

11262
2 ej 5



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**Facultad de Medicina,
División de Estudios de Posgrado
Instituto Mexicano del Seguro Social**

Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Endocrinas

**"CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DEL RECEPTOR
PARA CORTISOL EN HIPOFISIS HUMANA"**

T E S I S

Para obtener la Maestría en

CIENCIAS MEDICAS

p r e s e n t a

DRA. MIRZA ELIZABETH FLORES GARCIA



Tutor: Dr. Arturo Zárate Treviño

México, D. F , 1987

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ANTECEDENTES

En el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas participan una serie de eventos entre los que destacan por su importancia: 1) el libre paso del esteroide al interior de la célula, 2) la unión a un receptor específico en el citoplasma celular, 3) el transporte de este receptor al interior del núcleo, 4) su unión al DNA, 5) la síntesis de RNA polimerasas y de RNA mensajero, de transferencia y ribosomal, y 6) la síntesis de proteínas específicas a nivel citoplasmático que van a ejercer el efecto biológico de la hormona esteroide en cuestión (Fig. 1). Los receptores para hormonas esteroideas son moléculas cuya función es la de ser mediadores de la acción hormonal y se localizan en el citoplasma de las células efectoras. Los receptores son moléculas de naturaleza protéica, por lo tanto, termolábiles y no resisten a la acción de las proteasas. Su peso molecular se encuentra entre 250,000 y 350,000, con un coeficiente de sedimentación entre 7 y 9 unidades Svedberg.

Después de la difusión al interior de la célula, el esteroide se une en una reacción de equilibrio a su receptor, en forma reversible, constituyendo un complejo no covalente de alta afinidad. Con la unión de la hormona, el receptor sufre una "transformación" hacia una conformación que es capaz de unirse al DNA. La activación o transformación es un proceso irreversible que resulta en la estabilización de la unión del glucocorticoide y capacita al receptor para trasladarse al núcleo y poder unirse así al DNA. La interacción con el DNA resulta en una activación, o represión, específica de genes que son regulados por glucocorticoides, para su transcripción (1-6).

La mayor información existente respecto al receptor para glucocorticoides es en diversos tejidos animales (7-19), lo que ha permitido la caracterización de algunas de sus constantes físico-químicas. El receptor para glucocorticoides se ha estudiado en algunos tejidos humanos como placenta, linfocitos y glándulas suprarrenales; sin embargo, en nuestro conocimiento sólo existe un estudio de tejido cerebral con mínima y confusa información sobre hipófisis (20-23). El conocimiento del receptor para cortisol en hipófisis humanas reviste particular interés por ser esta glándula uno de los sitios más importantes donde se ejercen los finos mecanismos de retroalimentación sobre ACTH, a fin de mantener la homeostasis en los niveles séricos del cortisol (18,24,25).

En los estudios *in vitro* de los receptores, el esteroide se une en forma específica a la proteína receptora, pero también puede unirse a cualquier otra proteína o molécula (carbohidratos, grasas, etc.) inespecíficamente, por lo tanto los criterios para la identificación de un receptor son: 1) capacidad de unión limitada.- Indica que existe un número limitado de sitios para unir el esteroide y por lo tanto es un sistema saturable. Los estudios de saturabilidad se llevan a cabo exponiendo al receptor a concentraciones crecientes del esteroide radiactivo y midiendo la cantidad de esteroide unido y libre una vez que se ha logrado el equilibrio de la reacción; 2) alta afinidad.- Las cantidades fisiológicas circulantes de esteroide son muy pequeñas (entre 10^{-10} y 10^{-8} mol/L), por lo tanto los receptores deben poseer una alta afinidad para su respectiva hormona. La unión que se establece entre hormona y receptor en una reacción de equilibrio, es débil, no covalente y reversible, por lo cual es una unión desplazable. Esta característica se utiliza en el análisis de Scatchard, poniendo a competir a la hormona marcada isotópicamente con excesos de hormona no marcada, por los sitios de unión de los receptores. A través de este estudio podemos conocer las constantes de afinidad del complejo hormona-receptor; 3) alta especificidad.- El receptor es altamente discriminativo, por lo que une solamente a una hormona específica con características químicas bien definidas. A este respecto el cortisol es una molécula esteroidea de 21 átomos de

carbono cuyos grupos químicos (OH) ubicados en los carbonos 17, 21 y 11 tienen un papel determinante en cuanto al reconocimiento del receptor específico. Esta especificidad permite a una célula efectora responder a una señal hormonal sin interferencia de otras señales; sin embargo, la estereo-especificidad no es absoluta, ya que el sitio de unión en el receptor tiene una capacidad limitada para el reconocimiento y diferenciación de ligandos parecidos a su hormona primaria y por lo tanto similares en su estructura química. Estos ligandos funcionan como agonistas o antagonistas y pueden competir por un mismo receptor, mientras que no afectan otros sistemas de receptores. La especificidad se determina mediante estudios de desplazamiento, utilizando excesos crecientes de diversas hormonas "frías" (2,5).

Para analizar la naturaleza de los receptores citoplásmicos, se han utilizado una serie de métodos. Estos métodos diferencian al receptor específico de alta afinidad y baja capacidad, de la unión inespecífica a otras moléculas que tiene baja afinidad y alta capacidad -no saturable-. Para el estudio de la unión hormona-receptor, se incubó una preparación con una concentración constante del receptor y con concentraciones variables de la hormona tritiada, que cubran un margen de 0.1 a 10.0 veces la mitad de la concentración de saturación. La hormona y el receptor interactúan para formar un complejo hormona-receptor de acuerdo con la ley de acción de masas. La unión específica

se grafica en el eje de las ordenadas y la concentración de hormona libre en el eje de las abscisas. Cuando se alcanza la saturación del receptor, la unión específica adopta una meseta, originándose una hipérbola rectangular que comprende teóricamente por lo menos 10-90% de los receptores ocupados (Fig. 2). La formulación matemática corresponde a la cinética de equilibrio rápido, empleada en la derivación de la ecuación de Michaelis-Menten.

