

# ACEPTORES PARA LOS COMPLEJOS $^3\text{H}$ - TESTOSTERONA-RECEPTOR EN LA CROMATINA DE HIPOTALAMO DE RATON HEMBRA DE 7 DIAS DE EDAD\*

Por J. Ventanas Barroso (1)  
C. García González (1)  
C. J. López Bote (1)  
M. A. Fernández Martínez (2)  
A. López Pérez (2)

\* Este trabajo forma parte de un plan desarrollado conjuntamente por las Cátedras de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos de las Facultades de Veterinaria de León y Cáceres que tiene como objetivo profundizar en los mecanismos fisiológicos por los que los esteroides regulan el crecimiento y la composición de la canal con vistas a su manipulación hormonal.

## INTRODUCCION

Los esteroides gonadales desempeñan un importante papel en la regulación de los procesos fisiológicos que tienen lugar en sus tejidos «blanco» o «diana» (Gorski y cols., 1976). Entre dichos procesos se encuentra la diferenciación sexual del cerebro, donde por acción de la testosterona a nivel del hipotálamo durante una etapa precoz del desarrollo (el «periodo crítico») se establece un modelo de conexiones nerviosas diferente al desarrollado en ausencia del andrógeno (McEwen, 1976). Esta masculinización del sistema neuroendocrino se traduce, aparte de sus implicaciones en la esfera reproductiva y sobre el comportamiento, en un mayor ritmo de crecimiento y en una composición de la canal más magra (Barraclough y cols., 1974; Perry y col., 1979).

Sin embargo, el proceso de androgeneización «fisiológico» (bajo la acción de la testosterona segregada por los testículos del macho) o «artificial» (administrada a la hembra por vía subcutánea) no es bien conocido a nivel subcelular. Actualmente se piensa que la etapa clave reside en el número de complejos esteroide-receptor que interaccionan con los componentes del núcleo y más concretamente con la cromatina, activando determinados genes (McEwen, 1976; MacLuski y col., 1981; Ventanas y cols., 1986). Existen

(1) Cátedra de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos. Facultad de Veterinaria de Cáceres

(2) Cátedra de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos. Facultad de Veterinaria de León

discrepancias entre quienes afirman que la acción androgeneizante de la testosterona se debe a la propia hormona «per se» y quienes sostienen que es consecuencia del estradiol derivado de ella por aromatización (Fox, 1975; Naftolin y cols., 1975), aportando los citados autores sólidos argumentos tanto en uno como en otro sentido. Nosotros, en publicaciones anteriores (López y cols., 1985) hemos estudiado la interacción de los complejos  $^3\text{H}$ -estradiol-receptor con la cromatina del hipotálamo de ratón macho y hembra al final del «periodo crítico» (siete días de edad). Continuando en esta línea, en el trabajo que se presenta se investiga la presencia de aceptores en la cromatina de la hembra para la propia  $^3\text{H}$ -testosterona-receptor, que justificarían la participación directa del andrógeno en la inducción del modelo masculino.

## MATERIAL Y METODOS

La obtención del material biológico y radiactivo, así como la preparación de la cromatina, su unión a la celulosa y el análisis químico de la cromatina-celulosa, se realizaron tal como hemos descrito en publicaciones anteriores (López y cols. 1985).

### *Preparación de los complejos $^3\text{H}$ -testosterona receptor*

Tras la extracción del hipotálamo, que siempre se realizó dentro de los 15 minutos posteriores al sacrificio, se procedió a la homogeneización de los mismos en un buffer con Tris-ClH 10 mM, pH 7.4, sacarosa 0.32 M y 2-Mercaptoetanol 100 mM. Tanto la homogeneización como las operaciones posteriores se realizaron a temperaturas de 0-4°C. El homogeneizado se centrifugó de nuevo a 105.000 xg durante 90 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación constituye el citosol.

La  $^3\text{H}$ -testosterona, una vez evaporado el disolvente que la contenía con  $\text{N}_2$ , se incubó con el citosol durante 90 minutos para permitir la formación de los complejos  $^3\text{H}$ Testosterona-receptor. Los complejos se precipitaron con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  saturado, pH 7.2, al 40 % de saturación. Tras mantener 30 minutos en agitación la mezcla se centrifugó a 10.000 xg durante 15 minutos y el sedimento fue almacenado a -30°C.

Inmediatamente antes de su empleo, los sedimentos se resuspendieron en tampón Tris-ClH 5 mM, pH 7.5, conteniendo ClK 0.15M, EDTA 0.5 mM y 2-mercaptoetanol 50 mM; y se dializaron contra el mismo buffer. El dializado se centrifugó a 10.000 xg durante 5 minutos y previamente a su incubación con la cromatina se tomaron las correspondientes alícuotas para determinar la radiactividad específica (CPM/mg proteína).

