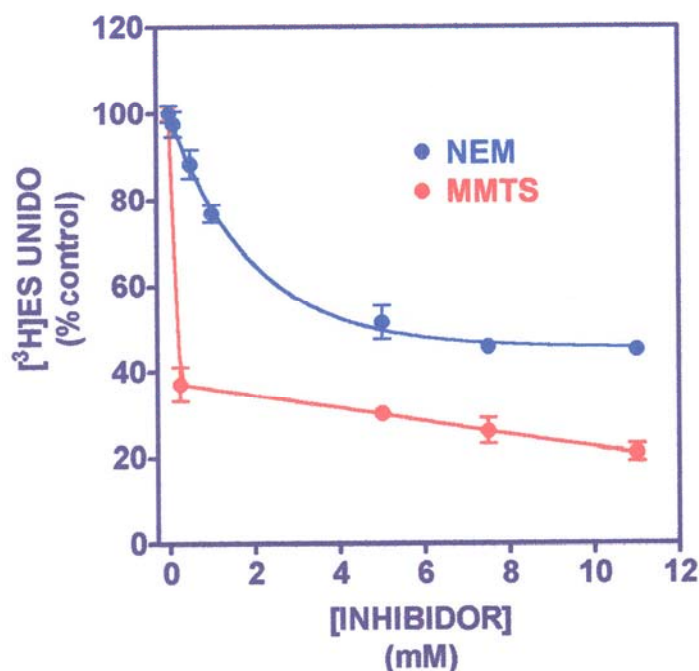
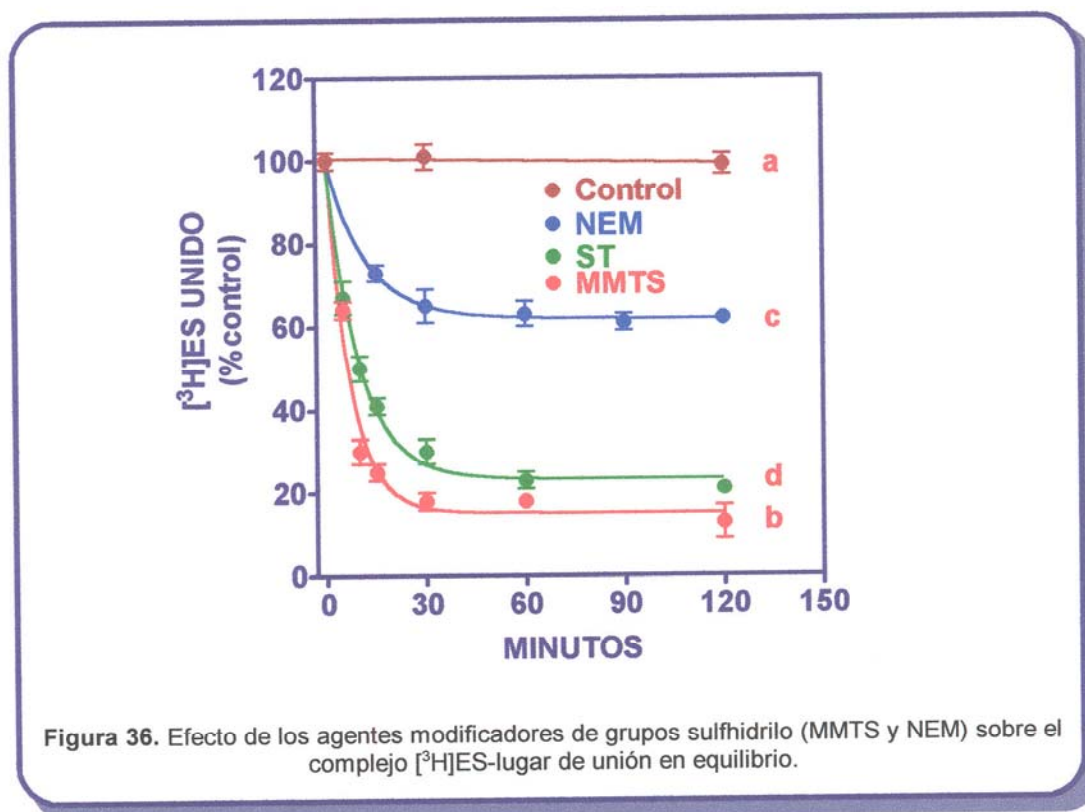


Figura 35. Efecto dosis-dependiente de los inhibidores de grupos sulfhidrilo Metilmetanotiosulfonato (MMTS) y N-etilmaleimida (NEM) sobre la capacidad de los microsomas para fijar específicamente [^3H]ES.

IV.6.2. EFECTO DE MMTS Y NEM SOBRE EL COMPLEJO LUES- $[^3\text{H}]$ ES

Una vez alcanzado el equilibrio en la unión del $[^3\text{H}]$ ES a los microsomas hepáticos examinamos el efecto del MMTS y NEM.

Los microsomas fueron incubados a 4°C con 150 nM de $[^3\text{H}]$ ES durante 12 horas. Este fue considerado el punto de partida para el experimento. La muestra fue dividida en cuatro alícuotas. La primera de ellas no fue tratada y en consecuencia fue utilizada como control. A la segunda y tercera alícuotas se les añadió MMTS o NEM (10 mM y 5 mM respectivamente, concentración final), con el objeto de medir la estabilidad del complejo $[^3\text{H}]$ ES-proteína de unión en presencia de dichos agentes. La cuarta alícuota sirvió para medir la velocidad de disociación del $[^3\text{H}]$ ES de su lugar de unión, para lo cual se le añadió 50 μM del esteroide no marcado. La fijación de $[^3\text{H}]$ ES se midió en todas las muestras tras tratamiento con DCC a los tiempos que se indican en la Figura 36. En incubaciones paralelas se midió la fijación inespecífica reproduciendo las mismas condiciones experimentales en presencia de 50 μM de ES.



A pesar de que el complejo $[^3\text{H}]$ ES-proteína es muy estable a 4°C (Figura 36, curva a), la actividad disminuyó de forma muy rápida en presencia de 10 mM de MMTS,

recuperándose tan sólo un 30% de la actividad tras 30 minutos de tratamiento con dicho agente (Figura 36 curva b). El efecto fue menos acentuado cuando la muestra fue tratada con NEM, observándose una fijación de aproximadamente el 65% con respecto al control a los 30 minutos (Figura 36, curva c). Como hemos dicho la cuarta muestra nos sirvió como control de la disociación de [3 H]ES de su lugar de unión, la cual se provocó con 50 μ M de ES (Figura 36, curva d).

IV.6.3. EFECTO DE AGENTES REDUCTORES DE PUENTES DISULFURO SOBRE LA FIJACIÓN MICROSOMAL DE [3 H]ES

Los puentes disulfuro juegan un papel importante en el mantenimiento de la conformación estructural de muchas proteínas. El método más ampliamente utilizado para la ruptura de este tipo de enlaces es el intercambio de los grupos tiol- por grupos disulfuro. Los donadores de grupos disulfuro más comunes son el mercaptoetanol y el ditioneitol (DTT). La Figura 37 (*arriba*) muestra los resultados de un experimento en el que los microsomas fueron incubados con concentraciones crecientes de DTT, durante 1 hora a 4°C antes de ser utilizados para ensayo de intercambio con [3 H]ES. En este caso comprobamos como dicha incubación dio como resultado un incremento de la fijación específica cercano al 50% (con respecto al control) usando 25 mM de DTT.

Sin embargo la preincubación de los microsomas con las mismas concentraciones de DTT, seguidas de la retirada del reactivo mediante sucesivos lavados de los microsomas antes del ensayo de intercambio, revirtió completamente este efecto inductor (Figura 37, *abajo*).

Estos resultados sugieren que el incremento en la fijación específica del [3 H]ES es un efecto directo del DTT sobre el radioligando. Este efecto ya ha sido observado en el caso de otros ligandos como algunos agonistas del receptor β -adrenérgico [216], pero hasta la fecha no se conoce el mecanismo por el que se produce esta interacción.

De todos los resultados anteriores podemos concluir que los agentes modificantes de grupos sulfhidrilo inactivan al LUES de forma tal que lo incapacitan para fijar [3 H]ES, así como que en presencia de estos reactivos el complejo [3 H]ES-proteína es muy inestable, siendo destacable que el MMTS aumenta la velocidad de disociación del [3 H]ES de los microsomas. Por otro lado, el mantenimiento de la integridad de los puentes disulfuro que puedan existir en la proteína (p.e. en el mantenimiento de la estructura cuaternaria) no parece un requisito imprescindible para que tenga lugar la fijación específica del [3 H]ES.

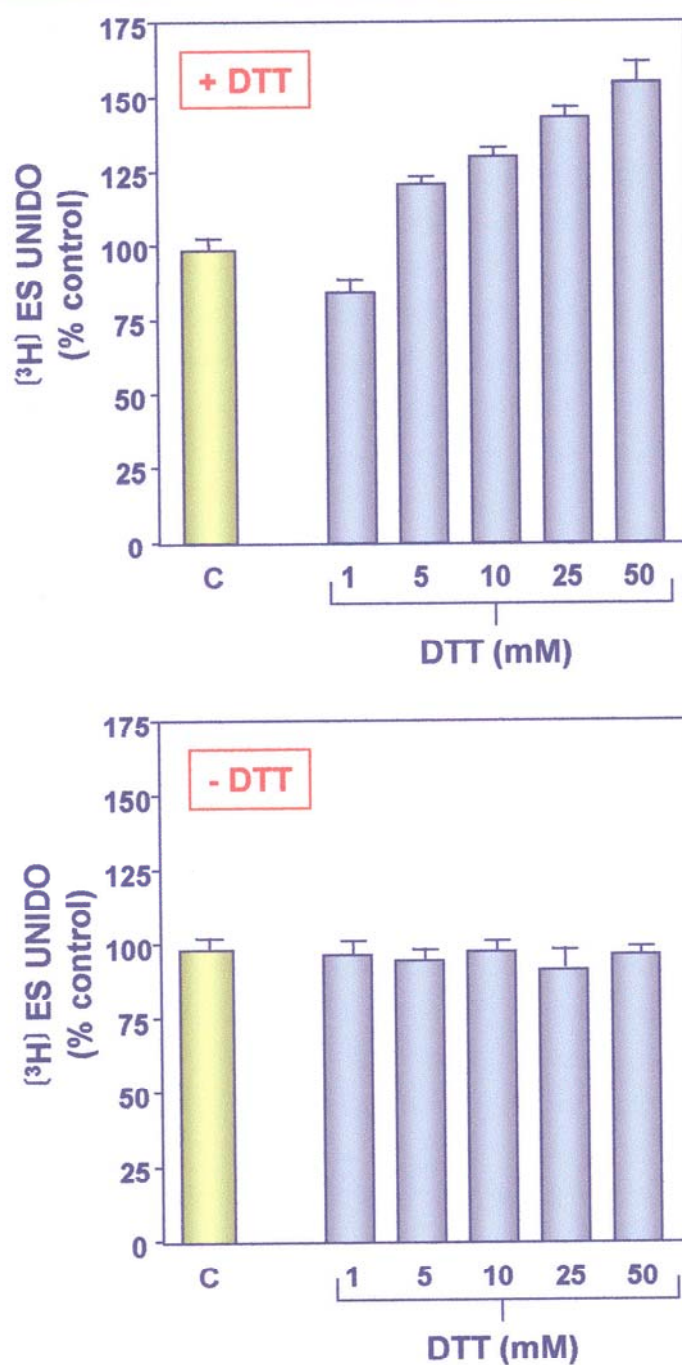


Figura 37. Efecto de un agente reductor de puentes disulfuro (DTT) sobre la capacidad microsomal de fijación específica de [3 H]ES.

IV.7. SOLUBILIZACIÓN DEL LUES

Una de las aproximaciones fundamentales en la caracterización bioquímica de las proteínas de membrana es su solubilización en estado funcional. Así mismo, este es un requisito indispensable previo al abordaje de su purificación.

Nosotros ya habíamos hecho algunas aproximaciones experimentales en el campo de la solubilización del LUES como la señalada en el apartado IV.2. del presente capítulo de Resultados. No obstante el uso de TX114 como detergente de rutina para la solubilización plantea algunos problemas derivados de sus particulares características de condensación. Así que se hacía necesario el establecimiento del detergente y de las condiciones óptimas de solubilización que serían utilizadas en adelante. En nuestro caso estudiamos la solubilización del LUES usando dos de los detergentes más ampliamente recogidos en la literatura: el CHAPS, y el TX100.

IV.7.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CHAPS Y TX100 SOBRE LA SOLUBILIZACIÓN DEL LUES

Como criterio operativo de solubilidad nosotros usamos la retención de la actividad de la proteína en el sobrenadante que se obtiene tras la centrifugación de los microsomas tratados con el detergente a 105.000 x g durante 1 hora. Dicho sobrenadante era además filtrado a través de filtros de 0,22 μ m con el fin de eliminar cualquier resto de material mal solubilizado que pudiera quedar. Los microsomas (5 mg proteína/ml) fueron incubados durante 2 horas a 4°C con concentraciones crecientes de CHAPS o TX100 (de 0.05 a 20 mM, concentración final). Tras la ultracentrifugación y la filtración se medía la fijación específica de [³H]ES remanente en el sedimento de microsomas y en el sobrenadante.

Los resultados mostraron que el LUES desaparecía del sedimento microsomal entre 1.5 y 5 mM de TX100 o entre 2.5 y 10 mM de CHAPS. A concentraciones superiores, la fijación específica de [³H]ES en el extracto soluble disminuía, a la vez que el contenido de proteínas en dicha fracción se hacía máximo.

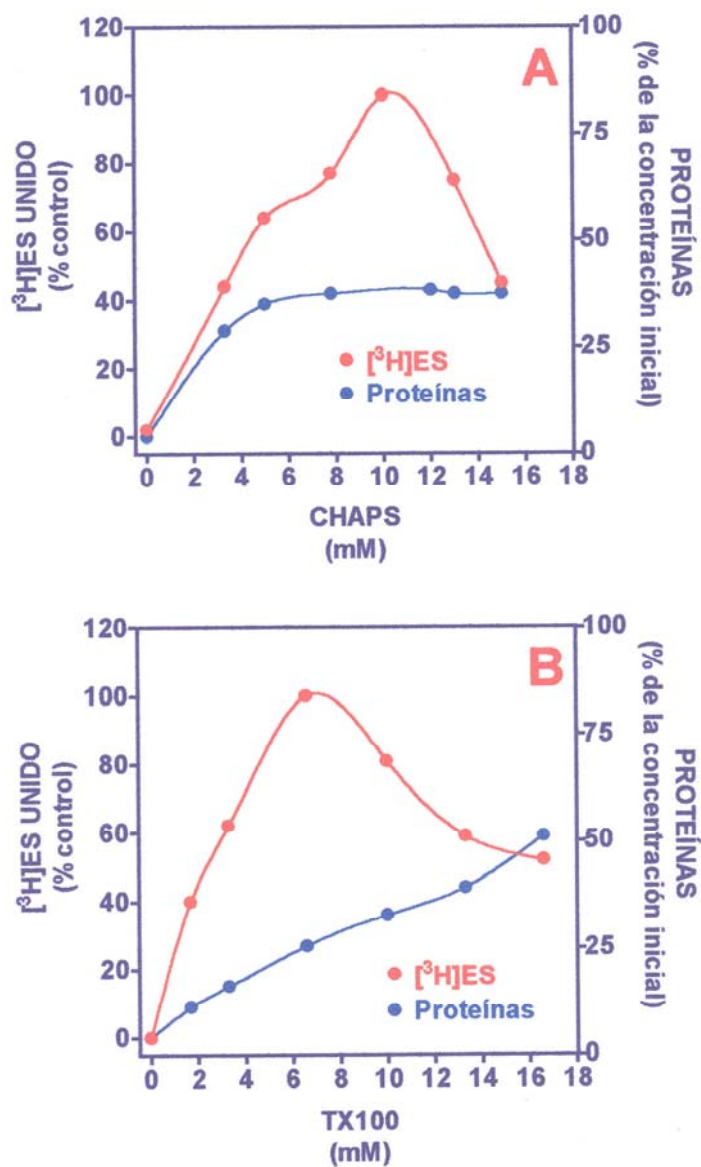


Figura 38. Efecto de concentraciones crecientes de CHAPS (Panel A) y TX100 (Panel B) en la solubilización de las proteínas microsomales totales y del Lugar de Unión para [³H]ES en particular.

La fijación específica de [³H]ES era máxima con 10 mM de CHAPS, o bien 6.5 mM de TX100, mientras que a esas concentraciones de detergente se solubilizaban tan sólo el 40-50% de las proteínas microsomales totales.

IV.7.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE PROTEÍNAS MICROSOMALES EN LA SOLUBILIZACIÓN DEL LUES.

Es bien conocido el hecho de que el ratio proteína/detergente es un factor condicionante en la solubilización de las proteínas de membrana [217]. Por lo tanto se realizó un sencillo experimento, cuyos resultados se muestran en la Figura 39A,B, con el fin de determinar la concentración ideal de proteínas microsomales de la que debíamos partir para rentabilizar al máximo la solubilización.

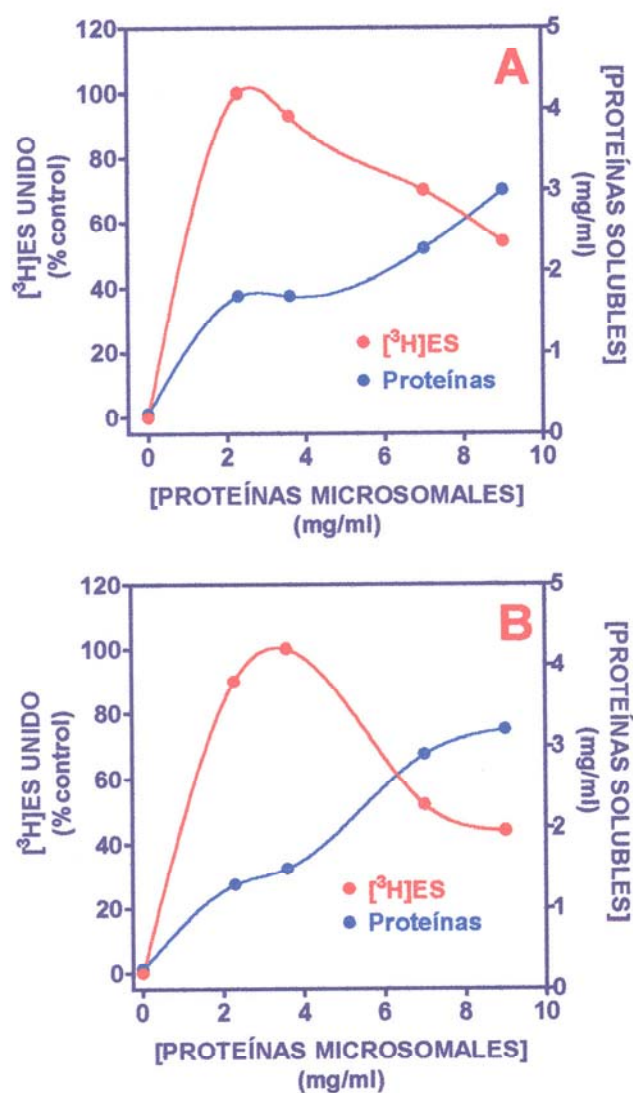


Figura 39. Efecto de la concentración inicial de proteínas microsomales sobre la solubilización del Lugar de Unión para [³H]ES con 10 mM de CHAPS o 6.6 mM de TX100.

En este experimento solubilizamos varias concentraciones de proteínas microsomales con las concentraciones de detergentes que previamente habíamos seleccionado (apartado 7.1).

En la gráfica se observa como la máxima solubilización se obtuvo con una concentración de partida de 2 mg/ml.

IV.7.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA SOBRE LA UNIÓN DEL [³H]ES A LAS PROTEÍNAS SOLUBILIZADAS

De los experimentos anteriores debemos concluir que las condiciones óptimas deberían ser la utilización de 10 mM de CHAPS o 6.5 mM de TX100 para solubilizar microsomas a 2 mg/ml. En este caso la concentración final de proteínas en el extracto soluble oscilaría entre 1-1.5 mg/ml.

Una vez comprobado que es posible solubilizar la proteína capaz de unir [³H]ES, y que no hay pérdida de actividad específica, se debe proceder a la caracterización de esa unión. Para ello previamente hay que determinar si la concentración proteica que hemos determinado como óptima entra dentro de un rango lineal para la fijación del [³H]ES.

Con tal objetivo preparamos extractos solubles de microsomas a concentraciones proteicas que oscilaban entre 0.10-6 mg/ml que se incubaban con [³H]ES a 150 nM durante 12 horas. El ensayo de intercambio era detenido por el método del DCC, tal y como se detalló en Material y Métodos.

Los resultados obtenidos (Figura 40A, B) indican que el aumento de la concentración proteica es seguido por un aumento de la unión específica, hasta que se alcanza un punto (2.5 mg/ml) en el que no aumenta dicha unión e, incluso, disminuye. Parece evidente que el rango de concentración proteica más adecuado para medir la fijación de [³H]ES al extracto soluble de microsomas es de 0.5 a 2.5 mg/ml. Por lo tanto la concentración de proteínas que nosotros habíamos fijado como óptima (1-1.5 mg/ml) se encuentra claramente dentro del rango lineal.

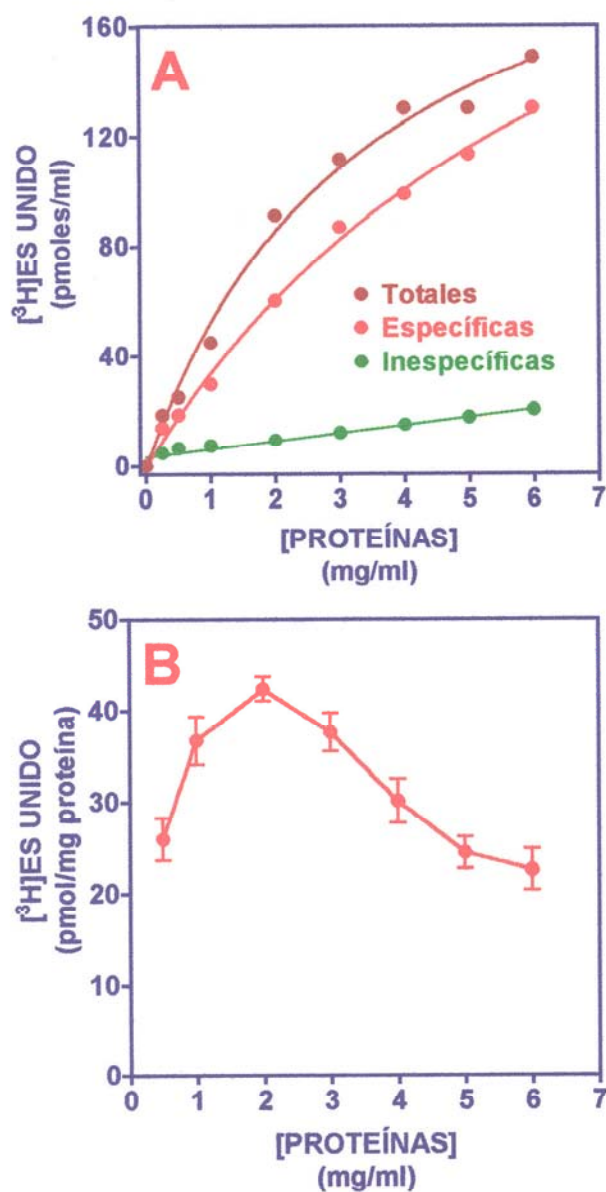


Figura 40. Efecto de la concentración de proteínas del extracto soluble sobre la fijación específica de $[^3\text{H}]\text{ES}$.

IV.7.4. ESTABILIDAD DEL LUES SOLUBILIZADO

Dado que el extracto obtenido debía de ser utilizado no sólo para la caracterización de la unión del $[^3\text{H}]\text{ES}$, sino que también con el objetivo de abordar la purificación de la proteína, ciertos parámetros de estabilidad de la proteína debían ser comprobados.

En este sentido se determinó la estabilidad de la proteína a 4°C que fue fijada en 3 días y también se comprobó la resistencia a la congelación, no observándose ninguna disminución en la fijación específica en extractos solubilizados almacenados a -80°C por periodos de 30-40 días.

IV.8. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA UNIÓN DEL [³H]ES AL LUES SOLUBILIZADO

En el estado solubilizado, el detergente puede afectar a la concentración efectiva de ligando disponible para unirse a la proteína. También el estado conformacional de la proteína puede verse afectado por el detergente, alterándose de esta forma sus propiedades. Otra posibilidad es que la solubilización haga que la proteína exhiba sitios activos o sitios alostéricos enmascarados por el medioambiente fosfolipídico. Por todos estos motivos, la caracterización inicial de una proteína solubilizada debe constar de dos puntos principales. El primero, que ya ha sido detallado, consiste en la determinación de que la actividad específica de dicha proteína se mantenga tras la solubilización. Por otro lado es necesario comprobar que dicha actividad es saturable, reversible y específica, y que dichas características se corresponden o son similares a las que exhibe la proteína en su estado no solubilizado.

