



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS EN LA EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN c-fos INDUCIDOS POR LA COPULA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL CONEJO.

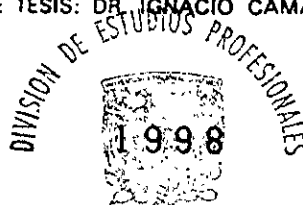
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOL O G A PRESENTA :

MARCELA ANDREA REYNA NEYRA



DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

267571



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
CAMBIOS EN LA EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN c-fos
INDUCIDOS POR LA COPULA EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL DEL CONEJO.

realizado por Marcela Andrea Reyna Neyra.

con número de cuenta 9016217-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Propietario

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Propietario

Quím. Julia Jeanett Segura Uribe.

Suplente

Biól. Juan Carlos Zamora Cunningham.

Suplente

Biól. Christian Humberto Guerra Araiza.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez D.
Dra. Edna María Suárez Diaz.

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
DIRECCIÓN GENERAL DE INSTITUCIONES EDUCATIVAS FEDERATIVAS

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo, en coordinación con el Centro de Investigación en Reproducción Animal CINVESTAV-UAT, con el apoyo del Subprograma 127 de “Formación Básica en la Investigación” de la Facultad de Química de la UNAM y una beca tesis de Licenciatura de Fundación UNAM.

Agradecimientos

A Dios por mostrarme muchas cosas que me motivan para ser mejor persona cada día y por darme tantas fuerzas para realizar este trabajo y mucha satisfacción por permitirme terminarlo

A la UNAM por permitirme formar parte de la Facultad de Ciencias y de un gran grupo de Investigación en la Facultad de Química

A la Fundación UNAM y al programa de Iniciación Temprana en Investigación de la Facultad de Química por la beca otorgada para la realización de esta tesis

Muy especialmente al Dr. Ignacio Camacho por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por dirigir esta tesis y por su gran paciencia, por sus críticas y llamadas de atención oportunas. Por su amistad y su disposición para escuchar problemas de este trabajo y personales MUCHAS GRACIAS.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón, por su disposición para la revisión de esta tesis. Por su gran paciencia y por hacerme sentir una persona importante en el grupo. Por enseñarme que TODO puede realizarse aunque suceda lentamente

Al Biólogo Juan Carlos Zamora C. : por la revisión de esta tesis y sus importantes y acertados comentarios para mejorarla

Al Biól. Christian H. Guerra y a la Quím. Julia Jeanett Segura, por sus críticas oportunas durante este trabajo y en la revisión del mismo

Al grupo del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) en Tlaxcala, especialmente a la Dra. Gabriela González Mariscal y al Dr. Carlos Beyr, por permitirme formar parte de este trabajo de coordinación, por brindarme todo el apoyo necesario para realizarlo, por su paciencia y por recibirme como una persona más de su equipo. Gracias también a Toño por tu paciencia para enseñarme cosas importantes de los conejos que eran necesarias para realizar este trabajo y por ser un gran amigo; a Evelia, Angeles, Rosario, Angel, César, Oscar por recibirme siempre con los brazos abiertos y por tratarme tan bien.

A TODOS los integrantes del Lab 202. Al Dr. I. Camacho, al Dr. Cerbón, a la Dra. A. Quintero, a Juanita, (Gracias por escuchar siempre los problemas que se me presentaban o me buscaba) a Adrianita (Gracias por salvarme en muchas ocasiones de caer en errores muy graves), a Mauricio (Gracias por las risas y locuras), Rocío García, Pao, Isa, José, Abelardo, Jesús y especialmente a mis compañeros de trabajo y amigos a Christian por ser una gran persona, por tu paciencia, por tu tiempo que dedicaste para que pudiera aprender las técnicas y por ser un gran amigo. A Julia por tu alegría, por ayudarme a intentar a resolver problemas de todo tipo, por tu dedicación a esta profesión y por que puedes explicarme muchas cosas que con libros en muchas ocasiones no entiendo. A Sara y Gaby por caminar conmigo hasta este momento, por las situaciones en las que nos metimos y en ocasiones no terminamos de solucionar como las muchas situaciones hipotéticas que me planteaste Gaby.

DEDICATORIA

A mi Madre por darme la vida, por mostrarme el camino más recto en mi vida, por todos tus consejos, por darme todas las oportunidades para ser una persona responsable y MUY FELIZ, por darme todo sin escatimar nada. TE QUIERO MUCHO.

A mi abuelita Angelita y a mi abuelo Ricardo, por hecharme siempre porras, por su paciencia y sus deseos de que siempre fuera alguien en la vida. Por compartir su vida conmigo sin poner barreras y por tratarme como una persona importante en su familia.

A mis hermanos José Manuel, Mario y Vicky por compartir todas sus alegrías y tristezas, por soportarme como soy y por su paciencia. Vi y José, gracias por el gran regalo que nos dieron. J M R R

A mi tía Coty y a mi tío Miguel, a mi tía Ale y mi tío Héctor, a mi tío Ricardo y mi tía Alejandra y a mi tía Lupe, por quererme como una más de sus hijas, por actuar en muchísimas ocasiones como mis Padres, por todos sus consejos y por apoyar mis ideas, por hacerme sentir importante en sus vidas.

A mis primos Sari y Armando, Claudia y Marco, Vero, Juan Miguel, Moni y Raúl, Paco, Sandro, Jorge y Brenda, Pepe, por compartir esta gran alegría conmigo y por quererme como soy.

A Nury y Susmy por ponerle un poco más de locura a mi vida, por todas las risas, por compartir este gran logro y por comprender un poco más esta bellísima profesión.

A todas las pequeñas personas que mantienen unida y con esperanzas a la gran Fam. NEYRA, Pily, Naty, Ilse, Donovan, Ana Paula, José Manuel, Diego, y los dos pequeños seres que en este momento no conozco (de Brenda y de Moni).

