

Evaluación de un Sistema Hormona-Receptor

Juan Carlos Calvo

Tal como se describió en los capítulos anteriores, la fisiopatología endócrina está íntimamente relacionada con la funcionalidad de los receptores hormonales. Al analizar el mecanismo de acción de cualquier sustancia biológicamente activa, en particular las hormonas, debe pensarse en la participación obligatoria de los sitios de reconocimiento, que denominamos receptores.

Podría definirse un sitio receptor como una macromolécula capaz de unir sustancias biológicamente activas, generando, mediante esta interacción, una respuesta fisiológica o patológica. Esto último debido a la existencia de respuesta "hormonal" en ausencia de hormona, desencadenada por un receptor "activado".

Cuando algo falla en esta molécula es de esperar en primera instancia una alteración en la respuesta mediada o determinada, por el receptor.

Esto se debe a que la función de una determinada molécula en la célula, depende de su configuración espacial, la que está fijada, en primera instancia por la estructura molecular y en segundo término por su interacción con el medio ambiente celular.

La conformación espacial de una molécula proteica, como son los receptores hormonales, define la existencia de sitios de interacción a los que pueden unirse los ligandos específicos. Estos ligandos, mediante uniones no covalentes interactuarán con los residuos activos de dichos sitios y, por interacciones electrostáticas mediarán cambios conformacionales que se transmitirán no solamente al resto de la misma molécula sino, a través del medio ambiente en que se encuentre (membrana plasmática o compartimiento intracelular), a otras moléculas con las que proseguirá en una cascada de señalización amplificada. Esta amplificación involucra interacciones eficaces con múltiples sistemas membranosos

o solubles intracelulares que definirán, finalmente, el tipo y la intensidad de la respuesta final.

La interacción entre moléculas, especialmente cuando no involucra enlaces covalentes, lleva al concepto de afinidad, reversibilidad, constantes de velocidad de asociación y disociación, etc. Dependiendo de la modificación impartida al receptor como consecuencia de la falla fisiopatológica o, tal vez, originante de dicha alteración, será la alteración que se observe. Por ejemplo, puede estar alterada la síntesis de la molécula receptora, con la consiguiente disminución en el número de sitios disponibles para interactuar con la hormona; puede haber ocurrido una mutación puntual o varias mutaciones que den como resultado un sitio activo configuracionalmente alterado, con una subsiguiente modificación en la constante de afinidad; o pueden darse ambas situaciones. También podría ocurrir que una alteración en la respuesta inmunológica del paciente, produjese como consecuencia la presencia de anticuerpos dirigidos contra la molécula receptora, con el consiguiente bloqueo en la interacción seguido de, aunque no necesariamente, un bloqueo en la respuesta.

Al analizar en detalle la definición anteriormente mencionada, encontramos que todos los receptores hormonales pertenecen a la familia de macromoléculas proteicas. La ubicación subcelular dependerá de la característica del ligando que reconozcan: en membrana plasmática para ligandos hidrofílicos e intracelular, citoplasmático o nuclear, para ligandos hidrofóbicos.

El hecho de poder correlacionar ciertos órganos con la respuesta a una determinada hormona, no es sino un reflejo de la distribución o especificidad tisular que encontramos en este tipo de sistema de reconocimiento. No todos los tejidos poseen receptores para todas las hormonas y, por lo tanto, no todos responden a todas las hormonas.

Pero existe otro tipo de especificidad, relacionada con la interacción molecular entre el sitio de reconocimiento o sitio activo y la estructura molecular que reconoce como ligando. Esta especificidad estructural, hace que existan receptores para andrógenos, estrógenos, progestágenos, gonadotrofinas, etc. y que no se evidencie una reacción cruzada entre estos sistemas.

Esa especificidad tan estricta es compartida por otras moléculas que interactúan entre sí, tales como enzimas y sustratos o anticuerpos con sus antígenos correspondientes.

Dado que cada célula poseerá un número limitado de sitios receptores, se desprende que se puede saturar los mismos con el agregado de cantidades crecientes de hormona.

Tal como mencionáramos más arriba, las interacciones más importantes, funcionalmente hablando, son las más débiles. En general puede establecerse una reacción reversible, cuyo desplazamiento hacia la formación del complejo Hormona-Receptor o en la dirección opuesta, dependerá de la afinidad existente entre el sitio activo y la molécula del ligando.