IV.8.1. CINÉTICA DE LA INTERACCIÓN DEL [³H]ES CON EL LUES SOLUBILIZADO

Los experimentos de cinética en los extractos solubles fueron realizados para determinar que la unión del [³H]ES era reversible y para establecer las condiciones de incubación para los posteriores experimentos en equilibrio.

IV.8.1.1. Cinética de Asociación

La asociación del ligando fue estudiada incubando proteínas solubilizadas con 150 nM de [³H]ES a 0°C durante diferentes periodos de tiempo. La incubación se prolongó a esta temperatura y fue detenida por el método del DCC detallado en Material y Métodos a los tiempos especificados en la Figura 41. En dicha gráfica se muestra como la interacción del [³H]ES fue inicialmente muy rápida, y para alcanzar un estado de equilibrio fueron necesarias al menos 3 horas. La asociación permaneció estable durante al menos 24 horas.

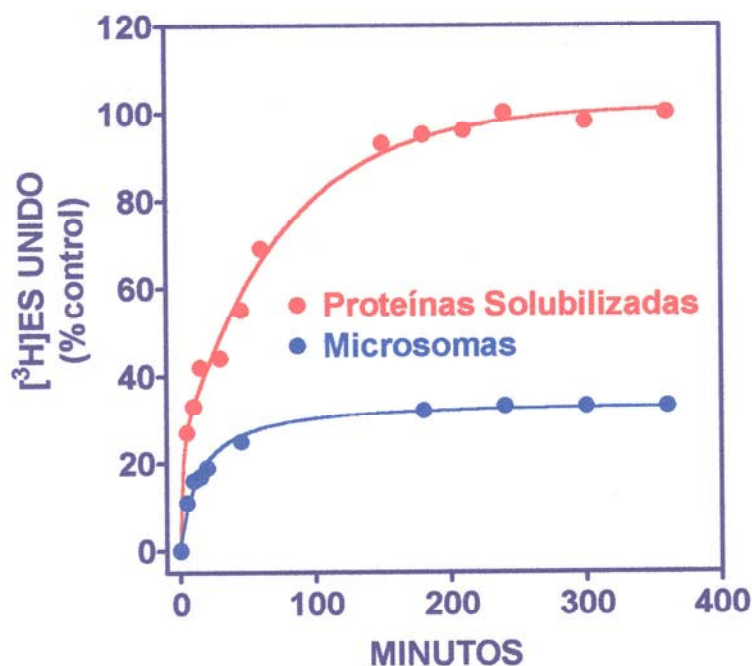


Figura 41. Cinética de asociación a 0°C del [3H]ES (150 nM) a los extractos obtenidos tras solubilización con CHAPS 10 mM. Se representan también en esta gráfica los datos correspondientes a la asociación del [3H]ES a los microsomas crudos en las mismas condiciones experimentales.

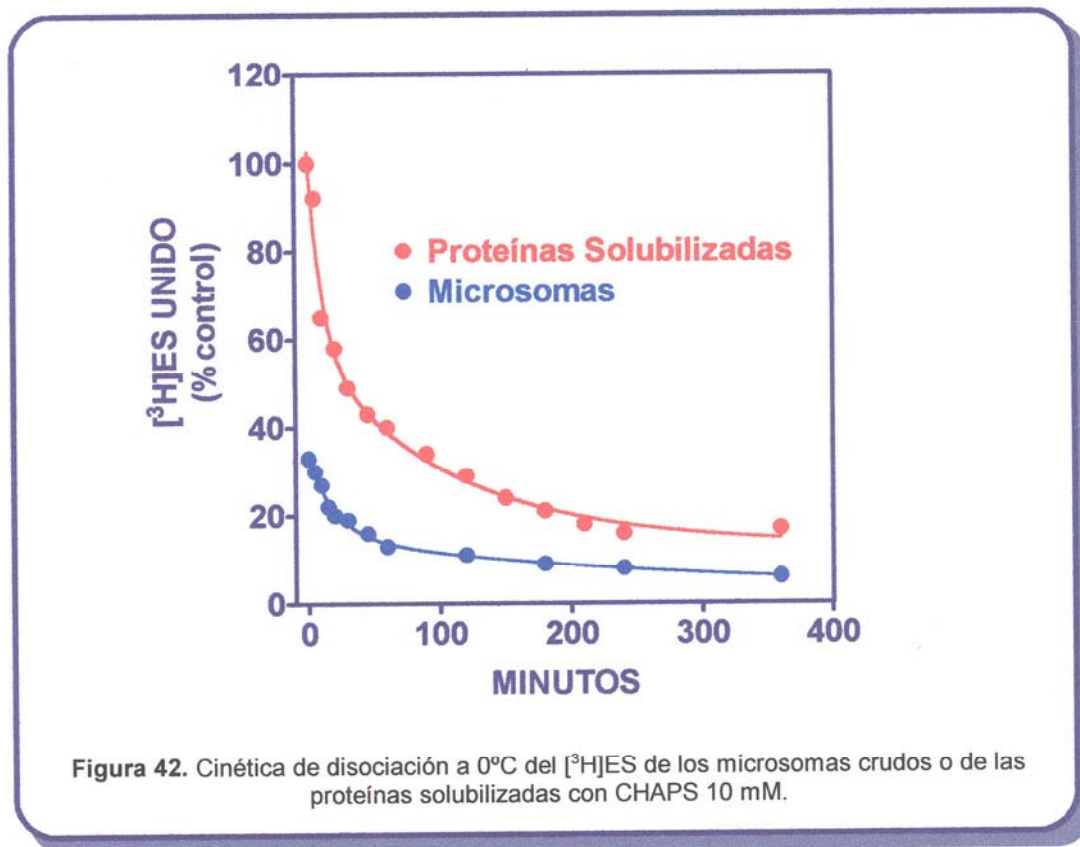
El análisis de los datos obtenidos fue realizado usando el programa KINETIC, y mostró que la asociación del [3H]ES a las proteínas solubilizadas era compatible con una reacción bi-exponencial. Las constantes medidas a 0° fueron $k_{obs1} = 0.161 \pm 0.067 \text{ min}^{-1}$ y $k_{obs2} = 0.0165 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ para las proteínas solubilizadas y $k_{obs1} = 0.793 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$ y $k_{obs2} = 0.059 \pm 0.061 \text{ min}^{-1}$ para los microsomas.

IV.8.1.2. Cinética de disociación

Una vez que la unión del [3H]ES a las proteínas solubles alcanzó el equilibrio, forzamos la disociación mediante la adición de ES no marcado a una concentración 500 veces superior a la del ligando tritado. A partir de este momento se dejó seguir la reacción a 0°C hasta que fue detenida usando el método del DCC, a los tiempos especificados en la Figura 42.

Los datos de la cinética de disociación también se ajustaron a un modelo bi-exponencial cuando fueron analizados mediante el programa KINETIC. Las constantes

calculadas para el caso de la disociación fueron $k_{-11} = 0.003 \pm 0.0095 \text{ min}^{-1}$ y $k_{-12} = 0.057 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$ para las proteínas solubilizadas y $k_{-11} = 0.00224 \pm 0.0023 \text{ min}^{-1}$ y $k_{-12} = 0.0023 \pm 0.091 \text{ min}^{-1}$



IV.8.2. CURVA DE SATURACIÓN Y ANÁLISIS DE SCATCHARD

El análisis de Scatchard de los datos de la curva de saturación en equilibrio del $[^3\text{H}]\text{ES}$ a las proteínas solubilizadas muestra el mismo comportamiento que habíamos observado en la caracterización de la proteína en condiciones nativas, siendo lineal en el rango de concentraciones de 20 a 500 nM, pero alejándose de la recta los puntos correspondientes a las concentraciones inferiores a 10 nM. En las Figuras 43 y 44 se muestran los resultados de este experimento, y también se incluyen los datos correspondientes a los microsomas.

Los resultados del Scatchard sugieren la existencia de una única población de lugares de unión con una $K_d = 40.75 \pm 1.95 \text{ nM}$ y $B_{\text{max}} = 75.2 \pm 7 \text{ pmol/mg}$ de proteína. Los datos correspondientes a las concentraciones bajas de ligando dan a la representación de Scatchard una morfología convexa lo cual, una vez han sido descartados todos los posibles artefactos (apartado 1.1), sigue siendo consistente con la hipótesis del cooperativismo positivo.

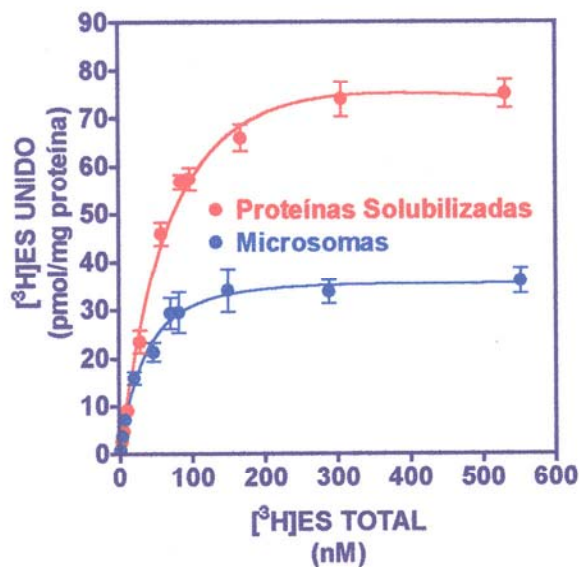


Figura 43. Análisis de saturación de la fijación específica del [³H]ES a los microsomas hepáticos y a los extractos solubles derivados de ellos cuando se someten a incubación con 10 mM de CHAPS.

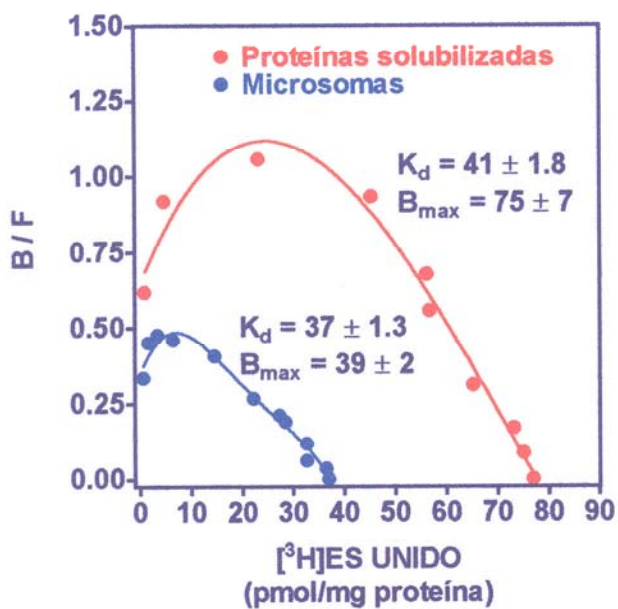


Figura 44. Análisis de Scatchard de los datos de la fijación específica del [³H]ES a los microsomas crudos y a los extractos solubles.

IV.8.3. ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD DE LA UNIÓN DEL $[^3\text{H}]\text{ES}$ AL LUES SOLUBILIZADO

El perfil farmacológico del LUES fue estudiado estimando su capacidad para unir $[^3\text{H}]\text{ST}$ en presencia de una serie de los productos que se habían ensayado en los microsomas (Tabla 6). Esta selección fue restringida a aquellos productos que, ensayados a una concentración 1000 veces superior a la del ligando tritiado, podían potencialmente ser capaces de inhibir la unión del $[^3\text{H}]\text{ES}$. Los productos seleccionados fueron ensayados en un amplio rango de concentraciones (0-50 μM). En la Tabla 9 se muestra como, al igual que en el caso de los microsomas, los lugares de unión solubilizados muestran selectividad por sólo dos productos (ES y DA), demostrándose que en ambos casos el lugar de unión presenta el mismo perfil farmacológico.

Tabla 9. Perfil Farmacológico de la unión del $[^3\text{H}]\text{ES}$ a los microsomas y a las proteínas solubilizadas

Inhibidor	RBA	
	Microsomas	Extracto Soluble
Estanozolol	100 $\pm$ 8	100 $\pm$ 15
Danazol	48 $\pm$ 6	23 $\pm$ 9
Testosterona	0	0
17 α -Metiltestosterona	0	0
R-1881	0	0
Dexametasona	0	0
Triamcinolona acetónido	0	0
Estradiol	0	0
Etinilestradiol	0	0
Progesterona	0	0
Corticosterona	0	0
Cortisol	0	0
Proadifeno	0	0

Los resultados se expresan como RBA de los inhibidores con respecto a la unión de $[^3\text{H}]\text{ES}$, que se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{RBA} = [\text{L}]_{50\%} / [\text{I}]_{50\%} \times 100$$

donde:

$[L]_{50\%}$ = Concentración de ES que provoca un 50% de inhibición de la unión de $[^3H]ES$ a las proteínas (microsomales o solubilizadas)

$[I]_{50\%}$ = Concentración de inhibidor que provoca un 50% de inhibición de la unión del $[^3H]ES$ a las proteínas (microsomales o solubilizadas)

En la Figura 45 se muestran las curvas de competición de los productos ensayados.

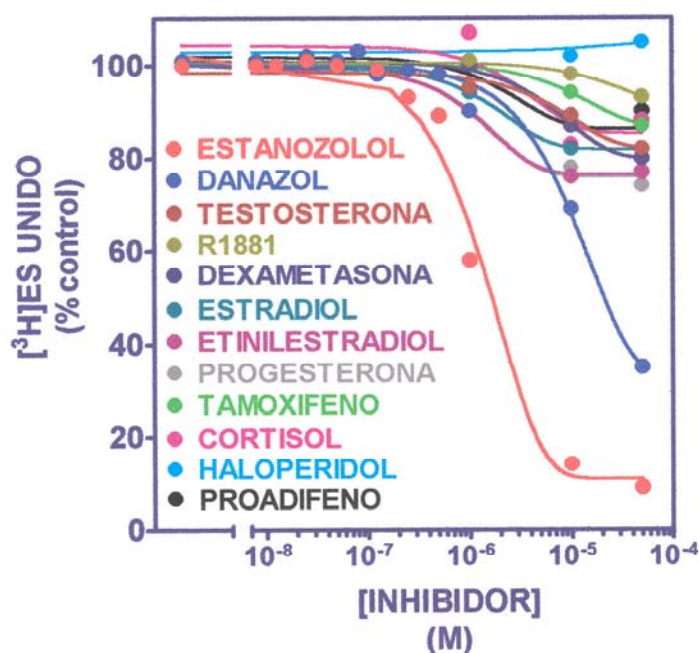


Figura 45. Especificidad del LUES solubilizado. Los extractos de CHAPS 10 mM fueron incubados con 25 nM de $[^3H]ES$ en presencia de concentraciones crecientes de ES, DA, y una selección de los esteroides que habíamos ensayado en los microsomas crudos. La fijación inespecífica fue determinada en presencia de 10 μM de ES.

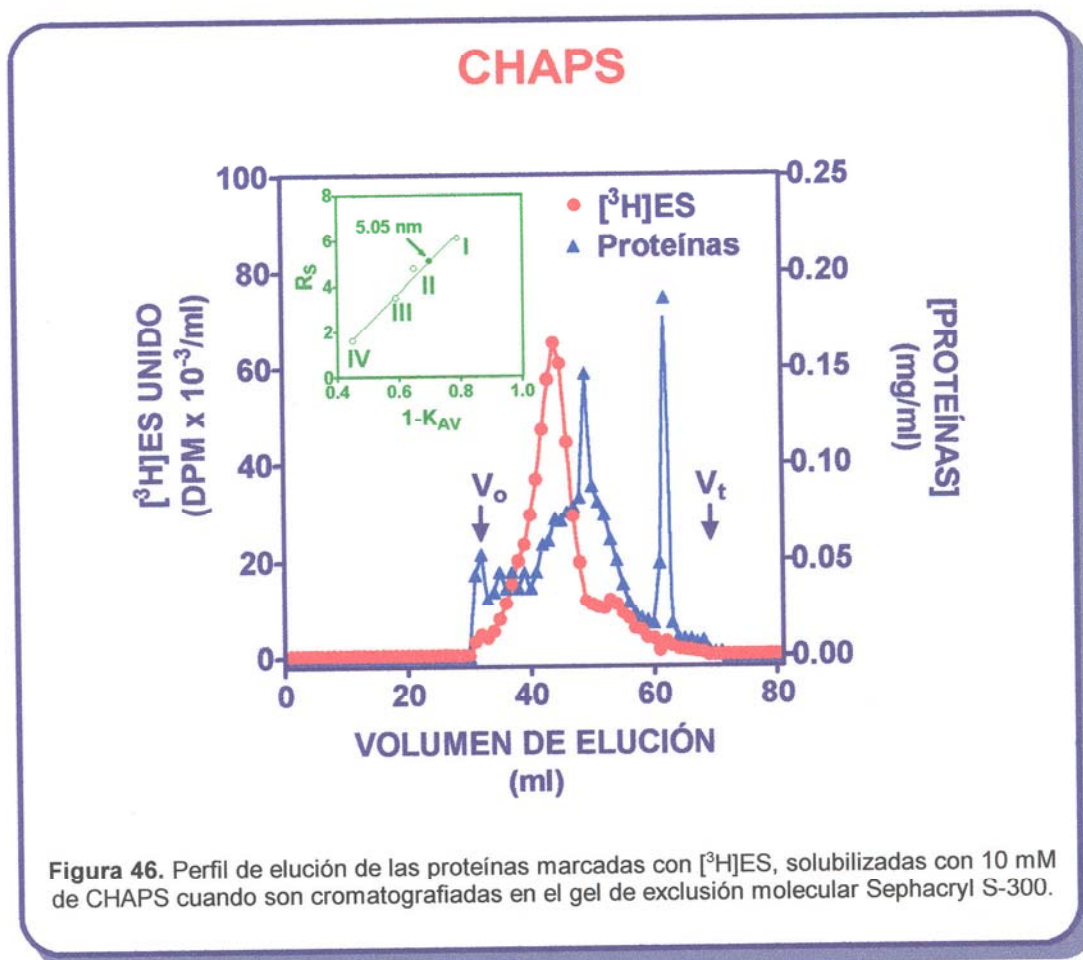
IV.9. PROPIEDADES HIDRODINÁMICAS DEL LUES

El principal objetivo del presente estudio fue la caracterización molecular del LUES que, como hemos señalado, habíamos solubilizado con éxito en forma activa. La aproximación experimental para cubrir tal objetivo fue la determinación de las propiedades hidrodinámicas tales como tamaño, densidad, sedimentación, y peso molecular, mediante la combinación de dos técnicas: cromatografía de exclusión molecular y ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

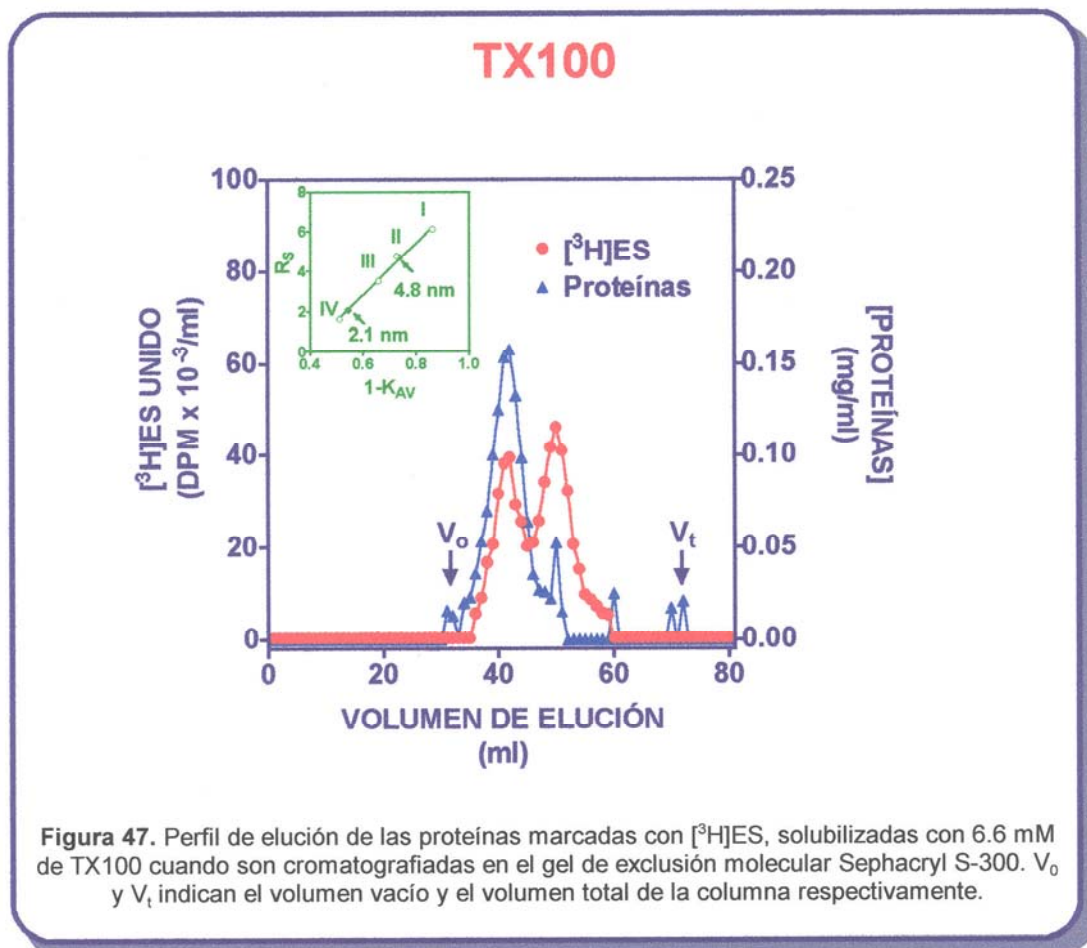
IV.9.1. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Para determinar el tamaño molecular de los complejos proteína-detergente, los extractos obtenidos tras la solubilización, bien con CHAPS o bien con TX100, fueron cromatografiados en una columna empaquetada con Sephacryl S-300. Se recogieron fracciones de 1 ml en las que se determinó la actividad de [^3H]ES.

Antes de calcular los volúmenes de elución de la actividad del ligando radiactivo, la columna fue calibrada usando el método de Ackers [213], mediante el cual se construyeron las rectas que se muestran en las Figuras 46 y 47 (dentro). En ella se representa una relación lineal entre el radio de Stokes de proteínas marcadoras conocidas y una función del coeficiente de partición ($1-K_{av}$), donde asumimos que la fase estacionaria es la totalidad del gel empaquetado. El radio de Stokes de los complejos proteína-detergente fue determinado por interpolación a partir de las rectas de calibración.



En la Figura 46 se muestra que la actividad de [3 H]ES de las proteínas solubilizadas con CHAPS fue obtenida en un pico muy bien definido, alrededor de la fracción 40. Sin embargo, la actividad en las proteínas solubilizadas con TX100 salió repartida en dos picos claramente definidos alrededor de las fracciones 40 y 55 respectivamente, como muestra la Figura 47.



Por otro lado, señalar que la actividad de [3 H]ES en presencia de CHAPS eluyó separada del grueso de las proteínas, mientras que los picos de actividad obtenidos en presencia de TX100 coincidieron con sendos picos de proteínas. De esto concluimos que la cromatografía de exclusión molecular en presencia de CHAPS representa un paso de purificación importante, toda vez que somos capaces de recuperar la mayoría de la actividad en fracciones que representan aproximadamente 1/6 de las proteínas totales cargadas.

Como se muestra en la Tabla 10, el radio de Stokes del complejo LUES-CHAPS resultó ser mayor que el correspondiente al primero de los picos de actividad específica obtenidos en presencia de TX100. El segundo pico de actividad obtenido en el cromatograma

de las proteínas solubilizadas con TX100 presentó un radio de Stokes mucho menor

Cuando en el medio de incubación, junto con el [^3H]ES, se añadió una concentración final de 10 μM de ES, se obtuvo un perfil de elución de la actividad de [^3H]ES prácticamente homogéneo, sin picos destacables, lo cual indica que los anteriores picos de actividad corresponden con un marcaje específico del LUES.

Cuando la detección de la fijación específica de [^3H]ES fue determinada en las fracciones, mediante la incubación de alícuotas de las mismas con el ligando tritiado, en presencia o en ausencia de un exceso del mismo ligando no marcado, comprobamos que el perfil de elución para el caso de los dos detergentes no variaba respecto del ya descrito. Es decir el marcaje previo de las proteínas solubilizadas no alteraba el radio de Stokes y, en consecuencia, el tamaño aparente ya descrito.

Idénticos resultados fueron también obtenidos cuando las proteínas microsomales fueron marcadas con [^3H]ES previamente a la solubilización con ambos detergentes en vez de marcar las proteínas una vez solubilizadas (resultados no mostrados).

IV.9.2. ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE LINEAL DE SACAROSA

Profundizamos en el estudio de las propiedades hidrodinámicas del LUES, sometiendo los picos obtenidos en la cromatografía de exclusión molecular a ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa.

