AISLAMIENTO DE RECEPTORES ESTROGENICOS DE UTEROS DE CONEJA POR CENTRIFUGACION SIMPLE: EFECTO DEL CARBON DEXTRANO, ETANOL Y SOLUCIONES TAMPON TRIS-HCl (pH 8.0) y FOSFATO (pH. 7.4).

Por

JAIME A. RAMIREZ P.
Estudiante Graduado
Escuela de Pos-Grado U.N.-I.C.A.

1. INTRODUCCION

Debido a las dificultades en la utilizacion de los Recursos tecnologicos adecuados para el aislamiento de - receptores estrogenicos uterinos segun la tecnica descrita por Corker (8), se ensayo la posibilidad de hacer la separacion de estos por centrifugacion simple, utilizando uteros de coneja cuyos extractos citosolicos fueron suspendidos en soluciones Tampon TRIS-HCl o de Fosfato. Durante el proceso se evaluo el efecto del - Carbon-Dextrano y/o del Etanol como recursos para la adsorcion o solubilizacion del exceso de Estradiol endogeno presente en el tejido, con el proposito de obtener receptores "libres" de la hormona.

El analisis de los resultados y la escogencia del procedimiento se hace por evaluacion cualitativa comparando las graficas de Porcentaje de enlace obtenidas con las curvas idealeso esperadas.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

La utilizacion de la técnica de saturación, por competencoa, de sustancias estrogenicas por la unión de receptores hormonales esteroidales sigue siendo de interes para el dosage de principios activos similares a las hormonas sexuales, con el propósito del

desarrollo de la investigacion básica o de la aplicacion clínica.

Se entiende por análisis de saturación (1) al ensayo en el cual el compuesto que se desea determinar satura progresivamente a un reactivo específico.

Este tipo de análisis presente multiples posibilidades para cualquier molécula que se quiera dosar en cualquier medio, siempre que se encuentre un reactivo específico de este y que se pueda - marcar la molécula con un isótopo radiactivo.

Los métodos de cuantificacion han venido evolucionando en tal forma que las técnicas procean una sensibilidad y especificidad cada vez mayores.

El método biológico de Allen y Doisy, consistente en la observacion de los cambios citológicos vaginales durante el ciclo estral de la ráta, es impreciso y no cuantificable.

Desde 1931, métodos cuantitativos han sido introducidos con base a la reaccion química cromógena del hidroxilo del anillo A del esteroide hormonal. Este método fue desarrollado por Kober y parcialmente modificado por Ittrich quien encontró que los cromógenos de Kober pueden ser extraídos y medidos fluorométricamente en microcelulas lo cual mejora la sensibilidad. Simultaneamente, Mead (2), describió un método para cuantificacion de 17-B Estradiol utilizando un derivado, la pentafluorofenilhidrazona para la determinacion por Cromatografia de gases mediante el recurso del detector de captura electrónica.

Murphy (3), demostró que tanto Estradiol como Testosterona se enlazan a sitios comunes sobre una Globulina del plasma. Esta afinidad conllevó al desarrollo de la Técnica por competencia proteica para la determinacion de Estradiol. Este posee una mayor afinidad por la proteina del tercer mes de embarazo (4). Sinembargo,la Glo

buMina es poco específica.

Jensen y Jacobson (5), desarrollaron un método de competencia proteica utilizando proteinas del útero como enlazantes de Estradiol. Korenman (6), perfeccionó la técnica, obteniendo un método muy sensible y altamente específico, que eliminaba los pasos de extracción del Estradiol a partir del plasma sanguineo. L

Los receptores pueden aislarse de uteros de coneja (Korenman)(7), Corker et al (8); o de ternera (9), etc.

El método mas recientemente desarrollado para la determinacion de niveles hormonales es el Radioinmunoensayo Directo en fase solida.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Biológicos

Se obtienen uteros de conejas recien sacrificadas, los cuales se echan en agua destilada mantenida a 4°C, hasta cuando se efectue el desgrase manual de estos, lo cual debe hacerse de inmediato, preferencialmente. El color rosado pálido de los úteros es un - criterio del estado fisiológico óptimo del ciclo estral para el aislamiento de receptores. Los úteros no deben usarse en condicio_ nes hemorrágicas o de congestion sanguinea.

3.2. Materiales y Equipos

- Nevera congelador
- Homogenizador celular
- Centrifuga refrigerada hasta de 5000 rpm.
- Pipetas de 10 ml.
- Micropipetas automáticas Eppendorf de 50,100,200 y 500 Landas.
- Equipo de diseccion.

