

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.

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.

MATERIAL Y METODOS

Productos químicos

Los esteroides marcados (1, 2, 6, 7-³H) Estradiol, 85-110 Ci/mmol (TRK 322) fueron suministrados por The Radiochemical Center, Amersham, Bucks (U.K.) y los radioinertes por Sigma Chem. Co. Los restantes productos procedían de Merck, Sigma, BDH y Pharmacia y eran de calidad reactivo. El líquido de centelleo empleado fue Instagel (Packard).

Material biológico

Para los experimentos descritos en este trabajo se emplearon ratones albinos cepa NMRI, intactos y alimentados «ad libitum», agrupados en lotes de machos y hembras constituidos por no menos de ocho animales, de 7, 14, 21, 35, 42 y 63 días de edad. Se sacrificaron por decapitación cervical, y se extrajo la tibia, que se liberó del tejido muscular y conectivo adherido, con ayuda de un binocular (5 × 10 aumentos). Inmediatamente después, los huesos se pesaron en un matraz previamente tarado y se midió su longitud con un calibrador provisto de Nonius (error ±0,01 cm.).

Todas las operaciones se realizaron sobre una superficie refrigerada con el fin de evitar que los tejidos estuviesen sometidos, en algún momento, a temperaturas que pudiesen alterar los receptores citoplasmáticos.

Preparación de citosol

Todas las operaciones que se describen a continuación se efectuaron en una cámara refrigerada a una temperatura de 0-4°C.

El citosol se preparó siempre en fresco. Los huesos se suspendieron en un pequeño volumen de buffer STEKT (0,32 M sacarosa, 10 mM Tris-ClH pH 8,6, 1,5 mM EDTA, 150 mM ClK), al que se añadió momentos antes tioglicerol hasta una concentración 12 mM; se trituraron, en primer lugar, en un mortero, y a continuación —una vez formada una papilla homogénea— dos veces en un homogeneizador de Sorwall (10.000xRPM); finalmente, se homogeneizaron en un Potter Elvehjem. El homogeneizado se filtró a través de una gasa, permaneciendo siempre en el filtro un «debris» mineralo-membranoso. El filtrado se centrifugó a 20.000xg. durante 15 minutos. Mediante observación microscópica del sedimento, pudo comprobarse, en todos los casos, la presencia de núcleos de células óseas (osteocitos y osteoblastos) demostrándose así que durante la homogeneización había tenido lugar la ruptura celular.

El sobrenadante se recogió con ayuda de una pipeta de Pasteur, incubándose alícuotas del mismo durante 18 horas a 0-4°C con ³H-estradiol (10 nM) o con ³H-estradiol (10 nM) más un exceso 100 veces superior (1 mM) de estradiol no

marcado. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 105.000xg., durante 90 minutos. en el caso de la testosterona, la incubación se prolongó durante 24 horas.

Cálculo de la interacción de la hormona-receptor mediante la absorción de la hormona libre con carbón activo-dextrano

El carbón activo-dextrano se preparó siguiendo el método descrito por Koreman⁸ y Smith⁹. Para ello, el carbón fue tratado con ClH 0,2 N, lavado con agua destilada y neutralizado con NaOH 0,1 N. Finalmente, se trató con etanol, éter y se liofilizó.

Se preparó luego una suspensión de carbón, al 0,5%, y dextrano, al 0,05%, en tampón Tris-ClH 10 mM de pH 7,4, 1,5 mM en EDTA; 12 mM en tioglicerol; la suspensión se agitó durante 6 horas a la temperatura ambiente. La suspensión se mantuvo antes de su uso durante 18 horas en agitación a 4°C.

