

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION (C1Na/Urea y C1HGu) SOBRE LA COMPOSICION QUIMICA DE LA CROMATINA DE HIPOTALAMO DE RATON Y SU CAPACIDAD DE INTERACCION CON LOS COMPLEJOS ³H-ESTRADIOL-RECEPTOR DEL MISMO ORIGEN*

Por A. López Pérez
J. Ventanas Barroso
J. Burgos

INTRODUCCION

Una etapa clave del mecanismo de acción de los esteroides hormonales reside en la interacción de los complejos receptor-esteroide hormonal con la cromatina.

Wester *et. al.*¹ sugieren que el número de lugares aceptores disponibles en la cromatina para la interacción con los complejos receptor-esteroide hormonal varía a lo largo del desarrollo e incluso con los distintos estados fisiológicos, debido a su enmascaramiento por determinadas proteínas cromosómicas. En este sentido, numerosos trabajos experimentales han demostrado^{1, 2, 8} que la capacidad de la cromatina para ligar el complejo receptor-esteroide hormonal se encuentra afectada por su composición. Es evidente, por tanto, el interés de un estudio exhaustivo no sólo de la composición química de la cromatina, sino también de las modificaciones provocadas por la acción de sales y agentes caotrópicos (C1Na, C1Na y Urea, C1HGu), capaces de disociar las proteínas presentes en ellas, con el fin de lograr el máximo desenmascaramiento de los aceptores específicos para las hormonas esteroides.

El papel central desempeñado por el hipotálamo en el proceso de diferenciación sexual nos ha llevado a elegir este tejido para los estudios de interacción de los complejos receptor-³H-estradiol con la cromatina. Para ello hemos empleado un sistema libre de células, donde incubamos la cromatina, previamente extraída con C1Na/Urea o con C1HGu con los complejos ³H-estradiol receptor en condiciones fisiológicas (C1K 0,15 M).

* Este trabajo ha sido realizado con fondos procedentes del proyecto n.º 4467 de la CAICYT. *An. Fac. Vet. León*, 1982, 28, 219-234.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

Se emplearon ratones albinos cepa NMRI, machos y hembras, de 7 días de edad, que se sacrificaron por decapitación cervical. Se extrajo la masa encefálica, que se colocó en una superficie fría, diseccionándose a continuación la zona correspondiente al hipotálamo, que se almacenó a congelación (-30°C) hasta el momento de su empleo.

Radioisótopos.—El ^3H -estradiol 85-110 ci/mmol (TRK 322) fue suministrado por The Radiochemical Centre, Amersham, Bucks (Inglaterra).

Preparación de la cromatina

A los hipotálamos congelados se les añadió buffer A (disolución de sacarosa 0,32 M en tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, conteniendo Cl_2Mg 5 mM, ClK 25 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM) y se mantuvieron a 4°C . Una vez descongelados, se homogeneizaron en un Potter-Elvehain.

El homogenizado se filtró a través de una gasa, y el filtrado se centrifugó, a 2.000xg., durante 10 minutos.

El sedimento resultante de la centrifugación se resuspendió en una mezcla 1/1 (v/v) de buffer A y B (disolución de sacarosa 2,4 M en tampón Tris-ClH 10 mM, pH 7,5, conteniendo Cl_2Mg 1,5 mM), se homogeneizó de nuevo y se centrifugó a 20.000xg. durante 10 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante y el abundante material lipídico depositado en la parte superior del tubo, los sedimentos obtenidos —que contienen los núcleos en estado de semipurificación— fueron suspendidos en 1 volumen de buffer A más 1 volumen de buffer B, suavemente homogeneizados, y se depositaron cuidadosamente con pipeta Pasteur en tubos de centrifuga, a los que previamente se les había añadido una solución compuesta por 1 volumen de buffer A y 2 volúmenes de buffer B, estableciéndose así un gradiente de sacarosa, cuya capa superior es 1,3 M, y la inferior, 1,7 M, centrifugándose a continuación, a 20.000xg., durante 15 minutos.

El sedimento se observó a microscopio, y si el grado de limpieza de los núcleos presentes en el mismo no era satisfactorio, se repitió la centrifugación, resuspendiendo previamente el sedimento en la mezcla (1/1) de tampones A y B.

El «sedimento nuclear» se resuspendió en el mismo medio al que se añadió Tritón X-100 (200 μl /100 ml.), y se homogeneizó lentamente. La solución se colocó sobre la disolución tamponada de sacarosa 1,7 M, obtenida mezclando 1 volumen de buffer A y 2 volúmenes de buffer B, y se centrifugó a 20.000xg. durante 15 minutos.

El sedimento obtenido, de aspecto pálido y transparente («cromatina»), exento de hemoglobina, fue lavado dos veces con una disolución de ClNa 80 mM y EDTA 20 mM, en tampón Tris-ClH 2 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 0,1 mM; centrifugándose entre cada extracción a 6.000xg. durante 5 minutos.

La cromatina así obtenida se almacenó a -20°C en buffer Tris-ClH 2 mM, pH 7,5, conteniendo 0,1 mM EDTA y 1 mM SO_3HNa .

Unión de la cromatina a la celulosa (según Litman³)

La cromatina se suspendió en tampón Tris-ClH 6 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 0,1 mM, SO_3HNa 1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM; y se homogeneizó lentamente con 0,5-2 g. de celulosa (Whatman CC-41), tratada previamente con ClH 1 N, lavada con agua destilada y liofilizada. A continuación se centrifugó, y el sedimento obtenido se liofilizó de nuevo.

El liofilizado se suspendió en 30-50 ml. de etanol absoluto, manteniéndose en agitación durante 30 minutos, tras lo cual fue expuesto a la luz ultravioleta durante 10 minutos a una distancia de 10 cm., manteniéndose siempre en agitación lenta.

El etanol se separó por filtración y la cromatina-celulosa fue lavada con 300 ml. de buffer Tris-ClH 2 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 0,1 mM SO_3HNa 1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM. Tras la eliminación del buffer, la cromatina celulosa se liofilizó y se almacenó en seco a temperatura ambiente.

Preparación de los complejos receptor de alta afinidad (HAR)- ^3H -estradiol

Los hipotálamos se homogeneizaron a buffer Tris-ClH 10 mM, pH 7,4, conteniendo sacarosa 0,32 M y 2-mercaptoetanol 100 mM con la ayuda de un homogeneizador de Potter. El homogeneizado obtenido se centrifugó a 38.000xg. durante una hora y el sobrenadante se centrifugó a 38.000xg. durante 90 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación constituye el citosol.

Al ^3H -estradiol, una vez evaporado el disolvente que lo contenía con N_2 , se añadió el citosol, manteniéndose 90 minutos en lenta agitación, tiempo necesario para la formación de los complejos ^3H -estradiol-receptor.

Los complejos ^3H -estradiol-receptor se precipitaron con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ saturado pH 7,2, al 25% de saturación, que se añadió lentamente por un espacio de 15 minutos. Tras mantener 30 minutos en agitación la mezcla, se centrifugó a 10.000xg. durante 15-20 minutos, y los sedimentos se almacenaron a -30°C .