3.3. Reactivos

- Buffer TRIS-HCl, Sacaorsa .25 M., pH 8.0
- Buffer Fosfato pH 7.4
- Soluciones de Etanol de 5, 10 y 15 % (Concentracion final)
- Solucion de Carbon-Dextrano (0.05 de Dextrano y 0.5 % de Carbon)

3.4. PROCEDIMIENTO

3.4.1. Fraccionar los uteros desgrasados. Echarlos en Buffer manteniendo una relacion 1:2 (P:V)

3.4.2. Provocar la ruptura celular del tejido uterino utilizando un Homogenizador celular de alta velocidad (10-12 x 10^3 rpm.) con pulsos alternantes de 15" a Temperaturas menores a 4 ^{o}C.

3.4.3. Centrifugar a 5000 rpm a 0-4 ^{o}C por 15'. Separar el sobrenadante.

3.4.4. Adicionar al sobrenadante, el Carbon Dextrano o las soluciones de Etanol manteniendo una relacion final de 10:1 (V:V) de fraccion citosolica y adsorbente o solvente. Agitar y guardr en nevera por 15'.

3.4.5. Centrifugar a 4500 rpm a 0-4 ^{o}C. por 30'. Separar el sobrenadante.

3.4.6. La fraccion soluble obtenida se alicuota en biales de e 2 ml. y se guarda congelado hasta el dia del ensayo de Porcentaje de enlace o la elaboracion de la Curva concentracion respuesta (ver Fig. 1).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Efecto del Buffer

Por compracion se observo el efecto de la solucion Buffer TRIS-HCl, Sacarosa 0.25 M, pH 8.0 y el Buffer Fosfato, pH. 7.4