Para la eliminación del sistema de la hormona libre se mezclaron volúmenes iguales del sobrenadante de la centrifugación a 105.000xg., 90 minutos y la preparación antes mencionada; la mezcla fue sometida a una agitación intensa durante 15 segundos, y, tras 5 minutos de reposo, se sometió a centrifugación (3.000xg. durante 15 minutos). El sobrenadante se sometió de nuevo al mismo tratamiento —adición de carbón-dextrano, agitación, reposo y centrifugación—. El sobrenadante de la segunda centrifugación se transfirió a los oportunos viales de recuento y, tras la adición de 10 mls. de Intagel, se procedió al contaje de la radiactividad, que representa la hormona ligada a las proteínas del citosol. Se denomina «interacción total» a la radiactividad del sobrenadante de los tubos a los que sólo se había añadido hormona marcada, e «interacción inespecífica» a la del sobrenadante de los tubos, a los que se había añadido, además de ³H-estradiol, un exceso 100 veces superior de estradiol sin marcar. La «interacción específica» es la representada por la diferencia entre ambas.

Las determinaciones de proteína se efectuaron por el método de Lowry modificado por Bensadound y Weinstein¹⁰, empleando seroalbúmina bovina cristalizada (Calbiochem) como patrón.

RESULTADOS

Receptores óseos de estradiol

Los resultados obtenidos del estudio de la interacción entre la fracción citosol y el estradiol demuestran la presencia de receptores de alta afinidad para esta hormona en la tibia de ratones machos y hembras de diferentes edades. La ausencia de contaminación significativa por α -fetoproteína se comprobó mediante inmunodifusión¹¹, empleando anticuerpos específicos contra la α -fetoproteína.

En cuanto a los niveles de receptores de estradiol en la tibia de ratón a lo largo del

crecimiento, encontramos (Fig. 1) que en los machos la tasa de receptores es alta durante las 3-4 primera semanas, alcanzando un pico alrededor del día 21. Por el contrario, en la tibia de las hembras la concentración es sumamente baja hasta la tercera semana, para ascender entonces bruscamente hasta el día 35; el incremento prosigue luego lentamente, no llegando nunca, dentro del período estudiado, a alcanzar niveles tan elevados como los presentes en los machos el día 21.

Localización anatómica de los receptores de estradiol en la tibia

Con el fin de localizar anatómicamente los receptores de estradiol, estudiados para el conjunto de la tibia de los ratones NMRI, se seccionó el hueso, separando por un lado la diáfisis y por otro la epífisis. A partir de estas fracciones óseas, procedentes de ratones de 35 días de edad, momento en el que el nivel de receptores es elevado, se preparó la fracción citosol y se determinó la interacción específica con el ^3H -estradiol siguiendo los métodos ya descritos. Los resultados obtenidos (Tabla I) muestran que los receptores de estradiol se encuentran localizados exclusivamente en la epífisis, no detectándose proteínas que interaccionan específicamente con el estrógeno en la porción central del hueso (diáfisis).

TABLA I
Localización en la epífisis de los receptores de estradiol
Los resultados correspondientes a la media de, al menos, 5 réplicas del citosol preparado a partir de las epífisis o de las diáfisis

Material de partida	Esteroides ensayado	Parte del hueso	Interacción (CPM/mg. proteína)		
			Total	Inespecífica	Específica
26 tibias de ratones hembras de 35 días	Estradiol-17 β	Diáfisis	6997 (± 730)	7837 (± 867)	—
	Estradiol-17 β	Epífisis	9690 (± 434)	6492 (± 881)	3198 (± 812)
14 tibias de ratones machos de 35 días	Estradiol-17 β	Diáfisis	5924 (± 1685)	6604 (± 980)	—
	Estradiol-17 β	Epífisis	7670 (± 408)	6650 (± 516)	1020 (± 464)

Competición con otros esteroides

Los resultados de los experimentos de desplazamiento del estradiol de su receptor de alta afinidad por otras hormonas esteroides se muestran en la Figura 2. Los resultados obtenidos muestran que el nivel de competitividad de la testosterona fue del 6%; del 8% para la corticosterona, del 18% para la progesterona y del 87% para el estradiol. Por consiguiente, solamente el estradiol no marcado, en un exceso de 100 veces, es un competidor efectivo para el ^3H -estradiol.