Previamente a su utilización, los sedimentos se disolvieron en tampón Tris-ClH 5 mM de pH 7,5, conteniendo ClK 0,15 M, EDTA 0,5 mM y 2-mercaptoetanol 50 mM; y se dializaron contra 300 ml. del mismo buffer durante 3 horas, cambiando tres veces el tampón. El dializado se centrifugó a 10.000xg. durante 5 minutos, y se tomaron alícuotas (50 μl) para la determinación de la radiactividad específica (CPM/mg. de proteína).

Extracción de la cromatina-celulosa, incubación de los complejos hormona-receptor con la cromatina y recuento de radiactividad

Alícuotas de cromatina-celulosa, tres réplicas de 10 mg. cada una, se hidrataron con una disolución de EDTA 0,1 mM, SO_3NH_4 1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM en

tampón Tris-ClH 2 mM, pH 7.5, durante 30 minutos, a 0-4°C. A continuación fueron extraídas con al menos 20 volúmenes del buffer de extracción correspondiente y lavadas con tampón Tris-ClH 2 mM pH 7.5, con EDTA 0.1 mM (para la extracción de clorhidrato de guanidina) o con tampón Tris-ClH 10 mM, pH 7.5 (para la extracción con ClNa y ClNa + Urea).

Los complejos hormona-receptor se incubaron durante 90 minutos con las cromatinas extraídas, y los complejos radiactivos no unidos se eliminaron lavando tres veces con tampón Tris-ClH 2 mM, pH 7.5, EDTA 0.1 mM. Al sedimento se le añadió 1 ml. de NCS y se mantuvo a 37°C durante 1 hora, tras lo cual se le añadieron 110 µl. de ClH 6 M. La mezcla se transfirió cuantitativamente a niveles de centelleo con 3 lavados de 4 ml. de Instagel. Las muestras se contaron durante 10 minutos una vez que la temperatura se hubo estabilizado. Para el recuento se empleó un espectrómetro líquido de centelleo, modelo Intertechnique SL-30.

Análisis químico de la cromatina-celulosa

En las muestras de cromatina celulosa, tal como fueron preparadas o extraídas con ClNa/Urea o con ClHGu, se determinó su contenido en DNA, proteína total, proteínas ácidas e histonas.

La proteína se cuantificó por el método de Lowry⁴, empleando seroalbúmina bovina (Sigma) como patrón para las proteínas ácidas y totales e histonas de timo de ternera (Sigma, tipo 11-S) para las histonas. Las proteínas totales se extrajeron con NaOH 0.5 M a 37°C durante 60 minutos. Las histonas fueron extraídas con ClH 0.2 M a 2°C durante 30 minutos, y a continuación se extrajeron las proteínas ácidas con NaOH 0.1 M a 37°C durante 60 minutos.

El DNA se determinó por el método de Giles & Myers⁵, modificación del modelo de Burton⁶, utilizando DNA de timo de ternera (Sigma) como patrón.

RESULTADOS

Composición química de las cromatinas preparadas

Los resultados del análisis químico de las cromatinas preparadas y la relación entre sus componentes se muestran en la Tabla I.

Se ha postulado⁷ que mientras la relación histonas/DNA es constante y próxima a la unidad, la relación proteínas ácidas es más variable, oscilando entre 0.5-2/1. Los resultados obtenidos por nosotros confirman ambas hipótesis, ya que el cociente histona/DNA es de 0.96/1, con oscilaciones mínimas y la relación proteínas ácidas/DNA es de 1.67/1, con un rango de variación más amplio (1.12-2.43). Ello demuestra la gran heterogeneidad de las proteínas ácidas, donde, además de las proteínas estructurales, existen proteínas enzimáticas, etc., y su rápido turnover.

TABLA I
Composición química de las cromatinas preparadas
Los datos abajo expresados corresponden a la media de tres réplicas de 10-30 mg. cada una.
Abreviaturas: M, macho; H, hembra.

Fecha de preparación	Edad (días)	Sexo	µg./mg. de cromatina-celulosa							
			Proteína total	Histonas	Proteínas ácidas	DNA	Proteínas tot./DNA	Histonas/DNA	Proteínas ácidas/DNA	P. total/histonas ácidas/ + P. ácidas
10 enero 79	7	M	5.81	1.82	3.73	1.73	3.39	1.04	2.19	1.05
23 febrero 79	7	M	19.22	5.42	10.2	6.20	3.01	0.87	1.64	1.23
13 marzo 79	7	M	13.81	4.73	8.44	5.45	2.53	0.86	1.54	1.05
20 marzo 79	7	M	7.61	2.62	4.82	2.25	3.37	1.15	2.13	1.02
30 marzo 79	7	M	11.73	4.21	7.11	4.05	2.78	1.03	1.75	1.03
4 abril 79	7	M	11.81	5.96	6.70	5.93	1.98	1.00	1.12	0.93
							Media . (2,84)	(0,99)	(1,73)	(1,05)
10 febrero 79	7	H	7.80	2.41	4.53	1.86	4.19	1.29	2.43	1.12
23 febrero 79	7	H	16.01	5.30	7.03	5.53	2.89	0.96	1.26	1.30
13 marzo 79	7	H	3.21	0.65	1.81	1.00	3.20	0.65	1.81	1.30
20 marzo 79	7	H	5.20	1.53	2.61	1.65	3.15	0.92	1.57	1.25
30 marzo 79	7	H	9.10	3.31	4.80	3.75	2.42	0.88	1.28	1.12
4 abril 79	7	H	8.42	3.21	5.03	3.67	2.28	0.87	1.36	1.02
							Media . (3,02)	(0,93)	(1,62)	(1,18)

En cuanto a la relación proteína total/proteínas ácidas + histonas, que en todos los casos se encuentra próxima a la unidad, confirma la limpieza de los núcleos preparados, que previamente se habían observado al microscopio, así como la pureza de las cromatinas obtenidas a partir de ellos, libres de proteínas contaminantes (proteínas del tejido conectivo, proteínas de la membrana, etc.).

Efectos de la extracción con ClNa y ClNa/Urea a pH 6,0, 7,2 y 8,3 sobre la composición química de la cromatina y su interacción con los complejos ³H-estradiol-receptor

a) Efecto del pH y del ClNa y Urea sobre la extractibilidad de las proteínas cromosómicas

Alícuotas de 10 mg. de cromatina-celulosa se hidrataron con tampón Tris-ClH 2 mM, de pH 7.5, conteniendo EDTA 0.1 mM, SO₃HNa 1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM; y se extrajeron con ClNa 2 M o con ClNa 2 M y luego con una disolución de ClNa 3 M y Urea 5 M. El análisis químico de la cromatina-celulosa residual se muestra en las figuras 1 y 2.

En ninguno de los dos métodos de extracción empleados sufrió el contenido en DNA variación a lo largo del experimento, lo cual demuestra que no hubo pérdidas de cromatina durante el lavado y que la unión del DNA a la celulosa, catalizada por la luz ultravioleta, fue satisfactoria en ambos casos.

