

1 9 9 1 - B

089028345

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



IDENTIFICACION DE ACTIVIDAD SEXUAL EN NEURONAS
HIPOTALAMICAS DEL RATON ADULTO POR MEDIO DE DOBLE
TINCION INMUNOCITOQUIMICA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARTHA ALICIA RIVERA TOVAR

GUADALAJARA, JALISCO. 1995

**IDENTIFICACION DE ACTIVIDAD SEXUAL EN
NEURONAS HIPOTALAMICAS DEL
RATON ADULTO POR MEDIO DE
DOBLE TINCION INMUNOCITOQUIMICA**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEL
CENTRO DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

PRESENTA

MARTHA ALICIA RIVERA TOVAR



Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas y Ambientales
Biología

0515/95

C. MARIYA ALICIA RIVERA TOVAR
PRESENTE. -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "IDENTIFICACION DE ACTIVIDAD SEXUAL EN NEURONAS HIPOTALAMICAS DEL RATON ADULTO POR MEDIO DE DOBLE TINCION INMUNOCITOQUIMICA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el Dr. Mario I. Romero Ortega.

C.U.C.B.A.



DIV. DE CS.
BIOLOGICAS Y
AMBIENTALES

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal. 17 de Marzo de 1995
EL DIRECTOR

Fernando Alfaro Bustamante

DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

EL SECRETARIO

Guillermo Barba Calvillo
BIO. GUILLERMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- El Dr. Mario I. Romero Ortega, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

FAB/GFC/cglr.

Recebi
21/03/95

Dr. Fernando Alfaro Bustamante
Universidad de Guadalajara
Facultad de Ciencias Biológicas
Director

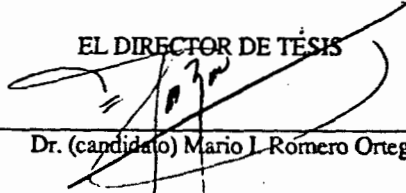
PRESENTE

Por medio de éste conducto, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante Martha Alicia Rivera Tovar código número 089028345 con el título "Identificación de Actividad Sexual en Neuronas Hipotalámicas del Ratón Adulto por Medio de Doble Tinción Inmunocitoquímica", consideramos que reúne los méritos necesarios para la ~~impresión~~ impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

ATENTAMENTE
Guadalajara, Jalisco. Mayo 5, 1995.

EL DIRECTOR DE TESIS


Dr. (candidato) Mario I. Romero Ortega

SINODALES:

Dr. Víctor M. Alcaráz
Instituto de Neurociencias
Universidad de Guadalajara

Dr. Fernando Alfaro Bustamante
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Guadalajara

M. en C. Emilio Rives
Centro de Estudios del Comportamiento
Universidad de Guadalajara



DEDICATORIA

A Mario: Por todo el apoyo que me brindo en todo momento, además le agradezco la infinita paciencia que tuvo hacia mí para asesorarme y guiarme de una manera correcta a través de éste proyecto.

Infinitas gracias ya que por tú esfuerzo y colaboración todo esto ha sido posible. Por eso, todo mi respeto y admiración ... Te amo.

A mis Hijos: Alexis y al que llevo aquí en mi vientre, por todos los momentos felices que he compartido con ellos.

A mis Padres y Hermanos: Por toda la confianza que un día depositaron en mi. Mil gracias por darme la oportunidad de estudiar y así lograr ser alguien en la vida.

A Alma: Por ser una persona que me ha enseñado a luchar como ella, y además por todas sus ganas de vivir. Amiga, ... Gracias.

A la Doctora Carol J. Phelps: Por la oportunidad que me brindó y por creer en mi. Gracias.

A Juan Carlos: Por su ayuda incondicional en todo momento.

A Rosa María Domínguez: Por la preocupación constante en la realización de éste proyecto.

INDICE

Agradecimientos.....	1
Lista de abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
INTRODUCCION.....	4
I. Actividad Sexual.....	4
A. Control neuronal de las gonadotropinas.....	4
B. Hormona de crecimiento en la actividad sexual.....	5
II. Inmunocitoquímica (ICC).....	8
A. Bases inmunológicas.....	9
B. Modalidades técnicas.....	10
a). Método directo.....	10
b). Método de dos etapas.....	10
c). Método de tres (PAP), y cinco (ABC), etapas.....	11
C. Especificidad en tinciones.....	13
D. Doble tinción.....	14
III. FOS como marcador de actividad neuronal.....	15
JUSTIFICACION.....	16
OBJETIVOS.....	17
MATERIAL Y METODOS.....	18
RESULTADOS.....	21
DISCUSION.....	40
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44

AGRADECIMIENTOS

La realización de éste proyecto técnico se llevo a cabo en el laboratorio de Neuroendocrinología del Departamento de Anatomía de la Escuela de Medicina en la Universidad de Tulane, Estados Unidos. Bajo la dirección y asesoría del Candidato a Doctor Mario Romero, a quien agradezco toda su enseñanza y seguimiento de éste trabajo. Toda mi admiración para Tí.

Así mismo doy toda mi gratitud a la Doctora Carol J. Phelps por apoyar y permitir la realización de éste trabajo, así como sus sabios comentarios para que todo funcionara lo mejor posible. El presente trabajo es parte de un proyecto de colaboración que se lleva acabo entre el Doctor A. Bartke en la Universidad de Southern Illinois y la Doctora Carol J. Phelps en la Universidad de Tulane, quienes son apoyados por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, claves HD 20001 y NS 25987, asignados a A. Bartke y C. Phelps, respectivamente.

Agradezco también a la M. en C. Cecilia Tinoco por sus valiosos comentarios en la escritura del presente trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

1°	Anticuerpo primario
2°	Anticuerpo secundario
ABC	Complejo avidina-biotina-peroxidasa
APO	Area preóptica en el hipotálmo anterior
DBA	Tetrahidrocloro de diaminobenzideno
EM	Eminencia media
FSH	Hormona folículo estimulante
HC	Hormona de crecimiento
ICC	Inmunocitoquímica
Igs	Inmunoglobulinas
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona estimulante de la hormona luteinizante
OVLT	Organo vascular de la lámina terminalis
PAP	Complejo peroxidasa/anti-peroxidasa
PA	Glándula pituitaria, lóbulo anterior
PBS	Solución salina amortiguadora

RESUMEN

La acromegalia es una enfermedad que en seres humanos resulta de la secreción excesiva y continúa de la hormona de crecimiento (HC) normalmente debido a tumores en la glándula pituitaria. La HC es un péptido que se sabe regula el crecimiento y el metabolismo energético en los organismos que la producen. Los altos niveles de HC se asocian con deficiencias en el aparato reproductor. En la Universidad de Tulane en Nueva Orleans, Estados Unidos, la Dra. Carol Phelps se ha propuesto determinar el efecto de altos niveles de HC en la reproducción y en el comportamiento sexual en un modelo de ratones con niveles altos de HC.

El presente estudio reporta la identificación de actividad (mediante la localización inmunocitoquímica del factor de transcripción molecular FOS) en aquellas neuronas que participan en la regulación sexual (aquellas que producen la hormona estimulante de las hormonas sexuales; LHRH), en ratones transgénicos con niveles elevados de HC. El tejido cerebral de éstos animales fué incubado por 48 hrs a 4° C con anticuerpos dirigidos tanto para la localización individual, como simultánea, de LHRH y de FOS. El complejo antígeno-anticuerpo fué visualizado mediante la incubación del tejido con una solución de avidina-biotina-peroxidasa conocida como ABC, seguida de la reacción enzimática catalizada por la enzima peroxidasa, utilizando 0.02% de tetrahidrocloro de diaminobenzideno y 0.003% de H₂O₂, lo cual da como resultado un producto precipitable de color café. La visualización de dos antígenos en el mismo tejido se logró mediante la adición de 0.5% de NiSO₄ a la solución de DAB, lo cual da un producto precipitable de color azul-negro.

La estimulación sexual de ratones machos a través de hembras nóveles resultó en la activación de neuronas localizadas en el núcleo preóptico anterior del hipotálamo, a aproximadamente 360 µm de la zona de mayor concentración de neuronas LHRH. El análisis cualitativo aquí realizado, parece indicar que los altos niveles de HC presente en los animales transgénicos, no interfiere con la activación neuronal del núcleo preóptico, e indica que la pregunta a acerca del mecanismo responsable de la falta de respuesta sexual en los ratones transgénicos, queda aún sin aparente respuesta.

INTRODUCCION

I. Actividad sexual

El funcionamiento normal del aparato reproductor depende de complejas interacciones entre el medio ambiente y los sistemas nervioso y endócrino. Esto es, los estímulos sociales que afectan el comportamiento sexual de los organismos, también estimulan secreciones endócrinas que preparan fisiológicamente a éstos animales para la reproducción sexual (Davidson, 1980).

La actividad sexual en general está regulada a través del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas (Figura 1), y depende primordialmente de hormonas, conocidas como gonadotropinas, que se producen en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria o adenohipófisis (pituitaria anterior; PA). Estas hormonas son, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Ambas gonadotropinas son secretadas por la PA al torrente sanguíneo para ser transportadas a sus sitios de acción; las gónadas, es decir; los ovarios en las hembras y los testículos en los machos. En éstos últimos, la FSH se une a receptores en las células de Sertoli que se encuentran localizadas dentro de los túbulos seminíferos, donde estimula la producción de una proteína que captura a la testosterona y la incorpora al interior de los túbulos seminíferos para que promueva la generación de espermatozoides (Malven, 1993, Vardin 1980).

La LH se une a receptores que se encuentran en la membrana de las células intersticiales en los testículos conocidas como células de Leydig, mediante los cuales la LH estimula la síntesis y la secreción de la hormona masculina, testosterona (Figura 1). La secreción de testosterona al torrente sanguíneo afecta a una variedad de órganos que en conjunto regulan el desarrollo y la respuesta sexual en los machos (Malven, 1993, Vardin, 1980).

I. A. Control neuronal de las gonadotropinas

La síntesis y la secreción de las gonadotropinas FSH y LH depende de un decapeptido conocido como hormona estimulante de la LH (LHRH), cuya presencia fue demostrada por MacCann y colaboradores en 1960. La LHRH estimula la secreción de ambas gonadotropinas de la PA. La localización anatómica de las neuronas que producen LHRH ha sido demostrada mediante

métodos inmunocitoquímicos (ver más adelante). Estas células nerviosas se encuentran localizadas en un núcleo del hipotálamo denominado area preóptica anterior (APO), a nivel de la banda diagonal de Broca y el septo medio, asemejando una "Y" invertida en su distribución.

La mayor concentración de neuronas LHRH se ubica en el area denominada órgano vascular de la lámina terminalis (OVLT). Desde ahí, éstas neuronas mandan proyecciones hacia una red de vasos sanguíneos localizados en la mediación del hipotálamo y la PA conocida como eminencia media (EM; Hoffman et al., 1986). En respuesta a estímulos sexuales, las neuronas LHRH secretan éste decapeptido al torrente sanguíneo de la EM para ser transportado a la PA, donde se asocia a receptores específicos en las células gonadótropas, y estimula la producción de FSH y LH, así como su secreción en el torrente circulatorio general, para que éstas a su vez estimulen a las gónadas.

Tal como se ilustra en la Figura 1, los niveles de las hormonas gonadotropicas son mantenidos en equilibrio fisiológico mediante el balance de la estimulación inducida por el LHRH, y la inhibición por retroalimentación que la testosterona tiene tanto sobre la LHRH en el hipotálamo, como sobre la liberación de las gonadotropinas en la PA (Malven, 1993, Vardin 1980).