Los perfiles obtenidos tras la ultracentrifugación en gradientes lineales del 18-34% hechos en H_2O o D_2O y en presencia de 10 mM de CHAPS, se muestran en las Figuras 48 y 49 (Paneles B) respectivamente. En dichas figuras (Paneles A) se incluyen también las rectas de calibración resultantes de la ultracentrifugación de proteínas con coeficiente de sedimentación conocido, bajo las mismas condiciones que las muestras solubilizadas. A partir de la recta de calibración calculamos los coeficientes de sedimentación aparentes en H_2O y D_2O . Dichos coeficientes de sedimentación aparentes (Tabla 10) del complejo [^3H]ES-LUES resultaron ser prácticamente idénticos calculados en H_2O que en D_2O , lo cual sugiere que tanto esta proteína como las proteínas usadas para la calibración presentan el mismo volumen específico parcial.

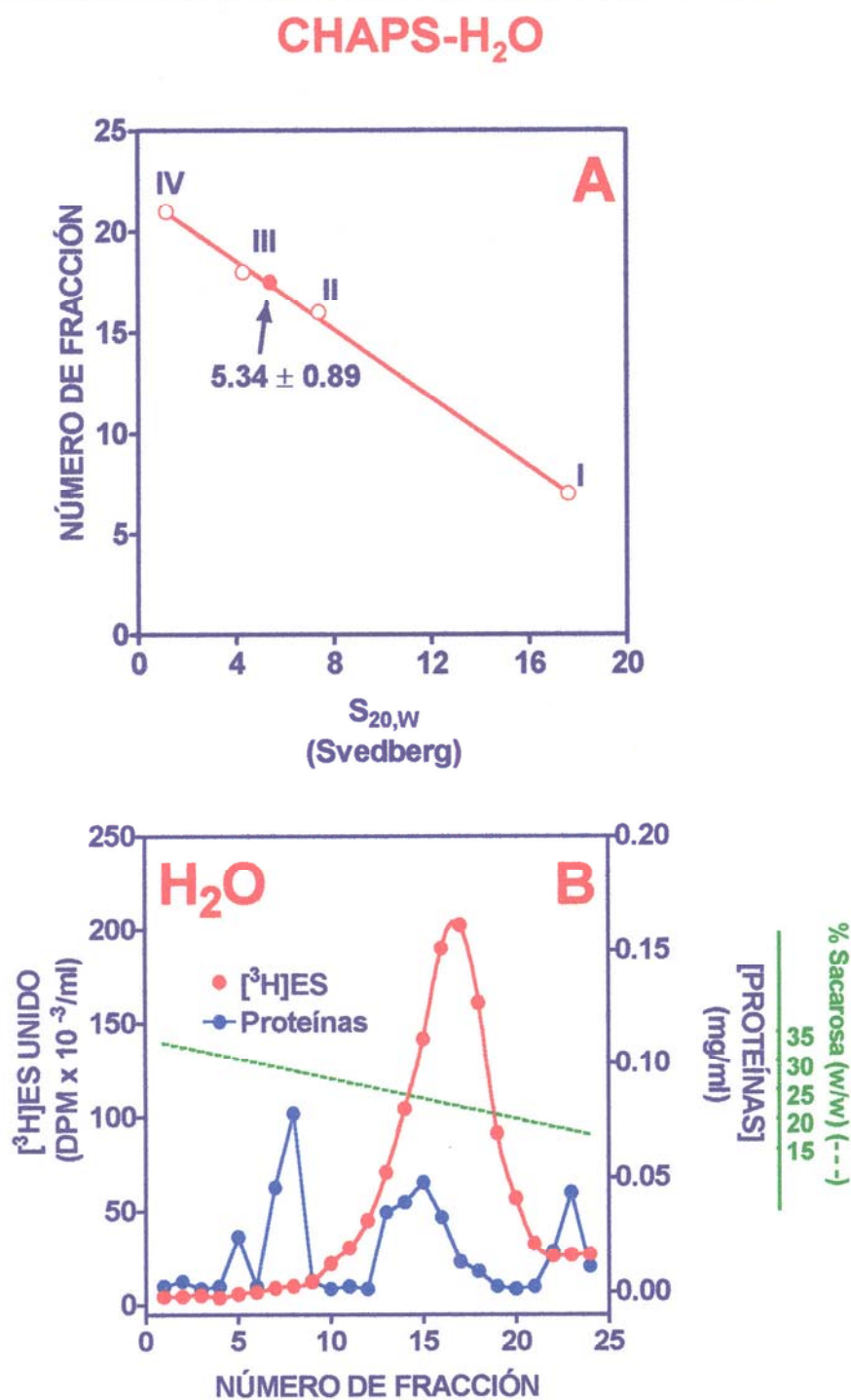


Figura 48. Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (18-34%), preparado en H₂O, de los extractos solubilizados con 10 mM de CHAPS. En el panel A se representa la centrifugación bajo las mismas condiciones de proteínas de $S_{20,w}$ conocido.

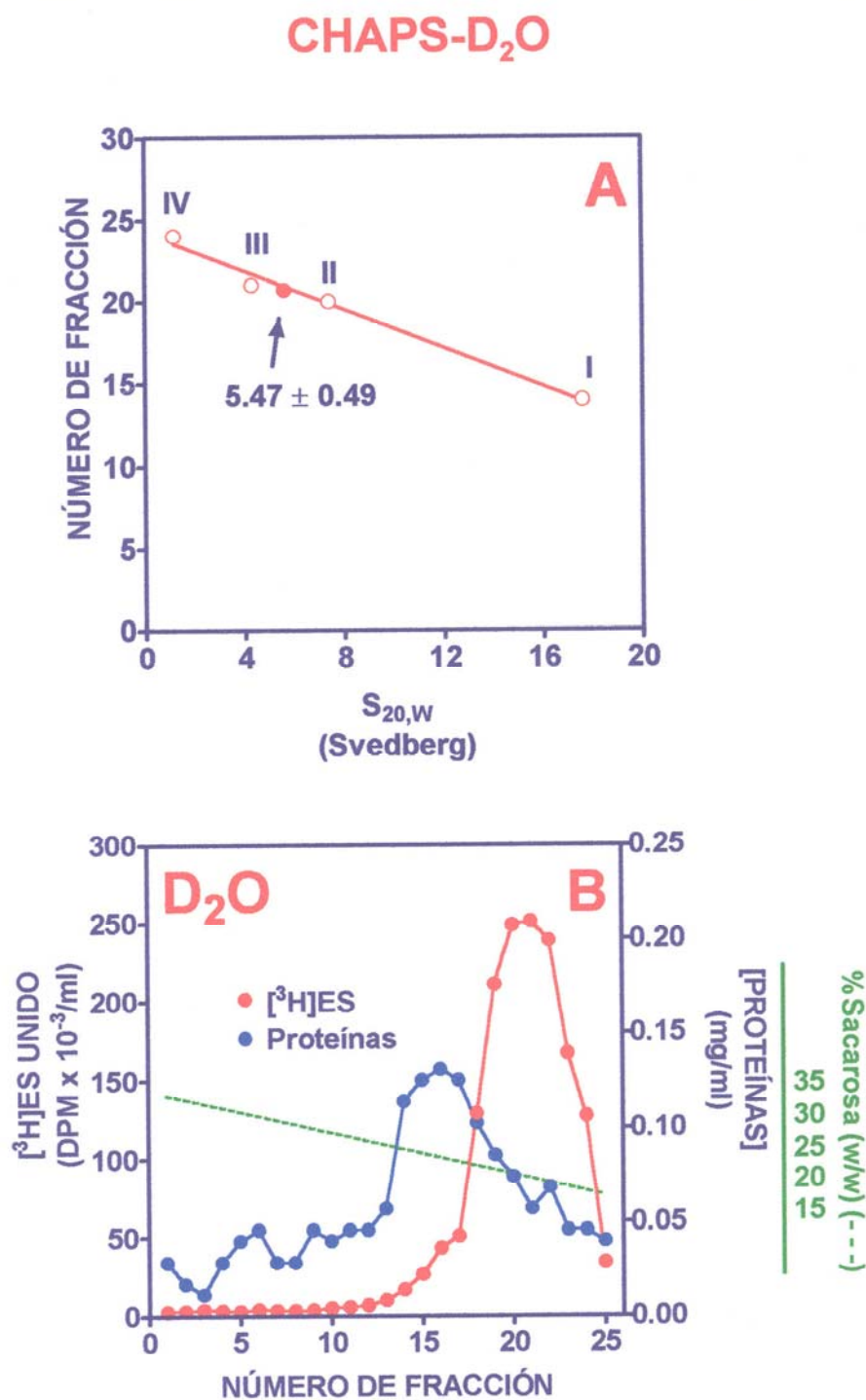


Figura 49. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (18-34%), preparado en Óxido de Deuterio (D₂O), bajo las mismas condiciones reflejadas en la Figura 48.

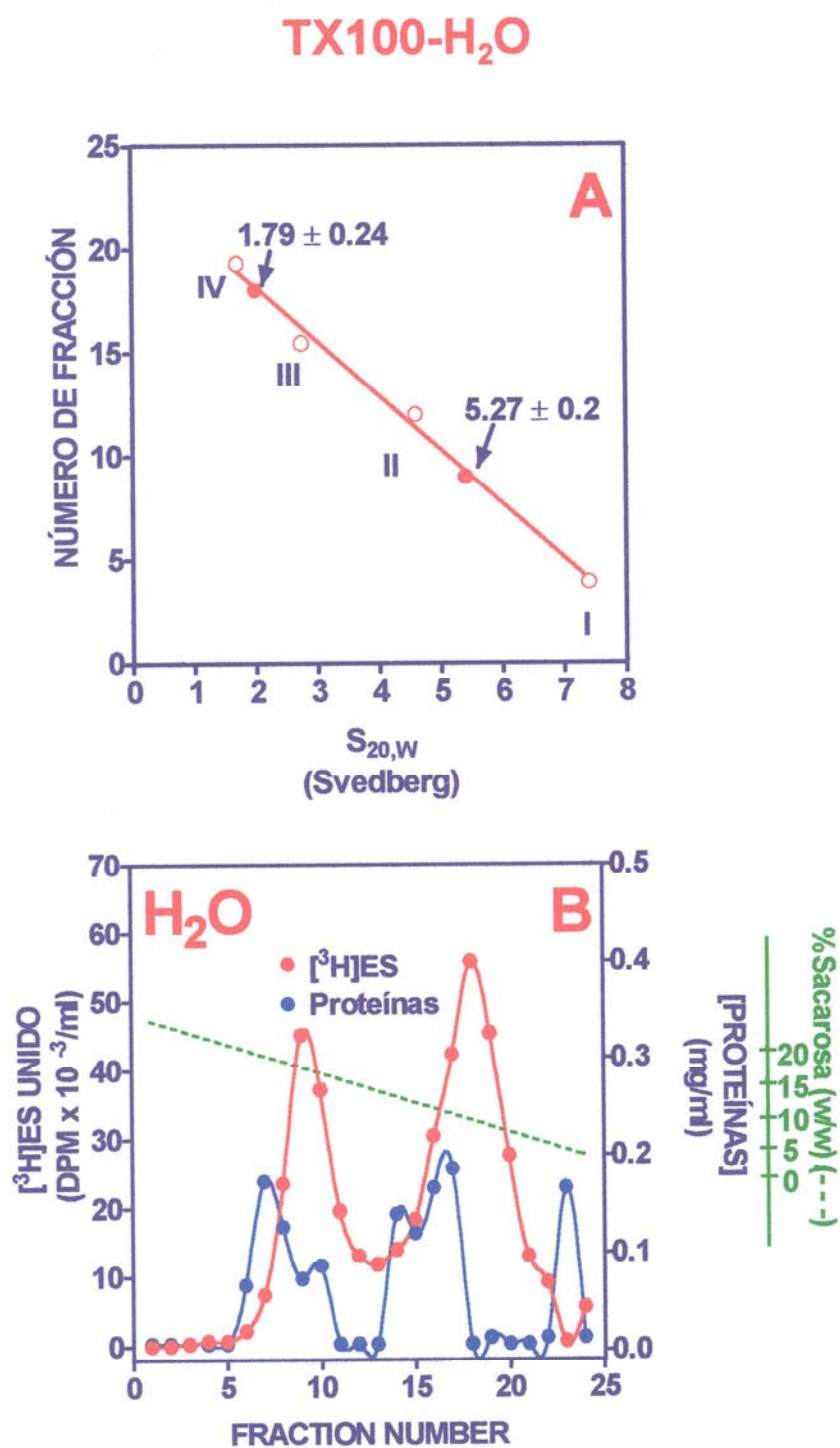


Figura 50. Ultracentrifugación en gradiente (2-20%), preparado en H₂O, de las proteínas solubilizadas con 6.6 mM de TX100, y marcadas con [³H]ES.

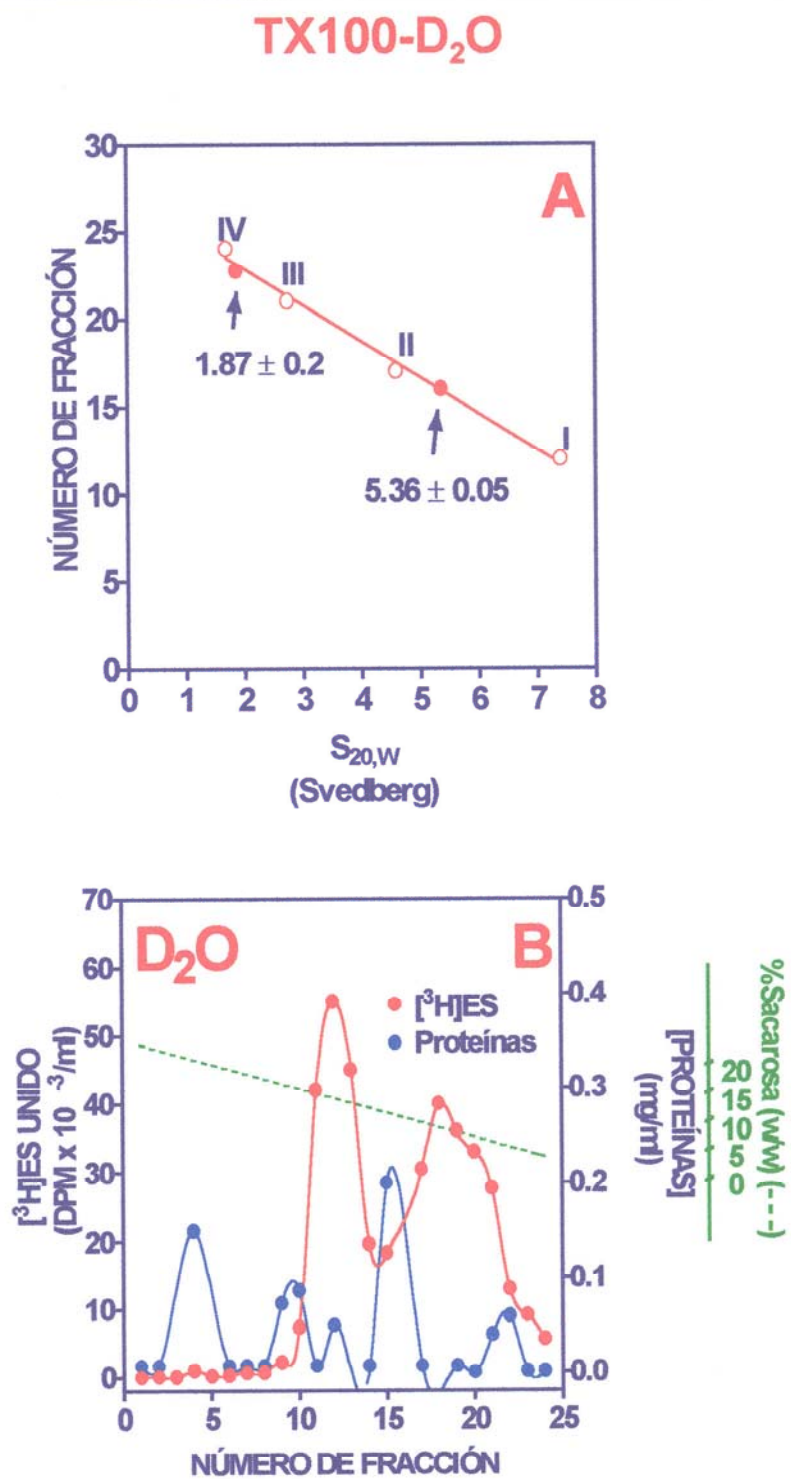


Figura 51. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (2-20%), preparado en D₂O, de las proteínas solubilizadas con 6.6 mM de TX100, y marcadas con [³H]ES.

Ambos coeficientes de sedimentación aparentes sirvieron para determinar el coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) del complejo LUES-CHAPS (Tabla 10).

Por otro lado, y como era de esperar, el análisis de los gradientes lineales de sacarosa del 2-20% hechos en H_2O o D_2O en presencia del otro detergente ensayado (TX100), reveló la existencia de dos picos de actividad. Los resultados se muestran en las Figuras 50 y 51, correspondientes al gradiente en H_2O y D_2O , respectivamente. En los paneles A de ambas figuras se muestran las correspondientes rectas de calibrado. En este caso, los coeficientes de sedimentación relativos calculados en H_2O y D_2O fueron, de nuevo, muy similares entre sí.

TABLA 10. Parámetros hidrodinámicos del LUES solubilizado a partir de microsomas hepáticos de rata macho (Los valores representan la media $\pm$ S.E.M. del número de determinaciones indicado entre paréntesis).

Parámetros	CHAPS	TX100	
		Pico 1	Pico 2
Radio de Stokes, α (nm)	5.02 ± 0.2 (4)	4.71 ± 0.17 (5)	2.1 ± 0.21 (5)
Coeficiente de Sedimentación $S_{20,w}$ (S)			
En H_2O	5.34 ± 0.89 (3)	5.27 ± 0.20 (4)	1.79 ± 0.24 (4)
En D_2O	5.47 ± 0.49 (2)	5.36 ± 0.05 (2)	1.87 ± 0.20 (2)
$S_{20,w}$ (S) ^a	5.405 ± 0.06	5.305 ± 0.10	1.83 ± 0.20
Volumen Específico Parcial, $\bar{v}$ (ml/g) ^b	74	74	74
Peso Molecular (kD), M_r ^c	118 (112-124) ^d	108 (100-116) ^d	16 (12-20) ^d
Relación de fricción, f/f_0 ^e	2.90	2.83	1.38

^a Los valores fueron calculados a partir de todas las combinaciones pareadas posibles de los datos de los gradientes en H_2O y D_2O .

^b Se asume que el volumen específico parcial ($\bar{v}$) de los complejos LUES- $[^3H]$ ES, es idéntica al de las proteínas estándar.

^c Para los cálculos ver Material y Métodos

^d Los valores del rango fueron calculados usando $1 \pm$ S.E.

^e Para los cálculos ver Material y Métodos.

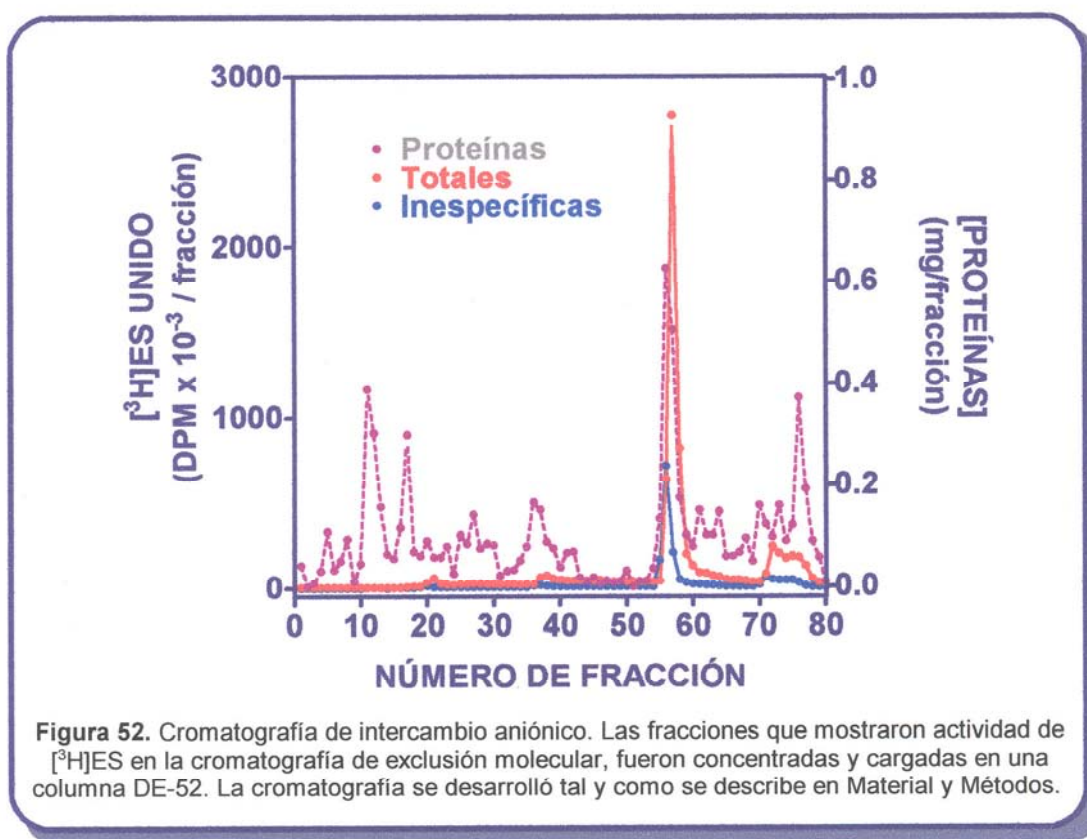
El peso molecular del complejo fue estimado a partir de los datos obtenidos en la cromatografía de exclusión molecular y de ultracentrifugación en gradiente. Cuando utilizamos el detergente zwitteriónico CHAPS, el peso molecular estimado fue 118 kDa. Por otro lado, cuando utilizamos el detergente no-iónico TX100, el complejo fue disociado en dos componentes de diferente peso molecular: 106 kDa para el más pesado y 16 kDa para el más ligero. La suma de los pesos moleculares de ambos picos de actividad, resultó ser un valor muy similar al determinado para el único pico de actividad obtenido con CHAPS. Estos datos sugieren que el LUES tiene una naturaleza oligomérica.

Otro resultado que pudimos obtener a partir de los datos hidrodinámicos de esta proteína, es su coeficiente o relación de fricción, f/f_0 . Es este un valor que nos informa acerca del grado de solvatación y del tamaño de la proteína. Si dicho valor, como ocurre en este caso, es muy superior a la unidad, debe concluirse que la proteína se halla muy solvatada, o que es muy alargada o de forma irregular (no globular), o bien ambas cosas a la vez.

IV.10. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La muestra obtenida de la cromatografía de exclusión molecular fue concentrada usando una membrana anisotrópica (Centriplus, Amicon) de la forma descrita en Material y Métodos. La muestra así preparada fue marcada con [^3H]ES de la forma habitual. Tras detener la incubación retiramos el exceso de esteroide libre por el método del DCC. En estas condiciones aplicamos la muestra para ser cromatografiada (4 ml).

La cromatografía se realizó en columna gravitatoria empaquetada con la resina DE-52, previamente equilibrada con el tampón de la muestra. Todo el proceso se realizó en la cámara fría a 4°C. La elución se realizó en gradiente discontinuo en etapas con tampones de fuerza iónica creciente, conteniendo 0M - 0.05 M - 0.2 M - 0.5 M - 1 M de NaCl. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 18-20 ml/h, y el colector automático se ajustó para recoger fracciones de 3.75 ml. De cada fracción se tomó una alícuota para el contador de centelleo. Como muestra el cromatograma (Figura 52), la actividad se recogió en un único pico simétrico en torno a las fracciones 57-58 (55-60), que coincidían con el final de la elución del tampón de 0.2 M de NaCl.



Este paso de purificación representa un enriquecimiento de aproximadamente 25 veces en relación con los microsomas crudos. El total de los pasos de purificación se presentan resumidos en la Tabla 11.

Tabla 11. Purificación parcial del Lugar de Unión para $[^3\text{H}]$ ES

Fracción	Proteína mg	Recuperación %	Fijac. Esp. $[^3\text{H}]$ ES pmol	Recuperación %	Densidad pmol/mg	Coefficiente de purificación
Microsomas	192	100	3823	100	171	1
Extracto - KCl	115	59	2829	74	246	1'5
Extracto CHAPS	51	26	3009	78	59	3'5
Sephacryl S-300	15	7'8	2126	56	141	8'5
DE - 52	2'7	1'4	1156	29	428	25

Los diferentes pasos de purificación fueron realizados como se describe en Material y Métodos. La concentración de proteínas fue medida mediante el método de Lowry modificado, compatible con la presencia de detergentes (BioRad D_o). Los datos que se muestran fueron obtenidos de un experimento típico.

IV.11. MARCAJE DE FOTOAFINIDAD Y SDS-PAGE DEL LUES

IV.11.1. MARCAJE DE FOTOAFINIDAD

Para estos experimentos utilizamos la muestra procedente de las fracciones 55-60 de la cromatografía de intercambio iónico. La muestra fue concentrada utilizando una membrana Centriplus de la forma descrita en Material y Métodos, consiguiendo una concentración aproximada de 2 mg/ml de proteína.