En situaciones patológicas o durante cambios fisiológicos que acompañan el desarrollo de un organismo o su crecimiento y diferenciación, las células pueden regular tanto el número de sitios receptores, como la afinidad de la interacción.

Para evaluar estas posibles situaciones, debe desarrollarse un sistema de detección del número

de sitios activos y de la constante de afinidad con que los mismos interactúan con el ligando.

El método más utilizado y que resuelve ambas situaciones al mismo tiempo, es el conocido como método según Scatchard y que consiste en lo siguiente: dada la imposibilidad de conocer exactamente la cantidad de receptor presente en una muestra de tejido o células, considerando que generalmente se cuenta con un homogeneizado tisular o suspensión celular, se recurre a tener la hormona identificada mediante una "marca" radiactiva o similar. En este caso, colocada esta hormona en presencia de la preparación de sitios receptores, se establecerá un equilibrio que dejará las especies libres y asociadas de hormona y receptor.

En un sistema "in vitro", las especies que pueden encontrarse en cualquier momento, son: Receptor libre, Hormona libre y complejo Hormona-Receptor. Debemos notar que, una vez establecido el equilibrio entre las diversas especies, una molécula de ligando se unirá a un sitio activo y que, por lo tanto, el valor del número de sitios de unión totales representará el número de sitios activos y no de moléculas de receptor (estas podrían tener más de un sitio activo por molécula nativa).

Con esta salvedad, cada vez que una molécula de hormona radiactiva se una a un sitio activo, se puede cuantificar como la expresión de un complejo ligando-receptor.

Considerando que se establece el siguiente equilibrio:



Es posible describir el equilibrio, en términos de hormona, de la forma siguiente:

$$K_a = \frac{[\text{HormonaUnida}]}{[\text{HormonaLibre}] * [\text{ReceptorLibre}]}$$

Considerando que no existan otras especies involucradas, tales como las formas degradadas de las moléculas, complejos con otras especies, etc, es correcto asumir que:

$$[ReceptorTotal] = [ReceptorLibre] + [ReceptorUnido]$$

Con esto, se reemplaza el factor [ReceptorLibre] (que queda indefinido ante la imposibilidad de determinarlo en forma directa) por su equivalente:

$$[ReceptorLibre] = [ReceptorTotal] - [ReceptorUnido]$$

De esta manera, la ecuación quedará constituida por:

$$K_a = \frac{[HormonaUnida]}{[HormonaLibre] * ([ReceptorTotal] - [ReceptorUnido])}$$

En realidad, si se considera que por cada sitio activo de molécula receptora, debe haber una sola molécula de hormona unida, es correcto decir que la [ReceptorUnido] es igual a la [HormonaUnida] y reemplazarlo. Esto tiene la ventaja de permitirnos manejar un dato conocido y de dejar la ecuación

expresada en los términos que nos interesa calcular: [ReceptorTotal] y la K_a . Una vez determinados estos parámetros, sabremos si la falla ocasionó una disminución o incremento en el número de sitios receptores o si lo que se modificó fue la afinidad de los mismos por su ligando específico.

Si escribimos esta ecuación, utilizando las abreviaturas de las palabras inglesas que normalmente se encuentran en los trabajos científicos, resulta:

$$K_a = \frac{B}{F * (N - B)}$$

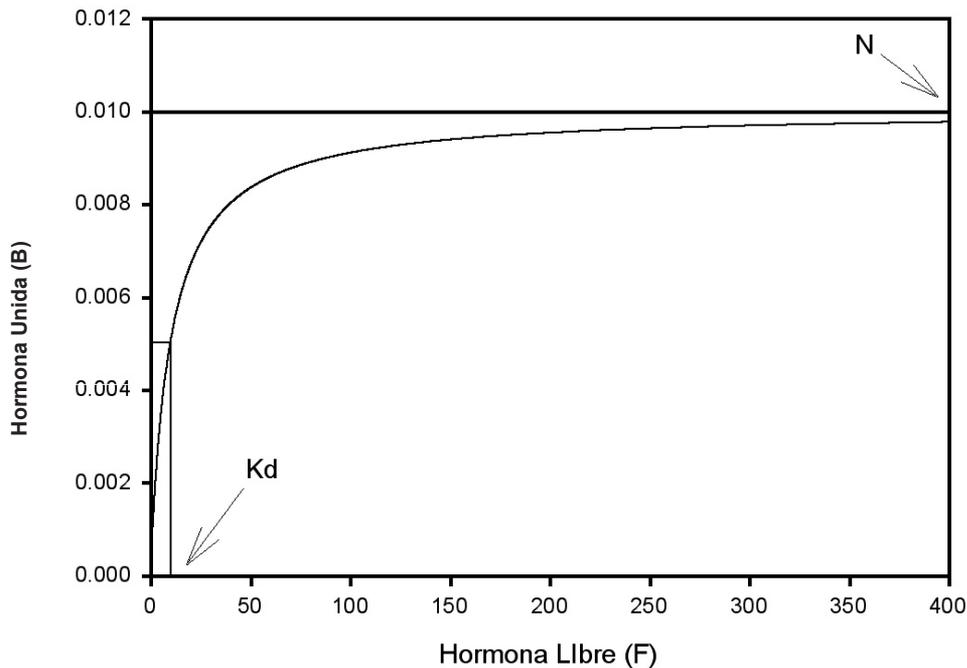
Donde B = [Hormona Unida], F = [Hormona Libre], N = [Sitios Receptores totales] y K_a = Constante de afinidad al equilibrio.