El protocolo seguido para la extracción de la cromatina-celulosa y su incubación con los complejos  $^3\text{H}$ -hormona receptor ya ha sido descrito con detalle en trabajos previos (Perry y cols., 1978; López y cols., 1985).

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Weber y Osborn (1969).

## RESULTADOS

Dado el reducido número de lugares aceptores en la cromatina disponibles para la interacción con los complejos  $^3\text{H}$ -esteroide-receptor en condiciones fisiológicas (Webster y cols., 1976), su cuantificación exige la extracción previa de determinadas proteínas enmascaradoras. Para ello, se prepararon varios lotes de cromatinas-celulosa a partir de los núcleos celulares obtenidos por centrifugación en gradiente de sacarosa de los homogeneizados de tejido hipotalámico (Figura 1). El análisis químico de las cromatinas reveló la ausencia de contaminación por otras fracciones subcelulares, como lo demuestra la relación Histonas/DNA que se mantuvo siempre en valores próximos a la unidad; lo cual coincide con los datos aparecidos en la bibliografía consultada (Stein y cols., 1975; Perry y cols., 1978).



Fig. 1.- Núcleos de hipotálamo de ratón purificados por centrifugación en gradiente de sacarosa ( $\times 1000$ ).

A partir de los homogeneizados de tejido hipotalámico se purifican los núcleos celulares, como los que se muestran en la microfotografía, que posteriormente fueron utilizados para la preparación de la cromatina. En todos los casos, el sedimento nuclear se observó al microscopio en fresco con objeto de descartar los contaminados con otros orgánulos. Se aprecian también restos de material nuclear (flecha) procedentes de núcleos fragmentados por el medio hipertónico (sacarosa 1.7M).

Al someter las cromatinas-celulosa a una extracción secuencial de las proteínas con clorhidrato de guanina (CIHGu) en el rango 0-7 M observamos (Figura 2A) que el contenido en histonas desciende rápidamente, siendo ya indetectables a partir de 5M. También las proteínas ácidas se eluyen progresivamente en los intervalos estudiados, obteniéndose tres fracciones que denominamos AP<sub>1</sub> (a la eluida con CIHGu 1 M), AP<sub>2</sub> (a la eluida con 1 M - 5 M) y AP<sub>3</sub> (a la eluida con 5 M - 7 M) por asimilar su nomenclatura a la empleada por (Webster y cols., 1976). El DNA permaneció constante, por lo que demuestra que la desproteínización de la cromatina por el CIHGu fue altamente selectiva.

La capacidad de interacción de las cromatinas-celulosa, extraídas con CIHGu como se indica en el párrafo anterior con los complejos <sup>3</sup>H-testosterona-receptor se muestra en la figura 2B. La separación de la cromatina de las histonas y proteínas ácidas enmascaradoras (fracciones AP<sub>1</sub> y AP<sub>2</sub>) se traduce en un incremento próximo al 100 % en el número de lugares aceptores disponibles. La subsiguiente extracción con CIHGu 7 M, que eluye la fracción AP<sub>3</sub>, reduce el número de complejos hormona-receptor unidos hasta valores próximos a la cromatina nativa.