A mis queridos amigos Luis Manuel, Marisol, Marlón, Laura y Luz Ma, por que a pesar de los diferentes caminos que elegimos siempre han estado conmigo compartiendo todas mis alegrías y contratiempos. Los quiero mucho.

A mis amigos de toda la vida Eduardo, Edith, Ricardo, Elia, Maribel, Cinthya, por compartir esta bella profesión desde el principio, por las terapias y por estar siempre juntos.

A Alc, Judith, Paty, Gina B, José Antonio (Toñofofo), Rosalina, Rosa Isela, Mayra, Nere, Jorge, Andrómeda, Laura (mamá de Wally) a Laura M, Raquel, Belem, Moni, Lety, Ericka, Angel y si alguien me faltó no es mi intención olvidarlo.

A Fernando Varela y a Virgilio, por compartir conmigo su gusto por la música, sus ideas, sus problemas existenciales, por escucharme siempre y quererme como soy.

M Andrea.

Para todas las personas que
"SIENTAN" esta imagen y esta
gran canción, especialmente a
FER.

M. ANDREA.

WITH OR WITHOUT YOU

See the stone set in your eyes
See the thorn twist in your side
I wait for you
Sleight of hand and twist of fate
On a bed of nails she makes me wait
And I wait.....without you

With or without you
With or without you

Through the storm we reach the shore
You give it all but I want more
And I'm waiting for you

With or without you
With or without you
I can't live
With or without you

And You give yourself away
And You give yourself away
And You give
And You give
And You give yourself away

My hands are tied
My body bruised, she's got me with
Nothing left to win
And nothing else to lose

With or without you
With or without you
I can't live
With or without you

INDICE

1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Generalidades de los Ciclos Reproductivos	3
3.2 El Ciclo Reproductivo del Conejo.	3
3.3 Generalidades de los Proto-oncogenes	8
3.4. El Proto-oncogen <i>c-fos</i>	8
3.4.1 Generalidades	8
3.4.2. Estructura y funciones de la Proteina FOS.	9
3.4.3. Funciones y regulación de <i>c-fos</i> en el Sistema Nervioso Central (SNC)	11
3.4.4 Cambios en la expresión de <i>c-fos</i> durante la conducta sexual.	12
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
5. OBJETIVOS.	16
6. MATERIALES Y METODOS.	17
6.1 Animales de experimentación.	17
6.2. Extracción y electroforesis del RNA total	17
6.3 Transcripción reversa (RT) acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	19
6.3.1. Síntesis de oligonucleótidos.	19
6.3.2 RT.	19
6.3.3 PCR	20
6.3.4. Electroforesis de los productos de RT-PCR.	21
6.3.5. Obtención y purificación de la sonda de <i>c-fos</i> a partir del RNA total de útero de coneja.	22
6.4. Hibridación "Southern Blot"	23
7. RESULTADOS	27
7.1. Obtención y características del RNA total.	27
7.2 Obtención de la sonda específica de <i>c-fos</i> a partir del RNA total de útero de coneja	28
7.3 Expresión de <i>c-fos</i> en el SNC después de la cópula.	29
7.3.1 Cambios en la Expresión de <i>c-fos</i> en el SNC de la hembra después de la cópula.	29
7.3.2 Expresión de <i>c-fos</i> en el SNC del macho después de la cópula.	33
8. DISCUSION.	36
9. CONCLUSIONES	41
10. REFERENCIAS.	42
11 APENDICE	49

1. RESUMEN.

El conejo es un animal de ovulación refleja por lo que la hembra de esta especie ovula como respuesta a la cópula entre las 10 y las 12 h después de que esta sucede. Las regiones cerebrales que participan en la regulación de la conducta sexual y la ovulación tales como el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza frontal han sido detectadas mediante diversas técnicas, algunas de las cuales determinan la actividad neuronal a través de la cuantificación de la expresión del proto-oncogen *c-fos*.

En este trabajo se estudiaron los cambios en la expresión del proto-oncogen *c-fos* en el hipotálamo (HYP), el área preóptica (POA), el hipocampo (HI) y la corteza frontal (CF) de conejos de ambos sexos sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC), mediante el uso de la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.

La expresión del proto-oncogen *c-fos* fue inducida por medio de la cópula de manera significativa en el HYP, de las hembras IC, mientras que en el grupo PC los niveles disminuyeron y fueron semejantes a los de los animales C. En el HI y la CF se observó una tendencia al aumento en la expresión de *c-fos* en el grupo IC y posteriormente en las hembras del grupo PC los niveles disminuyeron y fueron semejantes a los animales C. Por el contrario, en el POA de las hembras, se observó una tendencia hacia la disminución en la expresión de *c-fos* en los animales IC con respecto a los C. En el caso de los machos, en el HYP se observó también una tendencia hacia el aumento en la expresión de *c-fos*, en los animales IC con respecto al grupo C, mientras que la expresión disminuyó en los animales PC. En el POA, el HI y la CF de los machos no se observaron cambios significativos en la expresión de *c-fos* en los animales IC o PC respecto al grupo C.

El aumento significativo en la expresión del proto-oncogen *c-fos* observado en el HYP, así como la tendencia hacia el aumento en la expresión en HI y CF de las hembras IC, puede estar relacionado con el incremento significativo en los niveles de GnRH (péptido liberador de gonadotropinas) que se presenta inmediatamente después de la cópula y que es necesario para que ocurra la ovulación.

En el caso de los machos el aumento en la expresión de *c-fos* registrado en el HYP puede indicar la activación de núcleos hipotalámicos involucrados en la manifestación de la conducta sexual.

2. INTRODUCCION.

El conejo es un mamífero que pertenece al grupo de animales de ovulación refleja, es decir, que la hembra adquiere la capacidad de ovular como respuesta a la cópula, lo cual ocurre entre las 10 y 12 h después de esta última. Aunque la cópula en los conejos es un evento muy breve, provoca cambios muy evidentes tanto a nivel neuroendocrino como conductual.