I. B. La hormona de crecimiento en la actividad sexual

La hormona de crecimiento (HC) es también producida por células especializadas en la PA conocidas como células somatótropas. La HC es una hormona polipeptídica de aproximadamente 200 aminoácidos. Se sabe que la HC participa en la regulación del metabolismo energético y el crecimiento general de los tejidos y que sus niveles en sangre son regulados dentro de un rango fisiológico estricto. Los bajos niveles en la HC son responsables de algunos tipos de enanismo y desbalance energético, por el contrario, niveles muy altos de esta hormona como aquellos producidos por ciertos tumores en la PA, resultan en acromegalia. Esta condición es un síndrome clínico que se manifiesta como un crecimiento excesivo del tejido óseo, que resulta en la elongación de los huesos particularmente en la cara, manos y pies. Así mismo, resulta en el crecimiento del tejido epitelial que se manifiesta como engrosamiento de la piel. Si la acromegalia ocurre antes de que el proceso de osificación haya terminado, ésta condición induce un crecimiento excesivo de los huesos apendiculares lo cual da

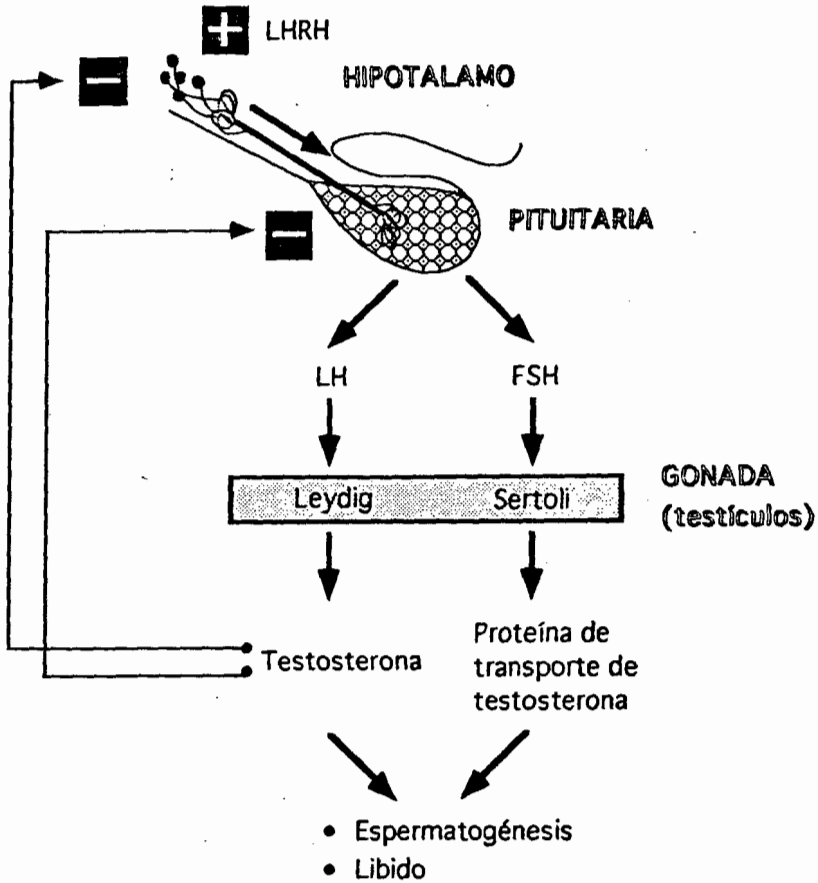


Figura 1. Regulación del eje hipotálamo-pituitaria-gónada en los machos

como resultado personas de muy alta estatura. Esta modalidad de acromegalia, es conocida como gigantismo (Bouloux et al., 1992).

Resulta interesante saber que en machos, el común denominador tanto en animales de experimentación como en seres humanos, es que los niveles elevados de HC debido a tumores en la PA, resultan también en la disminución

de los niveles de testosterona, en involución testicular, y en una total inhibición del comportamiento sexual en general (Krieger, 1980).

En los Estados Unidos, Andrezej Bartke en la Universidad de Southern Illinois, y su colaborador Carol Phelps en la Universidad de Tulane, utilizan ratones que fueron diseñados mediante ingeniería genética para que expresen continuamente niveles elevados de la HC, con el objeto de estudiar dicha hormona, y su papel en la actividad sexual en los ratones machos. Estos ratones transgénicos han demostrado ser un valioso modelo experimental debido a que, como resultado de los niveles elevados de HC, tanto hembras como machos presentan deficiencias reproductivas (Chandrashekar et al., 1991, Bartke et al., 1992).

Las deficiencias observadas inicialmente en los machos transgénicos a nivel de comportamiento sexual, no se han podido explicar en base a disfunción testicular, debido a que tanto la producción de testosterona, como de espermatozoides, es normal en éstos animales (Bartke et al., 1994). Por otro lado, los niveles de LH se encuentran ligeramente elevados en los machos transgénicos, lo cual parece excluir la PA como órgano causal de las deficiencias reproductivas en éstos animales. Sin embargo en condiciones de estimulación sexual, en donde la PA normalmente responde incrementando la secreción de LH (como lo es luego de que los machos son expuestos a hembras receptivas), acorde con la falta de conducta sexual de los ratones transgénicos machos ante tal tipo de estimulación, los niveles de LH no se modifican (Bartke et al., 1994).

A. Bartke y C. Phelps han diseñado un experimento, que intenta demostrar que los altos niveles de la HC en los machos transgénicos afectan directamente a las neuronas LHRH en el hipotálamo, evitando su acción sobre la secreción de LH, luego del estímulo sexual. Dicho diseño experimental se ilustra en la Figura 2, y consiste en tomar ratones machos normales que se sabe responden sexualmente a la presencia de hembras distintas a las habituales (nóveles), y ratones transgénicos, que se sabe no responden ante el estímulo de dichas hembras, y sacrificarlos una hora después de estimularlos con la exposición a dichas hembras, para evaluar el estado de actividad de las neuronas LHRH en el hipotálamo de estos animales.

MODELO EXPERIMENTAL

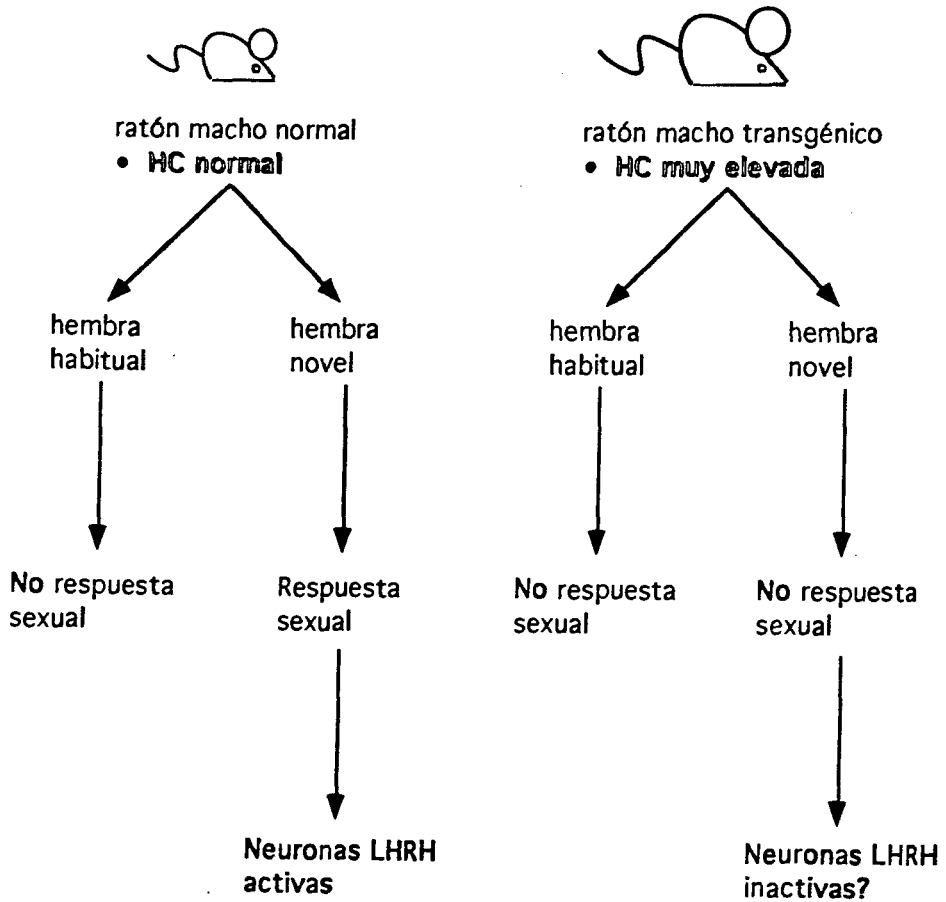


Figura 2. Diseño experimental del efecto de niveles altos de HC en la respuesta sexual en ratones machos

Técnicamente éste experimento requiere de identificar a las neuronas LHRH que participan en la regulación sexual, y de identificar cuales de éstas células se activaron luego de la exposición a las hembras nóveles. La identificación de la

neuronas que producen LHRH se realiza rutinariamente a través de técnicas de tinción inmunocitoquímicas, y el estado de actividad neuronal se puede demostrar mediante la evaluación inmunocitoquímica de la expresión de un factor de transcripción nuclear conocido como FOS, ambas técnicas se explican a continuación.

II. Inmunocitoquímica (ICC).

La ICC se ha convertido en la más popular de las técnicas histológicas de la actualidad, con amplias aplicaciones en todas las ramas de las ciencias biológicas y médicas. Sin embargo, el impacto ha sido mayor en el campo de la neurobiología. La ICC combina la sensibilidad y especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo con la habilidad de visualizar inmunoreactividad en tejidos mediante el uso de la microscopía, ya sea esta óptica, fluorescente, o electrónica. La importancia de la ICC reside en que provee evidencia anatómica acerca de la existencia y localización específica de antígenos de interés en una gran variedad de tejidos.

II. A. Bases inmunológicas

El fundamento inmunológico de la ICC reside en la especificidad del complejo antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos (Figura 3) son moléculas secretadas por los linfocitos B en el sistema circulatorio linfático. Pertenecen al grupo molecular de glicoproteínas conocidas como inmunoglobulinas (Igs) de las cuales se han descrito cinco diferentes clases: M, G, A, E y D. Las Igs G constituyen la clase más abundante en el torrente sanguíneo y es producida predominantemente durante la respuesta inmune secundaria. Las Igs G están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas de aproximadamente 440 aminoácidos y dos cadenas ligeras de aproximadamente 220 aminoácidos. La producción de anticuerpos por los linfocitos B es estimulada por moléculas que los organismos reconocen como extrañas, conocidas como antígenos. La parte del antígeno que es reconocida por el anticuerpo se denomina epítipo. Los genes que producen los fragmentos variables de las cadenas ligeras y pesadas, denominados kappa y lambda, tienen una tasa de

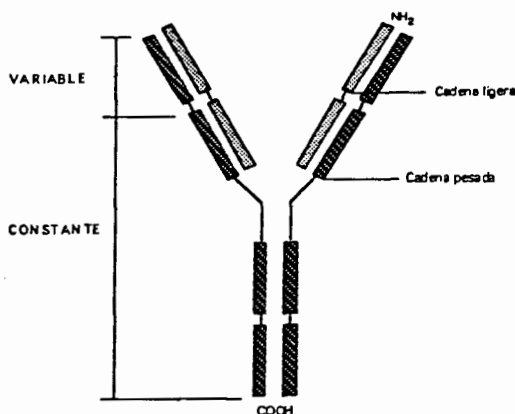


Figura 3. Estructura general de las inmunoglobulinas G

mutación somática muy elevada, que resulta en la producción de anticuerpos capaces de reconocer cualquier forma molecular concebible, lo cual se cree es la base de la generación de la respuesta inmune (Milstein, 1985, Köhler, 1986).