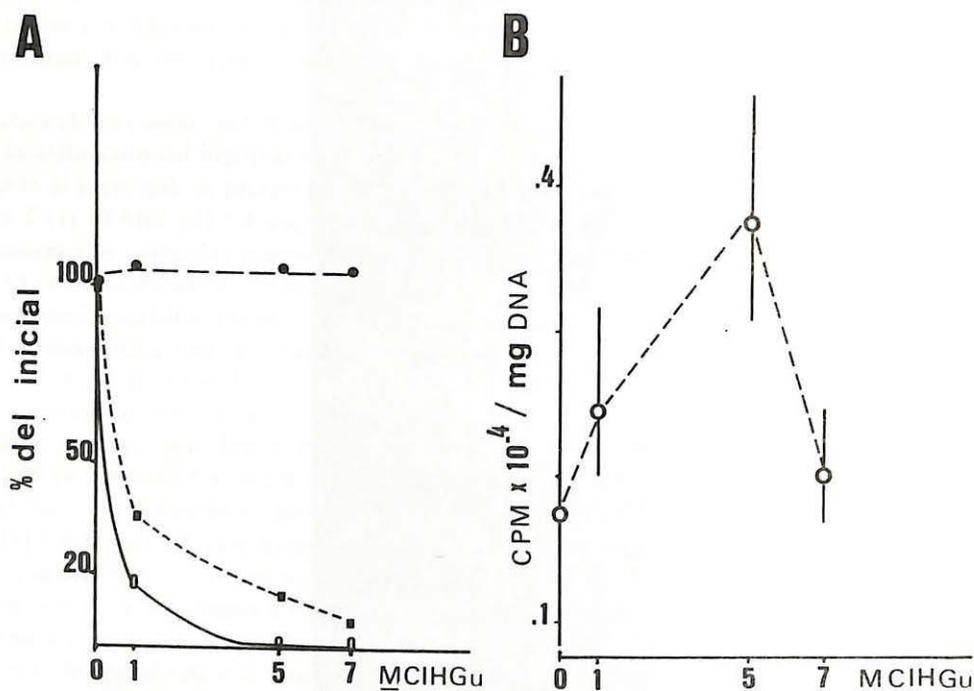


Fig. 2.- Efecto de la extracción con CIHGu (0M-7M) sobre la composición química de la cromatina y su capacidad de interacción con los complejos <sup>3</sup>H-testosterona receptor.

Las proteínas celulares se extrajeron con un buffer que contenía CIHGu 0M, 1M, 5M y 7M. En la figura 2A se representa el porcentaje de histonas (○), proteínas ácidas (■) y DNA (●) que permanecen en el residuo de cromatina-celulosa tras la extracción. En la 2B, el número de complejos <sup>3</sup>H-testosterona-receptor que liga la cromatina tras la extracción con CIHGu a las molaridades citadas expresadas como CPM/mg de DNA.

Las barras verticales representan el rango de los valores obtenidos en muestras por triplicado.

El n.º de complejos unidos a la cromatina extraída con 5M es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) al de la hidratada.

El descenso de la capacidad de interacción de la cromatina tras la extracción con C1HGu 7 M revela que ha sido desprovista de sus aceptores, encontrándose éstos por consiguiente incluidos en la fracción AP<sub>3</sub>. Con el objeto de realizar una identificación preliminar de las referidas proteínas aceptoras, la fracción AP<sub>3</sub> fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 3) de acuerdo con el método descrito por Weber y Osborn (1969) comprobándose que la fracción AP<sub>3</sub> es en sí misma heterogénea, con dos proteínas mayoritarias de peso molecular de 16.000 y 18.000 Daltons.

Igualmente se ha investigado el carácter saturable o no de los aceptores de la cromatina. Gorski y cols. (1976) afirman al respecto que los verdaderos aceptores se caracterizan por encontrarse en una cuantía limitada y por tanto saturable, a diferencia de otros lugares de interacción inespecíficos cuyo número es prácticamente ilimitado.

Para ello se incubaron alícuotas de 10 mg de cromatina-celulosa extraída con C1HGu

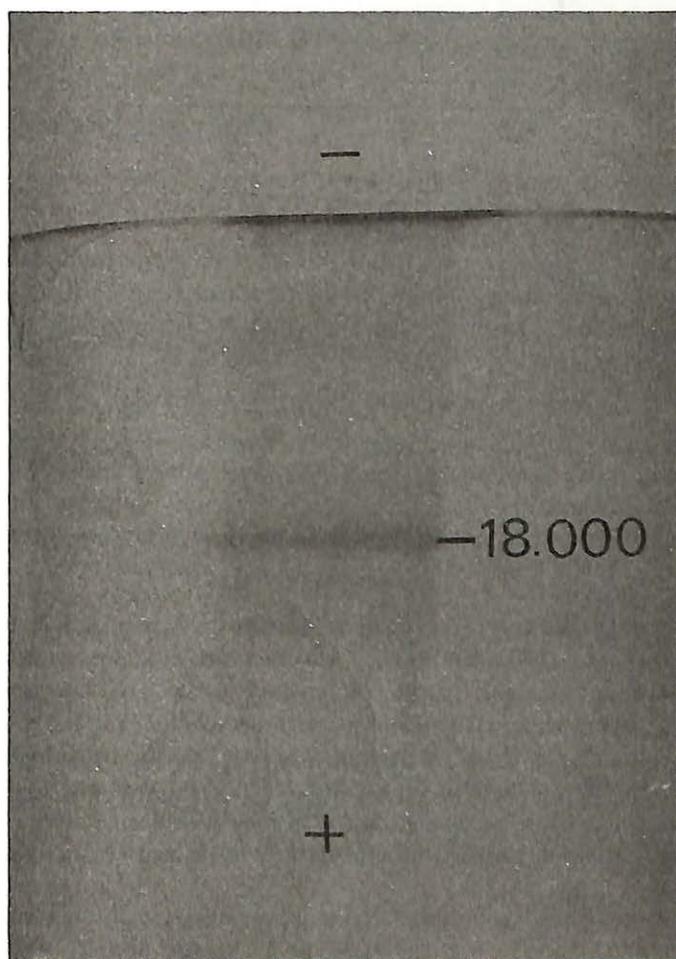


Fig. 3.- *Electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción AP<sub>3</sub>*