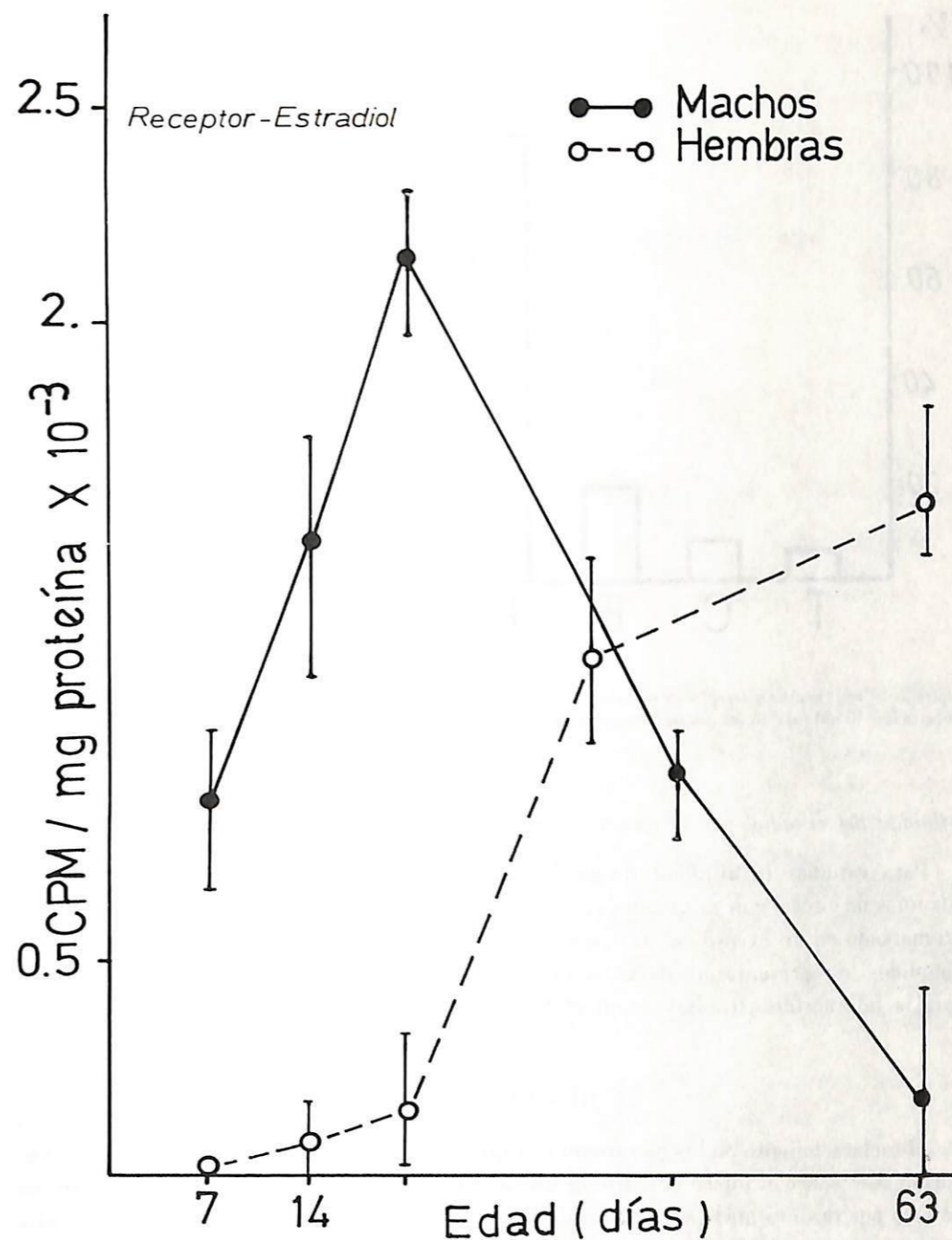


Figura 1.—Niveles de receptores de estradiol en tibia de ratones NMRI durante su crecimiento. Cada valor representado corresponde a la media de la radioactividad, «específicamente ligada», en tres réplicas.