$$RS = \frac{R+S}{kd+S}$$

Una vez alcanzado el equilibrio, es posible calcular la constante de disociación (Kd) y la constante de asociación (Ka); parámetros que indican la afinidad de la hormona por su receptor. La Kd es la concentración de hormona que une el 50% del receptor. Esto significa que entre menor sea la Kd, será mayor la afinidad (Ka) de la hormona por su receptor. El punto de saturación es igual al número de sitios receptores (n o R_t). Aunque se pueden hacer estimaciones razonables de R_t y Kd a partir de la curva de saturación, esto no es lo óptimo. El análisis de Scatchard es uno de los métodos más útiles para el estudio de un sistema de receptores y consiste en la linearización de los datos anteriores que forman una hipérbola rectangular, ajustándolos a la ecuación de la recta (y=mX+a) como se muestra en la Fig. 3. Esto permite un cálculo fácil de R_t y de la Kd. En

el eje de las abscisas se grafica la unión específica y en el eje de las ordenadas se grafica la relación unión específica/hormona libre. El intercepto con el eje de X representa R_t y la pendiente de la línea es igual a $\frac{-1}{K_d}$ (2,4,5,26).

Algunos sistemas de receptores contienen dos o más sitios de unión específica que unen al mismo esteroide con alta afinidad -cada uno con afinidad y capacidad propias- (Fig. 4). Esto hace el análisis de los parámetros de unión más complejo. En el caso del receptor para glucocorticoides, algunos estudios han informado dos o más sitios de unión en tejidos como el hígado (7) y el cerebro (19,23). Para resolver este tipo de sistemas con componentes múltiples, lo ideal es la separación física de las partes mediante procedimientos de purificación. Sin embargo, esto generalmente no es posible por las grandes cantidades de tejido que se requieren, debido a las pequeñas cantidades de receptor que contiene (5). Otros métodos para resolver sistemas mixtos son el análisis gráfico o vectorial (27, 28) y la inhibición diferencial de algunos de los componentes del sistema, haciendo uso de su especificidad hacia cierto ligando (2,5).

JUSTIFICACION

El estudio de receptores hormonales ha cobrado importancia no

sólo por ser los mediadores de la acción hormonal en la célula, sino porque además se ha demostrado que existen enfermedades por alteración primaria de receptores, como son por ejemplo: los síndromes de feminización testicular completa e incompleta, la diabetes insulino-resistente, y otros. El estudio de receptores para cortisol en hipófisis humana, puede permitir una mejor comprensión de los mecanismos que participan en la regulación de la secreción de ACTH en condiciones normales, y puede contribuir al esclarecimiento de la fisiopatogenia de algunos padecimientos como es la enfermedad de Cushing en donde se encuentran alterados tales mecanismos (29).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las características físico-químicas del receptor para cortisol en el citosol de hipófisis humana?

Sabemos que en este sitio existen receptores para cortisol (23), pero no han sido adecuadamente caracterizados.

¿Las características de este receptor en células hipofisarias son similares a las informadas para el mismo receptor en otros tejidos?

La caracterización del receptor para cortisol en otros tejidos humanos ha demostrado constantes de afinidad semejan-

tes (20, 22). Dado que la hipófisis es un sitio muy importante para la retroalimentación negativa por cortisol, que mantiene a la hormona circulante dentro de límites fisiológicos, pudiera esperarse que el receptor para cortisol en esta glándula tuviera características peculiares.

¿El receptor es único o múltiple?

En algunos tejidos como el hígado y el cerebro se ha informado que existe más de una población de receptores para glucocorticoides (7, 18); lo mismo pudiera ocurrir en un tejido como la hipófisis.

HIPOTESIS

En el citosol de hipófisis humana existe un receptor para cortisol que puede ser identificado a través del estudio de sus constantes físico-químicas.

OBJETIVOS

1.- Determinar las condiciones óptimas para el estudio del

receptor citosólico para cortisol en hipófisis humana.

- a) concentración de proteínas
- b) tiempo de incubación
- c) temperatura de incubación
- d) pH de amortiguadores

2.- Determinar las características físico-químicas del receptor citosólico para cortisol en hipófisis humana.

- a) especificidad
- b) saturabilidad
- c) K_d , K_a
- d) número de sitios de unión

MATERIAL

Se estudiaron 300 hipófisis, macroscópicamente sin patología, que se obtuvieron mediante necropsia efectuada durante las primeras 6 horas en cadáveres conservados a 4°C. Los individuos, con un promedio de edad de 46 ± 24 años, no tenían antecedentes de sintomatología relacionada con la hipófisis ni de ingesta de glucocorticoides durante su última enfermedad. Inme-

diatamente después de obtenerse el tejido, se congeló en nitrógeno líquido, en donde se conservó hasta su procesamiento. Los compuestos tritiados que se utilizaron fueron 1, 2, 6, 7 ³H-cortisol y 1, 2, 4, 6, 7 ³H-dexametasona (Amersham), con una actividad específica de 100 y 70 Ci/mmol respectivamente. Las hormonas no marcadas que se utilizaron fueron cortisol, dexametasona, progesterona, estradiol, testosterona, dihidrotestosterona y aldosterona, las cuales se obtuvieron de Sigma Company. La pureza de los esteroides tritiados y "frfos" se determinó mediante cromatografía en columna con Sephadex LH-20 (Pharmacia) y mediante cromatografía en placa delgada (Fig. 5 y 6). Los demás reactivos fueron todos de un alto grado de pureza.

Se utilizó como equipo un politrón Kinemática CH-6010 Kriens-LU (Brinkman Instruments), ultracentrifuga Beckman L8-80 con un rotor Ti 80, centrifuga refrigerada IEC PR-J (Damon/IEC Division) y un contador de centelleo Packard Tri-Carb modelo 3380-544 con una eficiencia de conteo de 40%.