Una de las soluciones tampon (Buffer Fosfato) se proLo incremen-

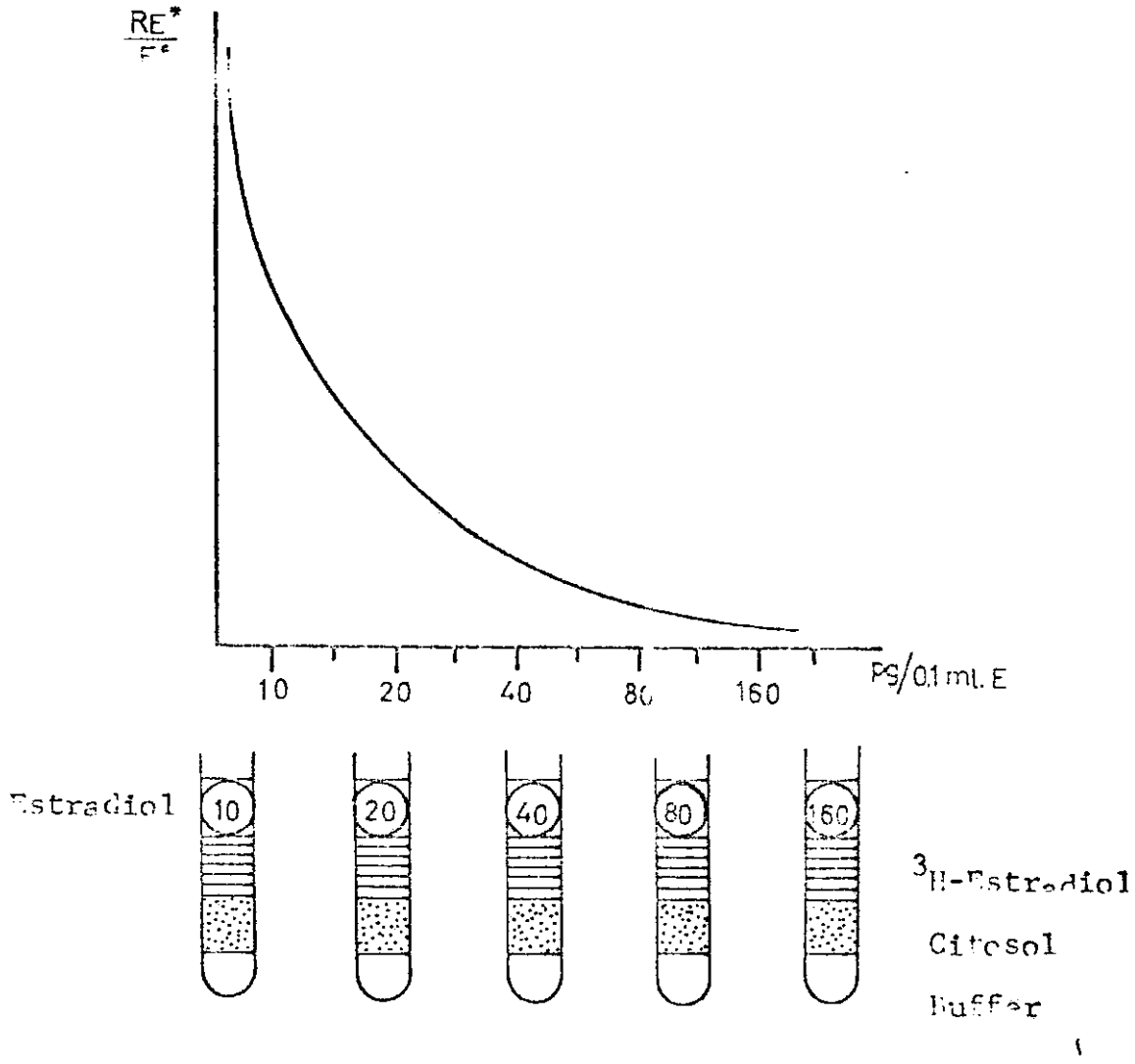

Figura 1 ; Curva de concentración respuesta. La serie de tubos contienen cantidades constantes de H-Estradiol (E*). Receptores (R) y el medio buffer y cantidades conocidas y crecientes de Estradiol frío (E). Luego de llegar al equilibrio, se separa, la fracción de moléculas trazadoras libres (E*) de la fracción de los moléculas trazadoras unidas a los receptores (R-E*). Se cuenta la radioactividad de cada fracción y su relación R-E*/E* se representa en función de la concentración de Estradiol frío (E).

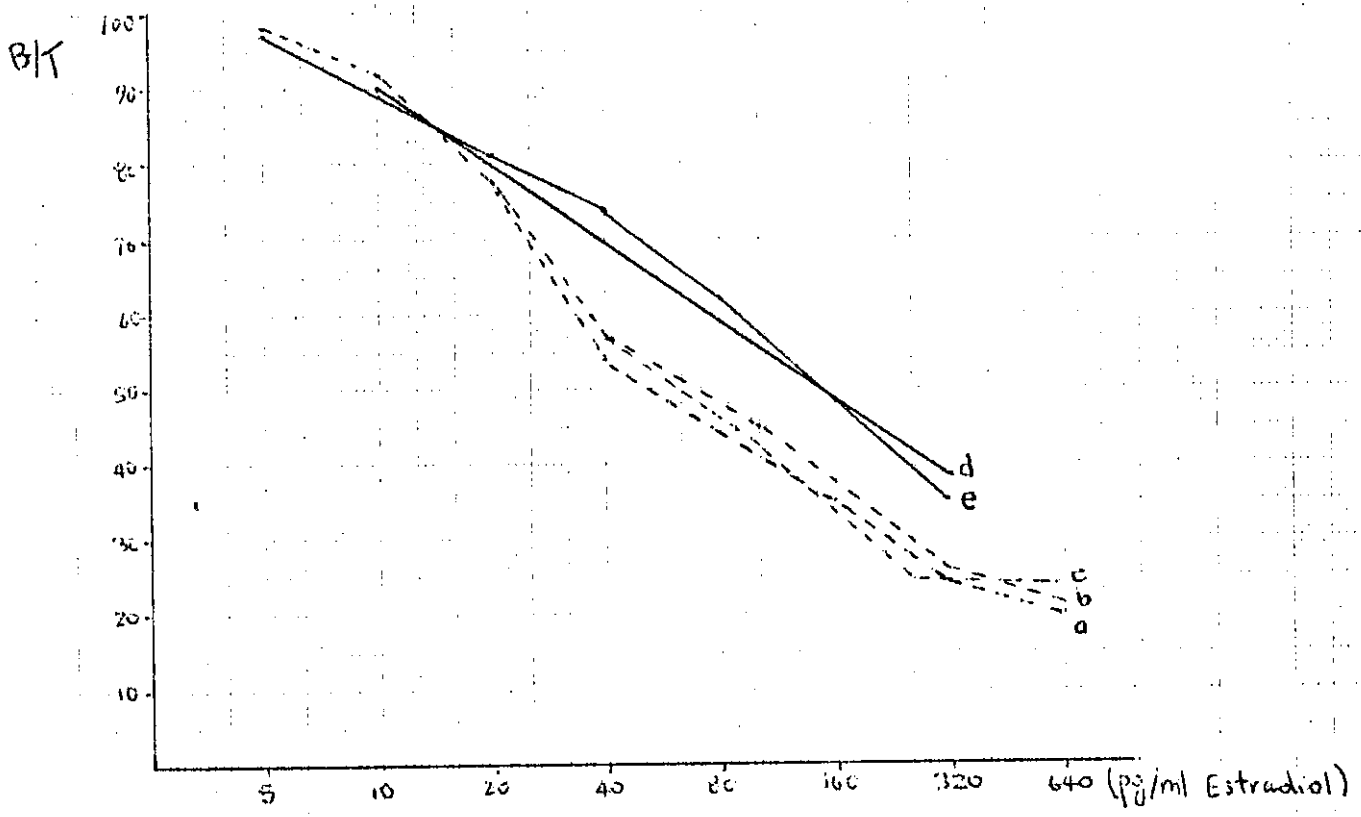

FIG. 2. Curva de Concentración respuesta de Receptores estrogénicos suspendidos en solución Buffer TRIS-HCl (a,b,c) y Fosfato (d,e).