Si se reordenan los términos, para encontrar la relación entre Hormona Unida y Libre, se obtiene la expresión de una hipérbola:

$$B = \frac{N * F}{K_d + F}$$

Donde $K_d = 1/K_a$, es decir la constante de disociación al equilibrio.

Curva de Saturación



Este gráfico recibe el nombre de Curva de Saturación porque en el experimento se mantiene constante la concentración de sitios receptores y varía la concentración de hormona radiactiva.

De dicho gráfico se puede observar que el valor de K_d se obtiene igualando la ecuación a $B = N/2$, de lo que sigue que K_d resulta ser la concentración de hormona libre para la que se satura la mitad de sitios receptores.

Debe hacerse notar que en muchos trabajos se representa el mismo tipo de gráfico usando la concentración de hormona total agregada, en lugar de la hormona libre, lo cual no es correcto. En ese caso, el valor de la concentración de hormona total agregada, para saturar la mitad de sitios receptores

será igual a $K_d + N/2$. Solamente cuando el número de sitios receptores sea despreciable frente a la K_d , ambos gráficos serán equiparables.

Si bien en la figura se colocaron valores arbitrarios, las coordenadas tienen unidades de concentración.

Como el patrón de referencia para los cálculos es la hormona radiactiva, el valor de concentración de hormona unida y libre se deberá obtener a partir de la actividad específica de la hormona marcada.

Este valor de actividad específica, es la relación entre la actividad radiactiva y la masa correspondiente a la molécula hormonal. Las unidades podrán variar pero, para el cálculo más sencillo de los parámetros, se transforma la ecuación en la de una línea recta,

tal como se indica a continuación:

$$\frac{[HormonaUnida]}{[HormonaLibre]} = K_a * [ReceptorTotal] - K_a * [HormonaUnida]$$

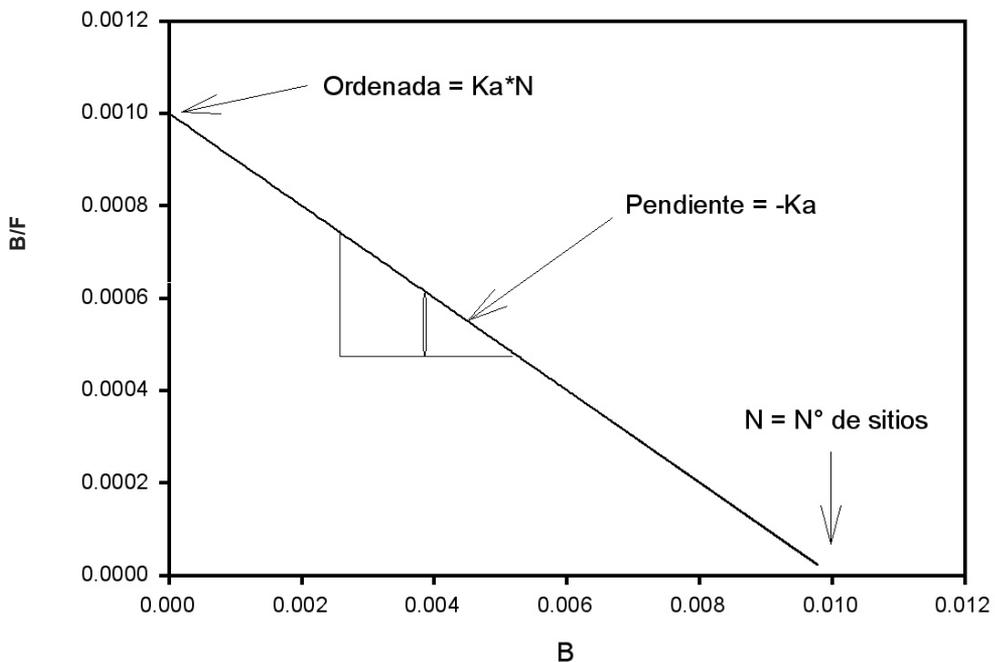
Esta ecuación es la expresión de una línea recta, con variable dependiente (y) igual a $[HormonaUnida]/[HormonaLibre]$, ordenada al origen igual a $K_a * [ReceptorTotal]$, pendiente igual a $-K_a$ y variable independiente (x) igual a $[HormonaUnida]$.