La fracción AP<sub>3</sub>, eluida de la cromatina en el rango 5-7M de C1HGu, tras una diálisis exhaustiva contra agua destilada, se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (5-15 % de concentración) en presencia de SDS de acuerdo con Weber y Osborn (1969).

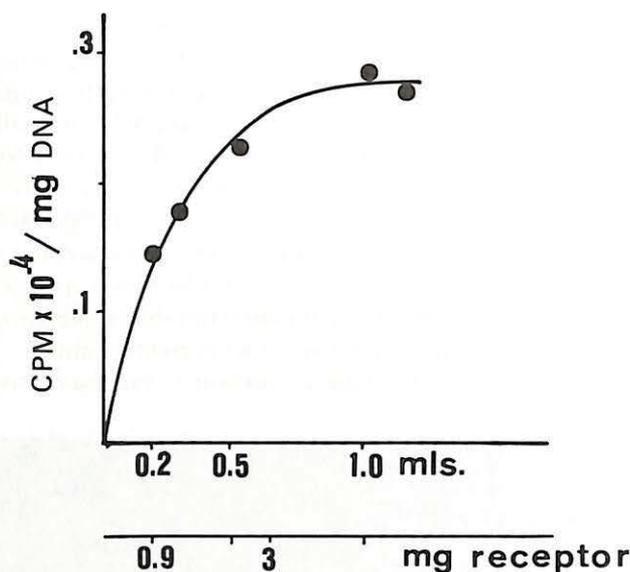


Fig. 4.- Curva de saturación de la cromatina de hipotálamo de ratón hembra incubada con complejos <sup>3</sup>H-testosterona receptor

5 M con cantidades crecientes de complejos <sup>3</sup>H-Testosterona-receptor (figura 4). Se cuantificó el número de complejos unidos resultando que una vez alcanzados determinados niveles de interacción, a pesar de seguir aumentando la cantidad de complejos <sup>3</sup>H-testosterona añadidos, no se logra incrementar los retenidos en la cromatina. La saturación de los aceptores se consigue con valores del orden de 3 mg de proteína receptora.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos confirman las conclusiones de los estudios realizados anteriormente por Webster y cols. (1976) trabajando con cromatina de oviducto de pollo y por Klyzsejko-Stefanowicz y cols. (1976) con próstata de rata, en el sentido de que en la cromatina nativa únicamente un reducido número de aceptores se hallan disponibles para la interacción con los complejos hormona-receptor. La elución de las histonas y de las proteínas ácidas enmascaradoras (fracciones AP<sub>1</sub> y AP<sub>2</sub>) permite la exposición de nuevos lugares de interacción. En nuestro caso la cromatina hidratada representa el 45 % de los lugares de interacción y la deshistonizada el 60 % respecto a la extraída con C1HG<sub>u</sub>.

Este incremento en el número de sitios con respecto a la cromatina inicial es característico de los «tejidos blanco» como han puesto de manifiesto Klyzsejko-Stefanowicz y cols. (1976) al estudiar la interacción de la <sup>3</sup>H-testosterona con la cromatina de próstata, páncreas e hígado. Los citados autores encuentran que sólo en el caso de la cromatina de próstata, de entre los tejidos estudiados, la extracción de las histonas y determinados gru-

pos de proteínas ácidas se traduce en un mayor número de lugares de interacción disponibles.

La presencia de verdaderos aceptores fue confirmada posteriormente por el carácter saturable de la interacción y porque tras la extracción de la fracción AP<sub>3</sub> tiene lugar un descenso notable de la capacidad aceptora de la cromatina, indicativo de que ha sido desprovista de sus aceptores específicos.

Las implicaciones de este hecho pueden ser de gran trascendencia desde el punto de vista de la diferenciación sexual del cerebro; la presencia en la hembra de aceptores para los complejos <sup>3</sup>H-testosterona-receptor garantiza el acceso de la testosterona al material genético y por consiguiente la sensibilidad del hipotálamo de la hembra a su acción moduladora. Es más, habida cuenta de que el citoplasma de las células hipotalámicas poseen receptores de alta afinidad para la testosterona (Fox, 1975) la masculinización del sistema neuroendocrino depende en exclusiva de la presencia de testosterona en el torrente circulatorio, procedente de los testículos o administrada a partir de una fuente exógena.