En el Sistema Nervioso Central (SNC), se ha utilizado al proto-oncogen *c-fos* como un marcador de actividad neuronal. Este gen de expresión temprana, es inducido por un gran número de estímulos (químicos, físicos, fisiológicos y conductuales) Esto ha sido evaluado, mediante el uso de técnicas como la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*. Se ha mostrado que la inducción de *c-fos* se produce en periodos de tiempo cortos, (minutos y horas) en el HYP, POA y HI de ratas (las cuales presentan ovulación cíclica), ovariectomizadas tratadas con hormonas involucradas en la manifestación de la conducta sexual y la reproducción, tales como el estradiol y la progesterona

En el SNC del conejo algunos eventos relacionados con la conducta de amamantamiento tales como la succión, inducen la expresión del proto-oncogen *c-fos* de manera significativa en el hipotálamo paraventricular y en el tálamo paraventricular, aumentando el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS (Allingham et al. 1998). Se ha reportado por estudios de inmunohistoquímica, que en el POA y el HYP ventromedial de la rata hembra se presenta un aumento en el número de células inmunoreactivas a FOS en hembras ovariectomizadas y tratadas con estrógenos (E_2) y progesterona (P_4) sometidas a diferentes cantidades de montas y que fueron sacrificadas 1 h después de estas condiciones experimentales. (Polston, E. K. y Erskine, M. S., 1995). En el HYP, el POA, y la CF de la rata hembra, se ha reportado un incremento significativo y transitorio en la expresión de *c-fos* a las 13:00 h del día del proestro (Camacho-Arroyo et al. 1998); sin embargo, se desconoce que sucede con este proto-oncogen, cuando se presenta la cópula o la ovulación en el conejo.

En este trabajo, se evaluó la expresión del proto-oncogen *c-fos* después de la cópula en el HYP, el POA, el HI y la CF del conejo utilizando la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

3. ANTECEDENTES.

3.1. Generalidades del Ciclo Reproductivo en mamíferos.

Los ciclos reproductivos en los mamíferos se definen básicamente por el tipo de ovulación: ovulación cíclica y ovulación refleja. La ovulación cíclica puede clasificarse con base en la respuesta del epitelio uterino a la estimulación hormonal, de este modo, se tienen los ciclos menstrual y estral. El periodo de receptividad sexual durante el ciclo menstrual se extiende en la mayor parte del tiempo de duración del ciclo y las capas superficiales del endometrio se desprenden acompañadas de una hemorragia (menstruación), mientras que en el ciclo estral, el periodo de receptividad es restringido y el desprendimiento de las células endometriales no provoca esta hemorragia. El ciclo menstrual se puede dividir en cuatro etapas: el periodo menstrual, el proliferativo (o folicular), el ovulatorio y el progesteronal (o luteal) y se presenta en diferentes especies de primates, mientras que el ciclo estral ocurre en distintas especies de roedores y se divide en varias etapas: proestro, estrus, metaestro y diestro (Fox y Lair, 1970).

En los animales que presentan ovulación refleja, la ovulación es inducida por la cópula. Entre los ovuladores reflejos más comúnmente estudiados, se encuentran el conejo, el gato y el hurón; sin embargo, se conoce que también animales como el ratón de campo, el mink, el camello, entre otros, presentan ovulación refleja (Staples, 1967, Ramírez y Beyer, 1985). En estos animales la ovulación ocurre horas después de la cópula, desde las 10 a 12 h después como en el caso del ratón de campo y del conejo, hasta 33 a 72 h después como en el caso del mink, en este periodo, se presentan cambios neuroendocrinos y conductuales que son necesarios para que ocurra la ovulación.

3.2 El ciclo reproductivo del Conejo.

El conejo es un mamífero que ovula como respuesta a la cópula entre las 10 y 12 h después de este evento. En estos animales, la cópula es un evento muy breve que solo dura entre 2.6 y 3.0 segundos e involucra la monta con intromisión y eyaculación por parte del macho (Beyer et al., 1980., Morali y Beyer, 1992), en respuesta a la monta la hembra adopta una postura de lordosis que permite la intromisión y aunque el evento es muy breve, ocasiona modificaciones neuroendócrinas y conductuales muy evidentes.

Básicamente, se han definido dos eventos neuroendócrinos involucrados en la ovulación. El primero de ellos está relacionado con la integración de los diversos estímulos sensoriales que son provocados por la monta, el segundo se refiere a la velocidad con que estos estímulos son integrados en el HYP (Ramírez y Lin, 1994). La activación del HYP por la cópula, ha permitido el reconocimiento de algunos péptidos que están involucrados directamente con la ovulación entre los cuales se encuentran el péptido liberador de gonadotropinas (GnRH) y el neuropéptido Y (NPY) así como catecolaminas como la norepinefrina (NE) (Spies et al., 1997).

El NE está ampliamente distribuido en los tejidos neurales y está involucrado en la regulación de la liberación de gonadotropinas por la hipófisis, entre otras funciones (Spies et al., 1997). La cópula provoca un incremento en los niveles de NE 5 minutos después de que esta ocurre; posteriormente se presenta un aumento en los niveles de GnRH hasta de 40 veces en el HYP medio basal (MBH) 20-60 min después de que ocurre la cópula (Fig 1) (Yang et al., 1996).