La muestra así obtenida fue primero irradiada a 254 nm durante periodos crecientes de tiempo, con el fin de determinar el tiempo máximo que es capaz de resistir el LUES a la posible degradación provocada por la radiación ultravioleta sin que haya pérdida de su capacidad de unión del ligando. En las muestras así tratadas se determinó posteriormente la fijación total e inespecífica mediante ensayo de intercambio con [^3H]ES de la forma habitual.

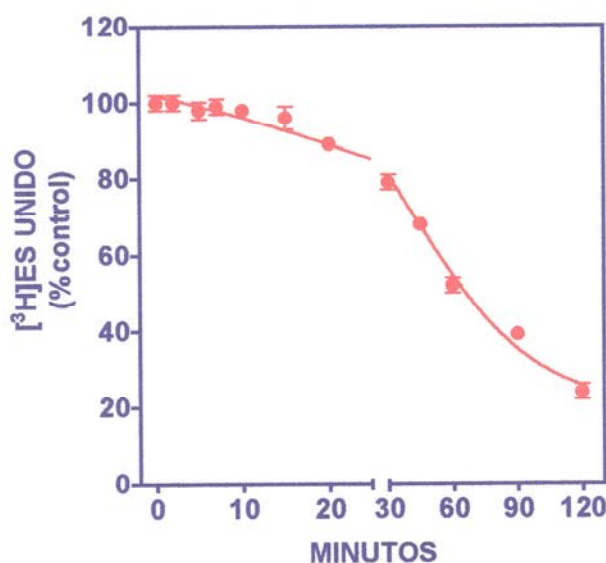


Figura 53. Exposición de las proteínas solubilizadas con 10 mM de CHAPS y parcialmente purificadas mediante cromatografía de exclusión molecular e intercambio aniónico a una fuente de luz ultravioleta (254 nm). Las muestras tratadas de esta forma durante intervalos crecientes de tiempo fueron sometidas posteriormente a ensayo de intercambio con [^3H]ES.

Los resultados (Figura 53) muestran que la irradiación puede mantenerse como máximo durante 20 minutos.

Teniendo en cuenta este dato, las muestras previamente incubadas en equilibrio con [^3H]ES de la forma descrita en Material y Métodos fueron irradiadas durante diferentes tiempos

(0-20) y también colocando la muestra a distancias crecientes del foco ultravioleta (0-30 cm). La eficacia de la irreversibilidad del marcaje fue comprobada en las muestras usando distintos métodos de demostración de covalencia: precipitación de la muestra con 5% de ácido tricloroacético; desnaturalización mediante hervido de la muestra a 100°C durante 20 minutos, etc. (datos no incluidos en la presente Tesis).

Estos experimentos sirvieron para determinar las condiciones óptimas para obtener el máximo rendimiento de marcaje irreversible: irradiación a 254 nM, durante 20 minutos a una distancia de 15 cm del foco. En estas condiciones cerca de un 4% del total de la fijación específica de la muestra inicial permanece unido a las proteínas de forma covalente (Tabla 12).

IV.11.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La muestra fotomarcada fue sometida a SDS-PAGE en gradiente de poliacrilamida (13-20%). Con ello pretendíamos determinar el peso molecular del complejo LUES, usando la técnica detallada en Material y Métodos. Como se muestra en la Figura 54, se resolvieron 3 péptidos marcados covalentemente con [³H]ES, con pesos moleculares cuya suma corresponde aproximadamente con el estimado para el complejo LUES-[³H]ES en el apartado 7 del presente capítulo. Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 12

Tabla 12. Fotomarcaje con [³H]ES de los microsomas solubilizados con CHAPS seguido de SDS-PAGE

	Control	1 ^{er} pico	2 ^o pico	3 ^{er} pico
Eficiencia del Fotomarcaje del LUES (%)	3.63 ± 0.44 ^a	0.56 ± 0.18	1.3 ± 0.17	1.1 ± 0.49
Peso molecular (kDa)	118 ^b	57.6 ± 4.25 ^c	38.6 ± 5.3 ^c	23 ± 3.25 ^c

^a Determinado mediante experimentos de demostración de covalencia descritos en Material y Métodos

^b Estimado mediante la ecuación de Svedberg a partir de los datos obtenidos en la filtración en gel y ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa

^c Determinado por comparación con patrones marcados con ¹⁴C

Cada dato representa la media ± SEM de tres experimentos diferentes

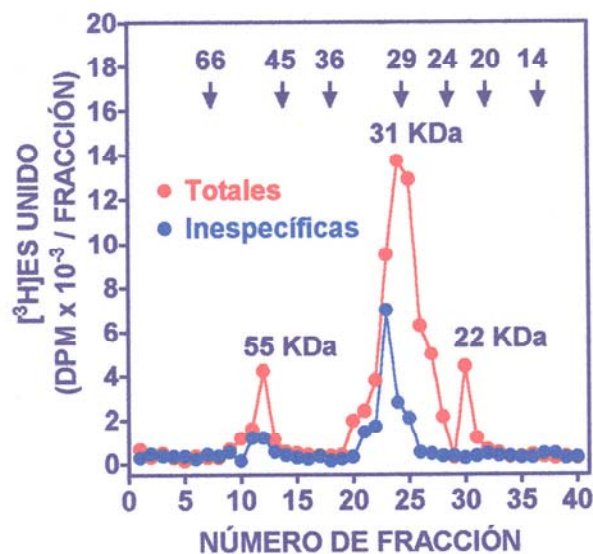


Figura 54. Análisis mediante SDS-PAGE en gradiente (13-20%) de la preparación enriquecida de proteínas solubles, marcada covalentemente con $[^3\text{H}]\text{ES}$ mediante fotoactivación. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras.

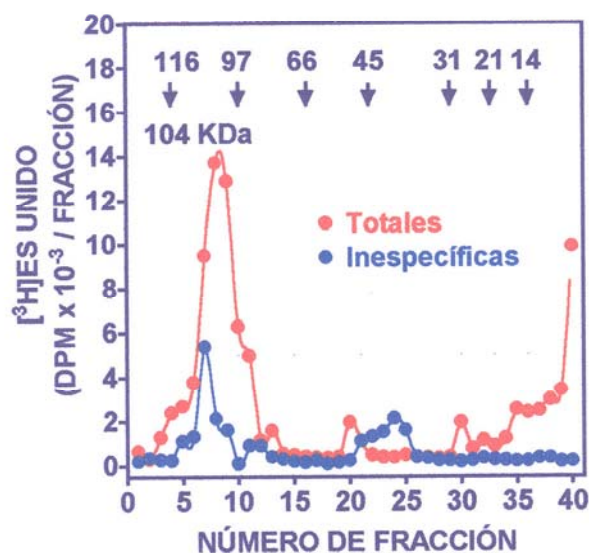


Figura 55. Análisis mediante SDS-PAGE en gradiente (6-16%) de la preparación enriquecida de proteínas solubles, marcada covalentemente con $[^3\text{H}]\text{ES}$ mediante fotoactivación. En este caso la electroforesis se realizó en condiciones no reductoras.

La especificidad del marcaje con [^3H]ES se demostró por la ausencia de radiactividad en calles paralelas de la electroforesis en las que la muestra había sido irradiada tras ser incubada con [^3H]ES pero en presencia de un exceso de 200 veces del ligando no marcado (Figura 54).

Como quiera que habíamos obtenido tres péptidos diferentes con capacidad para fijar [^3H]ES, cobraba fuerza la hipótesis formulada a partir de los datos matemáticos de la caracterización farmacológica (apartado 1) de que el LUES podría ser una proteína oligomérica. En este caso los datos indican que el lugar de unión para [^3H]ES es una proteína al menos trimérica. No obstante también era posible que las tres señales de fijación específica que obtuvimos en la electroforesis se correspondieran con fragmentos de degradación de la proteína original. Para descartar este supuesto hicimos un experimento adicional. En dicho experimento se partió de una muestra de proteínas solubilizadas y parcialmente purificadas que fueron fotomarcadas de la forma ya especificada. La muestra fue también sometida a electroforesis en gradiente, pero en este caso el rango lo hicimos del 6 al 16%. Además en esta electroforesis se eliminó del tampón de muestra el agente reductor DTT. De esta manera, si existía una unión por puentes disulfuro de los tres péptidos, ésta permanecería intacta. La Figura 55 muestra como en estas condiciones obtuvimos un sólo pico de actividad, correspondiente con un peso molecular de 104 kDa, muy similar al obtenido sumando el peso de los tres péptidos resuelto en condiciones reductores.

IV.12. REGULACIÓN HORMONAL DEL LUES

Como quedó reflejado en el apartado de "Introducción", el lugar de unión microsomal para [^3H]DEX (LUBAG) está sometido a una compleja regulación multihormonal, ampliamente estudiada en nuestro laboratorio [140,141]. Nuestra hipótesis de trabajo establece que el LUBAG y el que venimos caracterizando en esta Tesis Doctoral, el LUES, están íntimamente relacionados, debido a que existe un mecanismo alostérico negativo del segundo sobre el primero. Quisimos, pues, para finalizar el bloque experimental de este trabajo, realizar una serie de experimentos *in vivo* con el fin de conocer si el LUES también estaba sometido a regulación hormonal. La mayoría de los experimentos estuvieron encaminados a comparar si dicha regulación se correspondía con la descrita previamente para el LUBAG, más que para descifrar completamente la regulación del LUES, objetivo que se revelaría demasiado ambicioso para abordarlo enteramente en esta Tesis Doctoral.

IV.12.1. ONTOGENIA DEL LUES

La primera aproximación al conocimiento de la regulación hormonal del LUES fue estudiar si su concentración sufría modificaciones sustanciales con la edad. Esto es un método no invasivo que permite constatar diferencias atribuibles a los cambios hormonales fisiológicos que sufre el animal a lo largo de la vida. Para ello realizamos una serie de experimentos con el fin de determinar la concentración de LUES en el hígado de rata macho desde el nacimiento hasta la edad adulta. A efectos comparativos, en éstos y en el resto de experimentos de regulación hormonal, incluimos los resultados obtenidos para el LUBAG en las mismas preparaciones microsomales.

Los resultados de la ontogenia aparecen reflejados en la figura 56. Se aprecia como, a diferencia del LUBAG, cuyos niveles son indetectables durante las tres primeras semanas de vida, el LUES es posible medirlo desde el nacimiento. Ambos sufren posteriormente un incremento paralelo en su concentración, hasta que alcanzan el máximo nivel de actividad en torno a los 2-3 meses de edad.

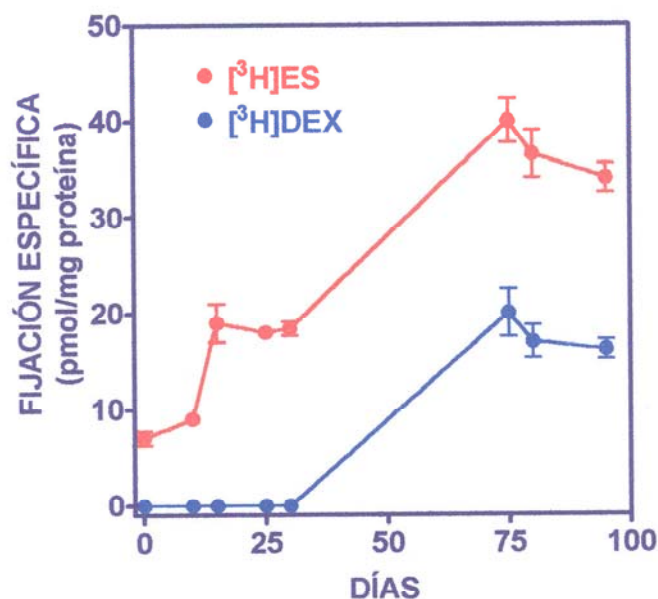


Figura 56. Ontogenia del LUBAG y LUES de microsomas de rata macho. Usamos ratas macho de las edades representadas en la figura, sus hígados fueron extraídos y procesados de la forma descrita en Material y Métodos. Cada punto representa la media $\pm$ S.E.M. de al menos cuatro animales, procesados por triplicado.

Estos datos sugieren que, a pesar de que las ontogenias de LUES y LUBAG siguen una perfil similar, las diferencias son lo suficientemente destacadas como para pensar que

están sometidos a una regulación fisiológica diferente.

IV.12.2. LA HIPOFISECTOMÍA DISMINUYE DRÁSTICAMENTE LA CONCENTRACIÓN DE LUES EN MICROSOMAS HEPÁTICOS

La hipofisectomía suele ser utilizada como una aproximación drástica e invasiva para la alteración del sistema endocrino. Como hemos dicho en la introducción de esta Tesis Doctoral, la hipofisectomía (HYPOX) produce una disminución de los niveles de LUBAG hasta hacerlos casi indetectables. Con el fin de comprobar el efecto que este estado endocrino tenía sobre los niveles de LUES llevamos a cabo una serie de ensayos de intercambio con [3 H]DEX (como control) y [3 H]ES usando como muestra los microsomas procedentes de ratas HYPOX macho adultas.

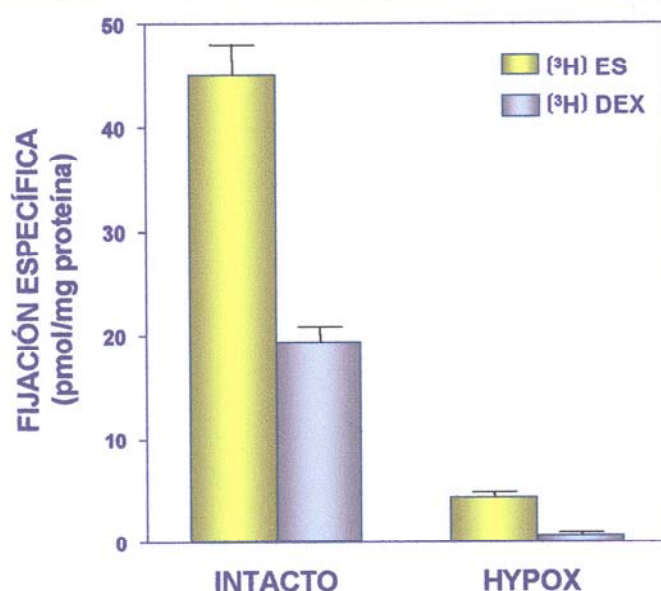


Figura 57. Efecto de la hipofisectomía sobre el LUBAG y el LUES de microsomas de hígado de rata macho. Cada barra representa la media $\pm$ S.E.M. de al menos tres experimentos diferentes.

La Figura 57 muestra como la hipofisectomía disminuye el nivel de LUES hasta los 5-6 pmol/mg proteína, caída importante pero no tan drástica como la de los niveles de LUBAG. Es importante constatar que el nivel de LUES tras la hipofisectomía se corresponde con el detectable durante los primeros días de vida.

Estos datos sugieren que las hormonas controladas por la hipófisis tienen un papel decisivo en el mantenimiento de los niveles de LUES durante la vida adulta del animal. Sin

embargo, una parte del LUES parece eludir el control hormonal relacionado con la hipófisis, lo que sugiere que parte del complejo oligomérico LUES no está sujeto a regulación hipofisaria. El paso obvio siguiente sería estudiar cuales de las hormonas secretadas por la hipófisis juegan los papeles reguladores decisivos para el control del LUES.

IV.12.3. LA ORQUIDECTOMÍA NO ALTERA LOS NIVELES DE LUES EN MICROSOMAS HEPÁTICOS

La capacidad del LUES de unir un andrógeno como el ES, y el aumento del nivel de LUES durante la pubertad de la rata sugerían que los andrógenos, hormonas dependientes de la hipófisis, podrían estar implicados en la regulación del LUES. Por otra parte, el hecho de que el ES sea un AAS capaz de modificar alostéricamente el LUBAG nos llevó a investigar el papel de los esteroides gonadales del macho en la regulación endocrina de ambos lugares de unión.

Para este estudio se orquidectomizó un grupo de ratas que fueron utilizadas para experimentación 7 días más tarde, determinándose la concentración de LUBAG y LUES en los microsomas obtenidos de estos animales. El control fue un lote de animales de la misma edad que fueron pseudo-operados.

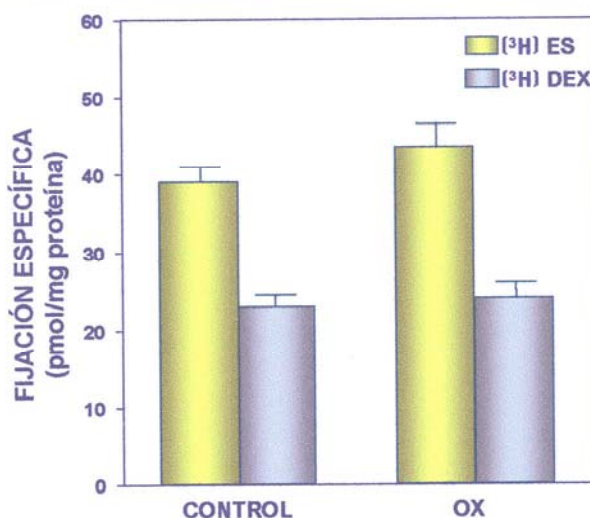


Figura 58. Efecto de la orquidectomía en la rata adulta sobre los niveles de LUBAG y LUES. Cada barra representa la media $\pm$ S.E.M. de tres experimentos diferentes

Como se puede observar en la Figura 58, la orquidectomía no tuvo un efecto

significativo sobre los niveles de LUES, ni tampoco sobre los de LUBAG. Estos resultados sugieren que el mantenimiento de niveles normales de andrógenos fisiológicos no es determinante para la normal dotación microsomal de LUES o de LUBAG.

IV.12.4. LOS GLUCOCORTICOIDES REGULAN LOS NIVELES DE LUES

El estudio del efecto de la supresión de las hormonas suprarrenales se consideró importante por varias razones: 1) están implicadas en la regulación fisiológica del LUBAG [140,187]; 2) son hormonas reguladas por la hipófisis; y, 3) interaccionan con el LUBAG. Por este motivo utilizamos dicho modelo experimental para cuantificar el nivel de LUES.

Para este estudio fueron adrenalectomizadas bajo anestesia un lote de ratas de tres meses de edad. Las ratas ADX fueron usadas para experimentación 7 días más tarde. Las ratas ADX fueron divididas en dos grupos: uno de ellos fue inyectado s.c. con una dosis diaria (1 mg/100 gr p.v.) de corticosterona acetato (CA), y el otro recibió el vehículo apropiado. Un grupo de animales de la misma edad fue pseudo-operado y usado como control, recibiendo estos animales únicamente el vehículo apropiado. El nivel de LUES fue determinado en los microsomas procedentes de estos grupos de animales mediante ensayo de intercambio con [3 H]ES. También se realizó ensayo de intercambio con [3 H]DEX para determinar el nivel de LUBAG, como control.

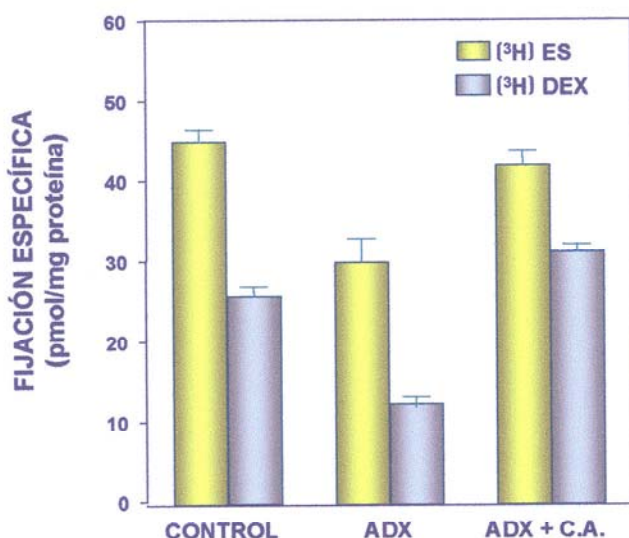


Figura 59. Efecto de la adrenalectomía sobre LUBAG y LUES de microsomas de rata macho. Cada barra representa la media $\pm$ S.E.M. de al menos cuatro experimentos diferentes.

Los resultados obtenidos los hemos representado en la Figura 59, en la que se muestra como la adrenalectomía es capaz de disminuir el nivel de LUES hasta un 60% del valor control. Esta disminución es del mismo orden que la obtenida sobre el nivel de LUBAG.

Es de destacar el hecho de que en ambos casos, el tratamiento sustitutivo con CA, fue capaz de restaurar los niveles hasta los valores del control. Esto excluye la posibilidad de que las hormonas no glucocorticoides (adrenalina, mineralcorticoides o andrógenos adrenales) tengan influencia en los niveles de LUES y, por lo tanto, indican que son los glucocorticoides las hormonas adrenales implicadas en la regulación de LUES.

IV.12.5. EL HIPOTIROIDISMO NO MODIFICA EL NIVEL DE LUES EN LOS MICROSOMAS HEPÁTICOS

Las hormonas tiroideas tienen una dependencia total de la hipófisis para su secreción, de modo que resulta evidente que su influencia en los niveles de LUES debía ser abordada en este estudio. Como previamente habíamos publicado [140], las hormonas tiroideas están implicadas en la regulación endocrina del LUBAG, de forma tal que el hipotiroidismo produce una disminución significativa del mismo.

Es importante destacar que en la rata la síntesis de GH hipofisaria es un proceso que requiere de las hormonas tiroideas. Tal es así, que un estado carencial de éstas produce también una drástica disminución de la secreción de GH.

La manipulación de la secreción de hormonas tiroideas se puede abordar desde diferentes modelos experimentales. Aquí utilizamos una aproximación farmacológica, consistente en administrar a las ratas fármacos antitiroideos, que interfieren con la síntesis de hormonas tiroideas. Así, para provocar hipotiroidismo agudo administramos propiltiouracilo (PTU) durante 21 días en el agua de bebida; y para provocar hipotiroidismo crónico administramos metimazol en el agua de bebida a las madres gestantes, así como durante el resto de la vida a las ratas hasta el momento del experimento.

En los dos modelos de hipotiroidismo se destinó un lote de ratas a ser tratado con hormona tiroidea (T_3) mediante inyección diaria de 2.5 $\mu\text{g/kg}$ p.v., durante un total de 7 días, mientras que los controles fueron inyectados con el correspondiente vehículo. Todas las ratas fueron sacrificadas a los 70 días de edad, y se midió el nivel microsomal de LUBAG (como control) y LUES mediante ensayo de intercambio con [^3H]DEX y [^3H]ES, respectivamente.

En la Figura 60 se muestra que, como había sido demostrado anteriormente, tanto el hipotiroidismo agudo como el crónico disminuyeron drásticamente el nivel de LUBAG. Este efecto fue revertido por la administración de T_3 . Sin embargo, ninguno de los dos tipos de hipotiroidismo afectó el nivel de LUES, y tampoco fue modificado por la administración de T_3 .

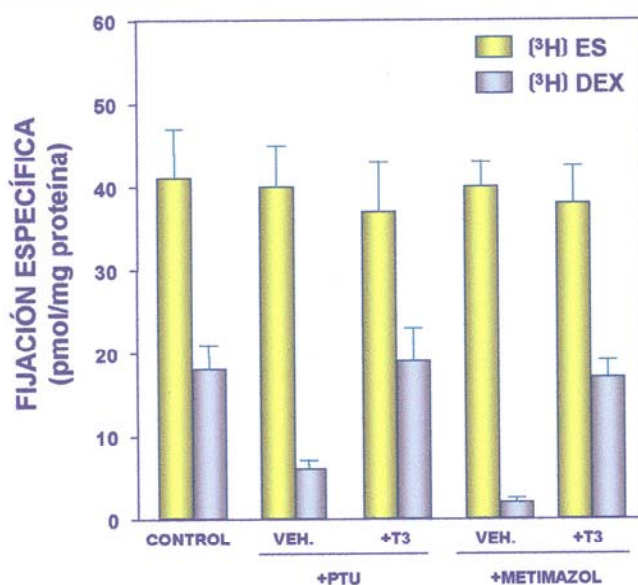


Figura 60. Efecto del hipotiroidismo agudo y crónico sobre el nivel microsomal de LUBAG y LUES. Cada barra representa la media $\pm$ S.E.M de al menos 4 experimentos diferentes

Estos resultados sugieren que las hormonas tiroideas no juegan un papel importante en la regulación del nivel de LUES. Pero es preciso insistir en que los animales hipotiroideos son también deficientes en GH, lo que sugiere que tampoco esta hormona es relevante en la regulación del LUES.