II. B. Modalidades técnicas

a). Método directo. Coons y colaboradores en 1941 fueron los primeros investigadores en utilizar anticuerpos marcados para la visualización de antígenos en los tejidos, su método denominado directo (Figura 4A), consiste en marcar los anticuerpos de interés con compuestos fluorescentes tales como fluoresceína, rodamina, ó con enzimas tales como peroxidasa de rábano, gluco-oxidasa, o con partículas de ferritina, o de oro coloidal.

b). Método de dos etapas. Con el objetivo de mejorar el poder de resolución de ésta técnica, Weller y Coons 1954, desarrollaron una modificación del método directo. Su nuevo método denominado de dos etapas (Figura 4B), utiliza un segundo anticuerpo, denominado secundario, dirigido contra la IgG del animal que se utilizó para la obtención del anticuerpo denominado primario que reconoce el antígeno de interés, para conjugarlo con un marcador visual. Esta modalidad se basa en la asociación del anticuerpo secundario con el primario,

por ejemplo; Igs G anti-conejo obtenidas en chivo son conjugados con fluorocromos o enzimas para detectar el anticuerpo primario obtenido en conejos. La ICC de dos etapas es más sensible que el método directo debido a que múltiples anticuerpos secundarios pueden asociarse con los anticuerpos primarios. También emplea anticuerpos comunes en el suero de varios animales para la manipulación de marcaje, lo que resulta en un método más conveniente y versátil para el proceso de visualización.

c). *Método de tres (PAP), y cinco (ABC), etapas.* A fines de los años 60 Sternberger desarrolló la técnica denominada peroxidasa/anti-peroxidasa (PAP; Sternberger et al., 1970). Este método (Figura 4C) se basa en la utilización de anticuerpos secundarios que no están marcados. La tercera etapa consiste en la utilización del complejo PAP (previamente formado), debido a que el anticuerpo anti-peroxidasa, se obtiene de la misma especie de donde se obtuvo el anticuerpo primario, entonces el anticuerpo secundario lo reconoce tal como lo hace con el primario, y como éste ya está asociado a la enzima peroxidasa, entonces solo se incubaba con la solución que permita localizar el complejo PAP luego de una reacción colorimétrica catalizada por la enzima. La ventaja sobre los métodos anteriores es una mayor sensibilidad debido a un incremento en el número de peroxidasa por antígeno.

Debido a que la intensidad de la tinción en el método PAP es función de la actividad de la enzima peroxidasa, entonces una mayor sensibilidad puede ser alcanzada si se incrementa el número de moléculas de peroxidasa ligadas al antígeno de interés. Esto se ha logrado mediante la técnica denominada avidina-biotina-peroxidasa (ABC; figura 4D) que fuera reportada por Hsu y colaboradores en 1981. La biotina es una vitamina de pequeño tamaño molecular y la avidina es una glicoproteína de 68 KD de peso molecular que se obtiene de la clara de huevo y de algunas bacterias. La avidina tiene una extraordinaria afinidad por la biotina y provee sitios de unión para cuatro moléculas de biotina. Por medio de ésta técnica el tejido es incubado con el anticuerpo primario, seguido de una incubación con el anticuerpo secundario, éste último es marcado con múltiples moléculas de biotina. Finalmente la preparación es incubada con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, en éste caso es la peroxidasa a la cual se le ligan

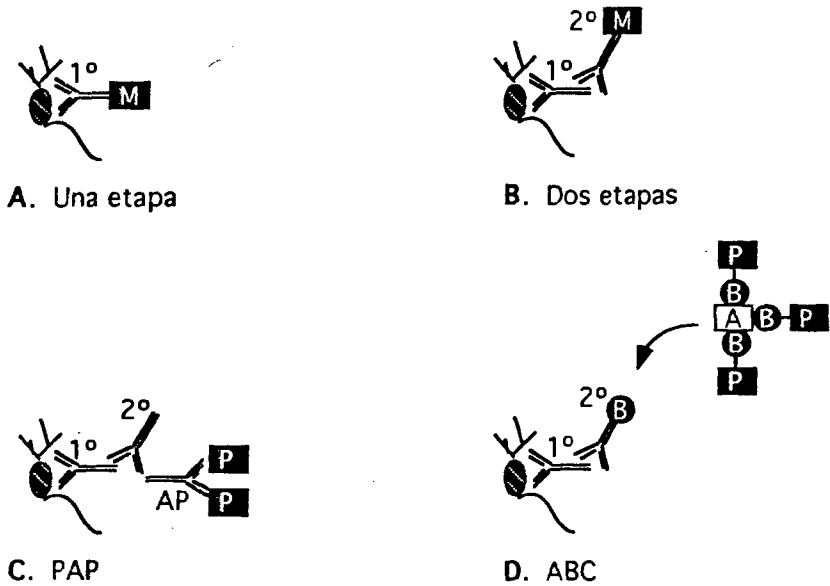


Figura 4. Modalidades técnicas del ICC. 1° = anticuerpo que reconoce antígeno de interés. 2° = anticuerpo que reconoce al anticuerpo 1°. M = molécula marcadora. P = peroxidasa. A = avidina. B = biotina.

varias moléculas de biotina, y cuando se asocia con la avidina, entonces se forma un complejo que amplifica el número de moléculas enzimáticas (dado a que la avidina une hasta 4 biotinas) por unidad de antígeno. La estructura molecular del complejo final se desconoce, pero se cree que debido a que la biotina se utiliza a concentraciones de subsaturación con respecto a sitios disponibles en la avidina entonces, cuando se incuba con el tejido, éstos sitios disponibles se asocian al anticuerpo secundario que también tiene moléculas ligadas de biotina (Hsu et al., 1981).

Además de peroxidasa, el complejo ABC puede asociarse con otras enzimas, ú otros métodos de visualización como fluorocromos, partículas de oro para microscopía electrónica, o marcas radiactivas como I^{125} . Por ello el método ABC

provee la sensibilidad del método de 3 etapas con la flexibilidad de marcaje de un método de dos etapas. Por ésta razón los métodos ABC son quizá los más utilizados actualmente en la inmunocitoquímica.

II. C. Especificidad en tinciones

Para poder caracterizar una tinción inmunocitoquímica como específica debe de cubrir dos requisitos independientes: especificidad del anticuerpo y especificidad del método (Watson y Akil, 1981).

La especificidad del anticuerpo tiene que ser demostrada con rigor (Leeuwen, 1986). Uno de los requisitos que deben de demostrarse es la prueba de preadsorción, dicha prueba, consiste en preincubar el anticuerpo primario con una cantidad apropiada del antígeno de interés previamente purificado. Los anticuerpos que sean específicos contra este antígeno formaran un complejo que deberá bloquear toda la inmunoreactividad específicamente debida a tal antígeno. Si luego de preadsorber el anticuerpo, aún se encuentra tinción en los tejidos, debe de tomarse como indicativo de anticuerpos contaminantes o reacción cruzada en el suero utilizado. Sin embargo, es importante notar que algunos anticuerpos monoclonales, es decir anticuerpos idénticos contra un solo determinante antigénico (epítope), y aquellos anticuerpos contra moléculas de pequeño tamaño, no forman complejos con sus antígenos y por lo tanto el proceso de "preadsorción" en estos casos, no elimina la tinción inmunocitoquímica.

Además de preadsorber con el antígeno de interés es también recomendable preadsorber el anticuerpo con sustancias similares a éste, particularmente con aquellas que pudieran encontrarse en el tejido a analizar, a fin de determinar si existe o no reacción cruzada del anticuerpo con éstas sustancias. Así mismo es recomendable procesar tejidos que se sabe contengan control positivo y carezcan de control negativo del antígeno de interés, a la par que los tejidos experimentales. El control positivo debe demostrar tinción en tanto que el negativo debe de ser el "blanco".

Para demostrar la especificidad del método, tiene que demostrarse que la tinción positiva es resultado exclusivo de la interacción entre el anticuerpo

primario y el antígeno de interés en el tejido. Esto es importante debido a que en ciertas circunstancias el tejido puede presentar autofluorescencia o actividad enzimática endógena, que pueden dar falsos positivos. La especificidad del método se demuestra realizando varios controles, el más importante es el de eliminar el anticuerpo primario de la solución incubadora y procesar el tejido con el resto de las soluciones a utilizar. Si alguna tinción es observada en este caso, entonces es una tinción no específica (Leeuwen, 1986). Normalmente se debe correr una serie de diluciones del anticuerpo primario para obtener aquella que maximice la señal con el mínimo de tinción no específica antes de procesar tejidos experimentales (Ciocca y et al., 1983).

II. D. Doble tinción

En ocasiones es necesario la localización simultánea de dos antígenos en el mismo tejido, lo cual se ha realizado de diferentes formas. Inicialmente se utilizaron anticuerpos primarios diferencialmente marcados con dos tipos distintos de fluorocromos utilizando el método directo, ésta manipulación da como resultado la visualización de los antígenos con dos colores fluorescentes distintos, usualmente rojo y verde (Vandesande, 1979).

Otra variante de métodos inmunocitoquímicos de doble tinción consiste en procesar el tejido para el primer antígeno de interés; fotografiarlo, remover los complejos antígeno-anticuerpo; es decir, borrar esa primera tinción y procesar el tejido para el segundo antígeno de interés (Tramu y et al., 1978, Nakane 1968, Brecha y et al., 1981). Más recientemente la utilización de reacciones enzimáticas que dan como resultado productos precipitables de dos colores distintos usualmente negro y café, han sido descritas particularmente para la co-localización de antígenos que utilizan distintos compartimientos celulares, por ejemplo; citoplasma y núcleo (Hoffman et al., 1992, Smith y Day, 1993).

El presente proyecto reporta la implementación de la técnica de doble tinción inmunocitoquímica, específicamente para localizar de manera simultánea aquellas neuronas que producen LHRH, así como aquellas células que producen el factor de transcripción molecular FOS, que como se explica a continuación, es también considerado como un índice de actividad neuronal.

III. FOS como marcador de actividad neuronal

La estimulación en las neuronas a través de receptores ya sea en la membrana celular, o bien intracelulares, o por depolarización, es interpretada en el interior de las células por aquellos substratos citoplasmáticos y nucleares que constituyen la respuesta al dicho estímulo (Doucet et al., 1990). En el núcleo, la respuesta a varios estímulos induce la expresión rápida y momentánea de un grupo de genes, conocidos como genes tempranos, tales como c-fos. Dichos genes codifican proteínas que actúan como factores de transcripción de otros genes es decir, participan en la regulación de las proteínas que la célula requiere para responder al estímulo.

La proteína que resulta de la transcripción de c-fos es conocida como FOS (Morgan y Curran, 1989). La mayoría de las neuronas normalmente no producen éste factor de transcripción cuando no están activas sin embargo, luego de ser estimuladas, la síntesis de c-fos es rápidamente inducida alcanzando el máximo nivel de expresión de 60-90 minutos después del estímulo inicial, permaneciendo detectable en las células de 2 a 5 horas después (Morgan y Curran, 1989). Por ésto, la expresión de c-fos en el sistema nervioso central se utiliza como un marcador convincente de actividad neuronal (Hoffman et al., 1992). Combinando la identificación fenotípica de las neuronas (como es la localización de neuronas que producen LHRH, y la localización del factor FOS, por medio de inmunocitoquímica doble, es posible evaluar el estado de actividad de tipos específicos de neuronas (Hoffman et al., 1990; Hoffman, 1992).