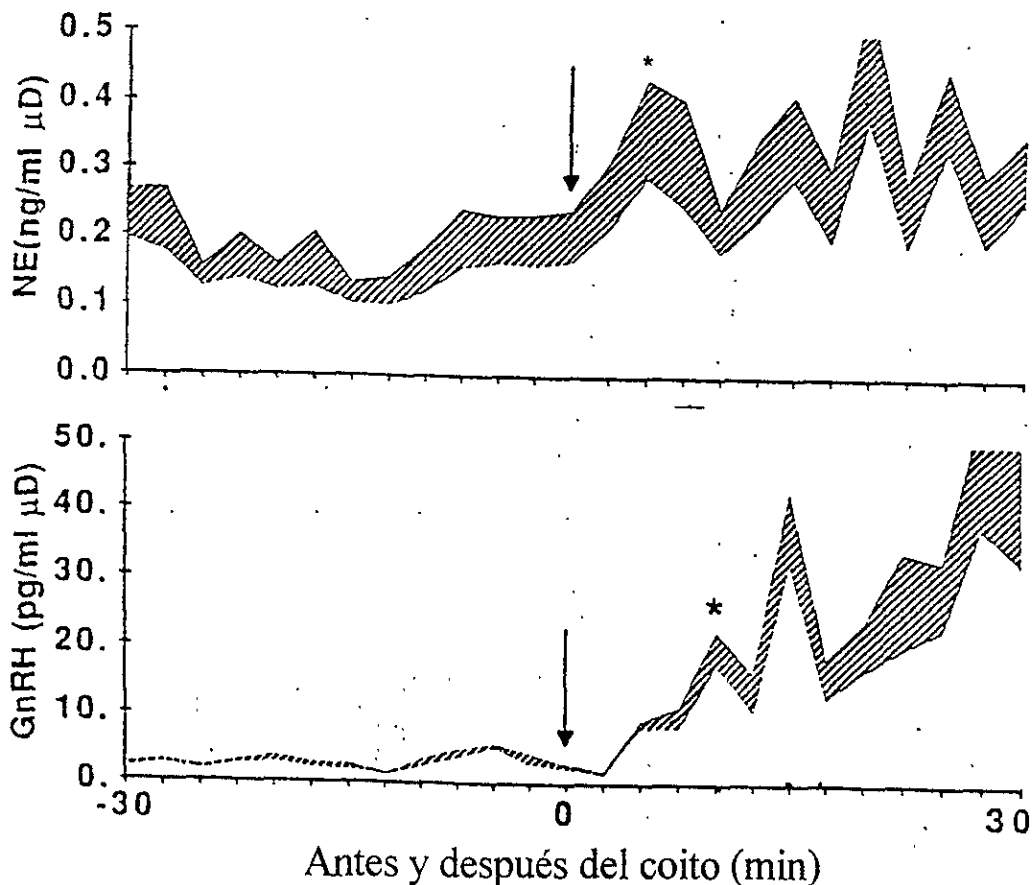


Fig.1. Concentraciones de norepinefrina (NE) y de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo medio basal (MBH) de la coneja, obtenidos por microdiálisis después de la cópula (Yang et al., 1996). La flecha indica el momento del coito. El asterisco indica el momento donde se presenta un aumento significativo en las concentraciones de NE o GnRH.

Después de la cópula los niveles de la hormona luteinizante (LH), de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), así como la prolactina (PRL) disminuyen en la hipófisis (Brown et al., 1968). En plasma, los niveles máximos de PRL (15 ng/ml) preceden a los de LH y a los de la hormona foliculo estimulante (FSH). Los niveles máximos de LH en el plasma se presentan 2 h después de la cópula alcanzando un aumento hasta de 20 veces con respecto a los niveles precoitales y retornan a los niveles basales 4 h después de la cópula. A diferencia de la LH los niveles máximos de FSH son solo 3 veces mayores que los niveles precoitales y se presentan entre las 2 y 3 h después de la cópula, sin embargo, se presenta un segundo pico entre las 12 y 24 h después (Fig 2) (Fuchs et al., 1981, Yang et al., 1996). Este segundo pico de FSH no es causado directamente por el estímulo coital, ya que sucede entre las 12 y 24 h después de la cópula y este periodo comprende el momento de la ovulación.

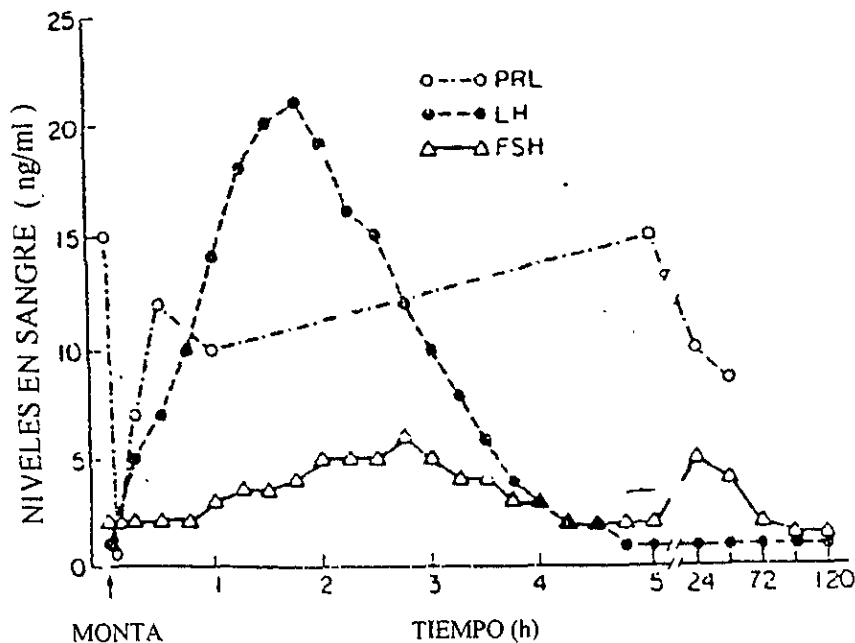


Fig 2. Concentraciones plasmáticas de prolactina (PRL), de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona foliculo estimulante (FSH) en la coneja, en respuesta a la monta (Fuchs et al., 1981)

El ovario de la hembra libera hormonas esteroides como el estradiol (E_2), la testosterona (T), la progesterona (P_4) y metabolitos de esta última como la 20α -hidroxiprogesterona (20α -OPH), la cual es secretada en mayor cantidad que las hormonas antes mencionadas, la máxima concentración de esta progestina se detecta 4 h después de que sucede la cópula, sin embargo, al acercarse el tiempo de la ovulación, los valores de las concentraciones de los esteroides mencionados disminuyen y son menores a los precoitales (Fig 3 A) (Hillard y Eaton, 1971, Ramirez, V D y Lin, W 1994).