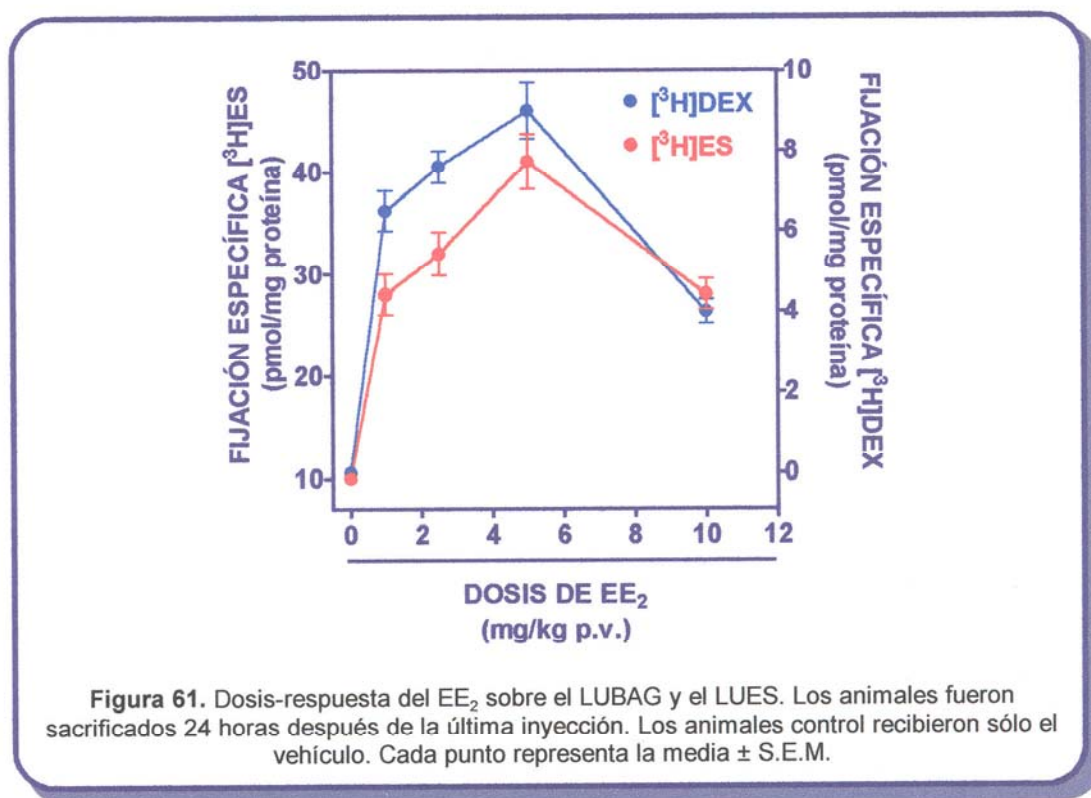
Resulta interesante el hecho de que el hipotiroidismo disminuye drásticamente el nivel de LUBAG y no el de LUES, ya que se convierte en un modelo animal en el que podemos estudiar ambas entidades por separado.

IV.12.6. EL ETINILESTRADIOL (EE_2) INDUCE LOS NIVELES DE LUES EN RATAS INMADURAS Y RATAS HYPOX

Previamente habíamos demostrado que los estrógenos, pero en particular el sintético EE_2 (o su análogo el mestranol), eran capaces de interactuar *in vitro* con el LUBAG,

y que dosis farmacológicas de EE_2 inducen *in vivo* el LUBAG en varios modelos animales [144]. Fue por ello que decidimos explorar la posibilidad de que este efecto inductor también lo ejerciera el EE_2 sobre el LUES. Para comprobarlo usamos ratas inmaduras (IMT) y ratas HYPOX, modelos ambos que, como hemos visto, presentaban niveles muy bajos de dichos lugares de unión.

Los experimentos de dosis-respuesta mostraron que el EE_2 (de 0.1 a 10 mg/kg p.v./día/5 días) ejercía un efecto inductor muy importante sobre el LUBAG, como ya sabíamos, pero también de forma muy destacada sobre el LUES (Figura 61), siguiendo en ambos casos un patrón de inducción semejante. El mayor efecto fue observado con 5 mg/kg p.v. tanto para el LUES como para el LUBAG.



Los experimentos de dosis-tiempo fueron realizados inyectando una dosis diaria de EE_2 durante 7 días (5 mg/kg p.v.) a ratas IMT (Figura 62). Este tratamiento reveló que la inducción de ambos lugares de unión sigue un modelo bifásico, con dos picos de máxima respuesta a los 2 y 5 días. No obstante es destacable el hecho de que el nivel de LUBAG disminuyó drásticamente después del 5º día de tratamiento, mientras que el nivel de LUES permaneció estable. Probablemente, esto sólo sea un reflejo de las vidas medias tan diferentes que poseen ambas proteínas ($t_{1/2} \text{ LUBAG} \leq 12 \text{ hr}$; $t_{1/2} \text{ LUES} \geq 24 \text{ hr}$).

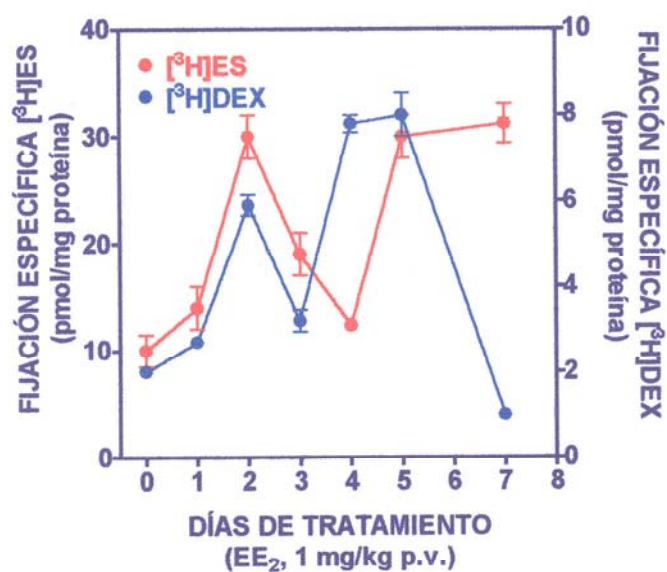


Figura 62. Dosis-tiempo del efecto del EE₂ sobre LUBAG y LUES. Los animales control recibieron vehículo sólo. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M.

Con el fin de confirmar el efecto inductor del EE₂ sobre el LUBAG y LUES, comprobamos el efecto del tratamiento con este estrógeno en otro modelo animal con muy bajos niveles de los lugares de unión, la rata HYPOX. Como mostramos en la figura 63, también en este modelo se obtuvo el mismo efecto inductor ya observado en ratas IMT.

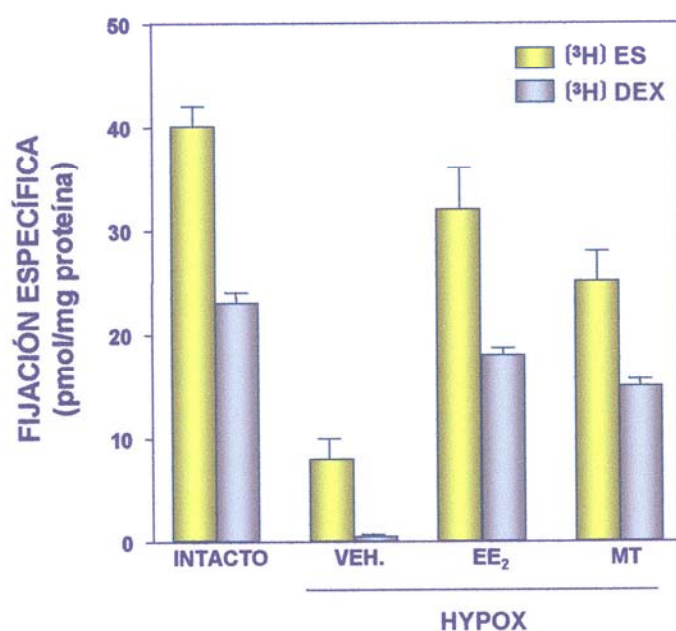


Figura 63. Efecto de la administración de EE₂ y Mestranol (MT) a ratas HYPOX macho adultas

IV.12.7. REGULACIÓN FISIOLÓGICA SELECTIVA DE LOS PÉPTIDOS DEL OLIGÓMERO.

Una cuestión de la máxima relevancia, surgida del estudio de los diferentes modelos de regulación hormonal, fue la de tratar de demostrar si los cambios observados en la concentración de LUES afectaban o no por igual a los tres péptidos que unen [3 H]ES. En otras palabras, parecía interesante constatar si los cambios que habíamos detectado en la concentración de LUES en los diferentes modelos experimentales estudiados eran simplemente cuantitativos, o eran, además el reflejo de cambios cualitativos en la proporción relativa de los diferentes péptidos.

La primera aproximación realizada se basó en comparar los perfiles de captación de ES en IMT y en animales adultos. Los microsomas obtenidos a partir de estos animales fueron incubados con [3 H]ES, y fotomarcados de la forma especificada en el apartado 11.1. Las muestras así marcadas fueron sometidas a SDS-PAGE en gradiente (13-20%), en condiciones desnaturalizantes y reductoras, y la radiactividad fue cuantificada mediante corte de los geles en porciones de 3 mm, y digestión de los mismos con H_2O_2 , como describimos en Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 64. En ella se constata que la banda predominante en la época de animal inmaduro es la de 22 kDa, pero que ésta disminuye en proporción en la edad adulta, donde predomina la banda de 31 kDa.

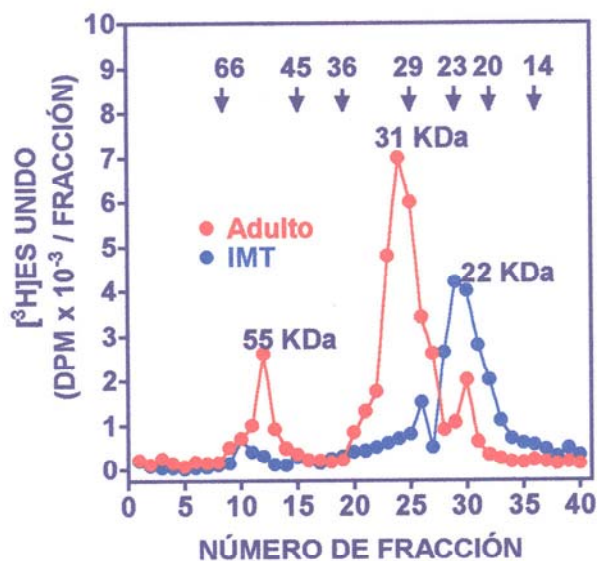


Figura 64. Regulación fisiológica selectiva de los péptidos del LUES. SDS-PAGE (13-20%) de microsomas procedentes de animales adultos vs. IMT

También comparamos el efecto de la hipofisectomía en la edad adulta sobre la abundancia relativa de los péptidos del oligómero. La Figura 65 muestra que el perfil de las ratas HYPOX es mucho más parecido al de las ratas inmaduras que al de las ratas adultas normales.

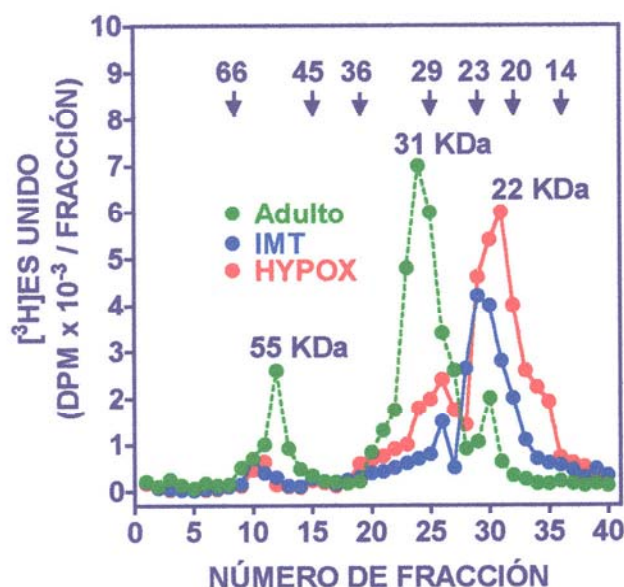


Figura 65. Regulación fisiológica selectiva de los péptidos del LUES. SDS-PAGE (13-20%) de microsomas procedentes de animales adultos vs. HYPOX

Todos estos resultados sugieren que los péptidos fijadores de [3H]ES pueden tener regulaciones fisiológicas separadas.

IV.12.8. EL EE₂ PRODUCE UNA INDUCCIÓN SELECTIVA DE LOS PÉPTIDOS DE 31 Y 55 kDa DEL OLIGÓMERO

Con el objetivo de consolidar la hipótesis de que los péptidos que componen el LUES pueden tener regulaciones separadas, realizamos un experimento en el que administramos EE₂ a la dosis de 0.5 mg/100 g p.v. a ratas IMT y a ratas HYPOX. En ambos casos se realizó también SDS-PAGE de muestras procedentes de los animales control (IMT o HYPOX no inducidos con EE₂).

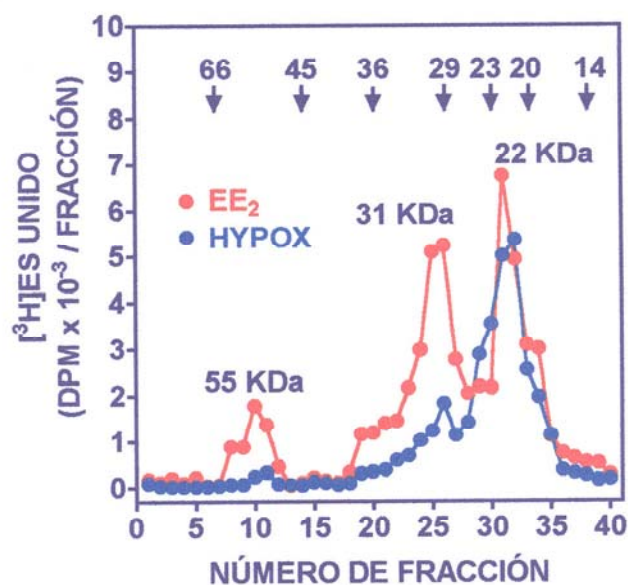


Figura 66. Inducción selectiva del EE_2 sobre los péptidos de 55 y 31 KDa en ratas HYPOX macho adultas

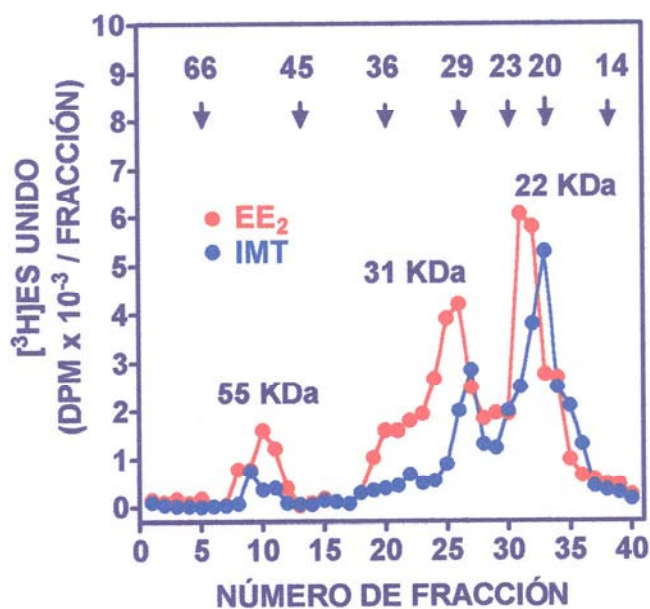


Figura 67. Inducción selectiva del EE_2 sobre los péptidos de 55 y 31 KDa de ratas IMT

En las Figuras 66 y 67 se muestran los resultados de este experimento. En ellas se puede observar que tanto en los animales IMT como en los HYPOX el péptido de 22 kDa no varía significativamente su expresión tras el tratamiento inductor con EE₂. La inducción, sin embargo, sí se produce de forma muy significativa sobre los péptidos de 31 y 55 KDa.

Estos resultados sugieren que los niveles de LUES que se miden constitutivamente en los animales durante los primeros días de vida y en el animal HYPOX corresponden al péptido de 22 kDa, y que son los otros dos péptidos que conforman el oligómero los que sufren una regulación endocrina y farmacológica. Esta complejidad hace que la tarea de descifrar la regulación fisiológica del LUES se presente como un reto fascinante, aunque arduo por su complejidad.

V. DISCUSIÓN

En este capítulo haremos una discusión general de los aspectos relacionados con la interacción del ES con la proteína de membrana LUES así como de las propiedades de la misma que, a nuestro juicio, resultan más relevantes. Al mismo tiempo, proponemos un modelo de trabajo en el cual esta proteína podría participar en el mecanismo de acción de algunos EAA.

En esta Tesis se aporta la primera evidencia experimental de la existencia de una proteína oligomérica de 104-120 kDa que posee elevada afinidad por el ES y que está integrada en las membranas del retículo endoplásmico. Esta proteína presenta una extraordinaria especificidad por el ES, y por su análogo estructural el DA, siendo capaz de reconocer a estos esteroides entre más de 100 compuestos ensayados. Aunque se han evidenciado claras diferencias con respecto al LUBAG, en la regulación endocrina del LUES también participan los glucocorticoides. Las subunidades del LUES están sometidas a una regulación diferencial dependiente del estatus endocrino del animal. Por último, estrógenos sintéticos como el EE₂ provocan una inducción selectiva de sólo dos de las tres subunidades peptídicas del LUES en modelos experimentales donde la expresión del RE hepático es muy baja o indetectable.

V.1. EL LUGAR DE UNIÓN PARA ESTANOZOLOL (LUES)

V.1.1. El [³H]ES se une específicamente a una proteína de membrana integrada en el retículo endoplásmico hepático

Muchas son las evidencias que, en conjunto, descartan la posibilidad de que la unión del [³H]ES a las membranas microsomales se deba a una interacción inespecífica con el componente fosfolipídico de las mismas. Esto se ve apoyado por hechos como los siguientes: 1) el tratamiento de los microsomas con proteasas elimina la fijación específica del [³H]ES a las membranas; 2) el tratamiento de los animales con CHX, un potente inhibidor de la síntesis proteica, demuestra que la unión específica del [³H]ES a las membranas depende de la síntesis de nuevas proteínas; 3) la capacidad de fijación específica es más estable a bajas temperaturas y depende del pH del medio de incubación; 4) la integridad de los grupos sulfhidrilo resulta imprescindible para el mantenimiento de la unión específica del [³H]ES a las membranas, propiedad que comparte con todos los receptores para hormonas esteroides [219]; y 5) la proteína solubilizada, carente de "entorno" fosfolipídico, mantiene toda su capacidad para fijar específicamente [³H]ES. La naturaleza proteica del LUES se confirmó con la SDS-PAGE de la proteína solubilizada marcada covalentemente con [³H]ES.

El fraccionamiento subcelular ha resultado muy útil para demostrar que la fijación específica del [3 H]ES a las membranas microsomales se localiza en el retículo endoplásmico. El uso de condiciones experimentales que rompen preferentemente las interacciones hidrofílicas y electrostáticas de las proteínas con la bicapa fosfolipídica (ej. elevada fuerza iónica en el tampón) nos indica que el LUES está fuertemente anclado a la membrana del retículo endoplásmico. Esto se confirmó cuando se llevó a cabo la partición de fases con TX114 lo que permitió detectar más del 98% de la actividad en la fase orgánica indicando que se trataba de una proteína fuertemente hidrofóbica, característica propia de las proteínas inmersas en la membrana. Más aún, el tratamiento de los microsomas con PLC disminuía drásticamente la capacidad de fijación del [3 H]ES por el LUES, lo que ponía de manifiesto que el entorno fosfolipídico dependiente de PLC es necesario para la estabilidad de esta proteína. Esto no es un hecho aislado sino que también se da con otras proteínas integradas en el retículo endoplásmico hepático como es el citocromo P450 [252]. De hecho las proteínas de membrana sufren modificaciones, entre las que se incluye la adición de lípidos como el glicosilfosfatidilinositol, que son necesarias para su localización membranar.

V.1.2. El LUES no es una forma membranar de RA ni una proteína transportadora de esteroides

El RA se localiza, principalmente, en el núcleo. Ahora bien, existen diversos trabajos que han descrito su presencia en la fracción microsomal hepática [196,243]. Esto nos hizo barajar la posibilidad de que el LUES fuera una forma membranar del RA. No obstante, el conjunto de datos obtenidos en esta Tesis sugiere que el [3 H]ES se une específicamente a una proteína distinta de la forma microsomal del RA.

Los perfiles farmacológicos del RA y del LUES son claramente distintos. A diferencia de lo que ocurre con el LUES, los andrógenos naturales T y DHT, o sintéticos como el R1881 se unen con alta afinidad al RA [197,222,223,243]. En la fracción citosólica existe una pequeña fijación específica de [3 H]ES que podría corresponder con la captación de este ligando por el RA, ya que, aunque hemos dicho que es de localización nuclear, en nuestras condiciones experimentales es fácilmente extractable a la fracción citosólica. Sin embargo, esta fijación específica de la fracción citosólica es prácticamente despreciable cuando se compara con la capacidad de unión de los microsomas. El nivel de LUES en el hígado es 1000 veces superior al del RA en los tejidos clásicamente descritos como dianas para los andrógenos (testículos, próstata, vesículas seminales, músculo esquelético, etc.), y 50 veces superior al descrito para la forma membranar del RA. Por último, destacar que la orquidectomía no modifica los niveles de LUES, mientras, como es bien sabido, tiene un

efecto de regulación a la alta del RA en los tejidos diana [197,243].

Excluimos la posibilidad de que se trate de la SHBG o de cualquier proteína sérica que pudiera estar contaminando la fracción microsomal basados en las siguientes evidencias: 1) la actividad de fijación de [3 H]ES en la fracción sérica es unas 100 veces inferior a la actividad microsomal hepática [242]; 2) la SHBG, por otro lado, transporta T , E_2 y otros esteroides los cuales no se unen al LUES, y 3) el tratamiento de los microsomas con KCl junto a los experimentos de partición de fases con TX114, indican que el LUES es una proteína anclada en la membrana y de naturaleza altamente hidrofóbica. Esto es totalmente incompatible con el papel de la SHBG.

V.1.3. El LUES presenta cooperativismo positivo

El análisis de Scatchard de los datos de la curva de saturación con [3 H]ES presenta una morfología rectilínea en el rango de concentraciones de 20 a 500 nM, e indica que se une a una única población de lugares microsomales ($B_{max} = 39$ pmol/mg proteína) con una afinidad relativamente alta ($K_d = 37$ nM). Sin embargo, a concentraciones inferiores a 20 nM los puntos tienden a alejarse de la recta y la representación de Scatchard adquiere una morfología convexa. Este tipo de morfología puede ser debida a de diversos artefactos experimentales, o bien puede sugerir la existencia de un fenómeno de cooperativismo positivo [220,221]. Descartados los posibles artefactos, tal como se demuestra en la sección de Resultados, nuestros datos experimentales apoyan la posibilidad de que realmente se trata de un cooperativismo positivo, fenómeno en el cual la afinidad del lugar de unión por el [3 H]ES aumenta conforme aumenta la ocupación por dicho ligando [220,221]. Además, el comportamiento bifásico de las cinéticas de asociación y disociación reflejan la existencia de dos estados diferentes de afinidad del complejo [3 H]ES-LUES, lo cual es perfectamente compatible con el modelo de cooperativismo. Por otro lado el análisis de Hill sugiere la existencia de, al menos, dos lugares de unión para el ligando dentro de la misma proteína.

Tomando en consideración todos estos datos podemos pensar que existen al menos dos lugares de unión para [3 H]ES en la molécula, que interactuarían entre sí, explicando así la existencia de cambios en la afinidad conforme aumenta la ocupación del LUES por el [3 H]ES. Aunque los experimentos de esta Tesis no aportan datos directos sobre la interacción entre las diferentes subunidades del LUES, sí demostramos la existencia de tres péptidos con capacidad para fijar específicamente [3 H]ES. Si estos péptidos son o no los responsables del cooperativismo positivo, es un aspecto que queda abierto a futuras investigaciones y que necesariamente pasa por la purificación de la proteína.

V.1.4. El LUES modula de forma alostérica al LUBAG

El ES inhibe *in vitro* la fijación específica de la [3 H]DEX al LUBAG a través de un alosterismo negativo [204]. Esta compleja interacción del ES con el LUBAG nos indica que el ES es captado por un lugar de unión diferente, capaz de modular a distancia la actividad del LUBAG. Esto no es un hecho aislado, ya que existen otras descripciones de modulación alostérica negativa, como la que realiza el ES sobre el GABA [17,18].

El marcaje con [3 H]ES nos ha permitido demostrar que el LUES y el LUBAG son entidades diferentes y que la hipótesis de un alosterismo negativo se puede apoyar en numerosas evidencias experimentales. Como hemos dicho la unión de [3 H]DEX al LUBAG es inhibida por ES, pero la del [3 H]ES al LUES no es inhibida por la DEX. Además, el perfil farmacológico del LUBAG es mucho más amplio, e incluye además del ES a muchos otros esteroides. Por último, la cinética de disociación del [3 H]ES desde el LUES sigue un comportamiento bifásico mientras que la de la [3 H]DEX del LUBAG es monofásica [140,195,202].

V.1.5. El LUES es una proteína que puede ser solubiliza en su forma nativa

Con los datos vistos hasta el momento estamos en disposición de descartar algunas hipótesis pero no podemos aventurarnos a dar ninguna teoría acerca del papel fisiológico que podría jugar esta proteína. Esto pasa necesariamente por acercarnos a algunas de sus propiedades bioquímicas. Una estrategia que se ha seguido en esta Tesis es la de solubilizar la proteína en su estado nativo, fuera del entorno fosfolipídico en el cual se encuentra inmersa en la membrana, estudiar sus propiedades hidrodinámicas, y aplicar con éxito su marcaje por fotoafinidad.