Recientemente, la ICC de doble tinción de LHRH y FOS, se ha utilizado en ratas hembras para demostrar que dichas neuronas se activan antes de la secreción de LH que se observa en estos animales en la tarde de proestro (Lee et al., 1990). Así mismo, se ha reportado que las neuronas LHRH expresan FOS, es decir; se activan, en roedores en el momento del apareamiento (Baum y Everitt, 1992, Wu et al., 1992). Estos estudios apoyan el uso de la doble tinción ICC de LHRH y FOS, como herramienta para evaluar el estado de activación del las neuronas LHRH, luego de la estimulación sexual.

JUSTIFICACION

El estudio del efecto de altos niveles de HC en la reproducción y el comportamiento sexual en un modelo de ratones con niveles altos de ésta hormona, intenta determinar si las neuronas que regulan el funcionamiento sexual en ratones machos, y que a su vez controlan la espermatogénesis y el comportamiento sexual en estos animales, se activan en respuesta a la exposición con hembras nóveles de la misma especie.

Técnicamente se requiere de identificar en secciones de tejido cerebral, a aquellas neuronas que participan en la regulación sexual (aquellas que producen la hormona estimulante de las hormonas sexuales; LHRH), y de identificar cuáles de éstas células se activaron luego de la exposición a hembras nóveles (aquellas que producen el factor de transcripción molecular FOS, que es a su vez un índice de actividad neuronal).

En éste proyecto se presenta la implementación de la técnica de doble tinción inmunocitoquímica, que localiza simultáneamente dos moléculas diferentes en el mismo tejido, y que se utilizará como herramienta para el estudio antes mencionado. En él se combina la tinción histológica de aquellas neuronas que producen LHRH, con la tinción de aquellas que expresan FOS, es decir; que están activas. La visualización simultánea de ambas moléculas se logró gracias a la tinción de color café de neuronas que producen LHRH en el citoplasma, y a la tinción de color negro de las neuronas que producen FOS en el núcleo. Las células que presentaron citoplasma café y núcleo de color negro, identifican a aquellas neuronas sexuales que se encuentran en estado de activación.

OBJETIVOS

- 1.- Implementar la tinción inmunocitoquímica de neuronas que producen LHRH en tejido cerebral de ratones adultos.
- 2.- Implementar la tinción inmunocitoquímica de neuronas que producen FOS en tejido cerebral de ratones adultos.
- 3.- Combinar las tinciones de LHRH y FOS de manera secuencial en los mismos cortes histológicos.
- 4.- Probar el uso de ésta técnica de doble tinción en las neuronas que regulan el funcionamiento sexual (LHRH), con el marcador de actividad (FOS), en ratones que debido a niveles excesivos en la HC presentan deficiencias reproductivas.



MATERIAL Y METODOS

Animales

Los animales utilizados en el presente trabajo pertenecen a dos líneas de ratones transgénicos que fueron diseñados para expresar de manera continua, ya sea la HC bovina, o la HC humana. Estos animales fueron creados mediante la microinyección de los genes de HC de éstas dos especies, al pronúcleo masculino de óvulos fecundados de ratón (Palmiter et al., 1982). La colonia de animales transgénicos pertenece al Dr. Bartke en la Universidad de Southern Illinois. Ahí se mantienen a estos animales en condiciones de temperatura y luz controladas, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Animales heterocigotos, es decir; normales, fueron empleados en los primeros tres objetivos del presente trabajo. En tanto que, animales homocigotos, es decir; ratones gigantes con niveles altos de la HC, solo fueron incluidos en la realización del cuarto objetivo. Únicamente animales machos de más de dos meses de edad, fueron incluidos en este estudio.

Preparación del tejido

Una hora después de que los ratones machos, tanto normales como transgénicos, fueron sometidos a la exposición a hembras, ya sea aquellas de la misma caja, o a hembras nóveles, éstos fueron anestesiados y canulados en el ventrículo izquierdo del corazón para la perfusión. La sangre fué removida mediante solución salina y posteriormente el tejido fué fijado mediante la perfusión con soluciones amortiguadas de formaldehído al 4%. La preparación del tejido fué también realizada en el laboratorio del Dr. Bartke, quien posteriormente de la mencionada preparación, nos envió los cerebros de éstos animales para su procesamiento inmunocitoquímico.

Al ser recibidos, los cerebros prefijados fueron transferidos a una solución de 32% sacarosa/ 4% paraformaldehído al menos durante 24 hrs, para evitar que el tejido se dañara al ser congelado para ser cortado en secciones. Dicho corte se realizó mediante un microtomo manual, en donde se obtuvieron secciones coronales de tejido cerebral de 30 μm de espesor. Las secciones fueron separadas en seis grupos, es decir; cada sexta sección en orden anterior a posterior fueron colectadas diferencialmente con el objeto de tener la posibilidad de realizar seis distintas evaluaciones inmunocitoquímicas por animal. Luego de seccionar el

cerebro, las secciones fueron almacenadas en una solución anticongelante a -20°C hasta su utilización.

Inmunocitoquímica

Para el proceso de ICC, el tejido cerebral fué lavado primeramente con una solución salina amortiguadora (PBS; pH 7.5), para eliminar el exceso de paraformaldehído o de anticongelante, según el caso, del tejido. Posteriormente, el tejido fué incubado durante 1 hr con suero normal de la especie de animal de la cual se obtuvo el anticuerpo secundario (2°), a fin de reducir la tinción no específica. El suero normal se utiliza a una dilución 1:70 en PBS. Al terminar la incubación, el tejido fué transferido a una solución de PBS-tritón X-100 (PBS-TX), un detergente que se adiciona al 4% a fin de facilitar la penetración del 1° al interior de las células, albúmina sérica bovina al 1%, y el anticuerpo primario (1°) a una dilución óptima para ser incubado por 48 hrs a 4°C . El exceso de 1° , que no haya formado complejo con el antígeno en las células, se removió mediante una extensiva serie de lavadas con PBS. El tejido fue luego incubado con el 2° que se utiliza a una concentración de 1:200 en PBS-TX, y está dirigido a reconocer las Igs G de las especies de animales de las que se obtuvo el 1° . El complejo antígeno- 1° - 2° fué visualizado mediante la incubación del tejido con una solución de avidina-biotina-peroxidasa conocida como ABC (Vectastain Kit, Vector Labs., Burlingame, CA; ver descripción del método ICC de cinco etapas en la introducción).

La inmunoreactividad fué localizada mediante la reacción enzimática de la peroxidasa, utilizando 0.02% de tetrahidrocloro de diaminobenzideno (DAB) y 0.003% de H_2O_2 en 0.1 M de amortiguador Tris (TRIZMA base; Sigma Chemical Co.; pH 7.5), lo cual da como resultado un producto precipitable de color café. La visualización de dos antígenos en el mismo tejido se logró mediante la adición de 0.5% de NiSO_4 a la solución de DAB, lo cual da un producto precipitable de color azul-negro. Luego del revelado el tejido fué lavado varias veces con el amortiguador Tris, antes de ser evaluados microscópicamente. El tejido fué montado en portaobjetos, deshidratado, y cubierto con Permount (Fisher Chemical, New Jersey), como medio de preservación histológica.

Para la localización de LHRH se utilizó un anticuerpo donado por el Dr. Robert Benoit, en tanto que el anticuerpo utilizado para la detección de FOS se compró a la compañía Cambridge Research Biochemicals (Wilmington, DE).

La dilución óptima para la utilización de cada anticuerpo se determinó experimentalmente. Es importante notar que debido a que la especificidad de estos mismos anticuerpos ha sido previamente demostrada en reportes anteriores (Hoffman, 1990, Hoffman, 1992), no se encontró necesaria su evaluación.

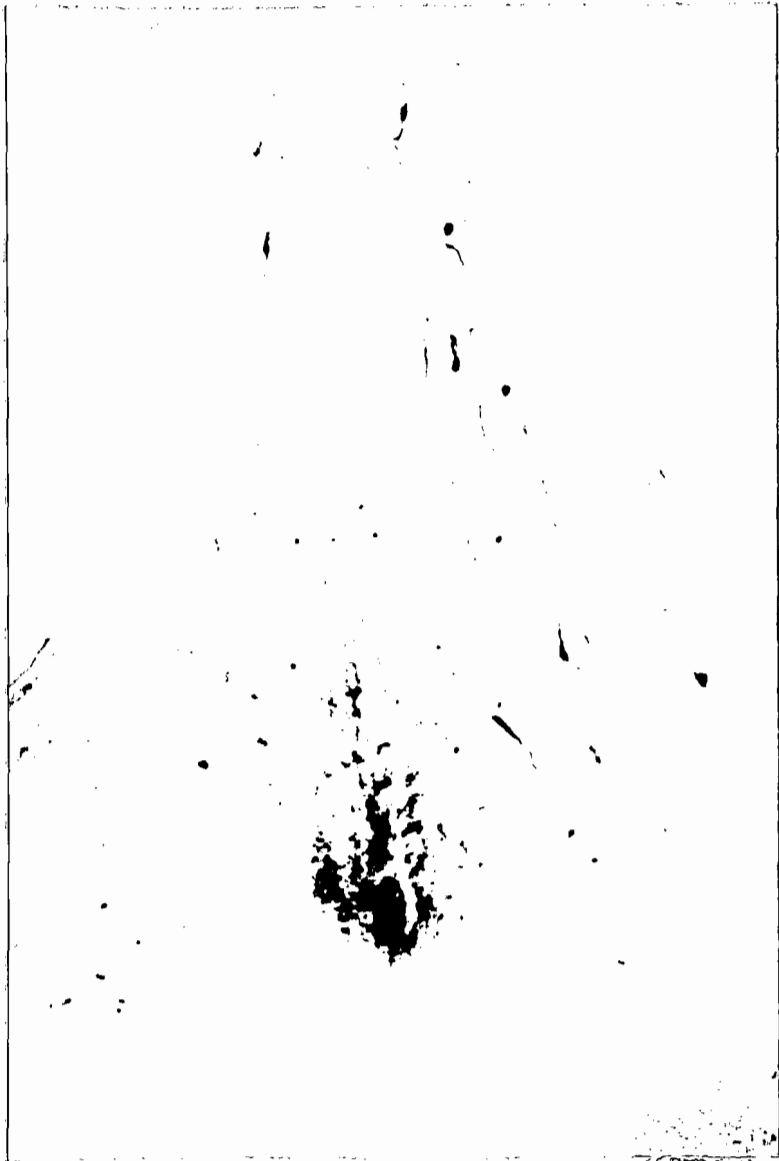
RESULTADOS

1). Tinción inmunocitoquímica de neuronas que producen LHRH

La tinción de LHRH se realizó como se describe en material y métodos. Inicialmente se probaron tres diluciones distintas del anticuerpo primario contra LHRH a fin de obtener la dilución óptima para la localización de dicho antígeno. Las diluciones fueron: 1:20,000, 1:50,000, y 1:100,000 en PBS-TX. La Figura 5 muestra micrograffias de tejido cerebral procesado con ICC para LHRH que fueron tomadas aproximadamente al mismo nivel del OVLT en el hipotálamo anterior, y donde el anticuerpo primario se diluyó a 1:20,000 (Fig. 5A) y 1:50,000 (Fig. 5B), respectivamente. Se encontró que la dilución 1:20,000 resultó en la mejor condición para la identificación tanto de fibras nerviosas, es decir; axones y dendritas, como de los cuerpos neuronales. Tal como se ilustra en la figura 5A, las neuronas LHRH se localizaron en la clásica distribución de "Y" invertida. Sin embargo, la tinción en el citoplasma de éstas neuronas resultó en la mayoría de las células analizadas ser de un color café oscuro, lo cual haría difícil su discriminación del color negro con el cual se intentaría teñir el núcleo de éstas mismas células. La dilución 1:50,000 del anticuerpo contra LHRH (Fig. 5B) resultó en una tinción más pálida, lo cual hace menos conspicua la presencia de fibras nerviosas en el OVLT del hipotálamo anterior, sin embargo, debido a que la tinción citoplasmática fué café claro, ésta concentración se encontró óptima para la doble tinción. Es importante aclarar que en todas las concentraciones que se utilizaron en la curva de titulación para éste anticuerpo, la tinción inespecífica fué mínima y el tiempo de revelado en la solución de DAB/H₂O₂ fue de 15 minutos.