Los niveles en plasma de los esteroides liberados por el ovario cambian significativamente en respuesta a la cópula (Fig 3B) La 20α -OHP se incrementa significativamente (5 a 25 ng/ml) 1.5 h después de la cópula, alcanza niveles máximos (28 ng/ml) 3 h después de la misma y disminuye a niveles basales 10 h después de la cópula (Ramirez y Beyer, 1988) Los niveles de P_4 en cambio, aumentan 5 h después de la cópula aunque no de manera significativa y vuelven a los niveles precoitales 10 h después La T también se incrementa significativamente en plasma en respuesta a la monta (60 a 280 pg/ml) lo cual ocurre 1.5 h después de la cópula, la concentración disminuye a los niveles basales 5 h después de la misma (Ramirez y Beyer, 1988). Una vez que ha ocurrido la ovulación, la concentración de esteroides en plasma, es menor que la precoital y no se detectan modificaciones en estas, hasta el momento de la implantación lo cual ocurre entre el día 7 y 8 después de la ovulación. Por otra parte, las concentraciones de P_4 en plasma permanecen constantes durante los primeros 3 días de la gestación y la concentración máxima (15 ng/ml) se registra el día 15, los niveles de P_4 varían entre 1 y 2 ng/ml al comienzo del periodo de lactancia y los de E_2 entre 45 y 47 pg/ml (Challis et al., 1973, Hillard y Eaton, 1971., González-Mariscal et al., 1994)

Las modificaciones neuroendócrinas que ocurren en el SNC del macho después de la cópula no son tan notables como en la hembra. Las concentraciones de NE y de GnRH en los machos que copulan, permanecen iguales a las que se registran antes de la cópula al igual que las concentraciones de LH y T en plasma (Yang et al., 1996).

La velocidad de integración de los estímulos provocados por la monta en el hipotálamo en la hembra, es muy rápida. Algunos bloqueadores de la neurotransmisión administrados 1 min después de la cópula, inhiben la ovulación (Sawyer et al., 1947). Las modificaciones conductuales más evidentes que se presentan como resultado de la cópula en el conejo son: la disminución significativa del marcaje odorífero por la glándula del mentón (chin gland) por parte del macho el cual es casi nulo cuando se presenta la saciedad sexual (máxima actividad sexual en 2 h); el marcaje odorífero es inhibido totalmente si se presenta una eyaculación. En la hembra, la conducta de ambulación disminuye después de una lordosis o si hay inseminación por parte del macho, el marcaje odorífero disminuye aunque no significativamente; sin embargo, tanto el marcaje odorífero como la ambulación, disminuyen significativamente cuando la hembra presenta tres lordosis (González-Mariscal et al., 1997)

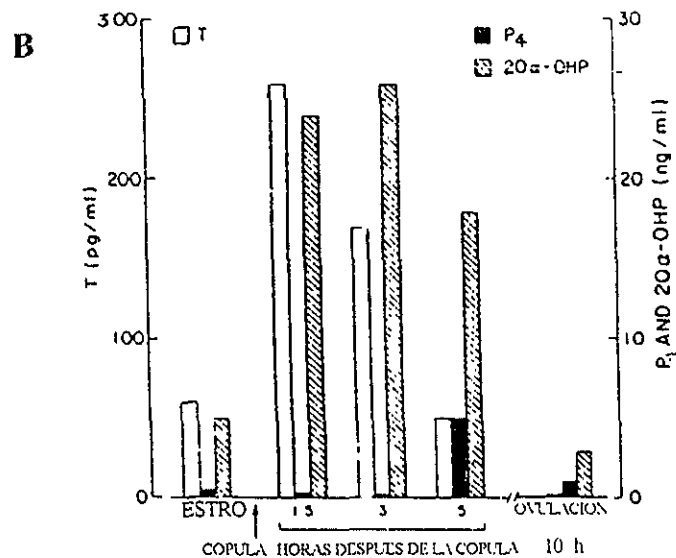
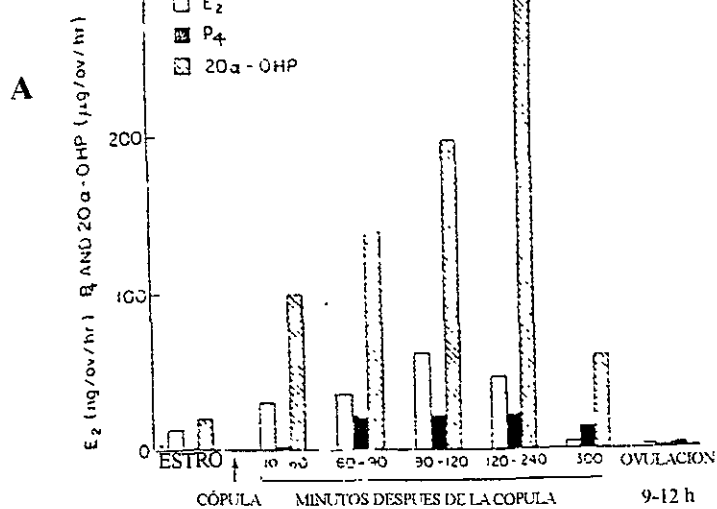


Fig. 3. (A). Concentración de esteroides liberados por el ovario, estrógenos (E₂), progesterona (P₄) y 20α-hidroxiprogesterona (20α-OHP) después de la cópula. (B). Concentración en plasma de P₄, 20α-OHP y testosterona (T) después de la cópula en la coneja (Ramírez y Lin, 1994).