MÉTODOS

Cada uno de los procedimientos se efectuó a una temperatura

entre 0-4°C. Previa trituración, el tejido se homogeneizó con el politrón (un pulso de 15 s) en amortiguador TEMD-G (Tris-HCL 25 mM, EDTA 1 mM, Na_2HPO_4 10 mM, dithiothreitol 5 mM y glicerol 20%, pH 7.5 a 22°C) a una dilución 1:8. El homogenado se centrifugó a 105,000 g durante una hora, con lo cual se obtuvo la fracción citosólica, que posteriormente se sometió a tratamiento con carbón-dextrán (0.5 g de carbón con 0.05 g de dextrán T-70, en 100 mL del amortiguador TEMD-G) durante 30 min, agitando constantemente, a fin de quitar los esteroides endógenos. Para la curva de saturación y el análisis de Scatchard, el citosol se incubó con concentraciones crecientes de ^3H -cortisol ó ^3H -dexametasona (0.5 - 10 nmo/L) en presencia y en ausencia de 200 veces la hormona fría en el caso del cortisol y de 5 veces en el caso de la dexametasona. Para separar la fracción libre del esteroide de la fracción unida, al término de la incubación se efectuó tratamiento con carbón-dextrán durante 10 min, y se centrifugó durante 15 min a 3000 g. Se tomó una alícuota del sobrenadante, la cual se sometió a conteo de radiactividad. Para conocer las condiciones óptimas del ensayo de receptores para cortisol, se incubó el citosol con una cantidad constante de la hormona marcada y de la fría, fijándose así mismo el resto de las

condiciones, excepto aquella en estudio. Para los estudios de desplazamiento se incubó el citosol con una cantidad constante de la hormona marcada durante 18 horas y se agregaron concentraciones crecientes de cada hormona fría (50x - 5000x). La determinación de proteínas se efectuó por el método de Lowry (30).

RESULTADOS

Optimización de las condiciones para el estudio de la unión del receptor de cortisol en citosol de hipófisis humanas.- La incubación de una concentración creciente de citosol con una concentración constante de ^3H -cortisol, en presencia y en ausencia de un exceso de 200 veces la hormona fría, mostró una máxima unión específica a una concentración de proteína de alrededor de 8 mg/mL (Fig. 7). La temperatura en la que se logró la óptima unión fue entre 0-4C, mientras que incubando a una temperatura ambiente (24C) la unión específica se redujo en un 97% (Fig. 8). La incubación realizada a diferentes tiempos, mostró como óptimo 18 horas para el caso del cortisol, mientras que para ^3H -dexametasona, el tiempo de incubación en que se logró la óptima unión fue de 24 horas (Fig. 9 y 10). El pH óptimo para el estudio del receptor fue entre 7.3 y 7.6. El método de separación por carbón-dextrán que se empleó en el estudio, fue optimizado mediante estudios preliminares en los que se establecieron las condiciones ideales de concentración y de

tiempo de incubación para eliminar la mayor cantidad de esteroide libre. La eficiencia de separación por este método fue de 98.7%.

Estudios de especificidad.- La especificidad de unión del cortisol al receptor citosólico mediante la adición de diferentes esteroides no radiactivos en concentraciones variables mostró que el mayor porcentaje (81%) de desplazamiento se logró con un exceso de 200 veces de cortisol frío (Fig. 11). Con un exceso similar de 200 veces de progesterona fría, se produjo un desplazamiento importante aunque menor (69%) que el de cortisol; sin embargo, cuando el exceso de progesterona fría se incrementó a 1000 veces, se alcanzó un desplazamiento similar al logrado con cortisol. Cuando se usaron como competidores aldosterona, testosterona y DHT, desprovistos de radiactividad los porcentajes de desplazamiento fueron considerablemente menores (30-65%), aún con los mayores excesos (1000x, 5000x). Con ninguno de los excesos empleados de estradiol "frío" se logró desplazar al cortisol de su receptor siendo por lo tanto el desplazamiento con este esteroide nulo. De los glucocorticoides fríos empleados en el estudio, la dexametasona produjo un desplazamiento menor al 20%, aún con los mayores excesos empleados (Fig. 7).

Constantes físico-químicas.- La saturación del receptor se alcanzó con concentraciones de cortisol alrededor de 3 nmol/L.

la K_d estimada mediante análisis de Scatchard en repetidos experimentos fue de $1.06 \pm .434$ nmol/L y el número de sitios de unión fue 335.3 ± 172 fmol/mg de proteína (Fig. 12). Los estudios con ^3H -dexametasona mostraron una saturación a una concentración alrededor de 8 nmol/L, la K_d fue de 5.9 nmol/L y el número total de sitios de unión (B_{max}) fue de 23 fmol/mg de proteína (Fig. 13).

DISCUSION

Los resultados de este trabajo demuestran la presencia en la hipófisis humana de receptores específicos de alta afinidad y baja capacidad de unión para cortisol. Estos datos confirman los hallazgos previos en animales (17-19) y contribuyen para un mejor conocimiento del receptor en hipófisis humana. Estudios previos han demostrado que la dexametasona es el esteroide más específico para el análisis "in vitro" del receptor para glucocorticoides (31,32). Por lo tanto, llama la atención que en este estudio sólo se logró un desplazamiento del cortisol tritiado del 19% cuando se empleó dexametasona fría como competidor. Este hallazgo también ha sido informado por otros investigadores (19), lo que puede explicarse por una de las dos siguientes alternativas. La primera posibilidad sería que el cortisol se uniera a su receptor intracelular específico y además lo hiciera a la proteína plasmática transportadora (CBG), que es un contaminante difícil de elimi-