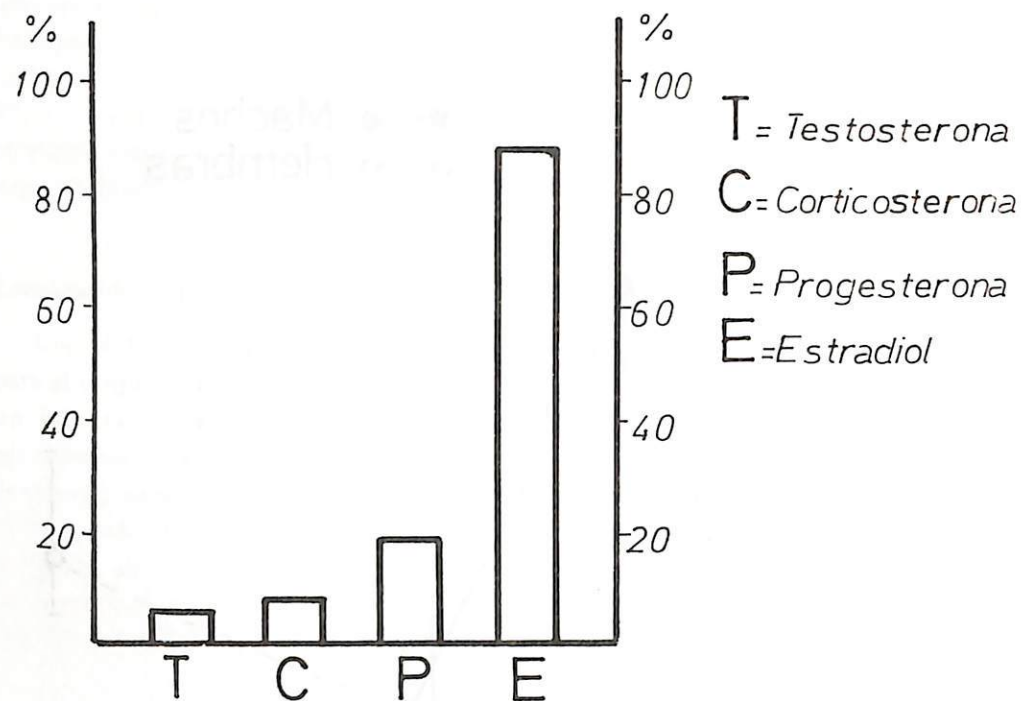


Figura 2.—Competición del receptor de estradiol con otras hormonas esteroides. En los experimentos se empleó ³H-estradiol 10 nM más un exceso de 100 veces de cada hormona no radiactiva (ver Material y Métodos).

Afinidad del estradiol por su receptor óseo

Para estudiar la afinidad de la interacción estradiol-receptor se incubaron alícuotas de citosol con cantidades crecientes de ³H-estradiol solo o ³H-estradiol, más un exceso de 100 veces hasta alcanzar la saturación. Los resultados obtenidos se representaron, de acuerdo con Scatchard¹² (Fig. 3), arrojando una Kd para la interacción estradiol-receptor de $2,71 \times 10^{-9}$ M.

DISCUSION

El esclarecimiento de los mecanismos implicados en las acciones de los esteroides hormonales sobre el hueso constituye un hecho científico de la mayor importancia no sólo por razones médicas, sino también por el creciente interés que ha adquirido su entendimiento desde el punto de vista de posibles manipulaciones del crecimiento animal. En este sentido, es bien conocido que el estradiol provoca el cierre prematuro de las epífisis en los huesos largos, limitando su crecimiento en longitud, de ahí la detención del crecimiento de las hembras cuando alcanzan la pubertad.