Aunque el LUES puede extraerse de la membrana usando varios detergentes, el CHAPS es el más apropiado. El análisis de Scatchard se ajusta a una recta en el rango de 20 a 500 nM, pero tiende hacia una curva convexa, a concentraciones inferiores. El análisis de Scatchard sugiere la existencia de una única población de LUES y presenta una afinidad ($K_d = 40$) similar a la descrita para el LUES no solubilizado. Sin embargo, la cantidad de lugares ocupados por el ligando es significativamente superior ($B_{max} = 75$ pmol/mg proteína), lo cual, resulta lógico, dado que con la solubilización conseguimos extraer prácticamente la totalidad de la fijación específica de [3 H]ES con una extracción de proteínas totales de sólo un 40%. Esto significa que la solubilización con CHAPS nos permite obtener un enriquecimiento de la proteína en solución de cerca de 3 veces (a 10 mM es capaz de extraer más del 90% de

la actividad mientras que la extracción de proteínas totales es sólo del 40%). Este fenómeno ha sido descrito en la solubilización de otras proteínas de membrana [225].

La morfología convexa de la representación de Scatchard de la proteína solubilizada es consistente con la hipótesis de un cooperativismo positivo. De igual forma apoyan esta hipótesis el hecho de que las cinéticas de asociación y disociación del [^3H]ES a las proteínas solubilizadas se ajusten a una función bi-exponencial, indicando así la existencia de dos estados de afinidad diferentes. Por otro lado, los resultados de los experimentos de competición mostraron que la proteína solubilizada exhibe una selectividad farmacológica exactamente igual a la descrita para la proteína anclada en la membrana. Todos estos datos indican que la unión del [^3H]ES al LUES solubilizado muestra el mismo comportamiento que se observa cuando la proteína está anclada en la membrana.

V.1.6. El LUES es una proteína oligomérica de 104-120 kDa

La cromatografía de exclusión molecular indica que el LUES solubilizado con CHAPS es una forma única con un radio de Stokes de 5.02 nm. Sin embargo, cuando es solubilizado con TX100 aparecen dos formas de tamaños diferentes capaces de unir [^3H]ES, una 4.71 nm y otra de 2.1 nm. Al tratarse el TX100 de un detergente más agresivo que el CHAPS, no descartamos la posibilidad de que la forma más pequeña represente una disgregación de una parte de la de mayor tamaño.

El marcaje de la muestra con [^3H]ES previo a la cromatografía no modifica de forma significativa el perfil de elución, lo cual indica que la ocupación del LUES por su ligando no varía su tamaño aparente. La ultracentrifugación en gradiente de sacarosa del LUES solubilizado con CHAPS indica la existencia de una única población de lugares de unión para [^3H]ES, con un coeficiente de sedimentación medio de 5.4 S. Ahora bien, cuando esta proteína se extrae con TX100 observamos un fenómeno similar al descrito antes para la cromatografía de exclusión molecular obteniéndose dos coeficientes de sedimentación diferentes: uno muy parecido al descrito para el CHAPS (5.3 S) y otro menor (1.8 S). El fenómeno puede tener nuevamente su explicación en una disociación de parte del complejo motivada por la mayor capacidad del TX100 para disociar péptidos.

No observamos ninguna diferencia entre los valores de los coeficientes de sedimentación medidos en H_2O o en D_2O de lo cual asumimos que el volumen específico parcial del LUES es idéntico al de las proteínas globulares utilizadas como marcadores [214].

Hay que destacar que en ninguno de los dos tipos de experimentos citados (cromatografía de exclusión molecular y ultracentrifugación en gradiente) se evidenció forma alguna de elevado peso molecular presente en el volumen vacío de la cromatografía o como sedimento en el fondo del tubo de ultracentrifugación. Esto indica que la proteína solubilizada no sufre ningún tipo de agregación durante su manipulación experimental. Este fenómeno se pudo evitar incluyendo en el tampón la misma concentración de detergente empleada para extraerlas de la membrana. En el caso de ambos detergentes esta concentración está por debajo de su CMC, aspecto muy útil desde el punto de vista operativo, ya que se sabe que la formación de micelas puede interferir en ciertos aspectos de la purificación de proteínas [214].

El peso molecular estimado a partir del conjunto de datos obtenidos de la cromatografía de exclusión molecular y de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa indican que la proteína solubilizada con CHAPS es de 118 kDa mientras que con TX100 se estiman dos componentes de 106 kDa y 16 kDa respectivamente. La suma de los pesos moleculares obtenidos con TX100 (122 kDa) resulta ser un valor muy próximo al descrito para la proteína solubilizada con CHAPS. Este dato apoya la hipótesis de que el LUES es una proteína de naturaleza oligomérica. El coeficiente de fricción (f/f_0), que nos informa tanto del grado de solvatación de la proteína como de su tamaño, es muy superior a la unidad lo que indica que estamos ante una proteína grande y/o de morfología muy irregular. Este aspecto es compartido por la mayor parte de las proteínas integradas en la membrana.

El marcaje covalente con [^3H]ES del LUES solubilizado seguido de SDS-PAGE nos muestra la existencia de tres péptidos de 55, 31 y 22 kDa respectivamente. La suma de los pesos de los tres dan un valor de 112 kDa, en consonancia con el dato previamente estimado a partir de los estudios hidrodinámicos. No obstante, siempre existe la posibilidad de que los péptidos correspondan a fragmentos de degradación de la proteína original. Esto es poco probable, ya que en todo momento se usaron inhibidores de proteasas y se trabajó a 4°C. A pesar de todo, hicimos un experimento en el que el LUES solubilizado no se sometía a condiciones reductoras, de forma que se conservaran los puentes disulfuro. En estas condiciones obtuvimos una sola proteína de 104 kDa, en lugar de los tres péptidos que se obtenían en condiciones reductoras. El resultado de este experimento apoya completamente la teoría de que el LUES es un oligómero formado al menos por 3 péptidos unidos por puentes disulfuro con capacidad de fijación específica de [^3H]ES.

V.2. REGULACIÓN ENDOCRINA DEL LUES

La compleja regulación endocrina a la que está sometido el LUBAG y la interrelación que parece existir entre el LUES y dicho lugar, nos llevó a hacer un seguimiento de la concentración de LUES en diferentes modelos endocrinos y, de forma paralela, con el objeto de comparar los resultados, se hizo el mismo estudio con el LUBAG.

El estudio de la regulación hormonal del LUES no ha sido exhaustivo, porque la tarea, como pronto se verá, se reveló inabarcable en esta Tesis. No obstante, de los datos obtenidos en la regulación hormonal del LUES, distinguiremos tres aspectos diferentes: 1) su regulación hormonal es distinta de los LUBAG; 2) los glucocorticoides se han revelado importantes en la regulación del LUES; y, 3) los péptidos que unen [³H]ES tienen una regulación diferente. Veamos por separado cada una de estas tres facetas.

V.2.1. La ontogenia y el hipotiroidismo demuestran que LUES y LAGS están sujetos a diferentes tipos de regulación fisiológica.

La primera evidencia de regulación separada fue obtenida al constatar que el LUES, a diferencia de lo que ocurre con el LUBAG, es posible medirlo desde el momento del nacimiento, si bien en una concentración 9-10 veces menor en relación con los niveles alcanzados en la vida adulta a partir de los 2-3 meses de edad. El LUBAG, por contra, es detectable sólo después de la 4ª semana de vida. Ambos lugares de unión sufren posteriormente un incremento paralelo hasta alcanzar un máximo en la vida adulta, cayendo posteriormente hasta estabilizarse a partir de los 6 meses. Además, en el animal adulto la concentración del lugar de unión para [³H]ES es considerablemente superior a la descrita para el LUBAG [143,195,202]. A pesar de que el desarrollo de ambos lugares sigue una ontogenia similar, las diferencias son lo suficientemente destacadas como para pensar que están sometidos a una regulación diferente.

La siguiente gran diferencia se obtuvo con los modelos de animales hipotiroideos. La privación de hormonas tiroideas provocó una reducción de los niveles de LUBAG hasta niveles de rata inmadura, mientras que los niveles de LUES quedaron intactos.

Dada la dependencia que tiene la síntesis de GH de las hormonas tiroideas, los modelos de hipotiroidismo experimental no aclaran si la reducción de los niveles de LUBAG se deben a la falta de GH o de hormonas tiroideas. Esto es así porque se requieren varios días de tratamiento con T₃ para que los niveles de LUBAG comiencen de nuevo a aumentar, en

un proceso de interrelación con la GH extremadamente complejo (141). Dado que los niveles de LUES en las ratas hipotiroideas crónicas fueron normales, parece claro que ni las hormonas tiroideas ni la GH deben jugar papeles importantes en la regulación del LUES.

V.2.2. El LUES está regulado por los glucocorticoides adrenales.

El aumento espectacular de LUES y LUBAG durante la pubertad de la rata sugería una relación directa con el aumento de secreción de andrógenos. Sin embargo, la castración de las ratas macho tanto en la edad inmadura como en la edad adulta, no provocaron alteración alguna de los niveles de LUES o de LUBAG. Por tanto, es posible descartar que los andrógenos puedan ser reguladores de la concentración de estas proteínas.

Dado que la hipofisectomía produjo una drástica reducción de los niveles de LUES, y que ni la GH, ni las hormonas tiroideas, ni los andrógenos parecían ser importantes en su regulación, se planteó la necesidad de estudiar el efecto de las hormonas suprarrenales. Así, la adrenalectomía provocó una reducción significativa del nivel de LUES y también de LUBAG, y el tratamiento sustitutivo con corticosterona acetato restauró el nivel normal de ambos. Esto permite sugerir que, al menos en parte, y al igual que sucede para el LUBAG, esta proteína está bajo el control de los glucocorticoides adrenales. Permite también descartar que otras hormonas adrenales (mineralcorticoides y andrógenos), pudieran jugar un papel importante en la regulación del LUES.

No obstante, y dado que el efecto de la supresión de glucocorticoides mediante adrenalectomía sobre la abolición del LUES no es total (40%), cabe pensar que si bien los glucocorticoides son importantes para mantener los niveles normales de LUES, deben existir otras hormonas que junto con ellos participen en la regulación endocrina del LUES.

Por lo tanto, del conjunto de los experimentos destinados a descifrar la regulación hormonal del LUES sólo se desprende que los glucocorticoides son importantes en la regulación fisiológica de su concentración. Sin embargo, el estudio de regulación hormonal de LUES requiere explorar mejor el efecto de los glucocorticoides, así como de explorar nuevas vías, como las hormonas pancreáticas y la prolactina, y de utilizar nuevas aproximaciones experimentales, como se verá en la siguiente sección.

V.2.3. Los péptidos que ligan ES están sujetos a una regulación selectiva tanto fisiológica como farmacológica

La naturaleza oligomérica del LUES planteó como cuestión primordial, la posibilidad de que los tres péptidos que la componen estuvieran regulados de diferente manera. Esta posibilidad no sería excepcional, pues se ha demostrado la regulación diferencial de diferentes subunidades de una proteína oligomérica como el receptor GABA_A.

La primera evidencia de regulación separada de los péptidos del LUES surgió al comparar los patrones electroforéticos de ratas inmaduras con ratas adultas, que son totalmente diferentes. Las ratas inmaduras tienen una clara predominancia del péptido de 22 kDa, con una exigua representación del de 31 kDa y aún menor del de 55 kDa. En las ratas adultas por el contrario predomina el péptido de 31 kDa, con exigua representación del de 22 kDa, y una presencia siempre pequeña del péptido de 55 kDa.

La hipofisectomía practicada en ratas adultas dió lugar a que la reducción constatada en la concentración de LUES se tradujera además en un cambio de patrón electroforético. Éste se caracterizó por un cambio del predominio del péptido de 31 kDa en la rata intacta por el de 22 kDa en la hipofisectomizada. Es decir, la hipofisectomía supuso una regresión a un patrón muy parecido al de la rata inmadura.

La segunda evidencia de que los péptidos responden de diferente manera a los estímulos hormonales se obtuvo en el experimento de inducción de LUES por dosis farmacológicas de estrógenos. En trabajos previos habíamos demostrado que el EE₂ era capaz no sólo de interactuar *in vitro* con el LUBAG sino también de inducirlo *in vivo* [135]. De igual forma, a pesar de que el LUES es incapaz de unir a este estrógeno sintético, el EE₂ produce un patrón de inducción sobre esta proteína similar al observado para el LUBAG.

A pesar de que el mecanismo exacto por el cuál el estrógeno sintético EE₂ induce al LUBAG o al LUES es hasta la fecha desconocido, el hecho de que estas proteínas puedan ser inducidas en animales HYPOX indica que el estrógeno no necesita la participación de las hormonas implicadas en la regulación endocrina de estas proteínas. Por otra parte, es fácil pensar que el efecto del EE₂ pueda estar mediado por el RE. Llama también la atención de que, a diferencia del RE uterino, la expresión hepática del RE está sometida a una regulación multihormonal, con la participación de los estrógenos, la GH, los glucocorticoides, y las hormonas tiroideas. Esta regulación es muy parecida a la descrita para el LUBAG. Esta regulación multihormonal del RE explica el porqué el contenido de RE hepático es menor en machos que en hembras [20], o porqué el nivel de RE es muy bajo en animales IMT

[191,196,232], en animales HYPOX [191,232], o en animales TX [191]. Estos hallazgos han sido correlacionados con la incapacidad de los estrógenos para inducir la síntesis de proteínas de influencia estrogénica (p.e. angiotensinógeno) en estos modelos animales [19,196].

Todos estos datos, unidos al hecho de que los niveles de RE son muy bajos o indetectables en estos modelos experimentales, sugieren que la inducción del LUES por EE₂ podría no estar mediada por dicho receptor. Esta hipótesis necesita confirmación experimental.

Cualquiera que sea el mecanismo por el que el EE₂ actúe, es importante destacar el hecho de que el EE₂ provoca una inducción selectiva de los péptidos de 31 y 55 kDa, sin que se vea alterado el de 22 kDa. Es decir, el aumento de la actividad LUES inducido por EE₂ desde niveles propios del animal inmaduro hasta los que se miden en la vida adulta, se hace a expensas de aumentar dos de los tres péptidos del oligómero. Sin embargo, el patrón electroforético que aparece tanto en IMT como en HYPOX tras el tratamiento con EE₂ no se parece al de las ratas adultas normales, pues todavía sigue predominando el péptido de 22 kDa.

Conjuntamente, estos experimentos sugieren que si se examinaran los patrones electroforéticos de todos los modelos experimentales de regulación endocrina nos podríamos encontrar con importantes variaciones de abundancia relativa de los tres péptidos. Estos cambios de patrón electroforético podrían ser compatibles con cambios inapreciables en la abundancia de LUES medido por intercambio de [³H]ES. Además, las causas que conducen a la desaparición progresiva del péptido de 22 kDa en la edad adulta del animal y su recuperación tras la hipofisectomía son un misterio. Todas estos interrogantes merecen sin duda un estudio más detallado.

Tomado como base los datos de que disponemos hasta ahora, parece probable que los niveles de LUES que se miden en el animal IMT o en el HYPOX correspondan sólo a la actividad del péptido de 22 kDa, mientras que los otros péptidos que forman el oligómero están sujetos a una regulación por parte del sistema endocrino del animal.

V.3. POSIBLES PAPELES FISIOLÓGICOS DEL LUES

La existencia de lugares de unión para [³H]ES en los microsomas, con características diferentes de otras proteínas que captan hormonas esteroideas, nos planteó la necesidad de encontrar una posible función celular. Los datos de los que disponemos para ello no son suficientes como para apoyar categóricamente ninguna de las posibilidades, por lo que nos limitaremos a relacionar algunas hipótesis y evidencias experimentales que las apoyarían. Este ejercicio de especulación no es gratuito, pues en otros estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado la presencia del LUES en tejidos humanos. Así, en cáncer de mama humano se han detectado amplias variaciones en su contenido. Dada la dependencia hormonal de este tipo de tumores y en particular el papel regulador que los estrógenos puedan ejercer en su desarrollo, es posible que el LUES juegue algún tipo de papel relevante en las células tumorales.

Como hemos señalado, existen ciertos efectos a nivel hepático que ejercen algunos andrógenos de síntesis, como los 17 α AA ES y DA, que son significativamente diferentes de los del resto de los andrógenos y que, por consiguiente no son fácilmente explicables únicamente por su unión al RA. Ejemplos de estos efectos son el incremento de algunos factores de coagulación que se produce en respuesta a estos andrógenos sintéticos, y que no producen la T o sus ésteres. Además, hay que destacar que este grupo de andrógenos ejercen sobre el hígado un efecto directo, es decir, actúan sin biotransformaciones previas. Indudablemente, tienen afinidad por el RA y, por tanto, activarían la expresión de los genes andrógeno-dependientes. Sin embargo, el que sean capaces de llevar a cabo acciones que la T o sus ésteres no producen, sugiere que el mecanismo de acción de estos andrógenos sintéticos no está mediado solamente por el RA, sino que existen otras proteínas capaces de modular su acción. Estas moléculas podrían ser el LUES, el LUBAG, o ambas.

En este contexto parece evidente que la interacción de los 17 α AA con las proteínas microsomales hepáticas puede tener relevancia farmacológica y toxicológica. Es posible imaginar que el LUES pudiera ejercer alguna de las siguientes funciones:

- a.- Dada su alta capacidad de fijación hormonal, es imaginable que retengan, a modo de **tampón intracelular**, una importante cantidad de 17 α AA no transformados, estableciéndose una relación de equilibrio entre ellos. Es un hecho comprobado experimentalmente que los esteroides anabolizantes androgénicos en general, y los 17 α AA en particular, producen hepatocarcinogénesis [230,231] cuando son administrados bajo determinadas circunstancias (habitualmente asociados a dosis bajas de compuestos del tipo nitroso-metil-urea). La utilización del LUES por los

17 α AA podría constituir una barrera que module su actividad, interfiriendo de este modo en su mecanismo de acción. Esta posibilidad asigna al LUES tan sólo un papel pasivo. Dada la compleja regulación hormonal del mismo, así como los complejos mecanismos de interrelación entre lugares microsomales que hemos descrito, parece poco probable que su papel se limite a acumular pasivamente esteroides u otros xenobióticos.

- b.- Por lo que respecta a la posibilidad de que el LUES sea una **enzima biotransformadora de esteroides** cabrían numerosas opciones, ya que en el retículo endoplásmico existe una amplia batería de sistemas enzimáticos capaces de metabolizar esteroides [226,228]. La localización microsomal, la ontogenia, y la regulación endocrina del LUES, recuerdan a la exhibida por algunas isoformas del citocromo P450 como CYP2C11, CYP2C13 o CYP3A [226]. A pesar de estas coincidencias, y en contra de esta hipótesis, existen otras evidencias experimentales. La expresión del CYP2C11 es abolida por la orquidectomía, mientras que dicho tratamiento carece de efecto sobre los niveles de LUES y LUBAG [140,141,245]. Al igual que el LUBAG, la expresión de CYP3A es inhibida por la deficiencia de vitamina A. Sin embargo, en animales alimentados con una dieta deficiente en vitamina A, CYP3A es inducido por glucocorticoides mientras que el LUBAG no [245]. En general, la saturación del LUES y el LUBAG se realiza a una concentración 10 a 100 veces menor que la necesaria para saturar cualquiera de los P450 conocidos [226,227]. El LUES y el LUBAG retienen su actividad tras la solubilización con detergentes como el deoxicolato sódico, mientras que el citocromo P450 pierde completamente su actividad [227]. EL LUES y el LUBAG carecen de afinidad por los inductores clásicos de citocromo P450. De igual forma, los inhibidores clásicos del P450 tampoco son capaces de desplazar al [3 H]ES de su lugar de unión (Tabla 4). Los inductores de citocromo P450 ensayados *in vivo* hasta la fecha se han mostrado ineficaces para inducir tanto al LUES como al LUBAG (datos no incluidos en esta Tesis Doctoral). Además nosotros hemos determinado que el oligómero LUES tiene un peso molecular de 104-120 kDa, lo cual lo separa aún más de la posibilidad de que sea un citocromo P450, ya que el peso molecular descrito para los distintos isoenzimas de esta familia está alrededor de 48-60 kDa [252]. Es poco probable que estas proteínas pertenezcan a algún otro sistema de biotransformación. Así, ni el LUES ni el LUBAG muestran afinidad por los sulfatos de esteroides ensayados con lo que excluimos la posibilidad de que se trate de sulfatasas [229]. No obstante, el que hayamos descartado estos tipos de enzimas no agota las posibilidades de que se trate de algún otro tipo de enzima biotransformadora de esteroides o alguna proteína interactuante con ellas.

- c.- Otra posibilidad es que se trate de alguna proteína asociada a los complejos enzimáticos microsomales. Por ejemplo, la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) cuya existencia ha sido demostrada en las membranas de la mitocondria de células que sintetizan esteroides, como las de las glándulas suprarrenales, y ha sido propuesta como un mediador del transporte de colesterol [246,247,248]. Esta posibilidad es bastante atractiva, pero en la actualidad no se dispone de evidencias que sustenten la hipótesis de que el complejo LUES-LUBAG pudiera ser una proteína de este tipo.
- d.- Otra hipótesis muy atractiva, es que se trate de un verdadero receptor de membrana para ES o DA, o bien parte de un receptor de membrana con capacidad para modular la acción de otras hormonas o fármacos esteroides. Se convertiría, de esta forma, en la primera descripción de una de estas proteínas para andrógenos. Como hemos visto extensamente en el capítulo de Introducción existen numerosas evidencias de la existencia de receptores membranales para los distintos tipos de esteroides. Estos receptores de membrana mediarían los denominados efectos no genómicos (o efectos rápidos) de las hormonas esteroides. Para los andrógenos, como ya señalamos, existen varios efectos no genómicos descritos, pero no se ha conseguido aportar hasta la fecha ninguna evidencia de la existencia de receptores membranales. Es interesante destacar que algunos miembros de la familia de las proteínas fijadoras de GTP localizadas en la membrana del retículo endoplásmico poseen un peso molecular (20-30 kDa) [253] que es similar al del péptido fijador de [3H]ST de 22 kDa. Algunas de estas proteínas también están asociadas formando estructuras mayores (de alrededor de 100 kDa) [254]. Debido a que la fijación específica de [3H]ES es insensible a la incubación con GTP o sus análogos (datos no mostrados), es poco probable que exista una relación entre estas proteínas fijadoras de GTP y el péptido de 22 kDa, pero no puede ser completamente descartada y serán necesarias investigaciones adicionales para profundizar en esta hipótesis.
- e.- Aunque los datos disponibles no son suficientes para apoyar plenamente ninguna de las hipótesis señaladas, el fenómeno de alosterismo descrito en esta Tesis, nos permite sugerir un **Modelo Operativo** para explicar la funcionalidad del LUES a través de su interacción con el LUBAG. Numerosas publicaciones han demostrado la existencia de un único lugar de unión para [3H]DEX en microsomas. Sin embargo, nuestros datos indican que para el [3H]ES existen al menos tres subunidades que, probablemente, interactúen entre sí siguiendo un patrón de cooperativismo positivo (Hill = 3). En la Figura 68 presentamos un modelo hipotético que asigna un papel

modulador del ES sobre los esteroides que se unen al LUBAG. En ausencia de ES, la [^3H]DEX, y otros esteroides, se unen libremente al LUBAG. Ahora bien, cuando el LUES es ocupado por el ES se produce una modificación alostérica negativa del LUBAG. Este mecanismo provocaría una inhibición irreversible de la unión de [^3H]DEX (y otros esteroides) al LUBAG [145]. La demostración de esta hipótesis, abriría ante nosotros todo un apasionante abanico de posibilidades que podría esclarecer muchos de los puntos oscuros del mecanismo de acción de estos esteroides anabolizantes.