nar de los tejidos y que une a los esteroides naturales como cortisol, pero no a los sintéticos como es la dexametasona (17,33). La segunda posibilidad sería la existencia de dos tipos de receptor para cortisol y que sólo uno de ellos fuera capaz de unir a la dexametasona. Estas dos alternativas han sido previamente discutidos por otros autores (19). Algunos de ellos han denominado a este posible segundo tipo de receptor para glucocorticoides "CBG-like" por su semejanza en su comportamiento bioquímico con la CBG (19,23,34). Por lo tanto, resulta difícil establecer si esta molécula, que une cortisol pero no dexametasona, es en realidad un receptor o corresponde a la transportina (19,23,34,35). En caso de tratarse de un "receptor", sus funciones serían muy específicas aunque no idénticas a las del receptor propiamente dicho, como ha sido sugerido por trabajos realizados con estos dos tipos de proteínas receptoras en preparaciones de núcleos (19,34,36-38). Las constantes físico-químicas encontradas en este trabajo, tanto con cortisol como cuando se utilizó dexametasona, son similares a las encontradas por otros investigadores para estas mismas hormonas en diversos tejidos (17,19,23,34). Por otra parte, en el análisis de Scatchard efectuado para el cortisol, no es posible ver las dos poblaciones de receptores probablemente porque estos receptores tienen constantes físico-químicas muy similares, como ha sido sugerido por Koch et al. (19). Los datos obtenidos de este estudio amplían los conocimientos previos sobre el receptor de

cortisol en hipófisis humana, lo que puede conducir a una mejor comprensión de la regulación de la secreción de ACTH en condiciones normales y puede contribuir al esclarecimiento de cuadros clínicos relacionados con una alteración en el mecanismo de producción de ACTH.

REFERENCIAS

- 1) Rousseau G: Structure and regulation of the glucocorticoid hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* 38:1, 1984
- 2) Clark JH, Schrader WT, O'Malley B: Mechanisms of Steroid Hormone Action. In: Williams, Textbook of Endocrinology. Ed. Wilson JD, Foster DW. W.B. Saunders Company, Seventh edition, 1985, pp 33
- 3) Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J, Wrangé O, Okret S, Wikström AC: Functional analysis of the purified glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem* 24:63, 1986
- 4) Agarwal MK: General considerations in steroid hormone receptor research. In: Principles of Receptorology. Ed: Agarwal MK. Walter de Gruyter, New York, 1983, pp 1
- 5) Clark JH, Peck EJ: Steroid hormone receptors: basic principles and measurement. In: Laboratory Methods Manual for Hormone Action and Molecular Endocrinology. Ed: Schared WT, O'Malley B. Department of Cell Biology. Baylor College of Medicine. Fourth edition, 1980, pp 1
- 6) Gustafsson JA, Carlstedt - Duke J, Poellinger L, Okret S, Wikström AC, Brønnegard M, Gillner M, Dong Y, Fuxe K,

Cintra A, Hårfstrand A, Agnati L: Biochemistry, molecular biology and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocr Rev* 8:185, 1987

- 7) Litwack G, Cake MH, Filler R, Taylor K: Physical measurement of the liver glucocorticoid receptor. *Biochem J* 1969:445, 1978
- 8) Alexis MN, Djordevic-Markovic R, Sekeris CE: Activation and changes in the sedimentation properties of rat liver glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem* 18:655, 1983
- 9) Andreasen PA: Transformation of glucocorticoid-receptor complex from rat thymocytes and its accumulation in chromatin in a cell-free system. *Biochem Biophys Acta* 428:792, 1976
- 10) Webb ML, Miller-Dieners AS, Litwack G: Purification, characterization, and activation of the glucocorticoid-receptor complex from rat kidney cortex. *Biochem* 24:1946, 1985
- 11) Giannopoulos G: Glucocorticoid receptors in lung. *J Biol Chem* 250:2904, 1975
- 12) Mayer M, Kaiser N, Milholland RJ, Rosen F: Cortisol

- binding in rat skeletal muscle. J Biol Chem 250:1207, 1975
- 13) Feldman D, Funder J, Loose D: Is the glucocorticoid receptor identical in various target organs? J Steroid Biochem 9:141, 1978
 - 14) Svec F: Comparison of glucocorticoid receptor depletion and suppression of ACTH secretion in the AtT-20 cell. J Steroid Biochem 20:821, 1984
 - 15) Emmanadian SM, Luttgé WG, Densmore CL: Chemical differentiation of type I and type II receptors for adrenal steroids in brain cytosol. J Steroid Biochem 24: 953, 1986
 - 16) Krozowski ZS, Funder JW: Rat anterior pituitary. Distinction of an 8S corticosterone-preferring species from dexametasone-binding glucocorticoid receptors. J Clin Invest 70:899, 1982
 - 17) Watanabe H: Dexametasone-binding receptor in bovine pituitary cytosol. J Steroid Biochem 6:27, 1975
 - 18) Watanabe H: Binding of glucocorticoid hormones in bovine

hypothalamic and pituitary cytosol. J Steroid Biochem
6:1113, 1975

- 19) Koch B, Lutz B, Briand B, Mialhe C: Heterogeneity of pituitary glucocorticoid binding evidence for a transcortin-like compound. Biochim Biophys Acta 444:497, 1976
- 20) Lacroix A, Bonnard GD, Lippman ME: Modulation of glucocorticoid receptor by mitogenic stimuli, glucocorticoids and retinoids in normal human cultured T cells. J Steroid Biochem 21:73, 1984
- 21) López Bernal A, Turnebull AC: High affinity glucocorticoid receptors in human intrauterine tissues. Horm Metab Res 17:265, 1985
- 22) Kontula K, Pomoell UM, Gunsalus GL, Pelkonen R: Glucocorticoid receptors and responsiveness of normal and neoplastic human adrenal cortex. J Clin Endocrinol Metab 60:283, 1985
- 23) Tsuboi S, Kawashima R, Tomioka O, Nakata M, Sakamoto N, Fujita T: Glucocorticoid binding proteins of human brain cytosol. Brain Res 179:181, 1979