La extracción de la cromatina-celulosa con ClNa 2 M, que tiene por objeto deshistonizar la cromatina, muestra ser más efectiva a pH 7,2 (Fig. 1), tanto en lo

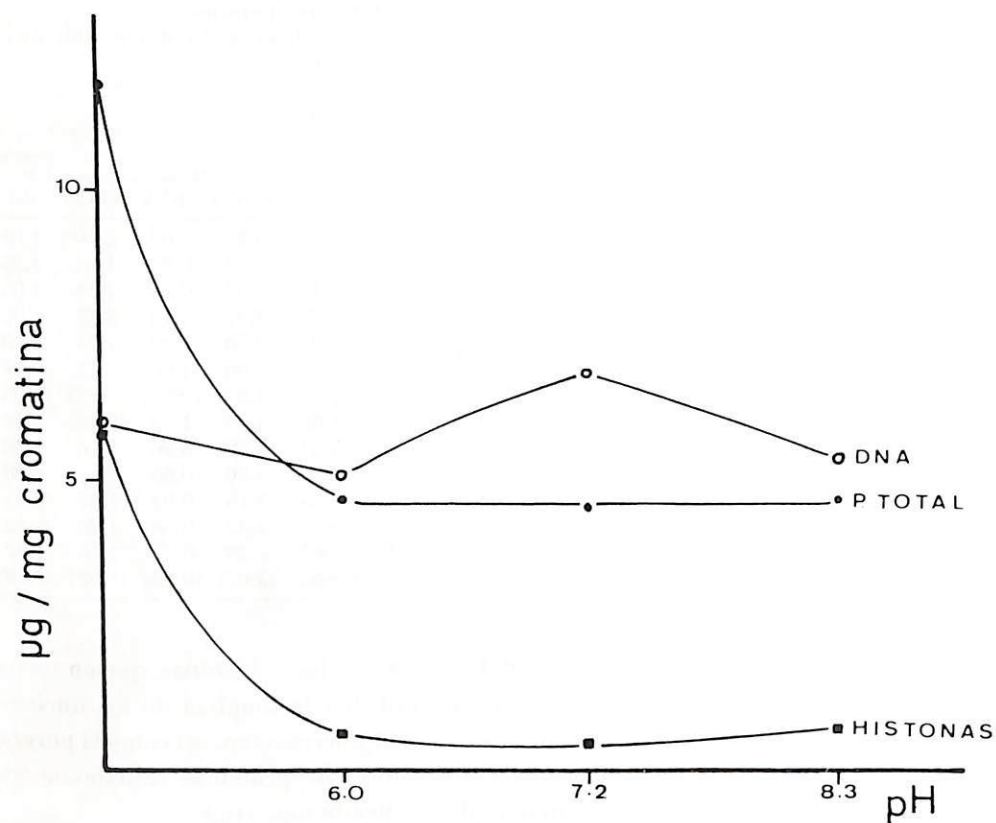


Figura 1.—Composición química de la cromatina extraída con C1Na 2 M. Los valores representados corresponden a los μg . de DNA o proteína por mg. de cromatina-celulosa que permanecen ligados a la matriz tras la extracción.

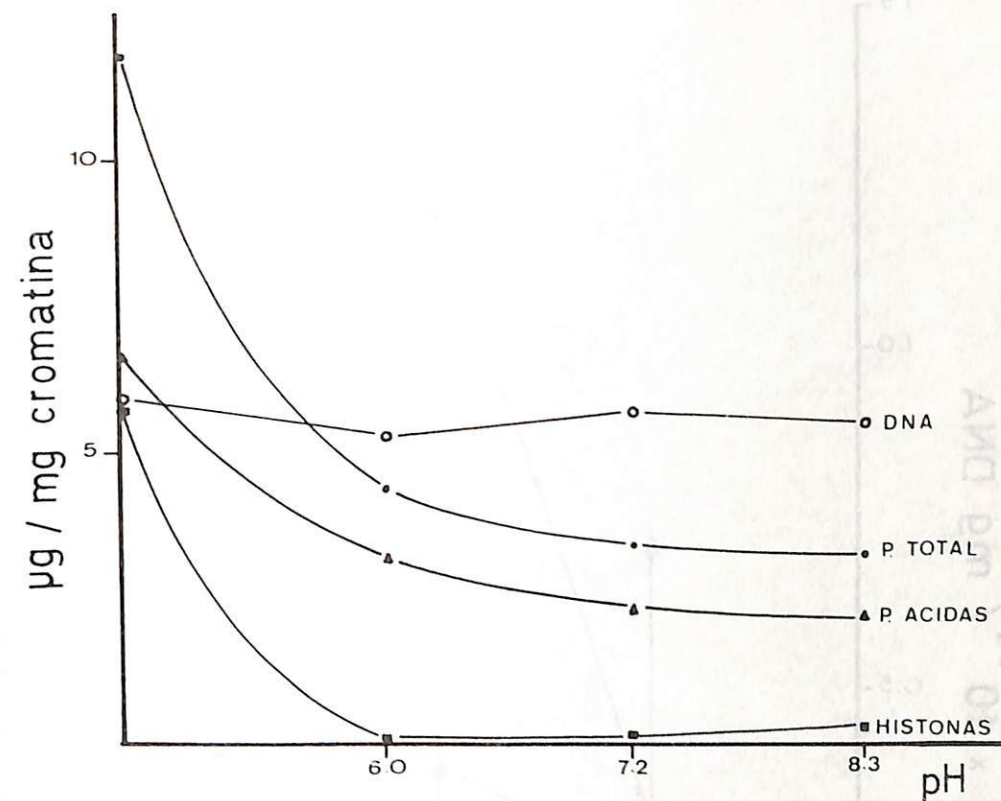


Figura 2.—Composición química de la cromatina extraída en dos etapas: primero con C1Na 2 M y luego con C1Na 3 M y Urea 5 M. Los valores representados corresponden a los μg . de DNA o proteína por mg. de cromatina-celulosa que permanecen ligados a la matriz tras la extracción.

que a cantidad de histonas remanentes se refiere como en lo que hace relación al cociente proteína/DNA, inferior a este pH en ambos casos. Del mismo modo, la extracción primero con C1Na 2 M y luego con C1Na 3M y Urea 5 M, con el fin de eliminar determinadas proteínas ácidas que enmascaran los aceptores, muestra ser más eficiente a pH 7,2 (Fig. 2).

b) Efectos del pH y del C1Na y Urea sobre la interacción de la cromatina con los complejos ^3H -estradiol-receptor

Se sometieron alícuotas de cromatina-celulosa a extracción con C1Na 2 M y otras al método en dos etapas, primero con C1Na 2 M y luego con C1Na 3 M y Urea 5 M, y se incubaron las cromatinas extraídas con el complejo ^3H -estradiol-receptor preparado, siguiendo la técnica descrita en Material y Métodos.