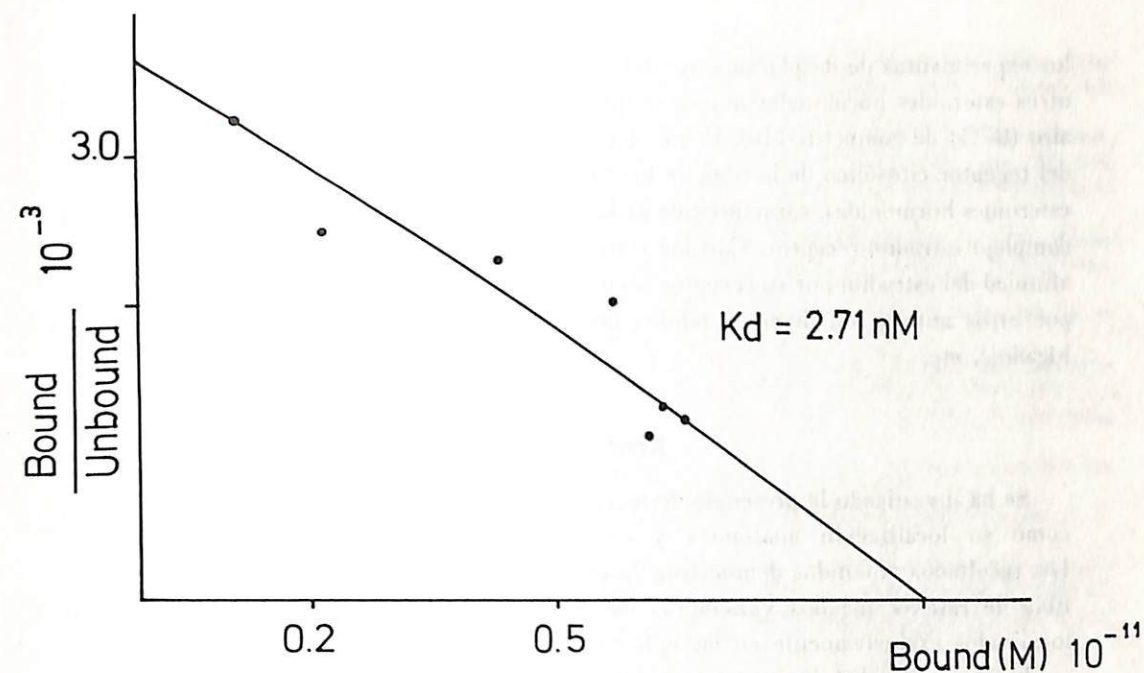


Figura 3.—Representación de Scatchard de la interacción del estradiol con su receptor.

De acuerdo con los conceptos actuales sobre el mecanismo de acción de las hormonas esteroides, los esteroides de estradiol son imprescindibles para una acción directa del estrógeno en el tejido óseo. Aunque intentos realizados para demostrar la presencia de receptores citoplasmáticos de estradiol en huesos largos de rata no han sido satisfactorios^{5, 6, 7}, sin embargo, Chen y Fedman⁷ piensan que puede haber diferencias entre especies. En este sentido es importante señalar que Atkins *et. al.*¹ sugieren un efecto directo del estradiol sobre las células óseas, demostrable en cultivos de osteocitos de ratón; la misma especie empleada por nosotros. La posibilidad de que la interacción del estradiol con componentes de la fracción citosólica del hueso detectada por nosotros pudiera ser debida a la presencia de alfa-fetoproteína fue descartada mediante inmunodifusión¹¹, utilizando anticuerpos específicos contra la alfa-fetoproteína.

Los resultados obtenidos sobre la localización anatómica de los receptores de estradiol muestran que éstos se encuentran únicamente en la epífisis (Tabla I), lo que no es de extrañar si tenemos en cuenta que las «líneas de crecimiento» de este hueso se encuentran precisamente situadas en esta región del hueso, y que es de esperar que cualquier posible acción de las hormonas esteroides sobre el crecimiento óseo (en peso y longitud), que lleva implícito la presencia de receptores para estos esteroides hormonales, por nosotros demostrado, para que puedan ejercer su acción, la desarrollarían a este nivel de la línea de crecimiento.

En cuanto a los estudios de caracterización de los receptores óseos de estradiol,

los experimentos de desplazamiento del estradiol de su receptor de alta afinidad por otros esteroides hormonales muestran que sólo el estradiol sin marca tiene un nivel alto (87%) de competitividad, lo que demuestra, una vez más, la clara especificidad del receptor citosólico de la tibia de los ratones por el estradiol y no por los demás esteroides hormonales, característica de las interacciones altamente específicas y del complejo estradiol-receptor. Con los estudios de afinidad hemos constatado que la afinidad del estradiol por su receptor óseo es alta, comparable a los valores obtenidos por otros autores en diversos tejidos blanco de estradiol: útero¹³, hipotálamo¹³, hígado¹⁴, etc.