- 24) Krieger D: Pathophysiology of Cushing's disease. *Endocr Rev* 4:22, 1983
- 25) Keller-Wood ME, Dallman MF: Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5:1, 1984
- 26) Schatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Scie* 51:660, 1949
- 27) Rosenthal HE: A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal Biochem* 20:525, 1967
- 28) Feldman HA: Mathematical theory of complex ligand-binding sites at equilibrium. *Anal Biochem* 48:317, 1972
- 29) Catt KJ, Dufau ML: The clinical significance of peptide hormone receptors. *Clin Endocrinol Metab* 12:xi-xlv, 1983
- 30) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Pary A, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol-reagent. *J Biol Chem* 193:265, 1951
- 31) Ojasoo T, Raynaud JP: Unique steroid congeners for receptor studies. *Cancer Res* 38:4186, 1978

- 32) Raynaud JP, Bouton MM, Moguilewsky M, Ojasoo T, Philibert D, Beck G, Labrie F, Mornon JP: Steroid hormone receptors and pharmacology. *J Steroid Biochem* 12:143, 1980
- 33) Wagner RK: Extracellular and intracellular steroid binding proteins. Properties, discrimination, assay and clinical application. *Acta Endocrinol (Kbh)*. 88 Suppl 218:1, 1978
- 34) Sakly M, Koch B: Ontogenesis of glucocorticoid receptors in anterior pituitary gland: transient dissociation among cytoplasmic receptor density, nuclear uptake, and regulation of corticotropic activity. *Endocrinology* 108: 591, 1981
- 35) Agarwal MK: Physical characterisation of cytoplasmic gluco -and mineralo- steroid receptors. *FEBS Lett* 85:1, 1978
- 36) Beato M, Kalimi M, Konstam M, Fiegelson P: Interaction of glucocorticoids with rat liver nuclei. II. Studies on the nature of the cytosol transfer factor and the nuclear acceptor site. *Biochem* 12:3372, 1973
- 37) Litwack G, Filler R, Rosenfield SA, Lichtash N, Wishman CA, Singer S: Liver cytosol corticosteroid binder II, a hormone

receptor. J Biol Chem 248:7481, 1973

- 38) Svec F, Harrison RW: The intracellular distribution of natural and synthetic glucocorticoids in the AtT-20 cell. Endocrinology 104:1563, 1979

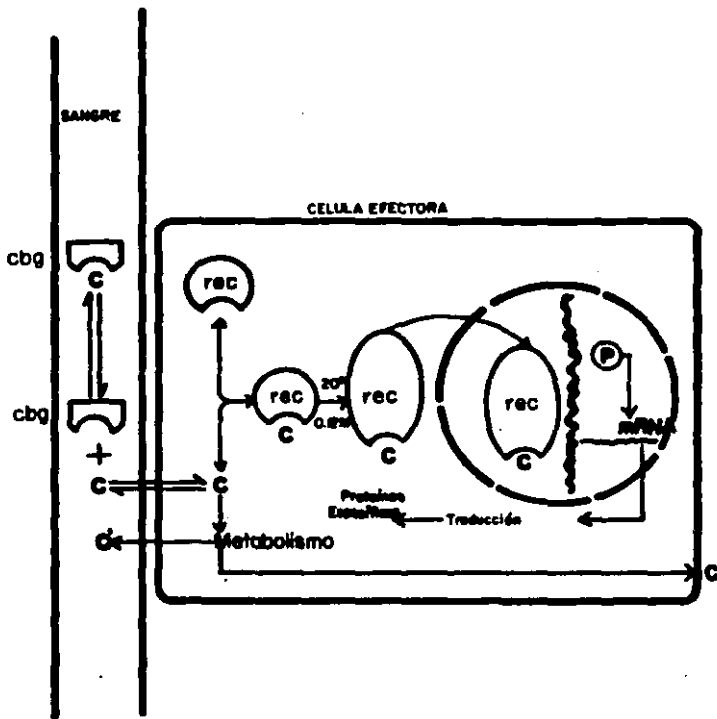


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de acción del cortisol (modificado de Gustafsson et al., Endocr Rev 8: 185, 1987).

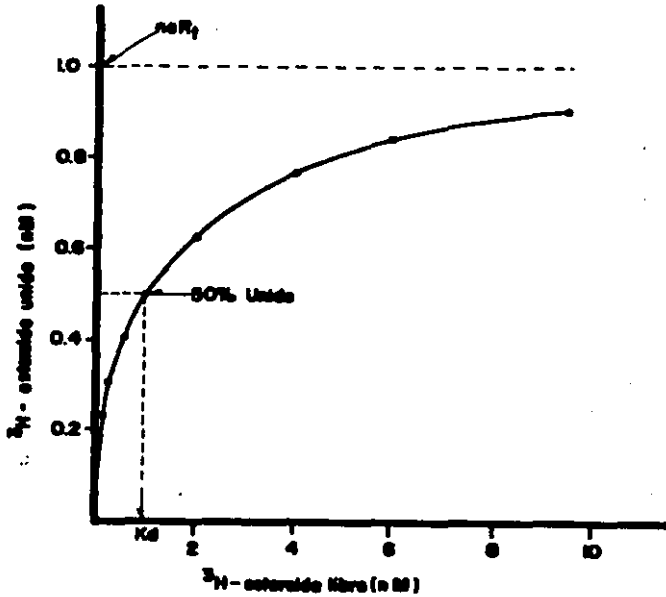


Figura 2. Curva de saturación resultante de la unión de una hormona esteroidal a su receptor específico (Tomado de Clark et al., En: Williams, Textbook of Endocrinology, Wilson & Foster, WB Saunders, New York, Seventh edition, 1985, pp 34).