2). Tinción inmunocitoquímica de neuronas que producen FOS

La curva de titulación para el anticuerpo contra FOS incluyó las siguientes diluciones: 1:1,000, 1:5,000, y 1:10,000 en PBS-TX. La Figura 6 representa tejido cerebral procesado con anti-FOS diluído 1:1,000 (Fig. 6A), y 1:5,000 (Fig. 6B). Las micrograffias fueron tomadas al nivel medio del hipotálamo con el fin de ilustrar la expresión basal de éste factor de transcripción.



BIBLIOTECA CENTRAL

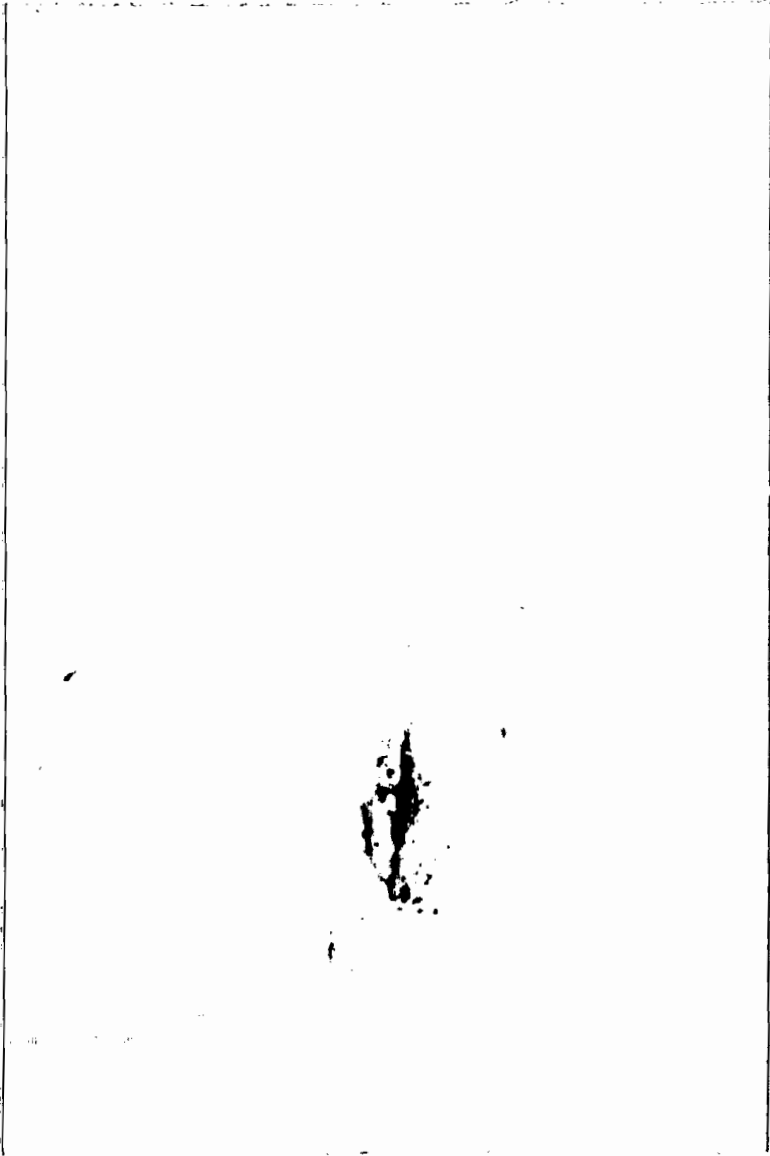


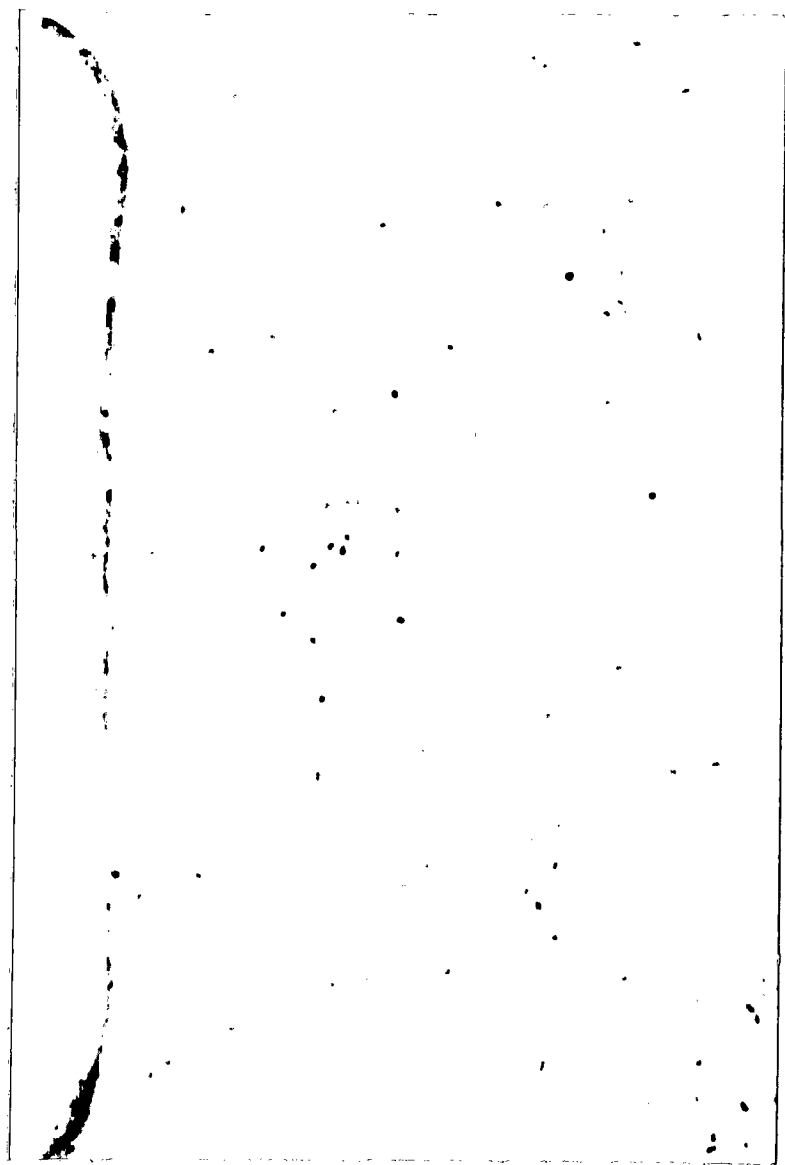
Figura 5. Micrografías del hipotálamo anterior a nivel del OVLT. Neuronas positivas en la inmunolocalización de LHRH donde el anticuerpo primario fué utilizado a una concentración de 1:20,000 (A), y 1:50,000 (B). El efecto de la concentración del anticuerpo anti-LHRH es notable en la inmunoreacción colorimétrica, que luce más intensa en el tejido expuesto a la concentración mayor del anticuerpo (A). Magnificación ocular 10 X.

Ambas diluciones dieron como resultado la localización de FOS en el núcleo de varias células. La dilución 1:5,000 (Fig. 6B), se encontró óptima debido a que presenta un menor grado de tinción de "fondo", o no específica comparada con aquella que se obtuvo con la mayor concentración de anti-FOS. La dilución 1:10,000 resultó en una menor detectabilidad de éste antígeno, lo cual se consideró inapropiado debido a que la doble tinción se beneficiaría de una tinción nuclear intensa y una tinción citoplasmática pálida, con lo cual se facilitaría la identificación de aquellas neuronas que expresen ambos antígenos. El tiempo de revelado en la solución de DAB/H₂O₂ fué de 17 minutos.

3). Combinación secuencial de las tinciones de LHRH y FOS en el mismo tejido

La doble tinción se realizó mediante la localización nuclear de FOS (1:5,000) seguida de la tinción citoplasmática de LHRH (1:50,000), como se describe en material y métodos. El orden de los anticuerpos primarios en ésta doble tinción, tiene como fundamento el de evitar la interferencia en la localización del antígeno nuclear, con la subsecuente localización del antígeno citoplasmático, interferencia, que sería más probable si el orden de los anticuerpos fuera opuesto al aquí indicado.

Como se describe en los resultados del objetivo No. 2, la tinción inicial de FOS se obtuvo rutinariamente sin complicaciones, sin embargo la subsecuente exposición de éste tejido a la tinción ICC para la localización de LHRH, resultó inicialmente en una exagerada reacción de tipo no específica (Fig. 7A), lo cual provocó que el tejido en general apareciera con una coloración intensa que era revelada en menos de 2 minutos, es decir de manera casi instantánea al compararlo con los 17 minutos de revelado cuando el tejido es procesado para