tando en 50% su fuerza iónica.

Los resultados se presentan en la Fig. 2. Las Curvas a, b y c presentan una mayor pendiente comparadas con d y e, lo cual nos permite inferir que la estabilidad de los receptores es mayor en soluciones Tampon TRIS-Hcl que en Fosfato. Puesto que la pendiente de las curvas es un indicativo de la afinidad de los receptores por el 17-B Estradiol, se puede concluir que el incremento de la Fuerza iónica afecta la estabilidad de la estructura cuateraaria del receptor (Curva e) probablemente por disociacion parcial de una de las dos fracciones proteicas que lo integran o bien por alteracion de los sitios de union especifica, que conllevan ademas a una disminucion de la sensibilidad (Curvas d y e).

Si bien las curvas a,b y c , muestran un mejor comportamiento, no son las óptimas. Podria arguirse una poblacion baja de receptores o bien un exceso de Estradiol endógeno que desplazaria mayormente al Estradiol-^{3}H , no permitiendo el equilibrio en la reaccion de Competencia proteica.

De cualquier forma, la tendencia de las curvas nos permiten seleccionar al Buffer TRIS-HCl como el mas adecuado tal y como lo indican Korenman (6,7), Corker et al (8), Zimmenning et al (10).

4.2. Efecto de la cantidad de Receptores

Con Buffer TRIS-HCl, Sacarosa 0.25 M., pH 8.0, se establecio el porcentaje de enlace de concentraciones diferentes de Receptores (50, 100 y 200 lambdas de citosol).

Con 50 y 100 lambdas de citosol se obtienen curvas paralelas con pendientes similares, lo cual primeramente nos indica la reproducibilidad del método,(ver Fig. 3). Se refuerza esto por el hecho de que la curva de 50 lambdas es comparable a las obtenidas con Buffer TRIS-HCl de la Fig. 2 con lamisma concentracion de receptores.