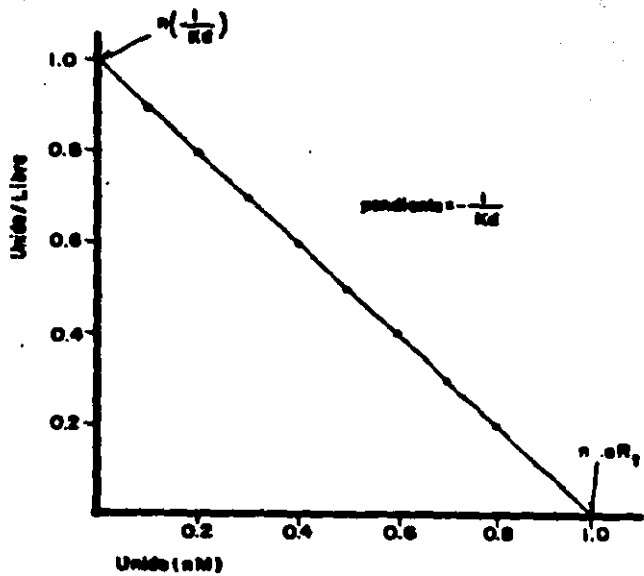


Figura 3. Gráfica de Scatchard que representa la relación unido/libre y unido del complejo hormona-receptor. (Tomado de Clark et al., En: Williams, Textbook of Endocrinology, Wilson & Foster, WB Saunders, New York, Seventh edition, 1985, pp 34).

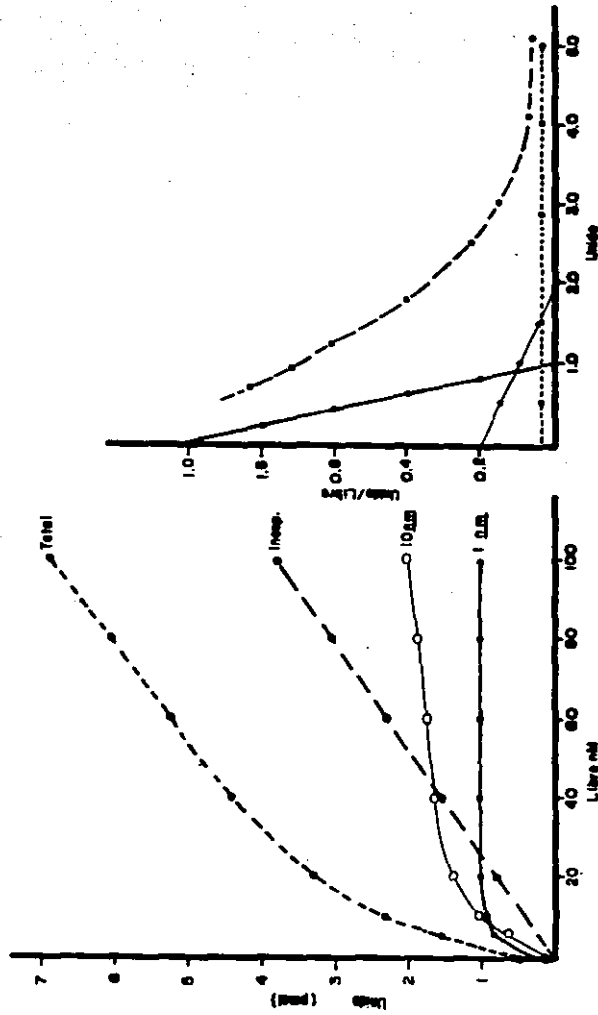


Figura 4. Representación gráfica de un sistema múltiple de receptores con alta afinidad. (Tomado de Clark et al., En: Laboratory Methods Manual for Hormone Action and Molecular Endocrinology, Schrader WT & O'Malley B, Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Fourth edition, 1980, pp 16).

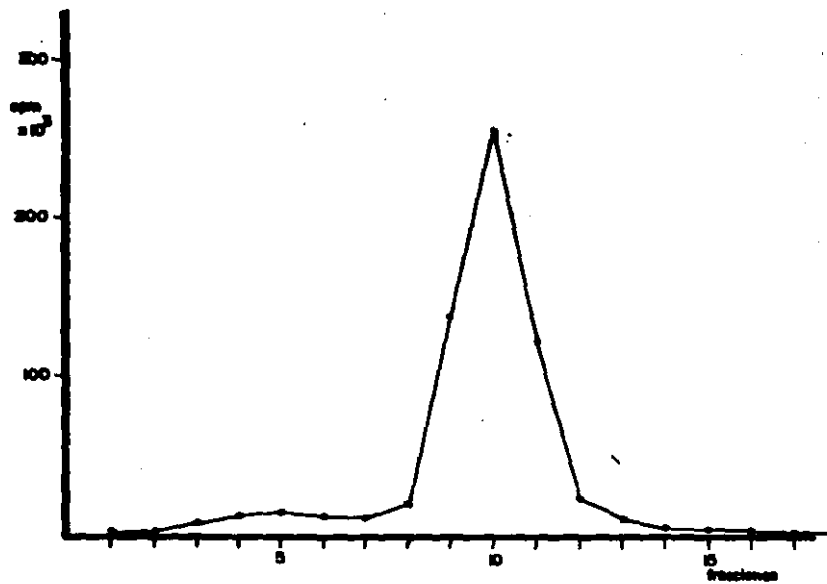


Figura 5. Purificación cromatográfica en columna con Sephadex LH-20, del cortisol y dexametasona tritadas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

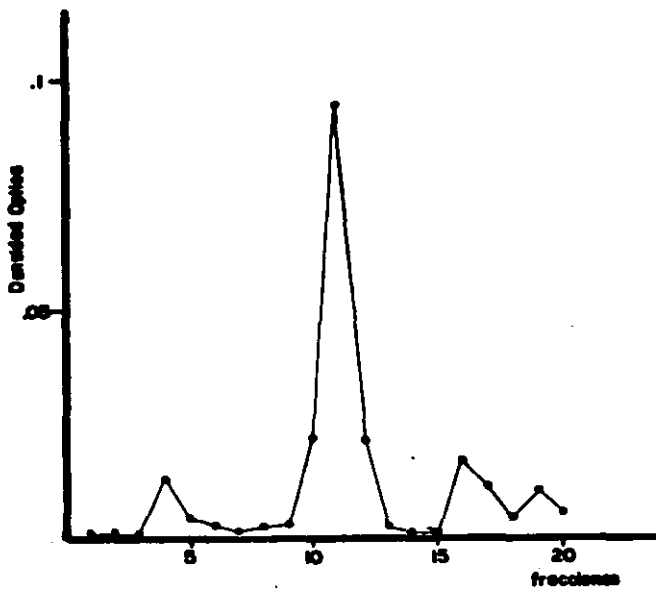


Figura 6. Purificación cromatográfica en columna con Sephadex LH-20, del cortisol y dexametasona no marcadas.