## RESUMEN

Se ha investigado la interacción «in vitro» de la cromatina de hipotálamo de ratón hembra con complejos <sup>3</sup>H-testosterona-receptor del mismo origen. La capacidad aceptora de la cromatina nativa es baja, pudiendo incrementarse hasta un 100 % mediante la extracción de las histonas y determinadas proteínas ácidas. La posterior elución de la fracción AP<sub>3</sub> conduce a un descenso del número de complejos hormona-receptor ligados por la cromatina.

Los resultados obtenidos sugieren que la cromatina de hipotálamo de ratón hembra contiene verdaderos aceptores para los complejos <sup>3</sup>H-testosterona-receptor, hecho que pueden tener importantes implicaciones desde el punto de vista de la diferenciación sexual del cerebro.

## THE BINDING OF 3H-TESTOSTERONE-RECEPTOR COMPLEX TO HYPOTHALAMIC CHROMATIN OF FEMALE MICE

### SUMMARY

The saturation binding of <sup>3</sup>H-labelled testosterone-receptor complexes with hypothalamic chromatin of female mice was measured «in vitro» in 0.15 M KCl.

After the histones AP<sub>1</sub> and AP<sub>2</sub> proteins were removed, the residual chromatin fraction (DNA + AP<sub>3</sub>) exhibited receptor affinity 200 %, that of the native hypothalamic chromatin. However, the binding affinity for the (<sup>3</sup>H)-testosterone receptor complex was markedly decreased after the removal of AP<sub>3</sub> proteins. This suggests that the hypothalamic chromatin of female mice contains «specific acceptor proteins» for (<sup>3</sup>H)-testosterone-receptor complex.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) BARRACLOUGH, C. A. y TURGEON, J. L. (1974).— Further studies of the hypothalamo-hipophyseal gonadal axis of the androgen-sterilized rat. In: *Internat Symposium on Sexual Endocrinology of the Perinatal Period*. Edited: Forest, M. G. and Bertrand, J. pp. 339-356. INSERM, Paris.
- 2) FOX, T. O. (1975).— Androgen and strogen-binding macromolecules in developing mouse brain: biochemical and genetic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 4303.
- 3) GORSKI, J. y GANNON, F. (1976).— Current models of steroid hormone action: a critique. *Ann. Rev. Physiol.* 38, 425-450.
- 4) KLYZSEJKO-STEFANOWICZ, L., CHIN, J. F., TSAI, Y. H. y HUILICA, L. S. (1976).— Acceptor proteins in rat androgenic tissue chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1954-1958.
- 5) LOPEZ, A., BURGOS, J. y VENTANAS, J. (1985).— The binding of <sup>3</sup>H-labelled oestradiol-receptor complex to hypothalamic of male and female mice. *Int. J. Biochem.* 17, 1.207-1211.
- 6) McEWEN, B. S. (1976).— Interaction between hormones and nerve tissue. *Sci. American* 235, 48-58.
- 7) McLUSKY, N. J. y NAFTOLIN, F. (1981).— Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211, 1294.
- 8) NAFTOLIN, F., RYAN, K. J. y DAVIES, I. J. (1975).— The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent progr. Horm. res.* 31, 295-319.
- 9) PERRY, B. N. y LOPEZ, A. (1978).— The binding of 3H-labelled oestradiol and progesterone-receptor complexes to hypothalamic chromatin of male and female sheep. *Biochem. J.* 176, 873-883.
- 10) PERRY, B. N., McCracken, A., Furr, B. J. A. y McFREE, H. J. H. (1979).— The separate roles of androgen and estrogen in the manipulation of growth and efficiency of food utilization in female rats. *J. Endocrinology* 81, 35-43.
- 11) STEIN, G. S., SWINEHART, J. y KLEINSMITH, L. (1975).— Chromosomal proteins and gene regulation. *Sci. American* 232, 46-61.
- 12) VENTANAS, J., LOPEZ BOTE, C., GARCIA, C. y LOPEZ, A. (1986).— Effect of testosterone on protein synthesis in the hypothalamus of newborn female rat. *Neuroendocrinol. Lettes* 8, (in press).
- 13) WEBER, K. y OSBORN, M. (1969).— The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. of Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- 14) WEBSTER, R. A., PIKLER, G. M. y SPELSBERG, T. C. (1976).— Nuclear binding of progesterone in hen oviduct. *Biochem. J.* 156, 409-418.