El nivel de interacción es máximo a pH 7,2, en ambos sistemas de extracción, aunque las diferencias no son significativas para la extracción con C1Na 2 M (Fig. 3).

c) Curva de saturación de la cromatina previamente extraída con C1Na y Urea

Para determinar la concentración de proteína receptora necesaria para saturar la capacidad aceptora de la cromatina se titularon alícuotas idénticas de cromatina-celulosa con cantidades crecientes de complejos ^3H -estradiol-receptor y se eliminó la radiactividad no ligada mediante lavado (Fig. 4). En los subsiguientes ensayos se empleo una concentración de proteína receptora superior a aquella con la que se alcanzó la saturación.

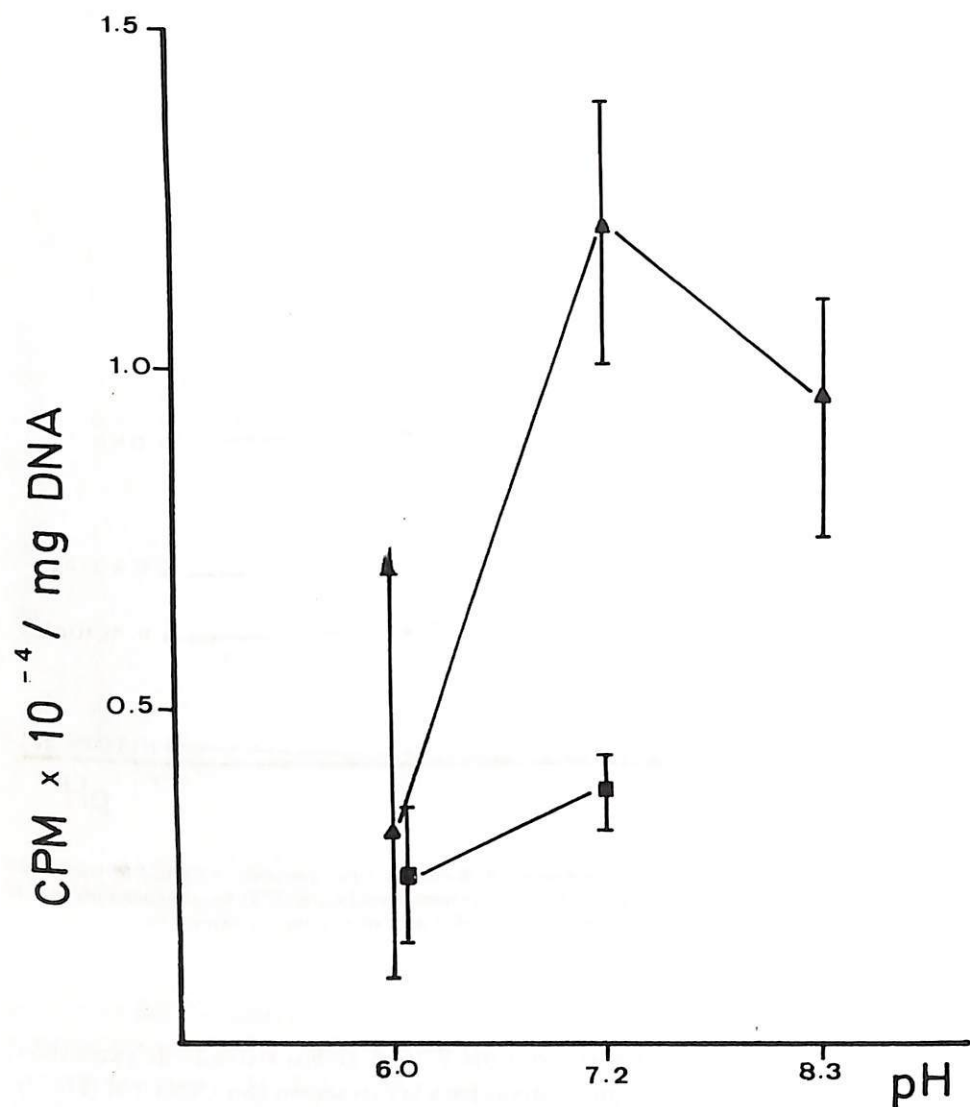


Figura 3.—Efecto del pH sobre la interacción del ^3H -estradiol-receptor con la cromatina-celulosa extraída con 2 M C1Na seguido de 3 M C1Na + 5 M Urea. La figura muestra los resultados de dos experimentos. En el primero, la cromatina preparada el 23-2-79 (5.53 μg . DNA/mg. de cromatina-celulosa) se extrajo con 2 M C1Na y se incubó con 800 μl . de complejo receptor-estradiol (con una radiactividad específica de 2.45×10^5 CPM/mg. proteína) a pHs. 6.0 y 7.2 (■). En el segundo, la cromatina preparada el 30-3-79 (4.05 μg . DNA/mg. de cromatina-celulosa) se extrajo primero con C1Na 2 M y luego con C1Na 3 M y Urea 5 M y se incubó con 1.100 μl . del complejo receptor-estradiol (con una radiactividad específica de 2.67×10^5 CPM/mg. proteína) a pHs. 6.0, 7.2 y 8.3 (▲). Los valores expresados representan la radiactividad ligada tras la incubación y lavado en las condiciones descritas en Material y Métodos (0.15 M ClK).