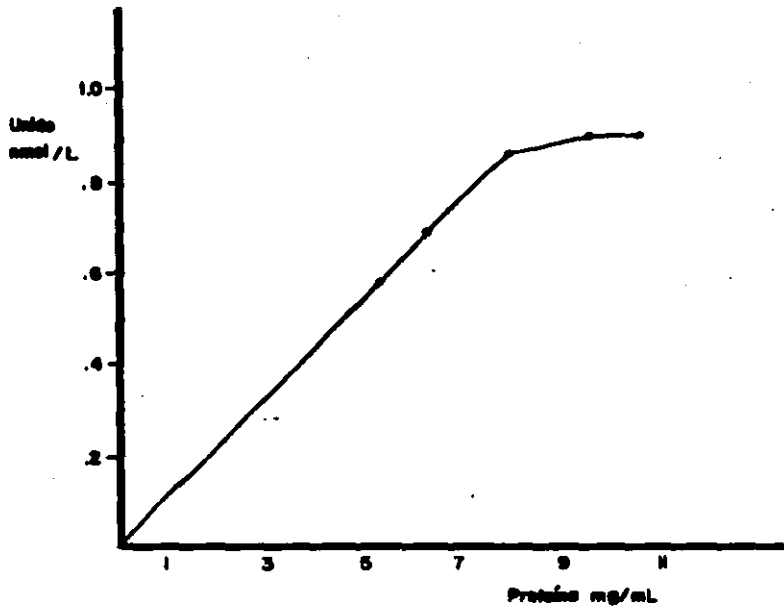


Figura 7. Unión del complejo receptor-cortisol con relación al contenido de proteínas en citosol de hipófisis humana.

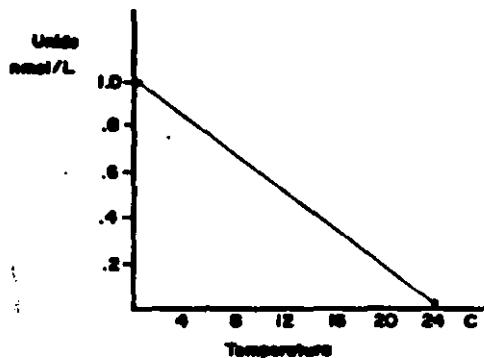


Figura B. Unión del complejo receptor-cortisol con relación a la temperatura empleada en el análisis.

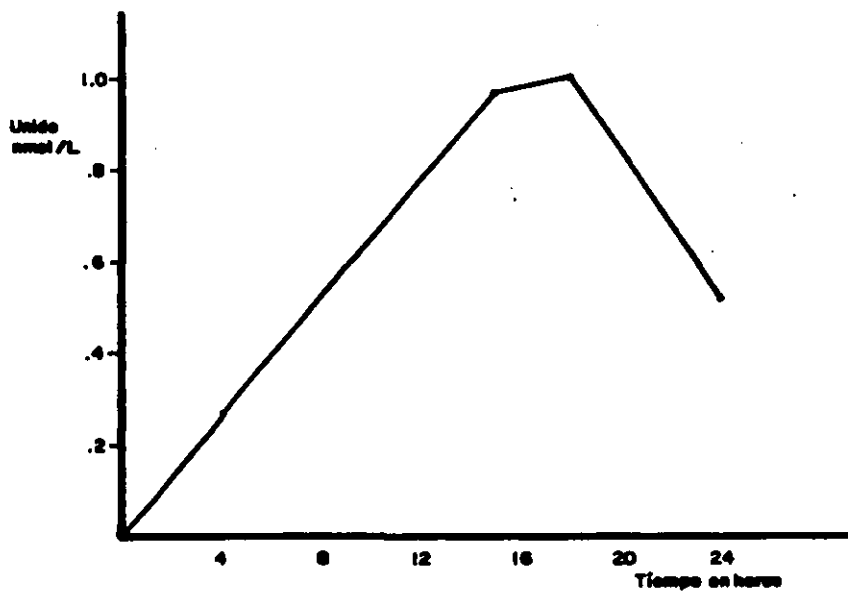


Figura 9. Unión específica del cortisol en citosol de hipófisis humana con relación al tiempo de incubación.

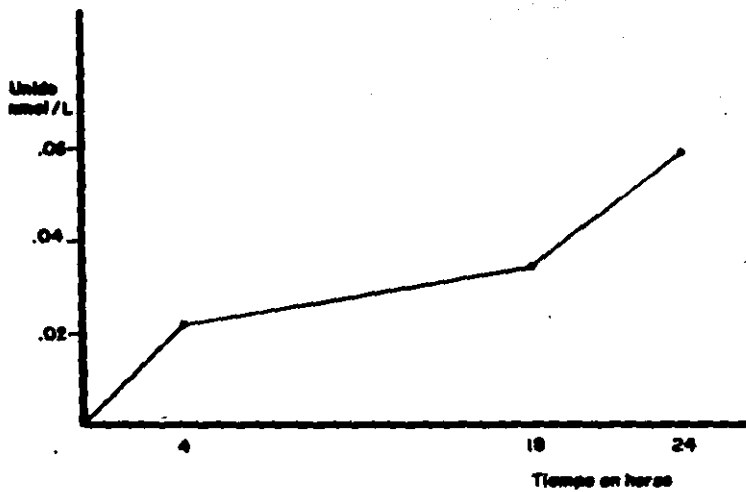


Figura 10. Unión específica de la dexametasona en citosol de hipófisis humana con relación al tiempo de incubación.