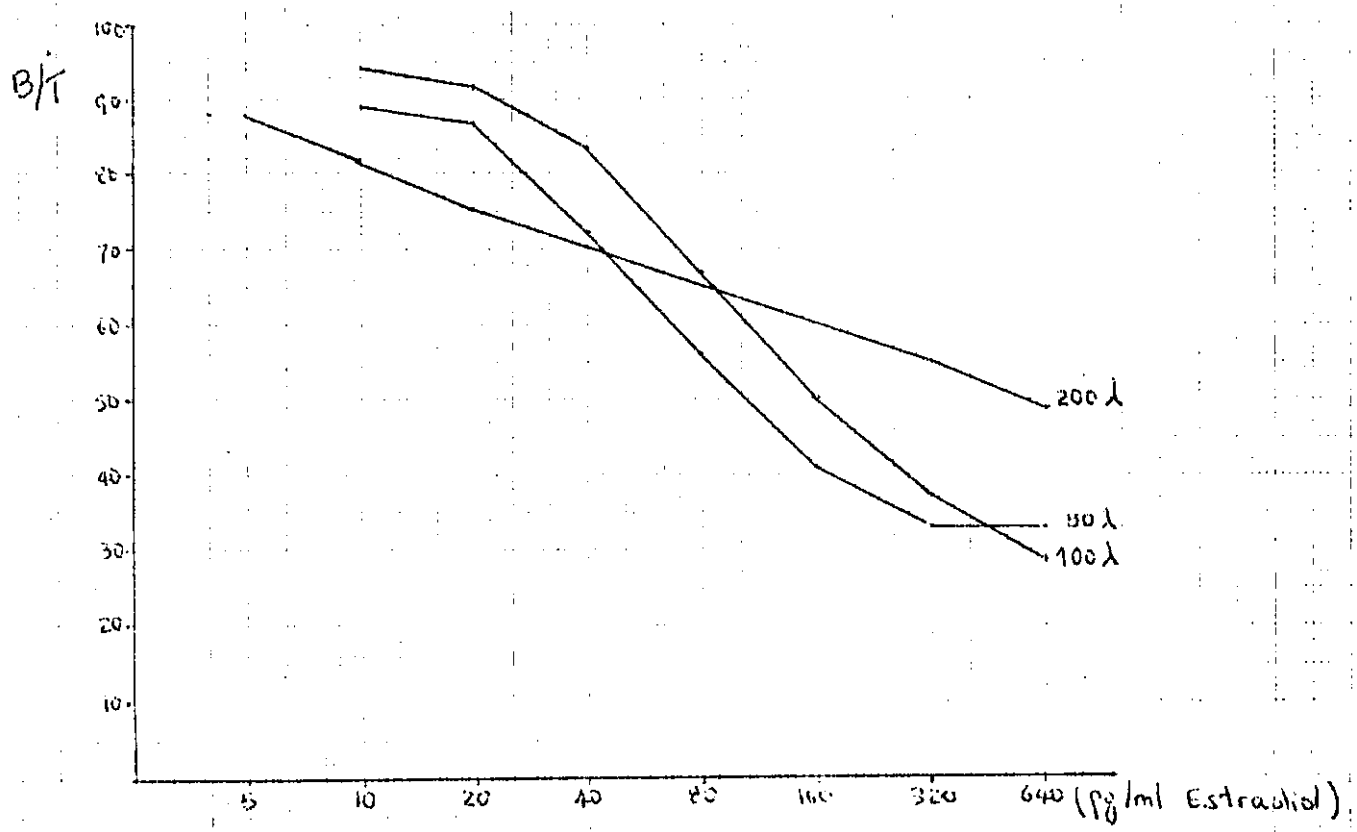

FIG. 3 Porcentajes de enlace y curvas de concentración respuesta de diferentes concentraciones de Receptores (50, 100 y 200 λ de Citosol).

El desplazamiento mayor, hacia la derecha, de la Curva de 100 lambdas (Fig. 3) con la misma pendiente de la de 50 Lambdas, nos indica la presencia de una poblacion de receptores con afinidad por el Estradiol, similar, pero con menor sensibilidad. A mayor concentracion de receptores (200 lambdas, Fig. 3), la pérdida de afinidad y sensibilidad del ensayo es ostensible. Aparentemente, este resultado contradice lo esperddo, sinembargo puede evaluarse la alternativa planteada acerca del exceso de Estradiol endógeno presente en los citosoles debido a los niveles fisiológicos circulantes de esta Hormona, en el momento de la extraccion de los úteros.

4.3. Adsorcion de Estradiol endogeno por Carbon-Dextrano

La Fig. 4, muestra el efecto del "lavado" previo, con Carbon-Dextrano, de los receptores presentes en 100 lambdas de citosol (Curva b) comparada con su patron (curba à) y la Curva patron c, obtenida de la Fig. 3.

No existen diferencias aparentes entre las curvas a y b pero si entre estas y la curva c.

La perdida de afinidad de los receptores "lavados" previamente con Carbon-Dextrano (b) o no (a) puede ser una consecuencia del deterioro paulatino de los receptores por la congelacion y descongelacion de los citosoles o cualquier otra causa no explicable.

4.4. Solubilizacion de Estradiol endógeno por adicion de Etanol al medio de incubacion de receptores estrogénicos.

Bajo las mismas condiciones del ensayo anterior y con los mismos citosoles se evaluo el efecto de adicion de Etanol (concentraciones fínales de 10,15 y 25 %) a los receptores a los que simultaneamente se "lavan" con Carbon-Dextrano.

La Fig. 5, repr4senta la tendencia y la respuesta de citosoles (100 lambdas) sin adicion de Carbon -Dextrano (linea interrumpi-