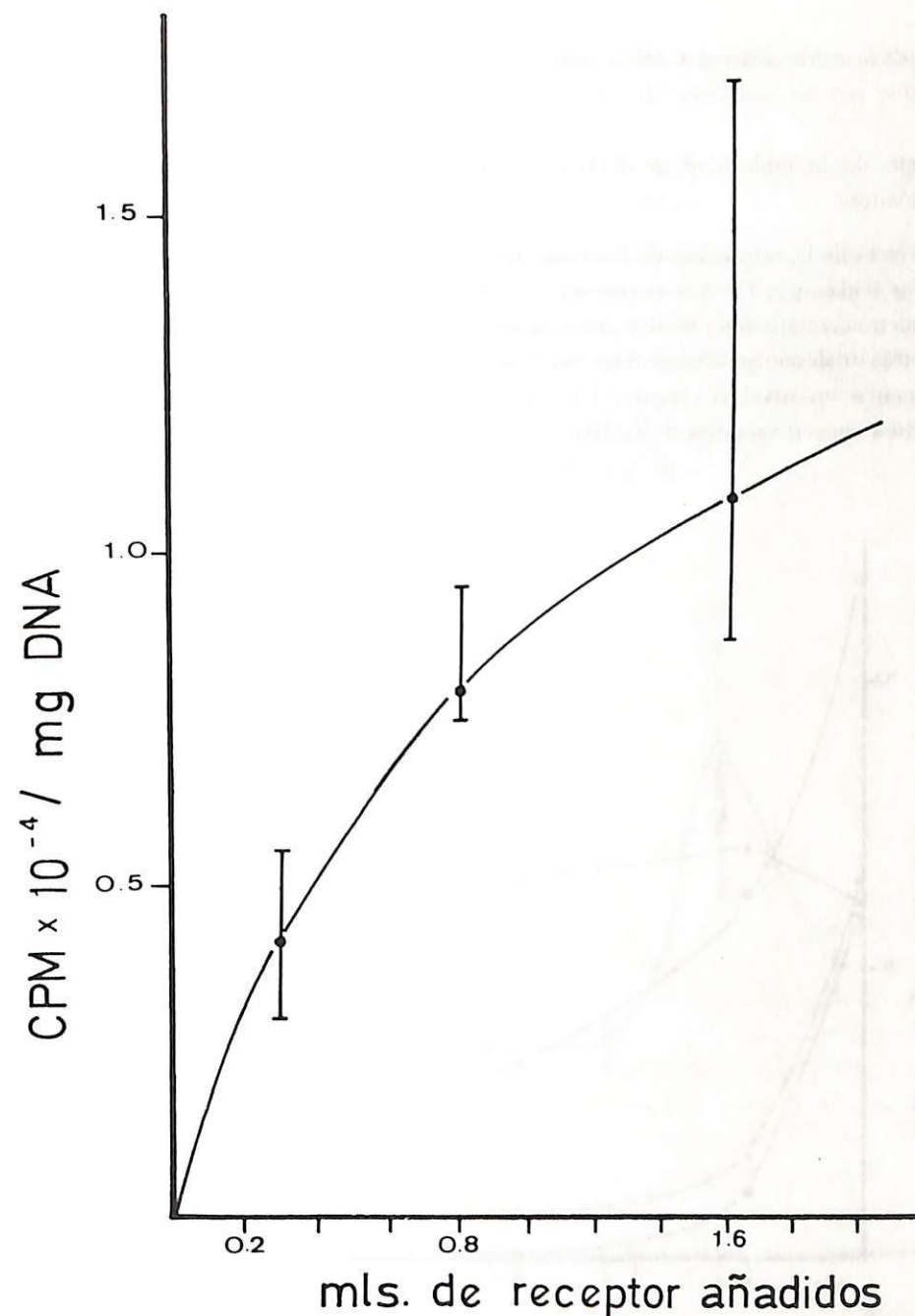


Figura 4.—Curva de saturación de la cromatina de hipotálamo, deshistonizada y desenmascarada, con los complejos ^3H -estradiol-receptor del mismo origen. Muestras de la cromatina de hipotálamo preparada el 20-3-79 (1.05 μg . DNA/mg. cromatina-celulosa) se extrajeron primero con C1Na 2 M (pH 7.2) y luego con C1Na 3 M y Urea 5 M (pH 7.2) y se incubaron con 300-1.600 μl . de ^3H -estradiol-receptor (radiactividad específica de 2.5×10^5 CPM/mg. proteína). Las barras verticales representan el rango de valores obtenidos en los ensayos, efectuados por triplicado.

Efectos de la extracción con CIHGu sobre la composición química de la cromatina y su interacción con los complejos ³H-estradiol-receptor

a) Efecto de la molaridad de CIHGu sobre la extractibilidad de las proteínas cromosómicas

El efecto de la extracción de la cromatina con CIHGu, 1 M, 3 M y 5 M sobre las proteínas ácidas, y el DNA se muestra gráficamente en la Fig. 5. Las proteínas totales descienden correlativamente al incrementar la molaridad. En cambio, las proteínas ácidas, tras un descenso brusco al iniciar el proceso de extracción con CIHGu 1 M, se mantienen a un nivel constante. Las histonas, por su parte, son extraídas por completo a concentraciones de CIHGu superiores a 3 M.

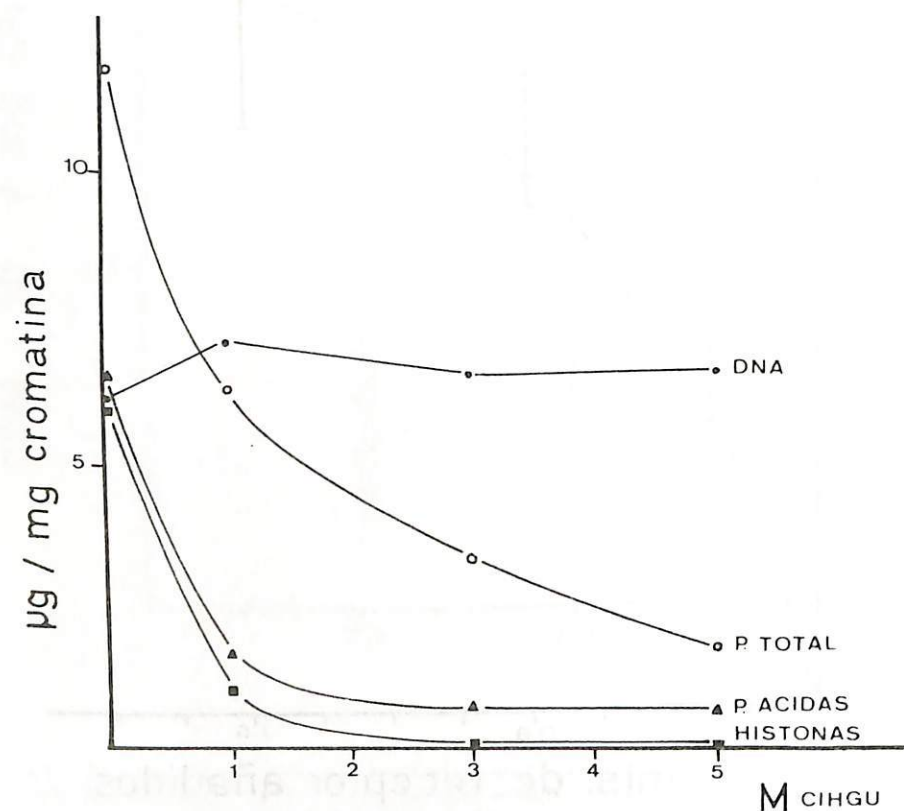


Figura 5.—Efecto de la extracción con CIHGu sobre el contenido en DNA: (●) proteínas totales, (○) proteínas ácidas, (▲) e histonas, (■) de la cromatina-celulosa. Tres réplicas de aproximadamente 10 mg. cada una se hidrataron con tampón Tris-ClH 2 M, pH 7.5, con EDTA 0.1 mM y se extrajeron dos veces con clorhidrato de guanidina. Las proteínas eluidas se eliminaron por lavado con el mismo tampón antes de proceder al análisis químico del complejo cromatina-celulosa residual, que se realizó tal como se describe en Material y Métodos.

El DNA, al igual que en la extracción con ClNa y ClNa y Urea, permanece constante a lo largo del experimento.

b) Efecto de la extracción con CIHGu sobre la interacción de los complejos ³H-estradiol-receptor con sus aceptores de la cromatina

La extracción secuencial de las proteínas cromosómicas con concentraciones molares crecientes de CIHGu (0-6 M), que permite a la vez estimar el número de lugares aceptores y su grado de enmascaramiento, incrementa significativamente la capacidad aceptora de la cromatina al extraer con CIHGu 5 M. La subsiguiente extracción con CIHGu 6 M reduce los niveles de interacción a valores comparables a los originales, lo que demuestra que han sido extraídas las proteínas responsables del anclaje de los complejos ³H-estradiol-receptor (Fig. 6).