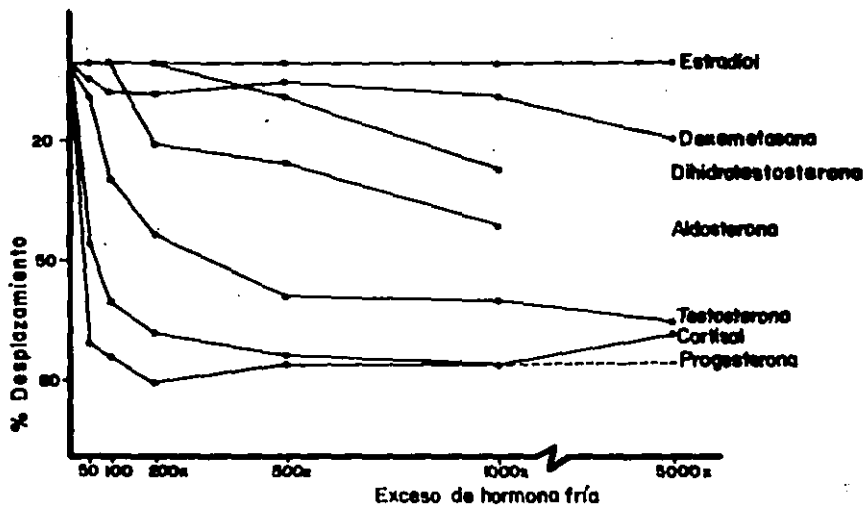


Figura 11. Desplazamiento del ³H-cortisol de su receptor específico por la adición de diferentes excesos de esteroides no marcados.

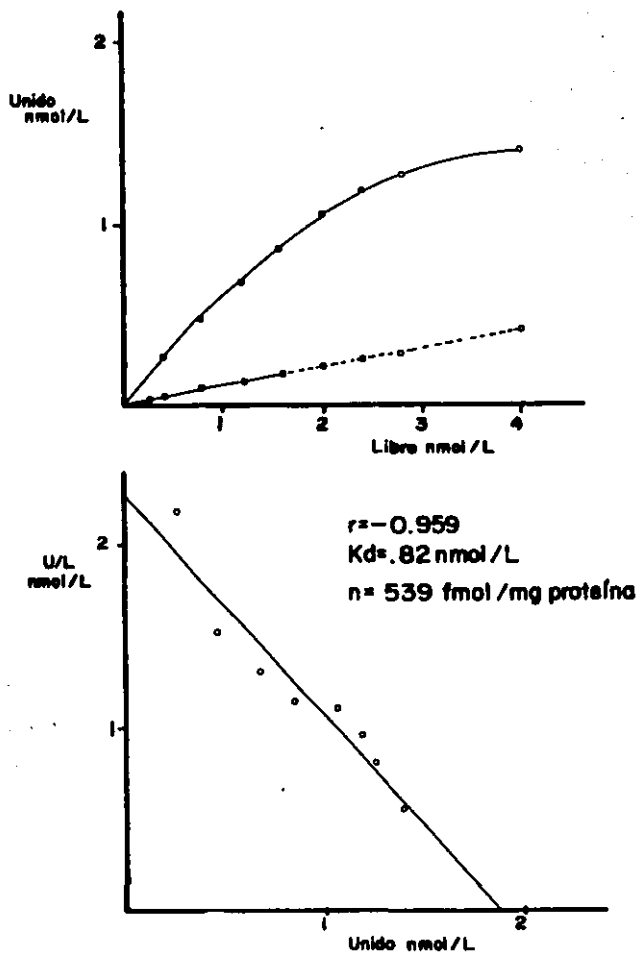


Figura 12. Curva de saturación y gráfica de Scatchard de la unión del complejo cortisol-receptor en citosol de hipófisis humana.

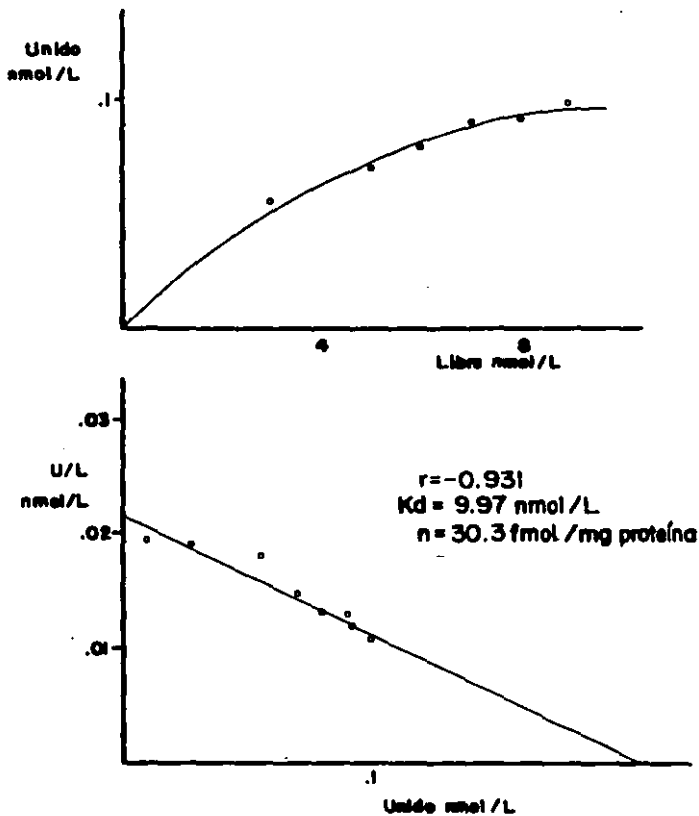


Figura 13. Curva de saturación y gráfica de Scatchard de la unión del complejo dexametasona-receptor en citosol de hipófisis humana.