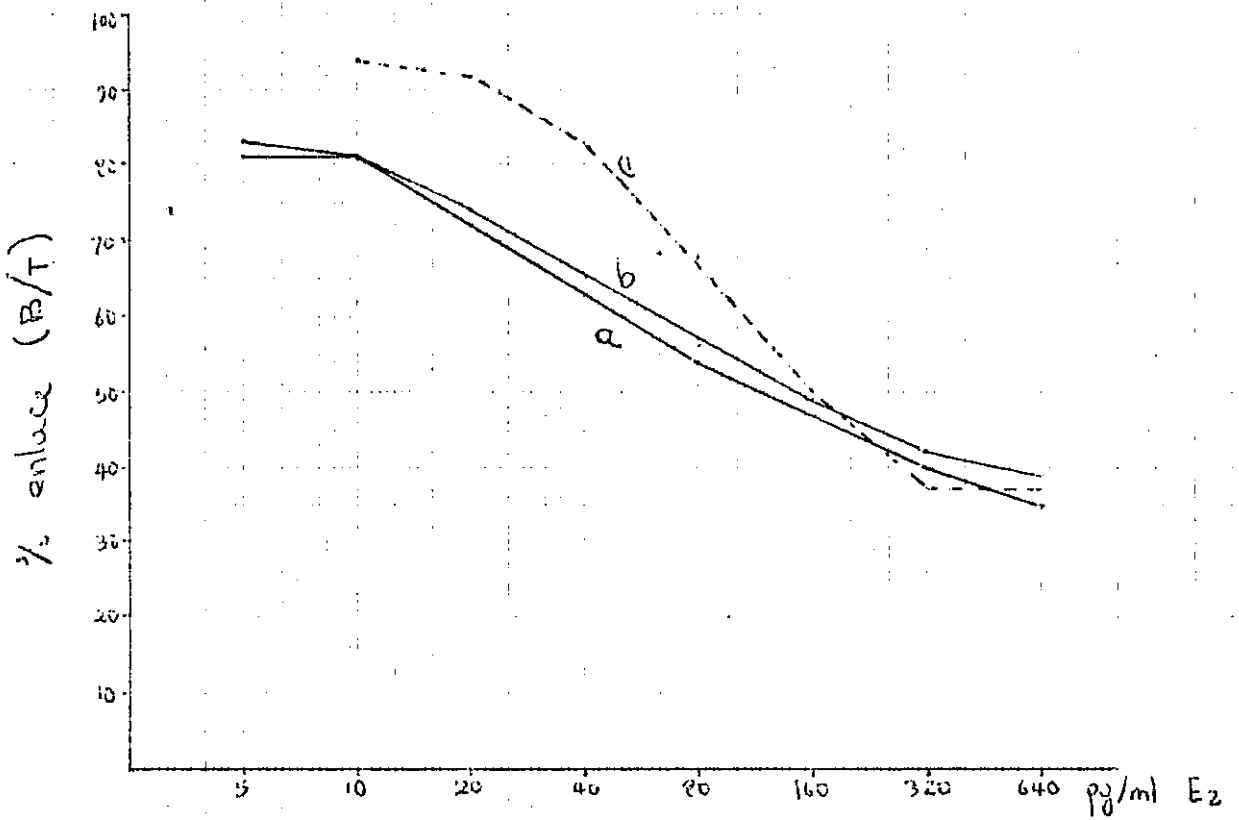

FIG. 4. Efecto del "prelavado" con Carbón-Dextrano de los Receptores estrogénicos sobre su comportamiento de Competencia Radio-receptor.
Curva a: Control interno
Curva b: "Prelavado" con Carbon-Dextrano
Curva c: Curva Patrón obtenida de Fig. 3.