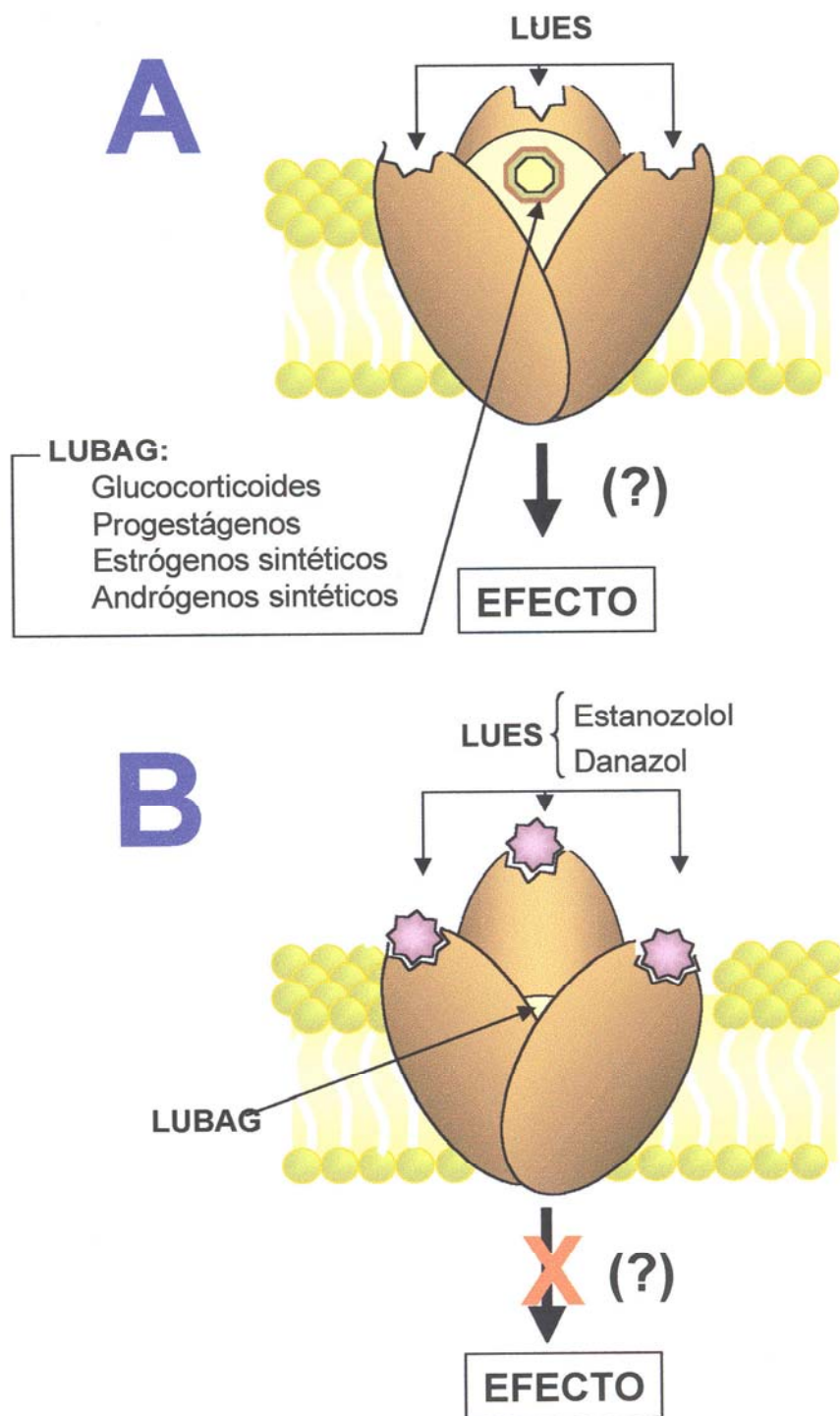


Figura 68. Modelo hipotético del LUES como modulador de la actividad de los esteroides que se unen al LUBAG

VI. CONCLUSIONES

1. Hemos identificado en microsomas de hígado de rata macho la presencia de un lugar de unión específico y saturable para el [3 H]ES. Éste presenta una afinidad de 37 nM y una capacidad de fijación máxima de 39 pmol/mg proteína. El perfil farmacológico de esta entidad demuestra una alta selectividad por el ES y su análogo estructural DA, de entre más de 100 compuestos ensayados.
2. El coeficiente de Hill mayor de 2, así como el estudio de las cinéticas de asociación y disociación sugieren que el ligando ES interacciona con esta entidad a través de un cooperativismo positivo.
3. El Lugar de Unión para ES no es una proteína periférica de membrana, ni citosólica, sino que está integrada en la membrana del retículo endoplásmico del hígado.
4. La integridad de los grupos sulfhidrilo es necesaria para que la proteína mantenga su capacidad de fijación del ligando. Esta es una característica que comparte con los receptores para hormonas esteroides.
5. La capacidad del Lugar de Unión para ES para fijar el ligando requiere la presencia de los fosfolípidos de membrana que son reconocidos por la PLC, pero no los reconocidos por PLA₂ y PLD.
6. El Lugar de Unión para ES es eficientemente solubilizado con CHAPS y TX100 de forma tal que conserva todas sus propiedades farmacológicas inalteradas.
7. El estudio de las propiedades hidrodinámicas del Lugar de Unión para ES indica que se trata de una proteína de gran tamaño, con un radio de Stokes de 5 nm, un coeficiente de sedimentación de 5.4 S y un coeficiente de fricción mayor de 2.9. Estos datos han permitido estimar que el Lugar de Unión para ES es una proteína de forma muy irregular y con un peso molecular de al menos 118-120 kDa.
8. El marcaje por fotoafinidad seguido de SDS-PAGE en condiciones reductoras ha permitido identificar al Lugar de Unión para ES como un oligómero formado, al menos, por tres péptidos de 22, 31 y 55 kDa con capacidad para fijar [3 H]ES. En condiciones no reductoras, identificamos una sola entidad de 104 kDa. Esto nos indica la importancia de la integridad de los puentes disulfuro en el mantenimiento de la estructura cuaternaria de esta proteína.

9. El animal inmaduro y el hipofisectomizado tienen un perfil electroforético similar, en el que sólo se detecta el péptido de 22 kDa. Sin embargo en el animal adulto predomina el de 31 kDa y el de 22 kDa es minoritario. Estos datos sugieren que los de 31 y 55 kDa están sometidos a una regulación dependiente de la edad del animal y de las hormonas hipofisarias.
10. La actividad del Lugar de Unión para ES se manifiesta desde el nacimiento del animal, aunque a un nivel 8-10 veces menor que el existente en el animal adulto. En el animal adulto hipofisectomizado los niveles del Lugar de Unión para ES disminuyen hasta los detectados en el animal inmaduro.
11. El hipotiroidismo agudo o crónico no reduce los niveles del Lugar de Unión para ES en el animal adulto. Estos datos sugieren que ni las hormonas tiroideas ni la GH juegan un papel relevante en la regulación del LUES.
12. La adrenalectomía provoca una disminución significativa del nivel de Lugar de Unión para ES, mientras que el tratamiento sustitutorio con glucocorticoides restaura el nivel normal. Esto sugiere que, al menos en parte, esta proteína está bajo el control de los glucocorticoides adrenales.
13. El estrógeno sintético EE₂ induce la actividad de los péptidos de 31 y 55 kDa del Lugar de Unión para ES, tanto en el animal inmaduro como en el hipofisectomizado. Teniendo en cuenta que estos dos modelos presentan niveles bajos o indetectables del receptor hepático de estrógenos, nuestros datos sugieren que la inducción de estos péptidos se produce por un mecanismo independiente de dicho receptor.
14. Los datos farmacológicos, bioquímicos y de regulación indican que el Lugar de Unión para ES es una proteína diferente del Lugar de Unión de Baja Afinidad para Glucocorticoides o de cualquier otra proteína fijadora de esteroides conocida. Aunque diferente, el Lugar de Unión para ES se presenta como una entidad que regula alostéricamente la actividad del Lugar de Unión de Baja Afinidad para Glucocorticoides.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Catlin DH.** Anabolic steroids. En: Endocrinology. Edit. DeGroot LJ. Saunders and Co., pp 2362-2376, 1991.
2. **Kochakian CD.** History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. En: Anabolic-androgenic steroids toward the year 2000. Edit. Kopera H. Blackwell-MZV, pp 3-27, 1993.
3. **Kopera H.** Side effects and contraindications of anabolic steroids. En: Anabolic-androgenic steroids towards the year 2000. Edit. Kopera H. Blackwell-MZV, Viena, pp. 262-265, 1993.
4. **Dominguez LD, Zumbado M.** Efectos tóxicos de los esteroides anabolizantes. Rev Toxicol 15: 448-55, 1998.
5. **Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG.** Biological actions of androgens. Endocr Rev 8:1-28, 1987.
6. **Schänzer W.** Metabolism of anabolic androgenic steroids. Clin Chem 42:1001-1020, 1996.
7. **Dequeker J, Geusens P.** Anabolic steroids and osteoporosis. Acta Endocrinol 110: 45-52, 1985.
8. **Ammus SS.** The role of androgens in the treatment of hematologic disorders. Adv Int Med 34: 191-208, 1989.
9. **Snyder PJ.** Clinical use of androgens. Ann Rev Med 35: 207-217, 1984.
10. **Cicardi M, Bergamaschini L, Cugna M.** Long-term treatment of hereditary angioedema with attenuated androgens: a survey of a 13-year experience. J Allergy Clin Immunol 87: 768-773, 1991.
11. **Saidi P, Lega BZ, Kim HC, Raska K.** Effect of danazol on clotting factor levels, bleeding incidence, factor infusion requirements and immune parameters in hemophilia. Blood 68: 673-679, 1986.
12. **Bassi F, Neri AS, Gheri RG.** Oxandrolone in constitutional delay of growth: analysis of the growth patterns up to final stature. J Endocrinol Invest 16: 133-137, 1993.
13. **Wilson JD, Griffin JE.** The use and misuse of androgens. Metabolism 29: 1278-1295, 1980.
14. **Rogol AD, Yesalis CE.** Anabolic-androgenic steroids and athletes: what are the issues?. J Clin Endocrinol Metab 74: 465-469, 1992.
15. **Haupt HA, Rovere GD.** Anabolic steroids: a review of the literature. Am J Sports Med 12: 469-484, 1984.
16. **Hosegood JL, Franks AJ.** Response of human skeletal muscle to the anabolic steroid stanozolol. BMJ 297: 1028-1029, 1988.
17. **Masonis AET, McCarthy MP.** Direct effects of the anabolic/androgenic steroids, stanozolol and 17 α -methyltestosterone, on benzodiazepine binding to the γ -aminobutyric acid_A receptor. Neuroscience Letters 189:35-38, 1995.
18. **Masonis AET, McCarthy MP.** Effects of androgenic/anabolic steroid stanozolol on GABA_A receptor function: GABA-stimulated ³⁶Cl⁻ influx and [³⁵S]TBSP binding. J Pharmacol Exp Ther 279: 186-193, 1996.
19. **Lukas SE.** Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. Trends Pharmacol Sci 14: 61-68, 1993.
20. **Wilson JD, Aiman J, McDonald PC.** The pathogenesis of gynecomastia. Adv Intern Med 25: 1-25, 1980.
21. **Clerico A, Federghini M, Palombo C, Leoncini R, del Chicca MG, Sardano G, Mariani G.** Effect of anabolic treatment on the serum levels of gonadotropins, testosterone, prolactin, thyroid hormones and

- myoglobin of male athletes under physical training. *J Nucl Med Allied Sci* 25: 79-88, 1981.
22. **Thompson PD, Cullinane EM, Sady SP, Chenevert C, Saritelli AL, Sady MA, Herbert PN.** Contrasting effects of testosterone and stanozolol on serum lipoprotein levels. *JAMA* 261: 1165-1168, 1989.
 23. **Rockhold RW.** Cardiovascular toxicity of anabolic steroids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 497-520, 1993.
 24. **Pope HG, Katz DL.** Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psych* 145: 487-490, 1988.
 25. **Gasior M, Carter RB, Witkin JM.** Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trend Pharmacol Sci* 20: 107-112, 1999.
 26. **Brower KJ.** Addictive potential of anabolic steroids. *Psychiatr Annu* 22: 30-34, 1992.
 27. **Laseter JT, Russell JA.** Anabolic steroid-induced tendon pathology: a review of the literature. *Med Sci Sports Exerc* 23:1-3, 1991.
 28. **Abu-Shakra S, Alhalabi MS, Nachtman FC, Schemidt RA, Brusilow WS.** Anabolic steroids induce injury and apoptosis of differentiated skeletal muscle. *J Neurosci Res* 47:186-197, 1997.
 29. **Plaa GL, Priestly BG.** Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. *Pharmacol Rev* 28:207-273, 1976.
 30. **Goldberg L.** Adverse effects of anabolic steroids. *JAMA* 276:257, 1996.
 31. **O'Shea JP.** A biochemical evaluation of the effects of stanozolol on adrenal, liver and muscle function in humans. *Nutr Rep Int* 10:381-388, 1976.
 32. **Bagchi MK, Tsai MJ, O'Malley BW, Tsai SY.** Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor-dependent gene activation in cell-free systems. *Endocr Rev* 13: 525-535, 1992.
 33. **Orti E, Bodwell JE, Munck A.** Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev* 13: 105-128, 1992.
 34. **Schuchard M, Landers JP, Shandu NP, Spelsberg TC.** Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endroc Rev* 14: 659-669, 1993.
 35. **Truss M, Beato M.** Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14: 459-479, 1993.
 36. **Ciocca DR, Rooig LM.** Estrogen receptors in human non-target tissues: biological and clinical implications. *Endocr Rev* 16: 35-62, 1995.
 37. **King WJ, Greene GL.** Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307: 745-747. 1984.
 38. **Welshom WV, Lieberman ME, Gorski J.** Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptor. *Nature* 307: 747-749, 1984.
 39. **Press MF, Xu SH, Wang JD, Greene GL.** Subcellular distribution of oestrogen receptor and progesterone receptor with and without specific ligand. *Am J Pathol* 135: 857-864, 1989.
 40. **Husmann DA, Wilson CM, McPhaul MJ, Tilley WD, Wilson JD.** Antipeptide antibodies to two distinct regions of the regions of the androgen receptor localize the receptor protein to the nuclei of target cells in the rat and human prostate. *Endocrinology* 126: 2359-2368, 1990.
 41. **Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM.** Inmunochimical

- localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology* 127: 3120-3126, 1990.
42. **Walters MR, Hunziker W, Norman AW.** Unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors. *J Biol Chem* 255: 6799-6805, 1980.
 43. **Gasc JM, Baulieu EE.** Steroid hormones receptors: intracellular distribution. *Biol. Cell* 56: 1-6, 1986.
 44. **Gasc JM, Renoir JM, Radany C, Joab J, Tuohimaa P, Baulieu EE.** Progesterone receptor in the chick oviduct: an histochemical study with antibodies to distinct receptor components. *J Cell Biol* 99: 1193-1201, 1984.
 45. **Perrot-applanat M, Logeat F, Groyer-Picard MT, Milgrom E.** Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. *Endocrinology* 116:1473-1484, 1985.
 46. **Brink M, Humbel BM, de Kloet R, van Driel R.** The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology* 130: 3575-3581, 1992.
 47. **Papamichail M, Tsokos G, Tsawdaroglovu N, Sekeris CE.** Immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptors in different cell types and their translocation from the cytoplasm to the cell nucleus in the presence of dexamethasone. *Exp Cell Res* 125: 490, 1980.
 48. **Evans RM.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895, 1988.
 49. **O'Malley BW.** The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol* 4: 363-369, 1990.
 50. **Green S, Chambon P.** A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. *Nature* 324: 615-617, 1986.
 51. **Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P.** Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J* 7: 3385-3392, 1988.
 52. **Tora L, White J, Brou C.** The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59: 447-487, 1989.
 53. **Díaz-Chico BN, Navarro D.** Estructura y función de los receptores de hormonas esteroideas. En: *Receptores esteroideos y mecanismo de acción hormonal*. Ed. Palacios S, MIRPAL, pp.15-52, 1996.
 54. **Daenilian PS, White R, Lees JA, Parker MG.** Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 11: 1025-1033, 1992.
 55. **Fawell SE, Lees JA, White R, Parker MG.** Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60: 953-962, 1990.
 56. **Forman BM, Samuels HH.** Dimerization among nuclear hormone receptors. *New Biol* 2: 587-594, 1990.
 57. **Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P.** Mechanisms of nuclear localization of progesterone receptor. Evidence for interaction between monomers. *Cell* 57: 1147-1154, 1989.
 58. **Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P.** Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *Embo J* 11: 3681-3694, 1992.
 59. **Webster NJG, Green S, Jin JR, Chambon P.** The hormone binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54: 199-207, 1988.

60. **Lees JA, Fawell SE, Parker MG.** Identification of two transactivation domain in the mouse oestrogen receptor. *Nucleic Acid Res* 17: 5477-5488, 1988.
61. **Godowski PJ, Rusconi S, Miesfeld R, Yamamoto KR.** Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature* 325: 365-368, 1987.
62. **O'Malley BW, Conneely OM.** Orphan receptors: in search of an unifying hypothesis for activation. *Mol Endocrinol* 6: 1359-1361, 1992.
63. **Sladek FM, Zhong W, Lai E, Darnell JE, Jr.** Liver enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev* 4: 2353-2365, 1990.
64. **Costa RH, Grayson DR, Darnell JE, Jr.** Similarities in transthyretin gene expression and differences in transcription factors: liver yolk sac compared to choroid plexus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6589-6593, 1990.
65. **Wynholds J, Muller E.** Oestrogen facilitates the binding of ubiquitous and liver-enriched nuclear proteins to the apo VLDL II promoter in vivo. *Nucleic Acids Res* 19: 33-41, 1991.
66. **Denis M, Wikstrom AC, Gustafsson JA.** The molybdate non-activated glucocorticoid receptor contains a dimer of Mr 90.000 non-hormone-binding protein. *J Biol Chem* 262: 11803-11806, 1987.
67. **Sánchez ER, Toft D, Schlesinger MJ, Pratt WB.** Evidence that the 90 Kda phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid is a murine heat shock protein. *J Biol Chem* 260: 12398-12401, 1985.
68. **Kost SL, Smith DF, Sullivan WP, Welch WJ, Toft D.** Binding of heat-shock proteins to the avian progesterone receptor. *Mol Cell Biol* 9: 3829-3832, 1989.
69. **Sánchez ER, Faber LE, Henzel WJ, Pratt WB.** The 56-59 Kda protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exist in cytosol in a complex with both de 70- and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry* 29: 5145-5152, 1990.
70. **Sánchez ER.** Hsp 59: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *J Biol Chem* 265: 22067-22070, 1990.
71. **Mester J, Baulieu EE.** Nuclear receptor subfamily. En: *Endocrinology*. Edit: DeGroot L. Saunders Philadelphia, pp. 93-126, 1995.
72. **Segnitz B, Guhering U.** Native structure of the estrogen receptor of the MCF-7 cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2179-2184, 1995.
73. **Bagchi M, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW.** Progesterone enhances target gene transcription by the receptor free of heat-shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70. *Mol Cell Biol* 11: 4998-5004, 1991.
74. **Denner LA, Weigel NL, Maxwell BL, Schrader WT, O'Malley BW.** Regulation of progesterone-receptor mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250: 1740-1742, 1990.
75. **Bagchi M, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW.** Identification of a functional intermediate in receptor activation in progesterone-dependent cell-free transcription. *Nature* 345: 547-550, 1990.
76. **Bagchi, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW.** Ligand and DNA dependent phosphorylation of human progesterone receptor in vitro. *Proc Natl Acad Sci Usa* 89: 2664-2668, 1992.
77. **McDonnell DP, Nawaz Z, O'Malley BW.** In situ distinction between steroid receptor binding and transactivation at

- a target gene. *Mol Cell Biol* 11: 4350-4355, 1991.
78. **Allan GF, Leng X, Tsai SY.** Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J Biol Chem* 267: 19513-19520, 1992.
 79. **Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonnell DP, O'Malley BW.** The mechanism of RU486 antagonism is dependent of the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell* 69: 703-713, 1992.
 80. **Martínez E, Givel F, Wahli W.** The estrogen responsive element as an inductive enhancer: DNA requirements and conversion to a glucocorticoid-responsive element. *EMBO J* 6: 3719-3727, 1987.
 81. **Klock G, Strahle U, Schutz G.** Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* 329: 734-736, 1987.
 82. **Beekman JM, Lawrence Ch, Ming-Jer T.** Hormonal control of gene expression. En: *The liver: biology and pathobiology*. Edit: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA. Raven Press Ltd, pp. 99-112, 1994.
 83. **Green S, Kumar V, Teulaz I, Wahli W, Chambon P.** The N-terminal DNA-binding "zinc-finger" of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J* 7: 3037-3043, 1988.
 84. **Revelli A, Massobrio M, Tesarik J.** Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocrine Reviews* 19(1): 3-17, 1998.
 85. **Duval D, Durant S, Homo-Delarche F.** Non-genomic effects of steroids: interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 737: 409-442, 1983.
 86. **Wehling M.** Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59: 365-93, 1997.
 87. **McEwen BS.** Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* 12: 141-147, 1991.
 88. **Teschemacher A, Zeise ML, Holsboer F, Zieglgänsberger W.** The neuroactive steroid 5-alpha-tetrahydrodeoxycorticosterone increases GABAergic postsynaptic inhibition in rat neocortical neurons in vitro. *J Neuroendocrinol* 7: 233-240, 1995.
 89. **Frye CA, Duncan JE.** Progesterone metabolites, effective at the GABAA receptor complex, attenuate pain sensitivity in rats. *Brain Res* 643: 194-203, 1994.
 90. **Moura AM, Worcel M.** Direct action of aldosterone on transmembrane Na⁺ efflux from arterial smooth muscle. *Hypertension* 6: 425-430, 1984.
 91. **Petzel D, Ganz MB, Nestler EJ, Lewis JJ, Goldenring J.** Correlates of aldosterone-induced increases in Ca_i²⁺ and I_{sc} suggest that Ca_i²⁺ is the second messenger for stimulation of apical membrane conductance. *J Clin Invest* 89: 150-156, 1992.
 92. **Wehling M, Käsmayr J, Theisen K.** Aldosterone influences free intracellular calcium in human mononuclear leukocytes in vitro. *Cell Calcium* 11: 565-571, 1990.
 93. **Oberleithner H, Weigt M, Westphale HJ, Wang W.** Aldosterone activates Na⁺/H⁺ exchange and raises cytoplasmic pH in target cells of the amphibian kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1464-1468, 1987.
 94. **Wehling M, Neylon CB, Fullerton M, Bobik A, Funder JW.** Non-genomic effects of aldosterone on intracellular calcium on vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 76: 973-979, 1995.

95. **Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C, Christ M.** Rapid effects of aldosterone on intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium release by single cell imaging. *Biochem. Biophys Res Commun* 204: 475-481, 1994.
96. **Thornton SN, Nicolaidis S.** Long-term mineralocorticoid-induced changes in rat neuron properties plus interaction of aldosterone and ANGII. *Am J Physiol* 266: 564-571, 1994.
97. **Borski RJ, Hellms LMH, Richman NH III, Grau EG.** Cortisol rapidly reduces prolactin release and cAMP and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in the cichlid fish pituitary in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2758-2762, 1991.
98. **Moore FL, Orchnik M.** Membrane receptors for corticosterone: a mechanism for rapid behavioural responses in an amphibian. *Horm Behav* 28:512-519, 1994.
99. **Orchinik M, Murray TF, Moore FL.** A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252: 1848-1851, 1991.
100. **Salas E, López MG, Villaroya M, Sánchez-arcía P, De Pascual R.** Endothelium-independent relaxation by 17- α -estradiol of pig coronary arteries. *Eur J Pharmacol* 258: 47-55, 1994.
101. **Moorley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL.** A new, non-genomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 131: 1305-1312, 1992.
102. **Shears SB.** Regulation of the metabolism of 1,2-diacylglycerols and inositol phosphates that respond to receptor activation. *Pharmacol Ther* 49: 79-104, 1991.
103. **Pietras RJ, Szago CM.** Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* 253: 357-359, 1975.
104. **Rambo CO, Szago CM.** Estrogen action at endometrial membranes: alterations in luminal surface detectable within seconds. *J Cell Biol* 97: 679-685.
105. **Tesarik J, Mendoza C.** Nongenomic effects of 17 β -Estradiol on maturing oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1438-1443, 1995.
106. **Beck KJ, Herschel S, Hungershofer R, Schwinger E.** The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X- and Y-bearing human spermatozoa. *Fertil Steril* 27: 407-412, 1975.
107. **Hicks JJ, Pedron N, Rosado A.** Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid. *Fertil Steril* 23: 886-893, 1972.
108. **Hyne RV, Murdoch RN, Boettcher B.** The metabolism and motility of human spermatozoa in the presence of steroid hormones and synthetic progestagens. *J reprod Fertil* 23: 886-893, 1978.
109. **Wasserman WJ, Pinto LH, O'Connor CM, Smith LD.** Progesterone induces a rapid decrease in $[\text{Ca}^{2+}]$ in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1534-1536, 1980.
110. **Turne KO, Meizel S.** Progesterone-mediated efflux of cytosolic chloride during the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 774-780, 1995.
111. **Blackmore JP, Lattanzio F.** Cell surface localization of a novel nongenomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 81: 331-336, 1991.