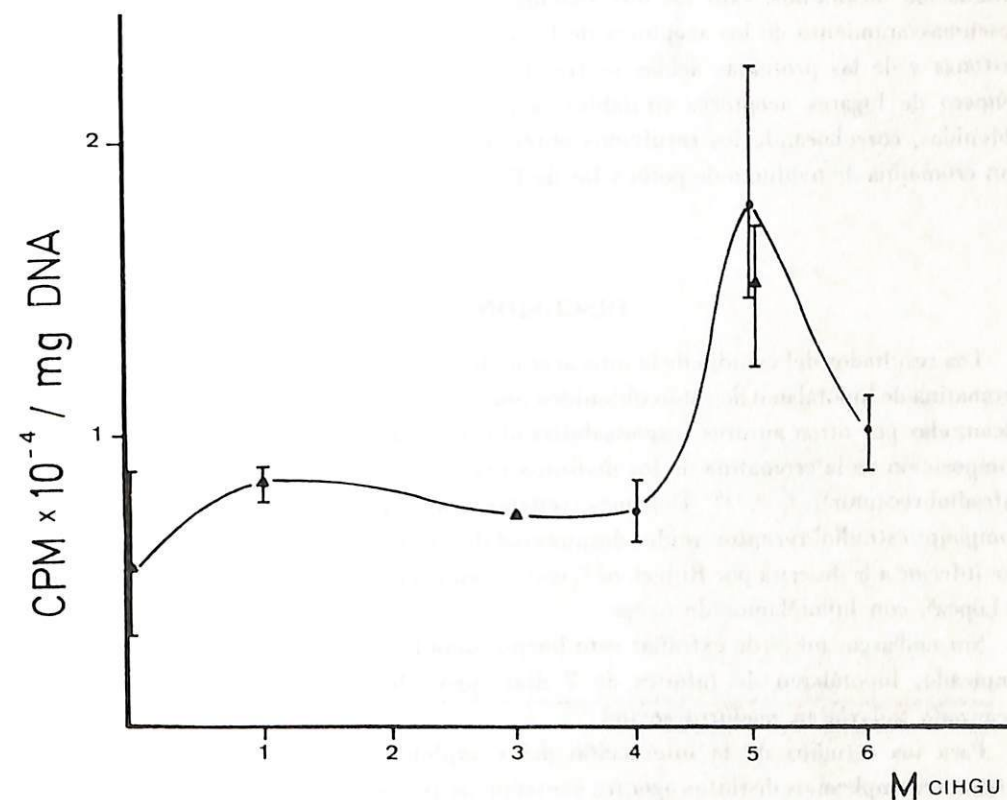


Figura 6.—Niveles de interacción de los complejos ³H-estradiol-receptor con la cromatina-celulosa extraída con clorhidrato de guanidina. Cantidades equivalentes de la cromatina-celulosa preparada el 10-1-79 (1.73 µg. DNA/mg. cromatina-celulosa), se hidrataron y extrajeron con concentraciones de CIHGu variables entre 0 y 6 M. Se incubaron luego con 1.300 µl. de ³H-estradiol-receptor (radiactividad específica 3.15×10^5 CPM/mg. proteína (●) y 2.91×10^5 CPM/mg. proteína (▲) preparados a partir de hipotálamos de ratón y la radiactividad ligada se cuantificó como se indica en Material y Métodos.

c) Curva de saturación de la cromatina previamente extraída con C1HGu

Alícuotas de 10 mg. de la cromatina celulosa preparada el 10-1-79 (1,73 μ g. DNA/mg. cromatina-celulosa) se extrajeron con C1HGu 5 M y se incubaron con distintos volúmenes de ^3H -estradiol-receptor (100-1.500 μ l) radiactividad específica de $2,91 \times 10^5$ CPM/mg. proteína). La curva de saturación expresada como radiactividad ligada en función del volumen de ^3H -estradiol-receptor añadido se muestra en la Fig. 7.

Efectividad de los métodos de extracción empleados (C1Na/Urea y C1HGu) en el desenmascaramiento de los aceptores

Los valores obtenidos muestran que ambos métodos tienen una eficacia similar (Fig. 8), no existiendo diferencias significativas en cuanto a los niveles de interacción alcanzados. Con los dos sistemas se consigue la deshistonización y el desenmascaramiento de los aceptores de la cromatina, ya que la eliminación de las histonas y de las proteínas ácidas se traduce en un incremento progresivo en el número de lugares aceptores titulables, a juzgar por los niveles de interacción obtenidos, corroborando los resultados obtenidos previamente por Spelberg *et. al.*² con cromatina de oviducto de pollo y los de Perry y López⁸ en hipotálamo de óvulo.

DISCUSION

Los resultados del estudio de la interacción del complejo estradiol-receptor con la cromatina de hipotálamo de ratón obtenidos por nosotros confirman las conclusiones alcanzadas por otros autores responsabilizando de una manera preponderante a la composición de la cromatina de los distintos niveles de interacción con el complejo estradiol-receptor^{1, 8, 9, 10}. Debemos señalar, sin embargo, que el número de complejos estradiol-receptor unidos después del desenmascaramiento de la cromatina fue inferior a la descrita por Ruh *et. al.*⁹, con cromatinas de útero de ternera, y Perry y López⁸, con hipotálamos de oveja.

Sin embargo, no es de extrañar este hecho, debido a que el tejido por nosotros empleado, hipotálamo de ratones de 7 días, procede de animales que no han alcanzado todavía su madurez sexual.

Para los estudios de la interacción del complejo ^3H -estradiol-receptor en la cromatina empleamos distintos agentes caotrópicos (C1Na/Urea y C1HGu), capaces de desproteínizar la cromatina y desenmascarar los centros aceptores para este complejo. Los resultados obtenidos muestran que, tanto el C1HGu como la mezcla de urea y C1Na, se muestran similares en cuanto a la eficacia del desenmascaramiento se refiere. Perry y López⁸, empleando un sistema libre de células y los mismos agentes caotrópicos, encontraron diferencias en cuanto al nivel de desenmascara-