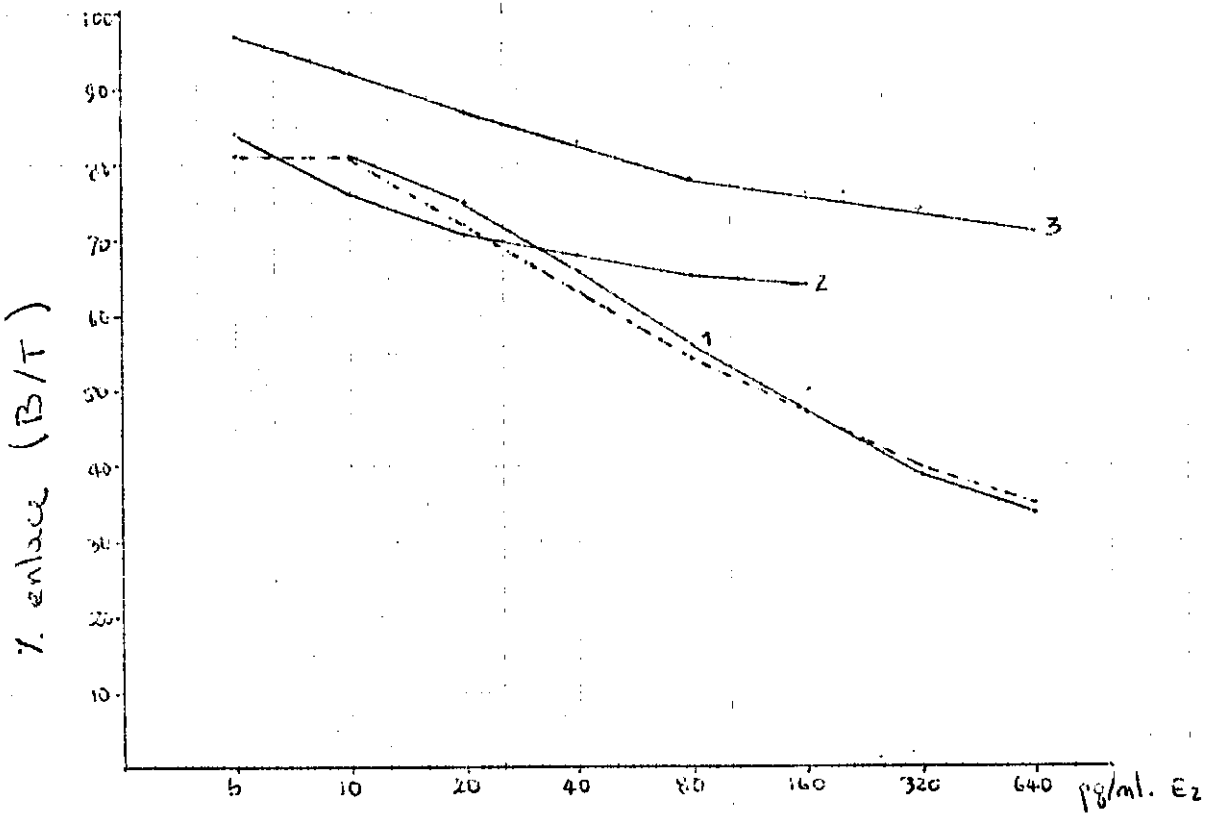

Fig. 5. Respuesta de Receptores estrogénicos "prelavados" con Carbon-Dextrano a los cuales se adicionó Etanol al 10% (curva 1), 15% (Curva 2) y 20% (Curva 3).
Linea interrumpida: Curva patron sin "prelavado"

da. La Curva 1, muestra el comportamiento de receptores a los cuales se adiciona Carbon-Dextrano y Etanol al 10 %. Si se compara con la Fig.anterior, la adicion del etanol no altera la respuesta de procentaje de enlace ya sea que se agregue o no Carbon Dextrano. Sinembargo, las curvas 2 y 3 de la Fig. 5, evidencian los efectos dramáticos de laadicion de Etanol a 15 y 25 % produciendo una paérdida casi total de la afinidad de los receptores por el 17-B Estradiol. De hecho, bien puede afirmarse que por encima del 10% de Etanol la naturaleza proteica de los receptores estrogenicos es completamente alterada.

4.5. Utilizacion de receptores frescos no congelados

La Fig. 6, ruestra la Curvas concentracion Respuesta de citosoles ensayados inmediatamente sin "lavado previo" de receptores (curva 1), con lavado previo de receptores (Curva 2) comparadas con la curva 3, patron de los ensayos anteriores, obtenida despues de mantener los citosoles congelados por algun tiempo y obviamentedescongelados para el ensayo.

En general, se puede deducir que la respuesta de los receptores de la Curva 1, es mejorada con la adicion previa de Carbon-Dextrano (Curva 2) cuya pendiente revela una alta afinidad y una gran sensibilidad. Comparativamente con la Fig. 3, se podria afirmar que el efecto de descongelacion podria incidir en la viabilidad del ensayo.

5. CONCLUSIONES

5.1. La solucion Buffer TRIS-HCl, Sacarosa 0.25 M., pH 8.0 es mas adecuada para el ensayo de competencia Radio-Receptor que la de Fosfato pH 7.4

5.2. El incremento de la Fuerza ionica de la solucion tampon conlleva a una perdida de afinidad, por los Receptores, del 17-B Estradiol.