3.3 Generalidades de los Proto-oncogenes.

Los proto-oncogenes de tipo celular, son genes normales que al presentar mutaciones pueden transformarse en oncogenes activos. Los proto-oncogenes pueden clasificarse funcionalmente dentro de tres grandes categorías: a) receptores de factores de crecimiento, b) mediadores de vías de transducción de señales intracelulares y c) factores de transcripción (Bishop, 1987). La interacción y cooperación entre los productos de las diferentes clases de proto-oncogenes juegan un papel primordial durante el crecimiento celular, la diferenciación y el desarrollo. Algunos proto-oncogenes que codifican para proteínas nucleares son *myc*, *myb*, *fos*, *jun*, *erbA*, *ski*, *rel*, y *E1A*.

Los proto-oncogenes de localización nuclear presentan las siguientes características en común: a) una rápida inducción transitoria en respuesta a numerosos agentes capaces de promover crecimiento, desarrollo y diferenciación; b) una vida media corta tanto de su RNA mensajero como de su proteína; c) las oncoproteínas nucleares son invariablemente modificadas post-traduccionalmente, por lo general son fosforiladas en residuos de serina; y d) un número de oncoproteínas nucleares se unen al DNA de manera específica (Ransone y Verma, 1990).

3.4. El proto-oncogen *c-fos*.

3.4.1. Generalidades

El proto-oncogen *c-fos* fue descrito originalmente como el homólogo celular del oncogen encontrado en dos retrovirus murinos, FBR y FBJ, que participaban en la generación de osteosarcomas inducidos por radiaciones (Curran, 1988). El gen de *c-fos* se expresa en un nivel basal, en la mayoría de las células. Sin embargo, su expresión es inducida temporalmente hasta altos niveles por una gran variedad de estímulos extracelulares.

El proto-oncogen *c-fos* es miembro de un conjunto de genes conocidos como genes de expresión temprana. Este conjunto se define por el hecho de que su expresión es inducida rápidamente por una variedad de estímulos extracelulares, aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Se ha propuesto que los genes de expresión temprana llevan a cabo su acción al acoplar el estímulo de corto plazo a cambios a largo plazo en el fenotipo celular, como pueden ser el crecimiento y la diferenciación celular. Esta hipótesis fue reforzada por el descubrimiento de que la proteína FOS actuaba como un regulador de la transcripción.

3.4.2. Estructura y funciones de la proteína FOS

El producto de *c-fos* es la proteína FOS que está constituida por 380 aminoácidos. Esta proteína sufre extensas modificaciones postraduccionales debido a la fosfoesterificación de los residuos de serina en el extremo carboxilo terminal de la proteína. FOS contiene un dominio en el que se repite periódicamente un residuo de leucina cada siete aminoácidos. A este dominio se le denomina "zipper" de leucina. Cuando este dominio se estructura en una α -hélice, los residuos de leucina quedan alineados a lo largo de una cara de la hélice. Adyacente a éste, se encuentra un dominio rico en aminoácidos básicos.

Los residuos de leucina de una α -hélice interactúan con los residuos de leucina de otra α -hélice de una proteína diferente, con lo cual se facilita la dimerización a través de interacciones hidrofóbicas. Por lo tanto, el dominio de "zipper" de leucina facilita la formación de heterodímeros. Esta secuencia está presente en diversos factores de transcripción, como las oncoproteínas Fos, Myc y Jun, los factores de transcripción de la levadura GCN4 Y AP-1 y la proteína que une al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB) (Hope y Struhl, 1987; Kouzarides y Ziff, 1988; Landschultz et al., 1988; Gonzales et al., 1989).

La región rica en aminoácidos básicos, adyacente al "zipper" de leucina, media la unión del heterodímero a una región específica del DNA, ya que inserciones o deleciones en esta región disminuyen o anulan dicha unión pero no la formación del dímero. El heterodímero se une a regiones promotoras que contienen el elemento de respuesta a TPA (12-*o*-tetradecanoil- forbol-13 acetato) llamado TRE (TPA response element) o sitio de unión a AP-1 (Fig. 4).

No obstante que el "zipper" de leucina es el dominio de dimerización principal y que la región básica es el dominio principal de unión al DNA, se debe de considerar que la proteína completa interactúa y que aminoácidos fuera de estos dominios también contribuyen a la dimerización y unión al DNA (Curran et al., 1990).

En los primeros estudios realizados sobre FOS se determinó que esta proteína podría formar parte de un complejo proteínico nuclear que se puede unir al DNA en presencia de extractos nucleares. En seguida se buscó la secuencia de nucleótidos que es reconocida por el complejo de FOS. Por medio de diferentes metodologías como la mutágenesis, estudios de competencia y ensayos de afinidad al DNA, finalmente se identificó el sitio de unión como la secuencia consenso del factor de transcripción AP-1. (Curran et al., 1985)

Estos estudios establecieron una conexión entre Fos, Jun (que es el producto proteínico de *c-jun*) y los sitios AP-1, pero aún no era claro si FOS se unía directamente al sitio AP-1, o indirectamente por medio de la asociación con la proteína p39 u otra proteína. Por medio de comparaciones estructurales e inmunológicas se identificó a p39

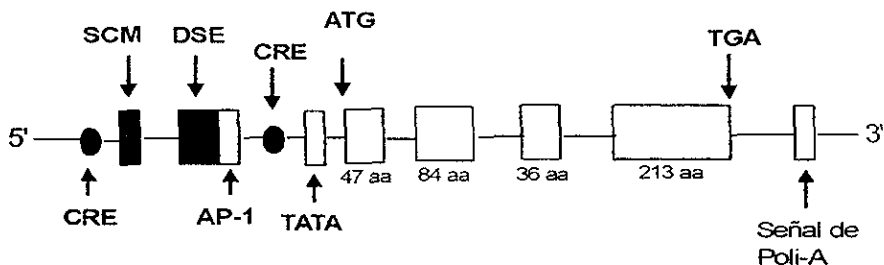


Fig. 4. Estructura del gen *c-fos* (ratón). Los exones están representados por cuadros blancos, los intrones y las regiones no traducidas 5' y 3' se representan por una línea. Debajo de cada exon se indica la longitud (en aminoácidos) del segmento de la proteína FOS que codifica. Los cuadros y regiones en negro son secuencias que reconocen algunos mediadores de la inducción de *c-fos* (Ransone y Verma, 1990) (AP-1. Secuencia que reconoce a la Proteína Activadora 1, ATG. Codón de inicio de la transcripción, CRE. Elemento de respuesta a AMPc; DSE. Elemento de simetría doble o de respuesta a simio, SCM. Secuencia mediadora de la inducción por el virus de Sarcoma de Simio; TGA. Codón de terminación de la transcripción).

como el producto proteínico del proto-oncogen *c-jun*. Más aún, se demostró que en células de mamífero transfectadas, la cooperación entre estas dos oncoproteínas nucleares se requiere para la completa transcripción de los genes que tienen en su región promotora el elemento de respuesta a TRE (Sassone-Corsi et al., 1988b).