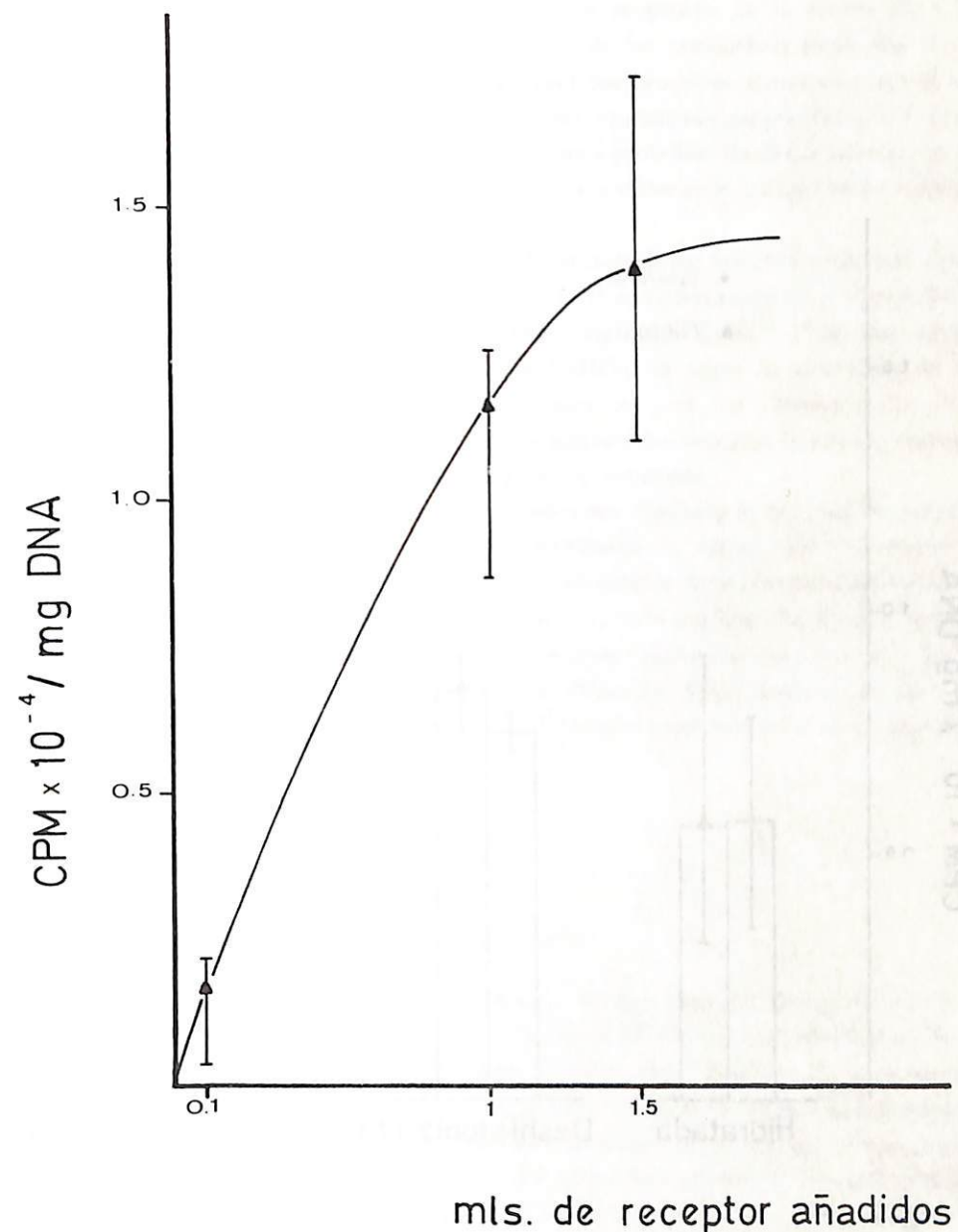


Figura 7.—Curva de saturación de la cromatina de hipotálamo de ratón extraída con C1HGu 5 M con complejos ^3H -estradiol-receptor del mismo origen.

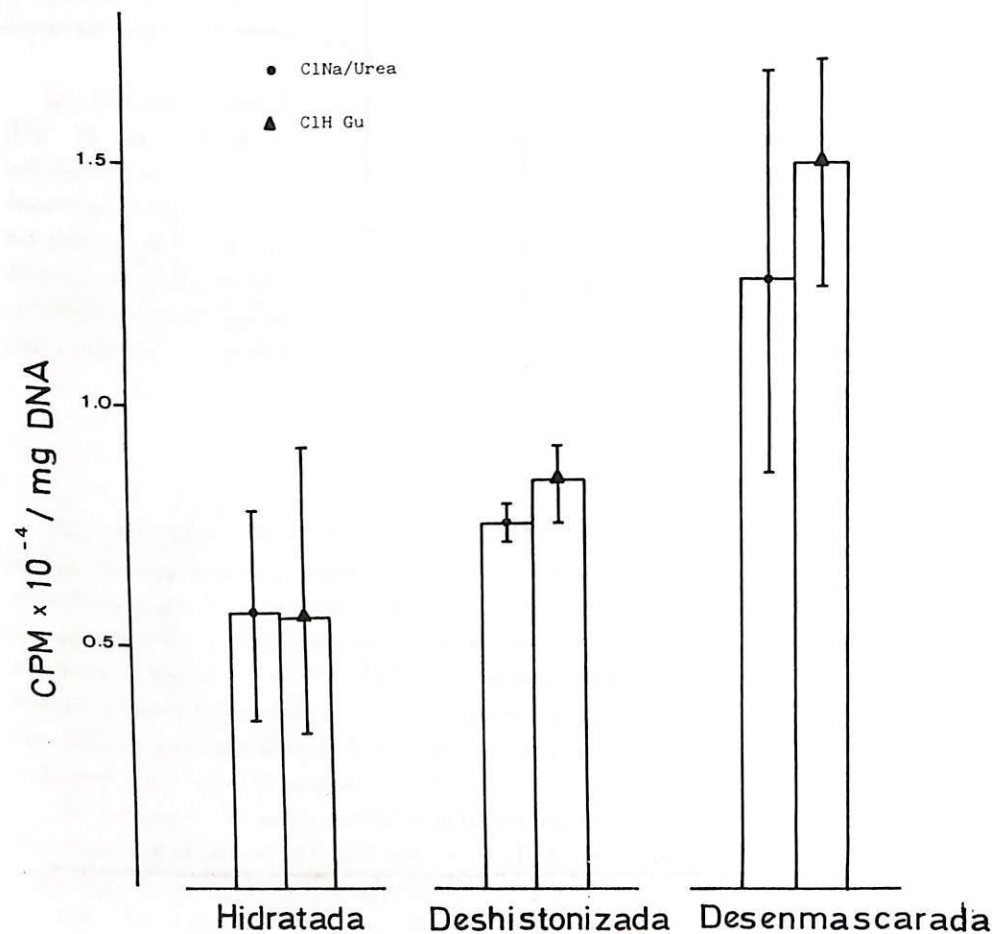


Figura 8.—Efectividad del C1Na/Urea y C1HGu en el desenmascaramiento de los aceptores nucleares de los complejos ³H-estradiol-receptor de hipotálamo de ratón. Se emplearon las cromatinas preparadas el 10-1-79 para la extracción con C1HGu (1.73 µg. DNA/mg. cromatina-celulosa) y el 20-3-79 (1.65 µg. DNA/mg. cromatina-celulosa) para la extracción con C1Na y C1Na y Urea. En la figura se expresa la cantidad de hormona radiactiva que permanece ligada a la matriz de cromatina-celulosa tras la incubación y lavado.

miento de los aceptores logrado con C1HGu y C1Na y Urea; siendo más eficaz el C1Na y Urea.