5.3. El Etanol, por encima de una concentracion del 10% , afecta drasticamente la naturaleza de los Receptores.

5.4. Aparentemente, la descongelacion de los citosoles o

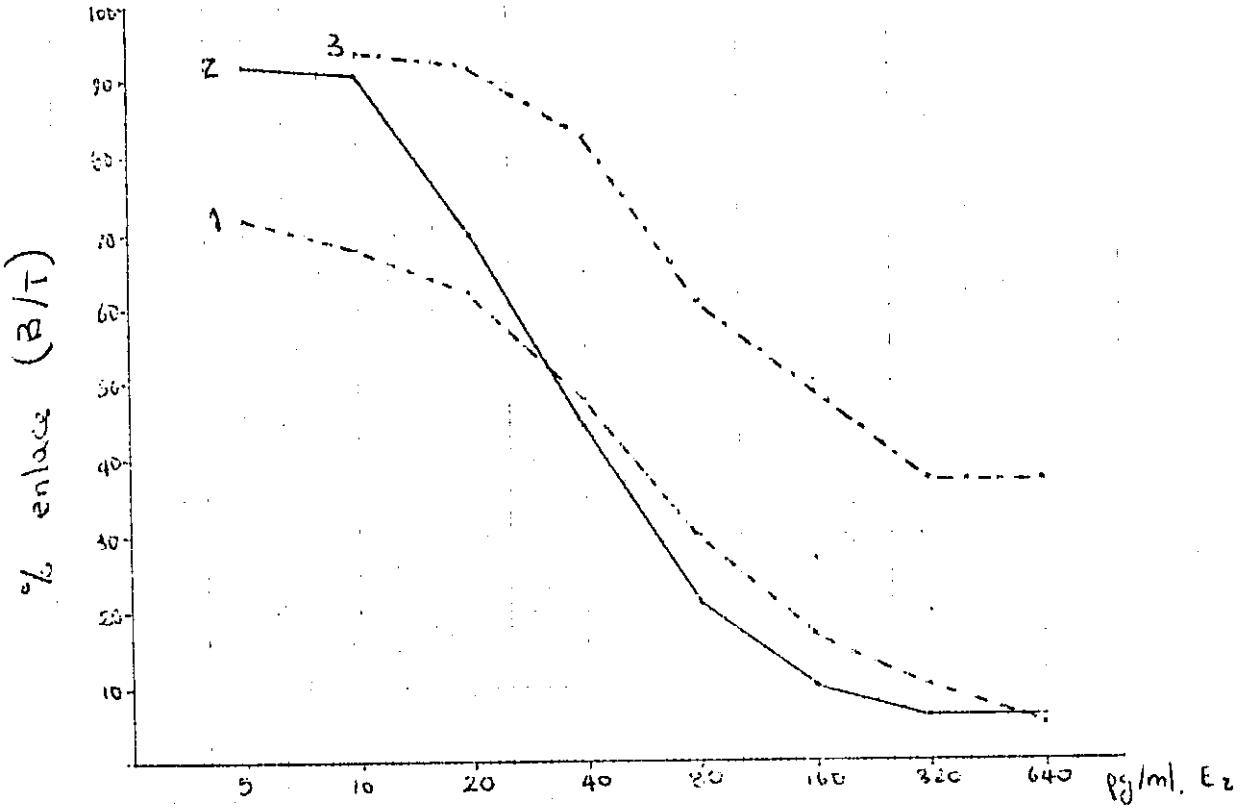

FIG. 6. Curva concentración-Respuesta de Receptores recien aislados (1) y "Prelavados" con Carbon-Dextrano (2) ó despues de la congelación y Descongelación de Citosoles (3).

la congelacion por periodos prolongados afecta la viabilidad del ensayo

5.5. Aparentemente, el "lavado"previo de los receptores con Carbon-Dextrano mejora lascondiciones de la Competencia Proteica Radio-Receptor.

BIBLIOGRAFIA

1. EKINS, R. P.; NEWMAN, G. B.;O'RIORDAN, J.L.H. En Radioisotopes in Medicine: "in vitro" studies (Eds. HAYES R.L.; GOSWITZ, F.A.; PEARSON-MURPHY.B.E.; ANDERSON,E.); USAEC, Conf. 671111, p. 59, .968.

2. MEAD, R.A.; HALTMEYER, G.C. Methods for the determination of free estradiol in peripheral plasma by gas fase chromatography. J. CHROMAT. SCI. 7:554, 1969

3. MURPHY, B.E.P. Binding of Testosterone and Estradiol in plasma. CAN. J. BIOCHEM. 46:229, 1968

4. DUFAU,M.L,; DULMAIS, A.;KEVIN, J.C.; HUDSON, B. Measurement of plasma estradiol-17 B competitive binding assay employing pregnancy plasma. J. CLIN. ENDOCRINOLOGY 28:127, 1969.

5. JENSEN, E.; JACOBSON,H.I. Recent. Progr. Hormon. Res. 18;387, 1962.

6. KORENMAN,S.G. Radio-ligand binding assay of specific estrogens using a soluble macromolecules . J. CLIN. ENDOCRINOL. 28:126, 1968

7. KORENMAN, S. G.; PERRIN, L. E.; McCALLUM, T. P. A Radio-ligand Binding Assay system for Estradiol Measurement in Human plasma. J. CLIN. ENDOCR. 29:879, 1969

8. CORKER, C.S.; EXLEY, D.; NAFTOLIN, F. Assay of 17-B Estradiol by competitive protein binding methods. ACTA ENDOCRINOLOGICA. Suppl. 147: 305, 1970

9. GIOVANI, A. P.; NOLA, E.; SICA, V.; BRESCIANI, F. Estrogens binding proteins of calf uterus. Interralation ship between various forms and identification of a receptor transforming factor. BIOCHEMISTRY 40 (11): 4157, 1972