FOS directamente modula la función de Jun por medio de la formación del heterodímero Fos-Jun (Sassone-Corsi et al., 1988a). La proteína de *jun* por sí sola puede formar un homodímero que se une a TRE, pero es un transactivador ineficiente. Por otro lado, FOS forma homodímeros, pero éstos son inestables, no se une como monómero al DNA ni activa la transcripción; sin embargo, en un heterodímero Fos-Jun, Fos no solamente contribuye a la unión específica al DNA, sino que también coopera en la transactivación.

La inducción del gen *c-fos* se lleva a cabo por agentes que activan la vía intracelular de la proteína cinasa C dependiente de calcio, o la vía de la adenilato ciclasa. El análisis de la región promotora del gen de *c-fos* humano revela la presencia de un elemento de respuesta a E_2 (ERE) localizado entre las posiciones -1060 a -1300, el cual está implicado en la inducción de la expresión de *c-fos* cuando hay administración de E_2 (Weisz and Rosales, 1990a). En el caso del proto-oncogen *c-fos* murino se han identificado ERE tanto en la región 5' como en la región 3' (Hyder et al., 1991a, Hyder et al., 1991b). De igual manera se han localizado dos elementos de respuesta dependientes de cAMP (CREs) en las posiciones -60 y -350 los cuales se requieren para la inducción por agonistas que activan a la adenilato ciclasa. Localizado entre las posiciones -299 y -320

está el elemento de simetría doble (DSE) también llamado elemento de respuesta a suero (SRE). Esta región es esencial para la inducción por suero, por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), por esteroides de forbol, por las oncoproteínas SRC y RAS, por factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y por el factor de crecimiento neural (NGF) (Ransome y Verma, 1990)

3.4.3. Funciones y regulación de *c-fos* en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Numerosos estudios han demostrado que *c-fos* y otros genes de expresión temprana son inducidos durante la estimulación del SNC, esto reafirma la idea de que dichos genes participan en la respuesta neuronal *in vivo*. Una activación rápida y transitoria de los genes de expresión temprana, incluyendo *c-fos*, *fra-1*, *zif/268*, *nur/77*, *jun-b* y *c-jun*, ocurre en las neuronas corticales después del incremento en la excitabilidad neuronal inducida por fármacos convulsivantes, como el pentilentetrazol (Morgan et al. 1987, Dragunow y Robertson, 1988; Saffen et al, 1988, Watson y Milbrandt, 1989) o antagonistas de la vitamina B6 (Mizuno et al, 1989)

Debido a la inducción rápida y transitoria de *c-fos* en el SNC por una gran variedad de estímulos tanto farmacológicos (Metrazol, cocaína, cafeína, alcohol, morfina, hormonas esteroides, etc) como fisiológicos (estrés, estimulación eléctrica, privación de sueño, de comida, trauma, etc), el incremento en la expresión de *c-fos* se ha propuesto como marcador de actividad neuronal y como herramienta para mapeo metabólico a nivel celular en el SNC (Morgan y Curran, 1991; Sheng y Greenberg, 1990; Mistry et al., 1994, Yang et al., 1994; Kosofsky et al , 1995; Svenningsson et al , 1995; Joppa et al., 1995).

El incremento en la expresión de genes tempranos ha sido detectado tanto a nivel del RNAm como de la proteína y muestra una cinética similar tanto *in vivo* como *in vitro*. La expresión de *c-fos* también es inducida por estimulación eléctrica intracerebral (Sagar et al., 1988, Dragunow y Robertson, 1987; White y Gall, 1987). Un ejemplo específico es el aumento en el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS que aparece en neuronas del asta dorsal de la médula espinal, después de la estimulación sensorial periférica (Hunt et al . 1987) Por otra parte, este incremento en la proteína FOS también se observa en los núcleos supraóptico y paraventricular que participan en el control de la sed después de 24 h de privación de agua (Sagar et al , 1988).

Todos estos estudios coinciden con la idea de que el proto-oncogen *c-fos* juega un papel en la respuesta neuronal. Aún no es claro si este gen forma parte de una respuesta metabólica de neuronas a la excitación eléctrica o trauma, o si está implicado en procesos específicos de plasticidad neuronal.

Varios estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* de secciones del

cerebro han revelado especificidad anatómica y temporal de la expresión de *c-fos* en el SNC (Morgan et al., 1987, Dragunow y Robertson, 1987, 1988, Sagar et al., 1988)

Además de los estímulos antes mencionados que participan en la inducción de la expresión de *c-fos* en el SNC, las hormonas esteroides están involucradas en la regulación de la expresión de este gen.

Las hormonas sexuales y en particular los E_2 , participan en la formación de varios circuitos neuronales durante el desarrollo fetal y/o neonatal y en los adultos controlan diferentes funciones cerebrales al actuar sobre su receptor intracelular (Blaustein et al., 1992) La acción de los E_2 sobre su receptor nuclear provoca un cambio conformacional en el receptor que aumenta la afinidad de unión al DNA y así el complejo receptor-hormona (H-R), interactúa con los ERE, modificando así la transcripción de varios genes (Landers y Spelberg, 1992)

En regiones como el hipotálamo y el área preóptica de la rata, el E_2 no modifica el número de neuronas GnRHérgicas inmunoreactivas a FOS; sin embargo, se detecta un aumento al administrar E_2 seguido de P_4 (Hoffman et al., 1990; Wu et al. 1992). En ovejas ovariectomizadas los niveles de FOS aumentan en neuronas GnRHérgicas en el POA y el HYP anterior y ventral después de que se presenta el pico máximo en la concentración de LH producido por la administración de E_2 , lo cual ocurre 24-30 h después (Moenter et al., 1993).