En nuestra forma de nombrar las especies, resulta:

$$B = K_a * N - K_a * B$$

Más aún, si uno extrapola esta recta hasta la intersección de la abscisa al origen, es decir el punto $(x,y)=(x,0)$, el valor de x resulta ser igual al número total de sitios receptores, es decir la $[ReceptorTotal]$. De la pendiente se puede obtener el valor de la constante de equilibrio de afinidad (K_a).

Gráfico según Scatchard



Este gráfico ha sido realizado utilizando los mismos valores arbitrarios que figuran en el gráfico anterior.

Esta forma de representación, tiene la ventaja de permitir, en un mismo par de ejes de coordenadas, visualizar la situación que se presente entre muestras controles y las muestras experimentales o bien, entre normales y pacientes, de cuyos tejidos (generalmente sangre o biopsias) se hayan obtenido los receptores.

Debe notarse que, para el cálculo de los valores incluidos en el gráfico según Scatchard, así como también para el gráfico de saturación, debieron calcularse los valores de hormona libre y de hormona unida en forma específica al receptor.

¿Por qué hacer esta salvedad? Porque es de sentido común el pensar que la hormona se unirá no solamente al receptor sino, también, al tubo de ensayo dado que su pared ofrecerá sitios de interacción inespecíficos. Resulta, por lo tanto, necesario determinar la cantidad de hormona que se ha unido en forma específica a los sitios receptores. Para esto, en paralelo a la incubación con hormona radiactiva, deberá incluirse una serie de tubos conteniendo una cantidad máxima, saturante, de hormona no radiactiva o "fría". Esta hormona competirá con la radiactiva por los sitios receptores y, al saturar los mismos, la radiactividad que quede asociada corresponderá al valor inespecífico. Dado que la hormona unida de esta manera no estará disponible para interactuar con el receptor, el valor de hormona libre se calculará como:

$$[\text{Hormona total}] - [\text{Hormona Unida tanto a los receptores como al inespecífico}]$$

La hormona unida en forma específica se calculará descontando al total unido el inespecífico.

Está más allá de las posibilidades de este capítulo, el analizar lo que sucede en otros casos donde el modelo es más complejo y no permite analizar los parámetros en forma tan sencilla, debido a la presencia de sitios múltiples de interacción, o interacciones tan fuertes que pueden considerarse "irreversibles".

En la mayoría de las situaciones, un análisis directo y simple como el presentado, permite resolver el problema planteado.

Bibliografía

1. Receptor-ligand interactions: a practical approach. E. C. Hulme. The practical approach series. IRL Press, Oxford University Press, New York, 1992.
2. Teoría de la interacción ligando-receptor. Monografía. Juan Carlos Calvo. Biblioteca Instituto de Biología y Medicina Experimental. Vuelta de Obligado 2490. (1428) Ciudad de Buenos Aires.
3. Measurement of specific activities in labelled hormones by self-displacement analysis. Calvo JC, Radicella JP, Charreau EH. Biochemical Journal 212(2): 259-264, 1983
4. A simple computer program for Scatchard plot analysis of hormone receptors including statistical analysis on a low cost desk top calculator. Sagripanti JL, Santa Coloma TA, Calvo JC. Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana 34: 51-59, 1984
5. Effects of radioiodination on hormone binding ability. Radicella JP, Calvo JC, Charreau EH. Journal of Receptor Research 5: 345.369, 1985