112. **Finidori-Lepicard J, Schorderet-Slatkine S, Hanoune J, Baulieu EE.** Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 292: 255-257, 1981.
113. **Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Carreras A.** Selective expression of progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil Steril* 58: 784-792, 1992.
114. **De Bold JF, Frye CA.** Genomic and nongenomic actions of progesterone in the control of female hamster sexual behaviour. *Horm Behav* 28: 445-453, 1994.
115. **Waldegger S, Beisse F, Apfel H, Breit S, Kolb HA.** Electrophysical effects of progesterone on hepatocytes. *Biochem Biophys Acta* 1266: 186-190, 1995.
116. **Lieberherr M, Groose B.** Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem* 269: 7217-7223, 1994.
117. **Gorcynska E, Handelsman DJ.** Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* 136: 2052-2059, 1995.
118. **Nemere I, Zhou LX, Norman AW.** Nontranscriptional effects of steroid hormones. *Receptor* 3: 277-291, 1993.
119. **Morelli S, Boland ARD, Boland RL.** Generation of inositol phosphates, diacylglycerol and calcium fluxes in myoblasts treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J* 289: 675-679, 1993.
120. **Barsoni J, Marx SJ.** Rapid accumulation of cyclic GMP near activated vitamin D receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1436-1440, 1991.
121. **Sergeev IN, Rhoten WB.** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ evokes oscillation of intracellular calcium in pancreatic beta cell line. *Endocrinology* 136: 2852-2861, 1995.
122. **Segal J, Ingbar SH.** An immediate increase in calcium accumulation by rat thymocytes induced by triiodothyronine: its role in the subsequent metabolic response. *Endocrinology* 115: 160-166, 1984.
123. **Hummerich H, Soboll S.** Rapid stimulation of calcium uptake into rat liver by L-tri-iodothyronine. *Biochem J* 258: 363-367, 1989.
124. **Lomax RB, Cobbold PH, Allshire AP, Cuthbertson KS, Robertson WR.** Tri-iodothyronine increases intracellular calcium levels in single rat myocytes. *J Mol Endocrinol* 7: 77-79, 1991.
125. **Watson GH, Muldoon TG.** Specific binding of estrogen and estrogen-receptor complex by microsomes from estrogen-responsive tissues of the rat. *Endocrinology* 117: 1341-1349, 1985.
126. **Sweet F, Murdock G.** Affinity labelling of hormone-specific proteins. *Endocrine Reviews* 8: 154-184, 1987.
127. **Pasqualini JR, Chetrite G, Nguyen BL, Maoloché C, Delalande M, Talbi M, Feinstein MC, Blacker C, Botella J, Paris J.** Estrone sulfate-sulfatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities: an hypothesis for their role in the evolution of human breast cancer from hormone-dependence to hormone-independence. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 407-413, 1995.
128. **Bouillon R, Okamura HO, Norman AW.** Structure-function relationship in the vitamin D endocrine system. *Endocrin Rev* 16: 200-218, 1995.
129. **Pietras RJ, Szego CM.** Especific binding sites for oestrogen at the

- outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265: 69-72. 1977.
130. **Pietras RJ, Szego CM.** Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J* 191: 743-760, 1980.
 131. **Berthois Y, Pourreau-Schneider N, Gandilhon P, Mittre H, Tuidana M.** Estradiol membrane binding sites of human breast cancer cell lines. Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding systems. *J Steroid Biochem* 25: 963-972.
 132. **Cheng CY, Boettcher B, Rose RJ, Kay DJ, Tinnerberg HR.** The binding of sex steroid to human spermatozoa: an autoradiographic study. *Int J Androl* 4: 1-17, 1981.
 133. **Bression D, Michard M, LeDafniet M, Pagesy P, Peillon F.** Evidence for a specific estradiol binding site on rat pituitary membranes. *Endocrinology* 119: 1048-1051, 1986.
 134. **Papas TC, Gametchu B, Watson CS.** Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labelling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 9(5): 401-410, 1995.
 135. **Fernández L, Boada LD, Luzardo OP, Zumbado M, Díaz-Chico JC, Díaz-Chico BN, Chirino R.** Ethinylestradiol interacts with liver microsomes and induces binding sites for steroid hormones in the male rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 270(3):1121-1126, 1994.
 136. **Yager JD, Campbell HA, Longnecker DS, Roebuck BD, Benoit MC.** Enhancement of hepatocarcinogenesis in female rats by ethinylestradiol and mestranol but not estradiol. *Cancer Res* 44: 3862-3869, 1984.
 137. **Vickers AEM, Lucier GW.** Estrogen receptor, epidermal growth factor receptor and cellular ploidy in elutriated subpopulations of hepatocytes during liver tumour promotion by 17 α -ethinylestradiol in rats. *Carcinogenesis* 12: 391-399, 1991.
 138. **White IN, Muller-Eberhard U.** Decreased liver cytochrome P-450 in rats caused by norethindrone or ethinyloestradiol. *Biochem J* 166: 57-64, 1977.
 139. **Sweeney GD, Cole FM.** Effects of ethinylestradiol on liver microsomal mixed function oxygenase activity in male rats. *Lab Invest* 42: 231-235, 1980.
 140. **Chirino R, Fernández L, López A, Navarro D, Rivero JF, Díaz-Chico JC, Díaz-Chico BN.** Thyroid hormones and glucocorticoids acts synergistically in the regulation of the low affinity glucocorticoid binding site in the male rat liver. *Endocrinology* 129: 3118-3124, 1991.
 141. **Chirino R, López A, Fernández L, Boada LD, Valerón PF, Díaz-Chico JC, Díaz-Chico BN.** The role of growth hormone in regulation of low-affinity glucocorticoid binding sites from male rat liver microsomes. *Endocrinology* 134: 1409-1415, 1994.
 142. **Whitlock JP.** The regulation of cytochrome P450 expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 26: 333-369, 1986.
 143. **Chirino R, López A, Navarro D, Cabrera JJ, Rivero JF, Díaz-Chico BN.** Steroid induction of low-affinity glucocorticoid binding sites in rat liver microsomes. *J Steroid Biochem* 34: 97-105, 1989.
 144. **Chirino R, Fernández L, López A, Navarro D, Rivero JF, Díaz-Chico JC, Díaz-Chico BN.** The estradiol induction of the microsomal low-affinity glucocorticoid binding sites (LAGS) in the male rat liver is independent of the endocrine status. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 757-

- 760, 1992.
145. **Jordan VC.** Biochemical pharmacology of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 36: 245-276, 1984.
 146. **Osborne CK, Bold DH, Clark GM, Trent JM.** Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in the early G₁ phase. *Cancer Res* 43: 3583-3585, 1983.
 147. **Rowlands MG, Parr IB, McCague R, Jarman M, Goddard PM.** Variation of the inhibition of calmodulin dependent cyclic AMP phosphodiesterase amongst analogues of tamoxifen: correlations with cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 40: 283-289, 1990.
 148. **O'Brian CA, Ward NE, Andersen BW.** Role of specific interactions between protein kinase C and triphenylethylenes in inhibition of the enzyme. *J Natl Cancer Inst* 80: 1628-1633, 1990.
 149. **Sutherland RL, Murphy LC, Foo MS, Green MD, Whybourne AM, Krozowski ZS.** High affinity antioestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. *Nature* 288: 273-275, 1980.
 150. **Watts CKW, Murphy LC, Sutherland RL.** Microsomal binding sites for nonsteroidal anti-estrogens in MCF7 human mammary carcinoma cells: demonstration of high affinity and narrow specificity for basic ether derivatives of triphenylethylene. *J Biol Chem* 259(7): 4223-4229, 1984.
 151. **Watts CKW, Sutherland RL.** High affinity antioestrogen binding sites are concentrated in rough microsomal membranes of rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 109-115, 1984.
 152. **Watts CKW, Sutherland RL.** Microsomal binding sites for antiestrogens in rat liver: properties and detergent solubilization. *Biochem J* 236: 903-911, 1986.
 153. **Clark JH, Winneker RC, Guthrie SC, Markaverich BM.** An endogenous ligand for the triphenylethylene antiestrogen binding site. *Endocrinology* 113: 1167-1169, 1983.
 154. **Van Den Koedijk CDMA, Vis van Heemst C, Elsendoorn GM, Thijssen JHH, Blakenstein MA.** Comparative affinity of steroidal and nonsteroidal antioestrogens, cholesterol derivatives and compounds with a dialkylamino side chain for the rat liver antioestrogen binding site. *Biochem Pharmacol* 43(12): 2511-2518, 1992.
 155. **Blondeau JP, Baulieu EE.** Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 219: 785-792, 1984.
 156. **Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Carreras A.** Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil Steril* 58: 784-792.
 157. **Bukusoglu C, Krieger NR.** Photoaffinity labelling with progesterone-11 α -hemisuccinate-(2-[¹²⁵I]iodohistamine) identifies four protein bands in mouse brain membranes. *J Neurochem* 63: 1434-1438.
 158. **Majewska MD, Demirgoren S, London ED.** Binding of pregnenolone sulfate to rat brain membranes suggests multiple sites of steroid action at the GABA_A receptor. *Eur J Pharmacol* 189: 307-315, 1990.
 159. **Yamada M, Miyaji H.** Binding of sex hormones by male rat liver microsomes. *J Steroid Biochem* 16: 437-446, 1982.
 160. **Yamada M, Indo K, Nishigami T,**

- Nakasho K, Miyaji H.** Progesterone-binding site of adult male rat liver microsomes. *J Biol Chem* 265 (19): 11035-11043, 1990.
161. **Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M.** Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem* 239: 276-731, 1996.
162. **Su TP, London ED, Jaffe JH.** Steroid binding at σ receptors suggest a link between endocrine, nervous, and immune systems. *Science* 240: 219-221, 1988.
163. **Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, DeCosta B, Rice KC.** Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol Rev* 42 (4): 355-402, 1990.
164. **Monnet FP, Mahe V, Robel P, Baulieu EE.** Neurosteroids, via σ receptors, modulate de [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (2): 3774-3778, 1995.
165. **Ross SB.** Heterogeneous binding of sigma radioligands in the rat brain and liver: possible relationship to subforms of cytochrome P-450. *Pharmacol Toxicol* 68: 293-301, 1991.
166. **Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus H-G, Striessnig J, Kempner E, Glossmann H.** Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8072-8077, 1996.
167. **Yamada M, Nishigami T, Nakasho K, Nishimoto Y, Miyaji H.** Relationship between sigma-like site and progesterone-binding site of adult male rat liver microsomes. *Hepatology* 20: 1271-1280, 1994.
168. **Nemere I, Dormanen MW, Hammond WH, Okamura WH, Norman AW.** Identification of a specific binding protein for $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D3 in basal lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* 269: 23750-23756, 1994.
169. **Baran DT.** Nongenomic actions of the steroid hormone $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3. *J Cell Biochem* 56: 303-306, 1994.
170. **Schmitz JP, Schwartz Z, Sylvia VL, Dean DD, Calderon F, Boyan BD.** Vitamin D3 regulation of stromelysin-1 (MMP-3) in chondrocyte cultures is mediated by protein kinase C. *J Cell Physiol* 168:570-579, 1996.
171. **De Boland AR, Boland RL.** Non-genomic signal transduction pathway of vitamin D in muscle. *Cell Signal* 6: 717-724, 1994.
172. **Massheimer V, Fernandez LM, Boland R, De Boland AR.** Regulation of Ca^{2+} uptake in skeletal muscle by $1,25$ -dihydroxyvitamin D3: role of phosphorylation and calmodulin. *Mol Cell Endocrinol* 84: 15-22, 1992.
173. **Selles J, Boland R.** Evidence of the participation of the $3',5'$ -cyclic AMP pathway in the non-genomic action of $1,25$ -dihydroxy-vitamin D3 in cardiac muscle. *Mol Cell Endocrinol* 82: 229-235, 1991.
174. **Siegrist-Kaiser CA, Juge-Aubry C, Tranter MP, Ekenbarger DM, Leonard JL.** Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes: a novel extranuclear action of thyroid hormones. *J Biol Chem* 265: 4766-4768, 1990.
175. **Davis PJ, Davis FB.** Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 6: 497-504. 1996.
176. **Incerpi S, Luly P, DeVito P, Farias R.** Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6

- myoblasts: high molecular specificity for 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 140: 683-689, 1999.
177. **Anderson R, Pastan I, Cheng S.** Characterization of the 3,3',5-triiodo-L-thyronine-binding site on plasma membranes from human placenta. *Endocrinology* 116: 2621-2630, 1985.
 178. **Pliam NB, Goldfine ID.** High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 79: 166-172, 1977.
 179. **Christ M, Sippel K, Eisen C, Wehling M.** Non-classical receptors for aldosterone in plasma membranes from pig kidneys. *Mol Cell Endocrinol* 99: R31-34, 1994.
 180. **Wehling M, Christ M, Theisen K.** Membrane receptors for aldosterone: a novel pathway for mineralocorticoid action. *Am J Physiol* 263: E974-979, 1992.
 181. **Wehling M, Eisen C, Aktas J, Christ M, Theisen K.** Photoaffinity labeling of plasma membrane receptors for aldosterone from human mononuclear leucocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1424-1428, 1992.
 182. **Meyer C, Christ M, Wehling M.** Characterization and solubilization of novel aldosterone binding proteins in porcine liver microsomes. *Eur J Biochem* 229:736-740, 1995.
 183. **Moore FL, Orchnik M.** Membrane receptors for corticosterone: a mechanism for rapid behavioural responses in an amphibian. *Horm Behav* 28: 512-519, 1994.
 184. **Moore FL, Orchnik M, Lowry C.** Functional studies of corticosterone receptors and neuronal membranes. *Receptor* 5:21-28, 1995.
 185. **Mayewski RJ, Litwack G.** [³H]Cortisol radioactivity in hepatic smooth endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 37:729-735, 1969.
 186. **Parchman LG, Cake MH, Litwack G.** Functionality of the liver glucocorticoid receptor during the life cycle and development of a low affinity membrane binding site. *Mech Ageing Dev* 7: 227-240, 1978.
 187. **Omran GR, Furukawa H, Sherwood JA, Loeb JN.** [3H]Dexamethasone binding by rat liver microsomes: effects of age, sex, and adrenal status. *Endocrinology* 112: 178-186, 1983.
 188. **Kaufmann SH, Shaper JH.** Binding of dexamethasone to rat liver nuclei in vivo and in vitro. Evidence for two distinct binding sites. *J Steroid Biochem* 20:669-708, 1984.
 189. **Quelle FW, Smith RV, Hrycyna CA, Kaliban TD, Crooks JA, O'Brien JN.** [3H]Dexamethasone binding to plasma-enriched fractions from liver of non-adrenalectomized rats. *Endocrinology* 123: 1642-1651, 1988.
 190. **Roszak AW, Lefebvre YA, Howell GM, Coddling PW.** Structural requirements for the binding of dexamethasone to nuclear envelopes and plasma membranes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:201-214, 1990.
 191. **LaCasse E, Howell GM, Lefebvre YA.** Microsomal dexamethasone binding sites identified by affinity labelling. *J Steroid Biochem* 35: 47-54, 1990.
 192. **Giannopoulos G.** Ontogeny of glucocorticoid receptors in rat liver. *J Biol Chem* 250: 5847-5851, 1975.
 193. **Howell GM, Po C, Lefebvre YA.** Identification of dexamethasone binding sites on male rat liver membranes by affinity labelling. *Biochem J* 260: 435-441, 1989.
 194. **Freyschuss B, Sahlin L, Eriksson HA.** Regulatory effects of growth hormone, glucocorticoids, and thyroid

- hormone on the estrogen receptor level in the rat liver. *Steroids* 56: 367-374, 1991.
195. **Roy AK, Vellanoeweth RL, Jung MH, Chatterjee B.** Cellular and molecular effects of androgenic-anabolic steroids. En: *Endocrine Toxicology*. Edit. Thomas JA, Colby HD, Taylor and Francis, pp. 213-225, 1997.
 196. **Eisenfeld AJ, Aten RF.** Estrogen receptors and androgen receptors in the mammalian liver. *J. Steroid Biochem* 27: 1109-1118, 1987.
 197. **Barbosa J, Seal US, Doe RP.** Effects of anabolic steroids on haptoglobin, orosomucoid, plasminogen, fibrinogen, transferrin, ceruloplasmin, α 1-antitrypsin, β -glucuronidase and total serum proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 49: 719-725, 1971.
 198. **Agostini A, Cicardi M, Martignoli GC, Bergamaschini L, Marasini B.** Danazol and stanozolol in long-term prophylactic treatment of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 65: 75-79, 1980.
 199. **Sheffer AL, Fearon DT, Austen KF.** Clinical and biochemical effects of stanozolol therapy for hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 68: 181-187, 1981.
 200. **Gralnick HR, Rick ME.** Danazol increases factor VIII and factor IX in classic hemophilia and Christmas disease. *N Engl J Med* 308: 1393-1395, 1983.
 201. **Wilson JD.** Androgen abuse by athletes. *Endocr Rev* 9: 181-199, 1988.
 202. **Fernández L, Chirino R, Boada LD, Navarro D, Cabrera N, Del Rio I, Díaz-Chico BN.** Stanozolol and danazol, unlike natural androgens, interact with the low affinity glucocorticoid binding sites from male rat liver microsomes. *Endocrinology* 134: 1401-1407, 1994.
 203. **Tomlinson G.** Inhibition of radioligand binding to receptors: a comprehensive business. *Trends Pharmacol Sci* 9: 159-162, 1988.
 204. **Fernández L, Boada LD, Luzardo OP, Zumbado M, López A, Díaz-Chico BN, Chirino R.** [3H]Dexamethasone binding activity in liver microsomes is modulated differently by 17 α -alkylated androgens and testosterone in vivo. *Pharmacol Toxicol* 77: 264-269, 1995.
 205. **Gram TE.** Separation of hepatic smooth and rough microsomes associated with drug-metabolizing enzymes. *Methods Enzymol*, 31: 225-237, 1975.
 206. **Loten EG, Redshaw-Loten JC.** Preparation of rat liver plasma membranes in a high yield. *Anal Biochem* 154: 183-185, 1986.
 207. **Blobel G, Potter VR.** Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science* 154: 1662-1665, 1966.
 208. **Graham JM.** The identification of subcellular fractions from mammalian liver. En: *Biomembrane Protocols: I. Isolation and Analysis*. Edits. Graham J, Higgins J. Humana Press, 1993.
 209. **Bordier C.** Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256: 1604-1607, 1981.
 210. **Smith DJ, Maggio ET, Kenyon GL.** Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry* 14: 766-771, 1975.
 211. **Myth DG, Nagamatsu A, Fruton JS.** Some reactions of N-ethylmaleimide. *J Am Chem Soc* 82: 4600-4604, 1960.

212. **Cleland WW.** Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3: 480-482, 1964.
213. **Ackers GK.** Molecular sieve studies of interacting proteins II: enumeration of components and determination of molecular size distributions. *J Biol Chem* 243: 2056-2064, 1968.
214. **Clarke S.** The size and detergent binding of membrane proteins. *J Biol Chem* 250: 5459-5469, 1975.
215. **Laemli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
216. **Strauss WL.** Sulfhydryl groups and disulfide bonds: modification of amino acid residues in studies of receptor structure and function. En: *Receptor Biochemistry and Methodology, Volume 1: membrane, detergents, and receptor solubilization.* Edits: Venter JC, Harrison LC, pp. 85-97. Alan R. Liss, Inc. 1984.
217. **Hjemeland LM, Chambach A.** Solubilization of membrane bound receptors. En: *Membranes, detergents, and receptor solubilization.* Edits: Venter JC, Harrison LC, pp 35-46, Alan R Liss, Inc., 1984.
218. **Andrés M, Marino A, Maraculla JM, Trueba M.** Characterization of specific corticosterone binding sites in adrenal cortex plasma membrane and their localization by autoradiographic studies. *CMLS Cell Mol Life Sci* 53: 673-680, 1997.
219. **Simons SS Jr, Chakraborti PK, Cavanaugh AH.** Arsenite and cadmium (II) as probes of glucocorticoid receptor. Structure and function. *J Biol Chem* 265: 1938-1945, 1990.
220. **Neet KE.** Cooperativity in enzyme function: Equilibrium and kinetic aspects. *Methods Enzymol* 64: 139-192, 1980.
221. **Notides AC, Lerner N, Hamilton DE.** Positive cooperativity of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4926-4930, 1981.
222. **Barbieri RL, Lee H, Ryan KJ.** Danazol binding to rat androgen, glucocorticoid, progesterone, and estrogen receptors: correlation with biologic activity. *Fertil Steril* 31: 182-186, 1979.
223. **Steinsapir J, Bryham M, Muldoon TM.** Relative binding properties of microsomal and cytosolic androgen receptor species of the ventral prostate. *Endocrinology* 125: 2297-2311, 1989.
224. **Silverstein AM, Richards JF.** Characteristics of prolactin binding by membrane preparations from rat liver. *Biochem J* 178: 743-747, 1979.
225. **McCann DJ, Su TS.** Solubilization and characterization of haloperidol-sensitive (+)-[3H]SKF-10,047 binding sites (sigma sites) from rat liver membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 257:547-557, 1991.
226. **Jefcote CR.** Cytochrome P450 enzymes in sterol biosynthesis and metabolism. En: *Cytochrome P450.* Edit Ortiz de Montellano P, Plenum press, pp. 387-428, 1986.
227. **Distlerath L, Guengerich FP.** Enzymology of human liver cytochrome P450. En: *Mammalian cytochromes P450.* Edit. Guengerich PF. CRC Press, Florida 133-199, 1987.
228. **Mannering GJ.** Microsomal enzyme system which catalyze drug metabolism. En: *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition.* Edit. LaDu BN, Williams and Wilkins 206-252, 1971.
229. **Iwamori M, Moser HW, Kishimoto Y.** Solubilization and partial purification of steroid sulfatase from

- rat liver: characterization of estrone sulfatase. *Ach Biochem Biophys* 174: 199-208, 1976.
230. **Wilson JD.** Androgen abuse by athletes. *Endocr Rev* 9: 181-199, 1988.
 231. **Wilson JD, Griffin JE.** The use and misuse of androgens. *Metabolism* 29: 1278-1295, 1980.
 232. **Nordtedt G, Wrange O, Gustafson JA.** Multihormonal regulation of the estrogen receptor in rat liver. *Endocrinology* 108: 1190-1196, 1981.
 233. **Baxter JD, Funder JW.** Hormone receptors. *N Engl J Med* 30: 1149-1161, 1979.
 234. **Rodbard D.** Mathematics of hormone-receptor interaction. I. Basic principles. *Adv Exp Mmed Biol* 36: 289-304, 1973.
 235. **Rodbard D.** Theory of hormone-receptor interaction. III. The endocrin target cell as a quantal response unit: a general control mechanism. *Adv Exp Med Biol* 36: 342-364, 1973.
 236. **Weiland GA, Molinoff PB.** Quantitative analysis of drug-receptor interactions: I. Determination of kinetic and equilibrium properties. *Life Sciences* 29: 313-330, 1981.
 237. **Molinoff PB, Wolfe BB, Weiland GA.** Quantitative analysis of drug receptor interactions: II. Determination of the properties of receptor subtypes. *Life Sciences* 29: 427-443, 1981.
 238. **Burt DR.** Criteria for receptor identification. En: *Neurotransmitter receptor binding* Eds: Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ, Raven Press, pp. 41-60, 1985.
 239. **Hollenberg MD.** Receptors: Their reactions and interactions. En: *Receptor pharmacology and function*. Edits: Williams M, Glenon RA, Timmerman P. Marcel Deckel Inc. New York, pp. 1, 1989.
 240. **Titeler M.** Receptor binding theory and methodology. En: *Receptor pharmacology and function*. En: Williams M, Glenon RA, Timmerman P. Marcel Deckel Inc. New York, pp. 1-16, 1985.
 241. **Scatchard G.** The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 669-672, 1949.
 242. **Boada LD, Fernández L, Zumbado M, Luzardo OP, Chirino R, Díaz-Chico.** Identification of a specific binding site for the anabolic steroid stanozolol in male rat liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 1123-1129, 1996.
 243. **Roy AK, Milin BS, McMinn AM.** Androgen receptor in rat liver: hormonal and developmental regulation of the cytoplasmic receptor and its correlation with the androgen dependent synthesis of $\alpha 2\mu$ -globulin. *Biochim Biophys Acta* 354: 213-232, 1974.
 244. **López-Guerra A, Chirino R, Navarro D, Fernández L, Boada LD, Zumbado M, Díaz-Chico BN.** Estrogen antagonism on T3 and growth hormone control of the liver microsomal low-affinity glucocorticoid binding site (LAGS). *J Steroid Biochem Mol Biol* 63 (4-6): 219-228, 1997.
 245. **Wright MC, Allenby G, Paine AJ.** Effect of vitamin A deficiency on the expression of Low Affinity Binding Site activity and glucocorticoid-dependent induction of CYP3A2 in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 211-216, 1997.
 246. **Stocco DM, Clark BJ.** Role of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) in Steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 51: 197-205, 1996.

247. **Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM.** Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 9: 1346-1355, 1995.
248. **Miller WL.** Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55: 607-616, 1995.
249. **Abu-Shakra S, Alhalabi MS, Nachtman FC, Schemidt RA, Brusilow WSA.** Anabolic steroids induce injury and apoptosis of differentiated skeletal muscle. *J Neurosci Res* 47: 187-197, 1997.
250. **Trueba M, Ibarrola I, Vallejo AI, Sancho MJ, Marino A, Maraculla JM.** Characterization of specific binding sites for corticosterone in mouse liver plasma membrane. *Memb Biochem* 8: 229-239, 1989.
251. **Ibarrola I, Andrén M, Marino A, Maracullá JM, Trueba M.** Purification of a cortisol binding protein from hepatic plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1284: 41-46, 1996.
252. **Waterman MR, Johnson EF.** Cytochrome P450. *Method Enzymol*, 206, 1991.
253. **Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, Kawata M.** Small GTP-binding proteins. *Int Rev Cytol* 133: 187-230, 1992.
254. **Shirataki H, Kaibuchi K, Yamaguchi T, Wada K, Horiuchi H, Takai Y.** A possible target protein for *smg-25A/rab3A* small GTP-binding protein. *J Biol Chem* 267:10946-10949, 1996.
255. **Laemli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