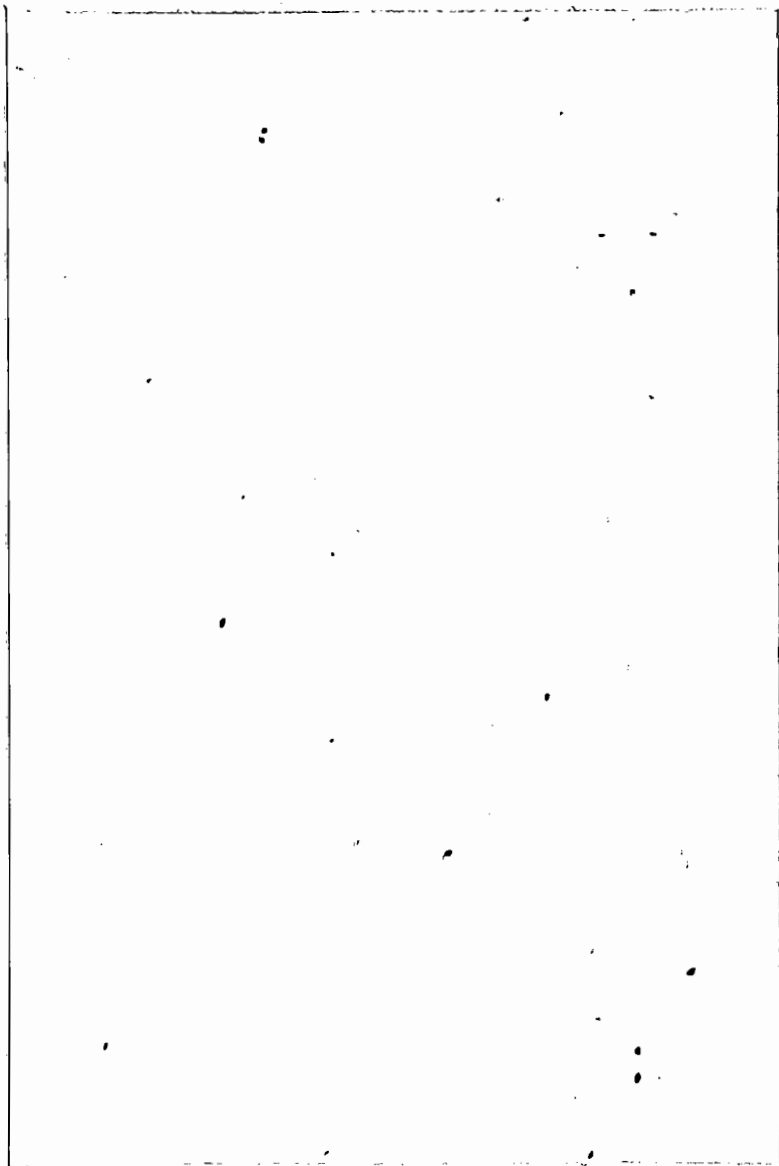


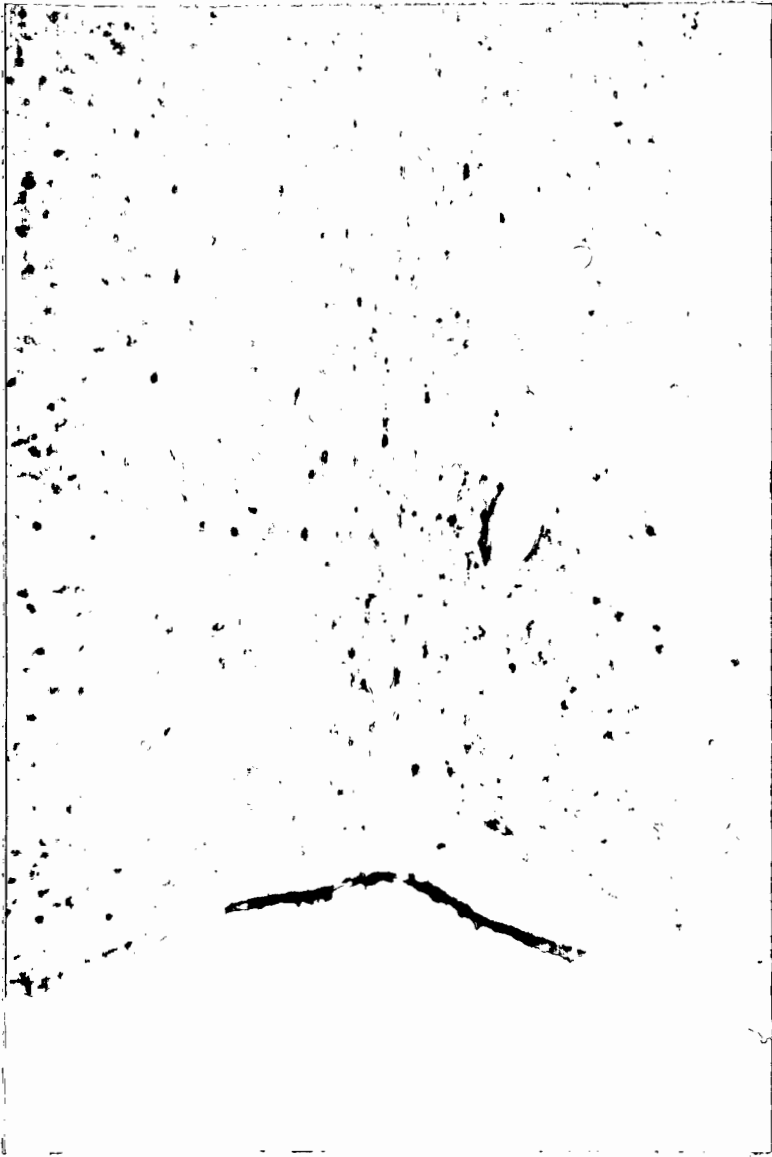
Figura 6. Micrografías del hipotálamo anterior a nivel del núcleo paraventricular. Neuronas positivas en la inmunolocalización de FOS donde el anticuerpo primario fué utilizado a una concentración de 1:1,000 (A), y 1:5,000 (B). El tejido expuesto a la mayor concentración de anti-FOS (A) muestra una mayor tinción general, es decir, no específica. Magnificación ocular 10 X.

DOBLE INMUNOCITOQUIMICA

	Especie Animal	Anticuerpo
• 1 Tincion		
Bloqueador	<u>Conejo</u> ← - - -	Suero norm. ← - - -
Ac. primario	Chivo	FOS
Ac. secundario	<u>Conejo</u> ← - - -	Chivo ← - - -
• 2 Tincion		
Bloqueador	Chivo	Suero norm.
Ac. primario	<u>Conejo</u> ← - - -	LHRH ← - - -
Ac. secundario	Chivo	<u>Conejo</u> ← - - -

Tabla 1. Etapas secuenciales en la doble ICC. La línea continua indica el reconocimiento del anticuerpo secundario en la segunda tinción con anticuerpos anti-conejo tal como se requiere para la tinción específica del antígeno LHRH. Las líneas discontinuas indican la asociación inespecífica de los anticuerpos secundarios de la segunda tinción (anti-conejo) con los anticuerpos presentes tanto en el suero bloqueador, como en los anticuerpos secundarios, ambos obtenidos en conejos y utilizados en la primera tinción.

bloqueador, como en el anticuerpo secundario de la primera tinción (indicado con líneas discontinuas). Debido a que se encontró tinción no específica en todo el tejido, se consideró que tal efecto era causado primordialmente por el primer suero bloqueador por lo cual se decidió repetir el proceso de doble tinción excluyendo totalmente éste paso. La estrategia anterior dió como resultado una doble tinción específica y la localización simultánea de células productoras tanto de FOS, como de LHRH, en el mismo tejido, la Figura 7B ilustra este resultado.



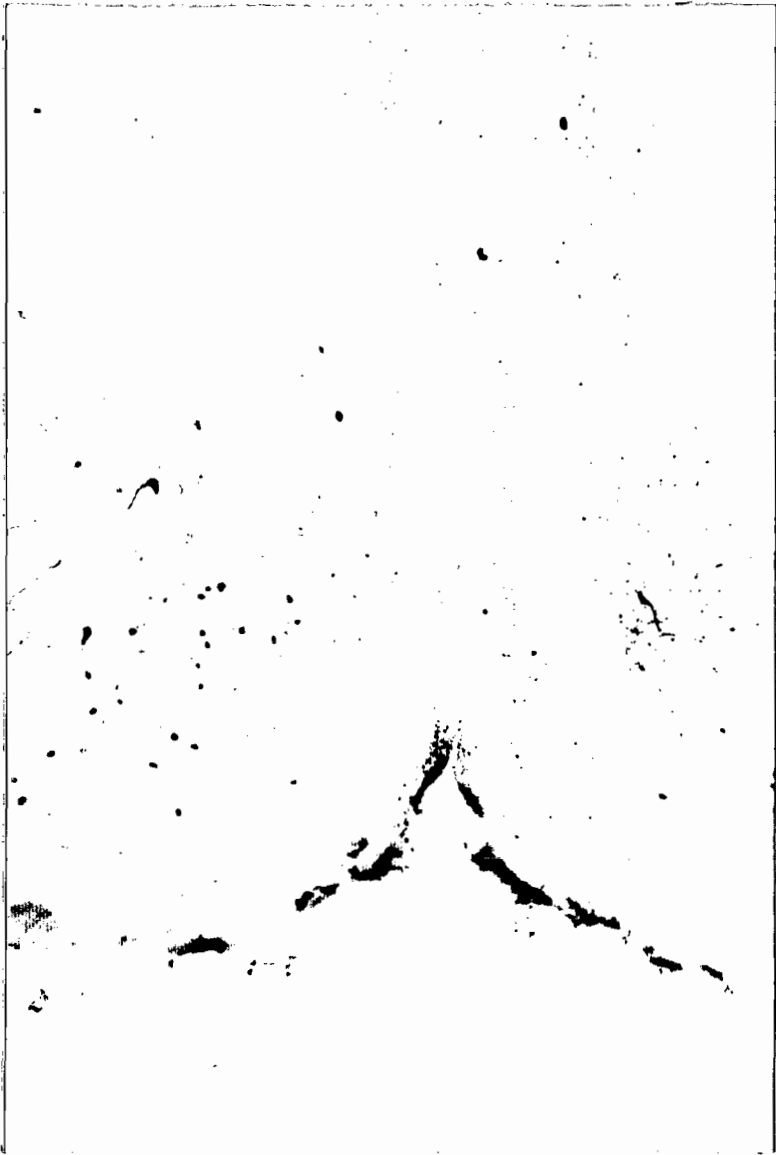
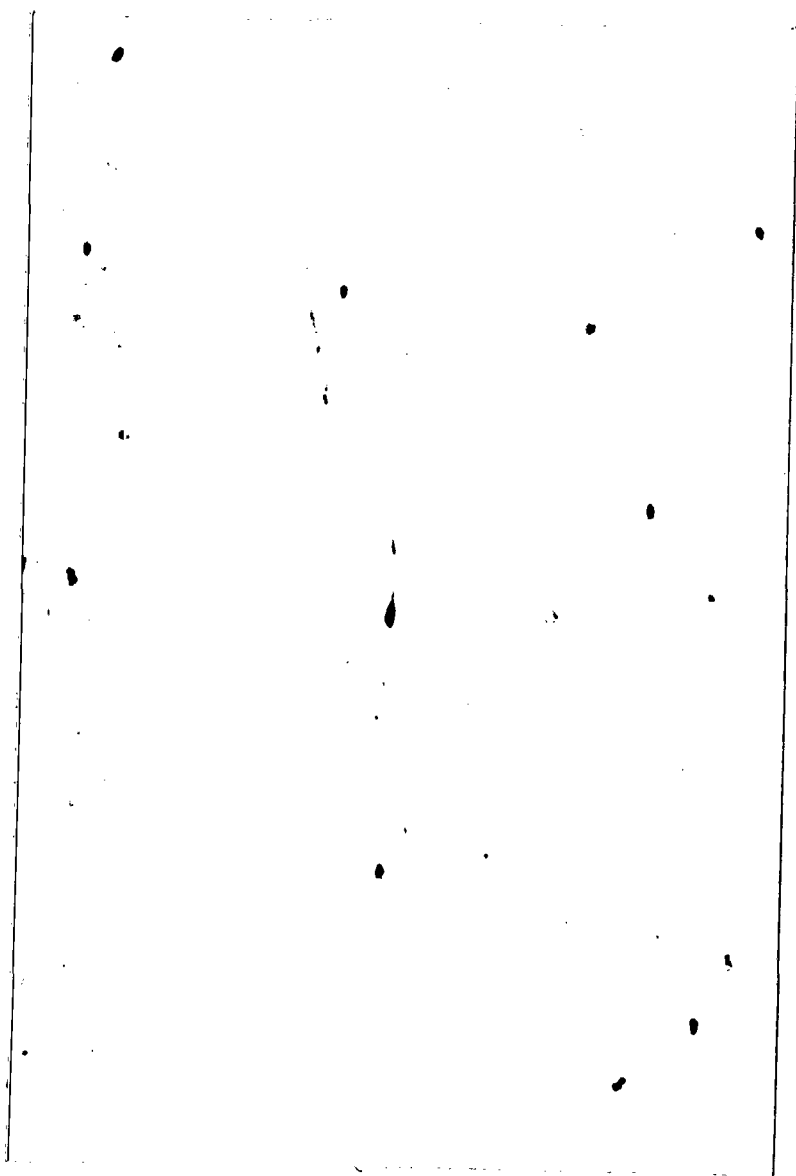


Figura 7. Micrografías del hipotálamo anterior, a nivel del OVLT, que muestra la localización simultánea de neuronas FOS-positivas y LHRH-positivas en el mismo tejido. La exagerada reacción inespecífica observada inicialmente (A), se debió a la reacción cruzada de algunos de los anticuerpos involucrados en el proceso de doble ICC. La exclusión de los sueros bloqueadores en el proceso de doble tinción previene el efecto de reacción cruzada casi en su totalidad (B). Magnificación ocular 10 X.