RESUMEN

Se ha investigado la presencia de receptores de estradiol en la tibia de ratón, así como su localización anatómica y su caracterización como tales receptores. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de receptores de estradiol en la tibia de ratones machos y hembras de diferentes edades y que se encuentran localizados exclusivamente en las epífisis.

La competitividad de otros esteroides con el estradiol por el receptor es baja, ya que solamente el estradiol no marcado, en un exceso de 100 veces, desplaza al ³H-estradiol-receptor, que, según los datos obtenidos por nosotros, es semejante a la de otros sistemas receptores en tejidos blanco del estradiol.

CHARACTERIZATION OF ESTRADIOL RECEPTORS FROM MOUSE TIBIAE

SUMMARY

Specific estradiol high affinity receptors have been detected in the tibiae of males and females of different age. Estradiol receptors were found in the epiphyses and lack in diaphyses; this finding is consistent with the fact that estradiol is capable of bringing about premature closure of the epiphyses.

Competition experiments reveals that only the unlabeled estradiol displaces the ³H-estradiol and do not testosterone, corticosterone and progesterone. Schatchard analysis allows to estimate Kd of estradiol-receptor interaction as 2.71 nM, similar to those of estradiol-receptors in several target tissues.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ATKINS, D.; ZANELLI, J. M.; PEACOCK, M., y NORDIN, B. E. C. (1972).—The effect of oestrogens on the response of bone to parathyroid hormone «in vitro». *J. Endocr.*, **54**: 107.
- 2) MARX, J. L. (1980).—Osteoporosis: new help for thinning bones. *Science*, **207**: 628.
- 3) GORSKI, J., y CANNON, F. (1976).—Current models of steroid hormone action: a critique. *Ann. Rev. Physiol.*, **38**: 425.

- 4) NIELSEN, H. E.; SKOVGAARD, H.; OLSEN, K. J.; GADEBERG, C. C., y SCHULTZ, H. (1979).—Bone mineral content and estrogen receptors in patients with breast cancer. *Europ. J. Cancer*, **15**: 703.
- 5) VAN PAASEN, H. C.; POORTMAN, J.; BORGAARD-CREUTZBURG, M. C.; THUISSEN, J. A. H., y DUURSMAN, S. A. (1978).—Oestrogen binding proteins in bone cell cytosol. *Calif. Tiss. Res.*, **25**: 249.
- 6) NUTIK, G., y CRUICKSHANK, R. L. (1974).—Estrogen receptors in bone: an evaluation of the uptake of estrogen into bone cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**: 265.
- 7) CHEN, T. L., y FELDMAN, D. (1978).—Distinction between alpha-fetoprotein and intracellular estrogen receptors: evidence against the presence of estradiol receptors in rat bone. *Endocrinology*, **102**: 236.
- 8) KOREMAN, S. G. (1969).—Comparative binding affinity of estrogen and its relation to estrogenic potency. *Steroids*, **13**: 163.
- 9) SMITH, R. G., y SCHWARTZ, R. J. (1979).—Isolation and purification of a hen nuclear oestrogen receptor and its effect on transcription of chick chromatin. *Biochem. J.*, **184**: 331.
- 10) BENSADOUN, A., y WEINSTEIN, D. (1976).—Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochem.*, **70**: 241.
- 11) OUCHTERLONY, O. (1953).—Antigen-antibody reactions in gels; types of reactions in coordinates systems of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **32**: 231.
- 12) SCATCHARD, G. (1949).—The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**: 660.
- 13) WHITE, J. O.; THROWER, S., y LIM, L. (1978).—Intracellular relationships of the oestrogen receptor in the rat uterus and hypothalamus during the oestrus cycle. *Biochem. J.*, **172**: 37.
- 14) GSCHWENDT, M. (1977).—A cytoplasmic high affinity estrogen-binding protein in the embryonic chicken liver. *Eur. J. Biochem.*, **80**: 461.