Coincidimos, sin embargo, con estos investigadores en responsabilizar del distinto grado de desenmascaramiento de los aceptores de la cromatina a las diferencias en la composición química inicial de las cromatinas empleadas y a la eficacia de los agentes caotrópicos en extraer las proteínas contaminantes de sus preparaciones. La composición química de las cromatinas empleadas por Perry y López⁸ muestran una gran variabilidad en lo que a proteínas totales se refiere y tal vez sea esta la razón de que obtengan diferencias en la eficacia de los agentes caotrópicos empleados.

Otro de los aspectos estudiados que se desprende de los resultados obtenidos es el carácter saturable de la interacción entre el ³H-estradiol-receptor y la cromatina desenmascarada es que en ambos casos, tanto empleando C1Na + Urea como agente desproteinizante como cuando se emplea C1HGu, se logra la saturación de los aceptores. Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos por otros autores^{8, 9}, que demuestran también que la interacción receptor-hormona esteroide con cromatina de tejidos banco es un proceso saturable.

En los sistemas libres de células ensayados por Spelberg *et. al.*², con cromatinas de oviductos de pollo, Perry y López⁸ en hipotálamos de ovejas, Tsai¹¹ en células de Sertoli de ratas y Klyzsejko-Stefanowicz¹⁰ en próstata de ratón; lo que sí parece claro, y en ellos todos los grupos coinciden en afirmar, es la implicación, a juzgar por sus resultados, de un tipo determinado de proteínas nucleares, una fracción de las proteínas ácidas presentes en la cromatina (fracción AP₃), como responsables y necesarias de la interacción de los complejos hormona-receptor con los agentes de la cromatina.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio comparativo de dos sistemas de extracción de la cromatina de hipotálamo de ratón (C1Na/Urea y C1HGu) con el fin de determinar su eficacia en cuanto al desenmascaramiento de los centros aceptores en la cromatina. Con ambos procedimientos se obtiene una deshistonización y desenmascaramiento de los lugares aceptores, que se refleja en un incremento del número de complejos estradiol-receptor unidos a la matriz de cromatina-celulosa. No encontramos diferencias significativas en cuanto a su eficacia, por lo que ambos pueden ser empleados indistintamente para la desproteización de la cromatina.

COMPARATIVE STUDY OF TWO PROCEDURES OF EXTRACTION
(C1Na/Urea and C1HG_u) ON CHEMICAL COMPOSITION OF
CHROMATIN AND ITS ABILITY TO BOUND ³H-ESTRADIOL-
RECEPTOR COMPLEXES

SUMMARY

Chromatin isolated from hypothalamic nuclei of sexually immature mouse was linked to cellulosa in u.v. light. The saturation binding of ³H-labeled estradiol-receptor complexes with chromatin was then measured «in vitro» in 0,15 M-KCl. Saturation was also measured after extraction of histones and masking acidic proteins with NaCl/Urea or GuHCl. Salt + Urea was observed to be equally effective than guanidine hydrochloride in unmasking acceptor sites.

BIBLIOGRAFIA

- 1) WEBSTER, R. A.; PIKLER, G. M., y SPELBERG, T. C. (1976).—Nuclear binding of progesterone in hen oviduct. *Biochem. J.*, **156**: 409-418.
- 2) SPELBERG, T. C.; WEBSTER, R.; PIKLER, G.; THRALL, C., y WELLS, D. (1976).—Role of nuclear proteins as high affinity sites («acceptors») for progesterone in the avian oviduct. *J. Steroid Biochem.*, **7**: 1.091-1.101.
- 3) LITMAN, R. M. (1968).—*J. Biol. Chem.*, **243**: 6.222-6.233.
- 4) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J. (1951).—Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- 5) GILES, K. W., y MYERS, A. (1965).—A improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature (London)*, **206**: 93.
- 6) BURTON, K. (1956).—A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem. J.*, **62**: 315-323.
- 7) STEIN, G. S.; SWINEHART, J., y KLEINSMITH, L. J. (1975).—Chromosomal proteins and gene regulation. *Scientific American*, **232**: 46-61.
- 8) PERRY, B. N., y LÓPEZ, A. (1978).—The binding of ³H-labeled oestradiol and progesterone-receptor complexes to hypothalamic chromatin of male and female sheep. *Biochem. J.*, **176**: 873-883.
- 9) RUH, S.; ROSS, P.; WOOD, D. M., y KEENE, J. L. (1981).—The binding of (³H)-oestradiol-receptor complexes to calf uterine chromatin. *Biochem. J.*, **200**: 133-142.
- 10) KLYZSEJKO-STEFANOWICZ, L.; CHIU, J. F.; TSAI, Y.-H., y HNILICA, L. S. (1976).—Acceptor proteins in rat androgenic tissue chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**: 1.954-1.958.
- 11) TSAI, Y.; SANBORN, B. M.; STEINBERGER, A., y STEINBERGER, E. (1980).—*J. Steroid Biochem.*, **13**: 711-718.

CATEDRA DE TECNOLOGIA Y BIOQUIMICA DE LOS ALIMENTOS

(Prof. Dr. J. BURGOS GONZALEZ)

CARACTERIZACION DE LOS RECEPTORES DE
ESTRADIOL DE LA TIBIA DE RATON*

Por A. López Pérez
J. Ventanas Barroso
J. Burgos

INTRODUCCION

Aunque a la luz de los conocimientos actuales es indudable una acción directa de los estrógenos sobre el tejido óseo, como lo demuestra el control negativo que ejerce el estradiol sobre la liberación de calcio por la hormona paratiroidea (PTH) en cultivos de osteocitos¹ y la frecuente aparición de osteoporosis a partir de la menopausia², los mecanismos en virtud de los cuales los esteroides actúan a este nivel son poco conocidos.

La existencia de receptores citoplasmáticos de alta afinidad que retengan los estrógenos en el interior de las células óseas contra gradiente de concentración a partir de la sangre es condición indispensable para justificar un efecto directo, según el mecanismo general de acción de las hormonas esteroides propuesto por Gorski y Cannon³. Sin embargo, tal vez porque —como acertadamente apunta Nielsen⁴— debido a la pequeña cantidad de proteína citosólica respecto al peso fresco del tejido y su dilución y mezcla con otras proteínas de la matriz, algunos intentos de demostrar la presencia de receptores de estrógenos no han tenido éxito^{5, 6}. Por esta razón se han propuesto vías alternativas, como el que los esteroides actúan sobre los sistemas enzimáticos del hígado y riñón que controlan la síntesis de vitamina D y el metabolismo del calcio⁷.

En los resultados que se presentan se demuestra la existencia de proteínas receptoras de estradiol en la tibia de ratón de diferentes edades, habiéndose investigado también la localización anatómica de estos receptores y su caracterización, mediante estudios de afinidad y de competición con otros esteroides.

* Este trabajo ha sido realizado con fondos procedentes del proyecto n.º 4467 de la CAICYT. *An. Fac. Vet. León*, 1982, 28, 235-243.