La co-localización de FOS y LHRH se ejemplifica aún mejor en la Figura 8, la cual a su vez válida la técnica aquí presentada en tanto que presenta células que únicamente producen FOS denotadas por una tinción granular de color negro, células que solamente expresan LHRH visibles a través del precipitado de color café claro en su citoplasma, y algunas células en las cuales FOS y LHRH son co-expresados en la misma célula, indicado por el núcleo negro y citoplasma café. La figura 8B muestra una neurona doblemente marcada a una magnificación ocular de 40X.

4.- Uso de ésta técnica en ratones que debido a niveles excesivos en la HC, presentan deficiencias reproductivas.

Los animales del diseño experimental, motivo de la implementación técnica aquí presentada, fueron procesados por medio de la doble ICC tal como lo muestra la Figura 9, de acuerdo a las condiciones descritas en los primeros tres objetivos. La expresión tanto de FOS como de LHRH fué realizada en animales normales y transgénicos, es decir, con niveles elevados de la HC, que fueron expuestos a hembras que co-habitaban la misma caja o bien a hembras nóveles. Se encontró de manera repetitiva que tanto los ratones normales como los transgénicos, mostraron una activación específica en la expresión de FOS en neuronas que se encontraron aproximadamente a 360 μm de localización posterior donde se encuentran la mayoría de las neuronas LHRH. Este efecto se ilustra en la Figura 9A. Los ratones del grupo control a quienes se les presentó a la misma hembra, no mostraron tal respuesta (9B). Es importante mencionar que aún cuando se había predicho que los animales normales, y no los transgénicos, presentarían co-expresión de FOS y LHRH, ésta fué mínima tanto en ratones normales como transgénicos.



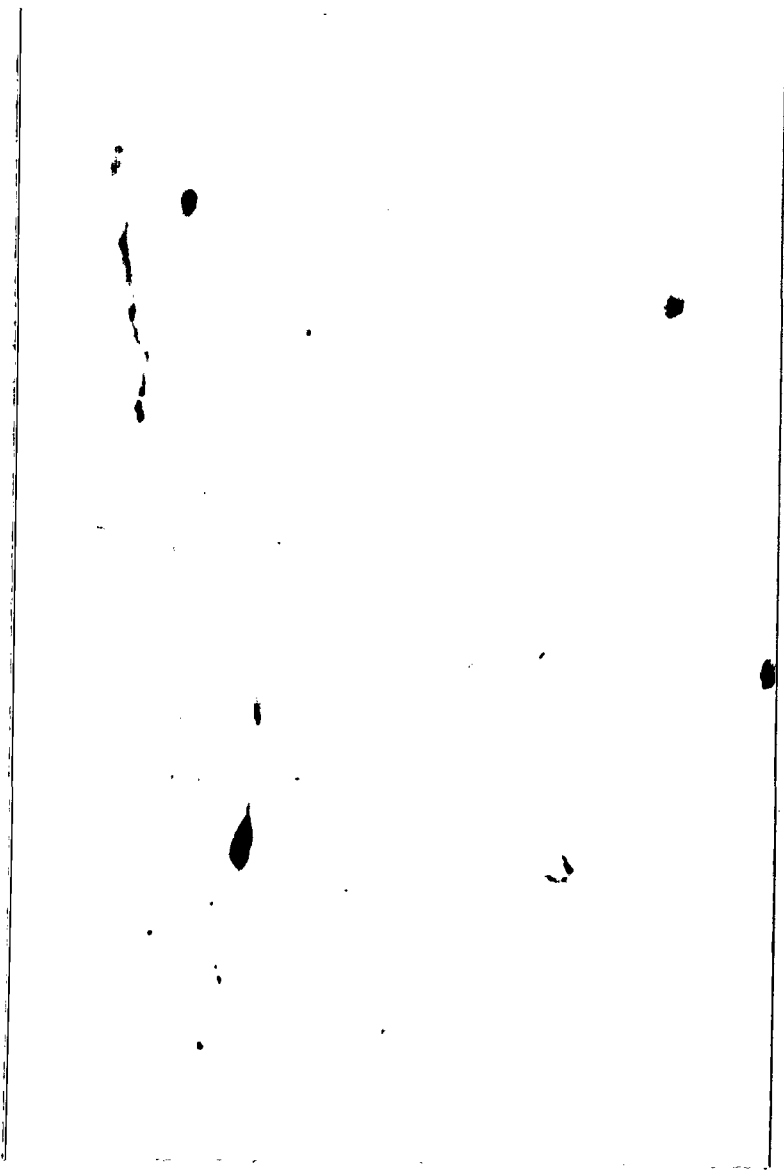
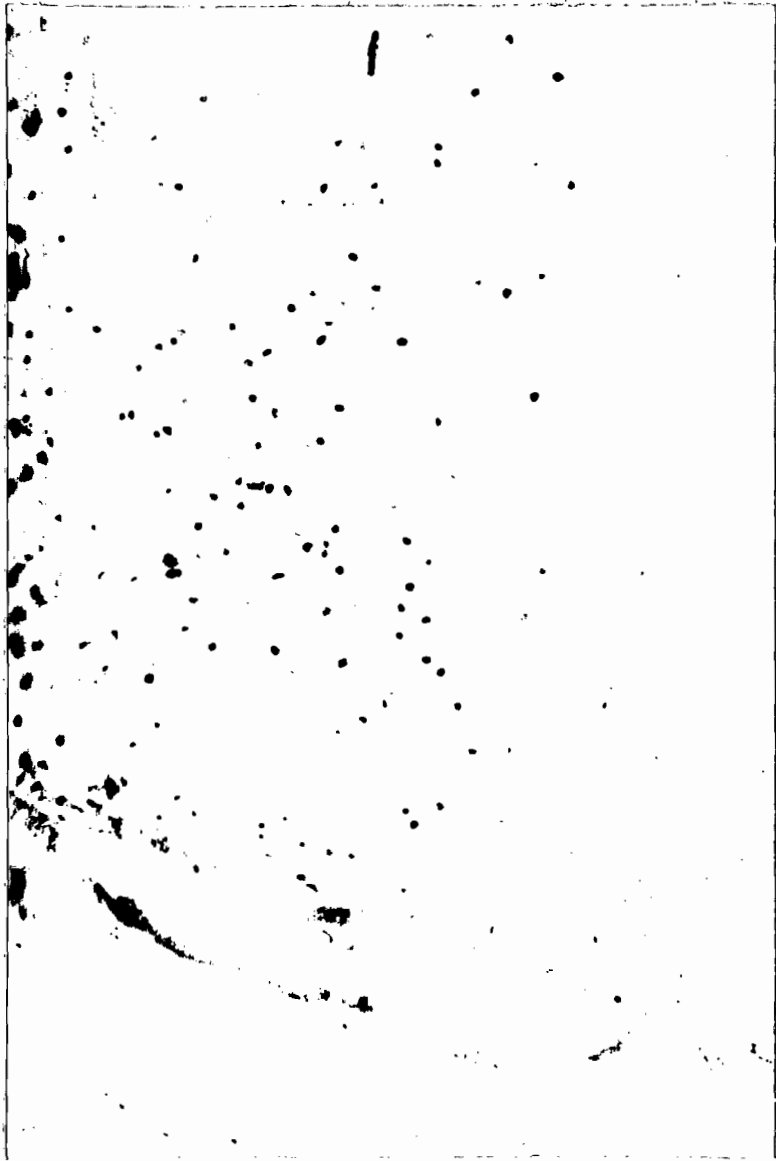


Figura 8. Micrografías del hipotálamo anterior, a nivel del OVLT, que muestra la localización simultánea de neuronas FOS-positivas y LHRH-positivas en el mismo tejido. La flecha indica una célula que se encontró positiva para ambos marcadores. Magnificación ocular 20 X (A) y 40 X (B).



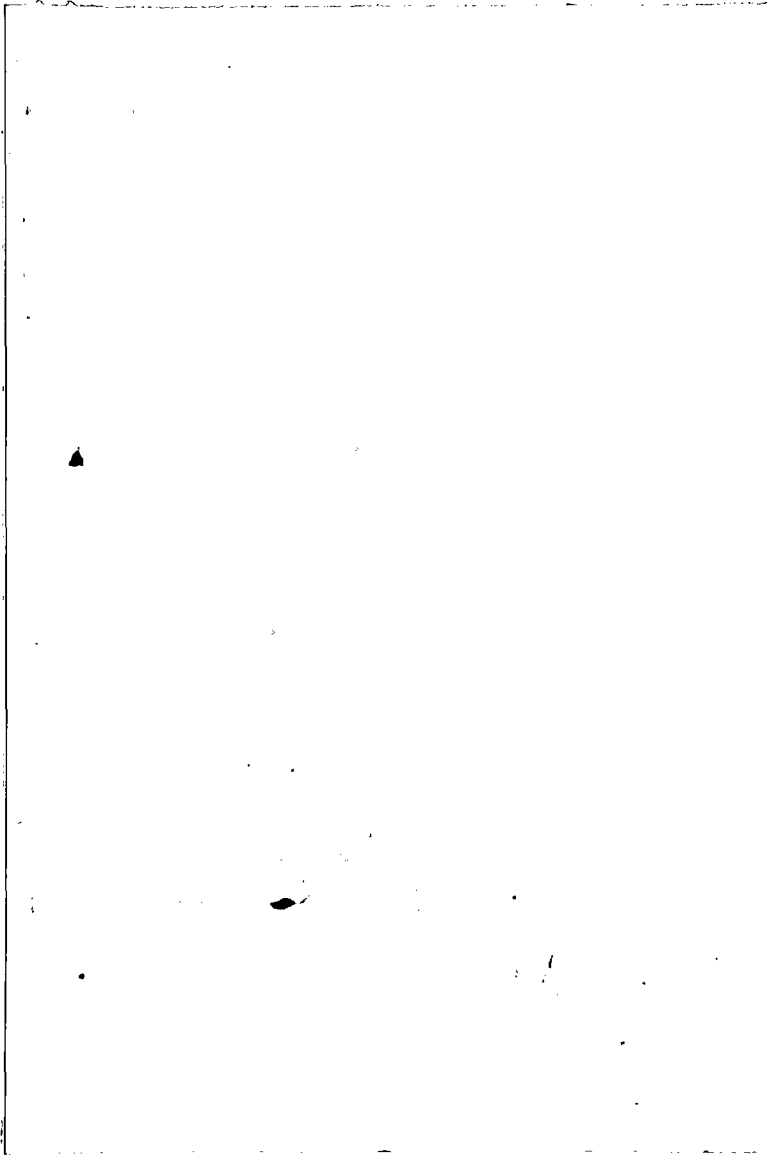


Figura 9. Micrografías del hipotálamo anterior, aproximadamente a 360 μm posteriores al OVLT, que muestra tejido procesado por doble ICC para FOS y LHRH en ratones tanto normales como transgénicos luego de ser estimulados con una hembra novel (A), o con una hembra habitual (B).

DISCUSION

La técnica de doble tinción inmunocitoquímica que aquí se describe se caracteriza por la localización simultánea de antígenos que se encuentran en compartimentos celulares distintos, esto es; el compartimento citoplasmático para la detección de LHRH y la ubicación nuclear en la localización de FOS. La tinción ICC de las neuronas que expresan LHRH resultó en la precipitación de un producto enzimático de color café, limitado al citoplasma de las éstas células, y cuya intensidad fué directamente proporcional a la concentración utilizada del anticuerpo primario. Para la tinción de neuronas que expresan el factor de transcripción FOS, y que indican un estado de activación de éstas células (Hoffman et al., 1990; Hoffman, 1992), el proceso ICC resultó en la precipitación de un producto enzimático de color negro que se encontró únicamente en el núcleo de las células. En ambos casos aquellas neuronas que resultaron positivas tanto para LHRH, como para FOS, fueron fácilmente identificables en contraste con la relativa falta de color del resto del tejido.

Técnicamente se encontró que los anticuerpos utilizados en la doble tinción deben de elegirse de manera que se evite al máximo la reacción cruzada que puede presentarse entre los anticuerpos a utilizar, ya sean éstos bloqueadores, primarios, ó secundarios. En particular el presente trabajo demuestra que la reacción cruzada entre el anticuerpo bloqueador con el anticuerpo secundario de la segunda tinción, contribuyen en mayor proporción a la tinción inespecífica que resulta de la combinación de anticuerpos inicialmente utilizados en la doble tinción aquí presentada, dado que éste problema es solucionado casi por completo luego de omitir los sueros bloqueadores.

También considerada de importancia es la observación de que las concentraciones de los anticuerpos primarios a utilizar, y en general los dos tipos de tinciones que se quieran combinar, deben de estar diseñados no únicamente para la localización óptima de los dos antígenos de manera individual, como sería el caso de FOS 1:5,000 y LHRH 1:20,000, sino para conseguir el mejor contraste entre estas dos tinciones individuales (FOS 1:5,000 y LHRH 1:50,000), de

tal forma que no sea difícil la distinción entre una célula que es positiva para un marcador, de aquella que es positiva para ambos marcadores.

La localización simultánea de LHRH y FOS ha sido utilizada anteriormente para reportar que éstas neuronas se activan en determinadas circunstancias fisiológicas como lo son la tarde de proestro en roedores hembras, en donde se sabe los niveles de LH y FSH se elevan como respuesta a la estimulación de LHRH sobre las células gonadótropas en la PA, en la preparación para la ovulación en estos organismos (Lee et al., 1990). Así mismo, se ha reportado que las neuronas LHRH expresan FOS, es decir; se activan, en roedores en el momento del apareamiento (Baum y Everitt, 1992, Wu et al., 1992). Estos estudios apoyan el uso de la doble tinción ICC de LHRH y FOS, como herramienta para evaluar el estado de activación de las neuronas LHRH, luego de la estimulación sexual.

En ratones se sabe que la exposición de los machos a hembras nóveles estimula sexualmente a éstos animales, que en poco tiempo intentan aparearse con dicha hembra. Esta respuesta de comportamiento sexual también se ha documentado fisiológicamente en la medida en que los niveles de LHRH, LH, y testosterona se incrementan, es decir; todo el eje hipotálamo-pituitaria-gónadas se activa en éstos animales (Bronson y Desjardinis, 1982). Es interesante notar que esta respuesta de tipo sexual no ocurre si al macho no le interesa la hembra o si se le estimula con hembras con las que co-habita normalmente. Este tipo de comportamiento sexual también está ausente en animales con altos niveles en la HC, como los ratones transgénicos que fueron evaluados en el presente trabajo, y donde la estimulación con hembras nóveles no induce el incremento en los niveles de LH o testosterona (Dr. A. Bartke comunicación personal), que son observados en los animales con niveles normales de HC.

La hipótesis inicial de los Drs. Bartke y Phelps era que la falta de respuesta sexual en los ratones machos transgénicos se debía a que los altos niveles de la HC interferían con la activación de las neuronas que producen LHRH. Cuando la doble tinción ICC, que se desarrolló durante la primera etapa del presente trabajo, se aplicó en estos animales para la evaluación del estado de actividad de las neuronas sexuales, se encontró cualitativamente que prácticamente no había estimulación de éste tipo particular de neuronas. Sin embargo, la estimulación

sexual a ratones machos a través de hembras nóveles resultó en la activación de otro tipo de neuronas distintas a aquellas que producen LHRH y que fueron localizadas en el núcleo preóptico anterior, a aproximadamente 360 μm de la zona de mayor concentración de neuronas LHRH.

El análisis cualitativo aquí realizado, parece indicar que los altos niveles de HC presente en los animales transgénicos, no interfiere con la activación neuronal del núcleo preóptico, e indica que la pregunta a acerca del mecanismo responsable de la falta de respuesta sexual en los ratones transgénicos, queda aún sin aparente respuesta.

CONCLUSIONES

- Las condiciones más adecuadas en la localización de FOS incluyen la utilización del anticuerpo primario aquí descrito a una concentración de 1:5,000.
- La utilización del anticuerpo anti-LHRH a una dilución de 1:20,000 se encontró óptima en la resolución tanto de cuerpos, como de proyecciones en éste tipo de neuronas. Sin embargo, la intensa reacción colorimétrica en el citoplasma de las células LHRH a ésta dilución se asemeja al color negro, lo cual complica su utilización en la doble tinción. Se encontró que la dilución 1:50,000 provee de un adecuado contraste para la doble ICC.
- La doble tinción de FOS y LHRH debe excluir a los sueros bloqueadores del proceso, a fin de evitar una intensa reacción inespecífica debido a reacción cruzada del anticuerpo secundario de la segunda tinción (anti-conejo), con los anticuerpos del primer suero bloqueador, así como con los anticuerpos secundarios de la primera tinción, dado que todos ellos pertenecen a la misma especie (conejo).
- La estimulación sexual a ratones machos a través de hembras nuevas resulta en la activación de neuronas localizadas en el núcleo preóptico anterior, a aproximadamente 360 μm de la zona de mayor concentración de neuronas LHRH.
- El análisis cualitativo aquí realizado, parece indicar que los altos niveles de HC presente en los animales transgénicos, no interfiere con la activación neuronal del núcleo preóptico, e indica que la pregunta a acerca del mecanismo responsable de la falta de respuesta sexual en los ratones transgénicos, queda aún sin aparente respuesta.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander L, Appleton D, Hall R, Ross W M, Wilkinson R (1980) Epidemiology of acromegaly in the Newcastle region. *Clin Endocrinol* 12: 71
- Bartke A, Naar EM, Johnson L, May MR, Cecim M, Yun JS, Wagner TE (1992) Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice. *J Reprod Fertil* 95:109-118.
- Bartke A, Cecim M, Tang K, Steger RW, Chandrashekar V, Turyn D (1994) Neuroendocrine and reproductive consequences of overexpression of growth hormone in transgenic mice. *Proc Soc Exp Biolo Med* 206:345-359.
- Baum MJ, Everitt BJ (1992) Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience* 50:627-646.
- Bronson FH, Desjardins C (1982) Endocrine responses to sexual arousal in male mice. *Endocrinology* 111, 1286-1291.
- Bouloux P, Grossman A (1992) *Clinical Neuroendocrinology*. In Nemeroff Ch B, *Neuroendocrinology*. CRC Press. pp 445-475
- Brecha N, H.J. Karten, and C. Schenker (1981) Neurotensin-like and somatostatin-like immunoreactivity within amacrine cells of the retina. *Neuroscience*. 6: 1329-1340.
- Chandrashekar V, Bartke A, Wagner TE (1991) Interactions of human growth hormone and prolactin on pituitary and Leydig cell function in adult transgenic mice expressing the human growth hormone gene. *Biol Reprod* 44:135-40.

- Ciocca D.R, D.J. Adams, R.J. Bjercke, G.W. Sledge, Jr., D.P. Edwards, G.C. Chamness, and W.L McGuire (1983) Monoclonal antibody storage conditions, and concentration effects on immunohistochemical specificity. *J Histochem Cytochem* 31: 691-696.
- Davidson JM (1980) The neuroendocrinology of male reproduction. In *Neuroendocrinology*. Krieger DT, Hughes JC (Eds). Sinauer Ass Inc. pp 232-238.
- Doucet JP, Squinto SP, Bazan NG (1990) Fos-Jun and the primary genomic response in the nervous system. In; Bazan NG (ed) *Molecular Neurobiology*. The Humana Press pp:27-55
- Hoffman GE, Kee W-S, Attardi B, Yann V, Fitzsimmons MD (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express c-fos antigen after steroidal activation. *Endocrinology* 126:1736-1741.
- Hoffman GE, Phelps CJ, Khachaturian H, Sladek JR, Jr. (1986) Neuroendocrine projections to the median eminence. In: Ganten D, Pfaff D (Eds.) *Current topics in Neuroendocrinology* 7:161-196.
- Hoffman GE, Smith MS, Fitzsimmons MD (1992) Detecting steroidal effects on early gene expression in the hypothalamus. *Neuroprotocols* 1:52-66.
- Hsu S-M, Raine, and H Fanger (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 29: 1349-1353.
- Köhler G (1986) Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Science* 233:1281-1286.
- Lee WS, Smith MS, Hoffman GE (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express FOS protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5163-5167.

- Leeuwen FV (1986) Pitfalls in immunocytochemistry with special reference to the specificity problems in the localization of neuropeptides. *Amer J Anat* 175: 363-377.
- MacCann Sm, Taleisnik S, Friedman HM (1960) LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 82:432.
- Malven PV (1993) Gonadotropins in the males. In: *Mammalian Neuroendocrinology*. CRC Press pp 161-180.
- Milstein C (1985) From the structure of antibodies to the diversification of the immune response. *EMBO J.* 4:1080-1092.
- Morgan JI, Curran T (1989) Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 12:459-462
- Nakane, P.K (1968) Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on the pituitary gland of the rat. *J Histochem Cytochem.* 16: 557-560.
- Palmitier RD, Brinster RI, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Brinberg NC, Evans RM (1982) Dramatic growth of mice that develops from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611-615.
- Sternberger L.A, P.H. Hardy J, J.J Cuculis, and H.G.Meyer (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333.
- Tramu G, A. Pillez, and J. Leonardelli (1978) An efficient method of antibody elution for the simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 26: 322-324.

Vandesande F (1979) A critical review of immunocytochemical methods for light microscopy. *J Neurosci Methods* 1: 3-23.

Vardi W (1980) The neuroendocrinology of male reproduction. In *Neuroendocrinology*. Krieger DT, Hughes JC (Eds). Sinauer Ass Inc. pp 239-247.

Watson S.J, and H. Akil (1981) Immunocytochemistry: technique, trials, and tribulations. *Neuroscience, Comment.* 1: 10-15.

Wu TJ, Segal AZ, Miler GM, Gibson MJ, Silverman A-J (1992) FOS Expression in gonadotropin-releasing hormone neurons: Enhancement by steroid treatment and mating. *Endocrinology* 131: 2045-2050.