En regiones como el POA, el núcleo paraventricular del HYP y la amígdala media (mAMG) de ratas sometidas a estimulación vagino-cervical y tratadas con E_2+P_4 , aumentó el número de células que presentan FOS (Pfaus et al., 1993). Por otro lado, se ha reportado que no hay un incremento en el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS en mAMG, en el HYP ventromedial o el área lateral del HYP ventromedial. Sin embargo, en el POA y el HYP dorsomedial de la rata hembra, se ha reportado un aumento en el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS cuando las ratas son tratadas con E_2 y 48 h después reciben un tratamiento con P_4 (Auger y Blaustein, 1995).

En algunos estudios realizados durante el ciclo estral de la rata, empleando la técnica de RT-PCR, se ha reportado un aumento en la expresión de *c-fos*, en el HYP, el POA y la CF a las 13:00 h del proestro lo cual puede estar asociado con el aumento en los niveles séricos de E_2 observados a las 11:00 h y a las 13:00 h del proestro. Dicho aumento antecede al observado en regiones relacionadas con la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (Camacho-Arroyo et al., 1998).

3.4.4 Cambios en la expresión de *c-fos* durante la conducta sexual .

En el SNC de algunos mamíferos las lesiones e implantes de hormonas esteroides,

han mostrado los componentes neuronales que controlan la conducta sexual (Joppa et al., 1995). Estudios de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* han permitido conocer las regiones cerebrales y los núcleos neuronales específicos, que son activados después de estímulos conductuales relacionados con la reproducción.

En el hámster hembra se ha encontrado por estudios de inmunohistoquímica, que hay un incremento en el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS 1h después de la conducta de lordosis en regiones como el núcleo preóptico medial (MPN), la base del núcleo de la estria terminalis (BNST), la mAMG y en el núcleo paraventricular del HYP (Joppa et al., 1995).

En la rata hembra se ha reportado que 1 h después de la estimulación vaginal-cervical recibida durante la monta o por medios mecánicos artificiales, se induce la expresión de FOS en regiones como la mAMG, el POA y el HYP; sin embargo, cuando hay monta e intromisión por parte del macho hay mayor número de células que presentan inmunoreactividad a FOS en estas regiones en la hembra (Polston et al., 1995; Erskine, M. 1993).

En el hámster macho, en regiones como la mAMG, el mPOA y la BNST así como en el bulbo olfatorio, las cuales se encuentran relacionadas con el reconocimiento de feromonas necesarias para que se lleve a cabo la conducta sexual y específicamente para que ocurra la cópula, presentan inmunoreactividad a FOS. La inmunoreactividad en estas regiones, permite el reconocimiento de subnúcleos específicos en los que la monta promueve la expresión selectiva de FOS, ya que esta es mayor una vez que ha ocurrido la cópula, tanto inmediatamente como 1 h después de esta (Fiber et al. 1993 Kollack et al., 1992., Robertson, et al. 1991). En la rata macho se ha informado que la expresión de FOS es mayor entre los machos que montan y eyaculan con respecto a los machos que solo montan o que solo son expuestos a feromonas de la hembra (Lehman et al., 1983).

En ratas macho castrados y tratados con propionato de testosterona o con dihidrotestosterona, sacrificados 1 h después de recibir los tratamientos, presentan un aumento en la inmunoreactividad a FOS en el mPOA, en BNST así como en mAMG (Baum, M. J. y Wersinger, S. R., 1993).

En neuronas secretoras de oxitocina del HYP paraventricular de la rata hembra, se ha reportado un aumento significativo en el porcentaje de neuronas que expresan FOS en ratas tratadas con E_2 y P_4 y que presentaron lordosis, comparadas con ratas que sólo fueron tratadas con hormonas o que solo fueron montadas y que fueron sacrificadas inmediatamente después de haber interactuado durante 1 h con el macho (Flanagan et al., 1993).

Algunos estudios de inmunohistoquímica, han permitido reconocer los núcleos neuronales secretores de GnRH que presentan inmunoreactividad a FOS. En el cerebro anterior de los hurones que son mamíferos pequeños en los cuales las hembras presentan ovulación refleja, se ha reportado que existe un aumento en el número de células que

presentan inmunoreactividad a FOS en regiones como la BNST, el mPOA, la mAMG, así como en el HYP medio dorsal en las hembras que copularon a diferencia de las que no lo hicieron y que fueron sacrificadas 1 h después de la cópula (Lambert et al., 1992). En el caso de los hurones macho que copularon y fueron sacrificados 1 h después, los estudios de inmunohistoquímica mostraron que solo en la mAMG, se presenta un aumento significativo en el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS (Lambert et al., 1992).

En el conejo, se ha mostrado que en el núcleo talámico paraventricular y en neuronas magnocelulares del núcleo hipotalámico paraventricular de conejos neonatales, hay un aumento en la expresión de FOS cuando se presenta el comportamiento de succión asociado al amamantamiento, el cual es un evento muy breve que solo dura entre 3 y 5 min en estos animales (Allingham et al., 1998).

En el conejo se ha reportado que en neuronas productoras de GnRH en la hembra, en regiones como el POA, el área septal, el HYP anterior y el HYP medio basal se presenta un aumento en la proporción de células que presentan inmunoreactividad a FOS una vez que ha ocurrido la cópula; en los machos sin embargo, no fueron detectadas neuronas inmunoreactivas a FOS en estas regiones una vez que copularon (Caba et al. 1998). En estos organismos, se desconocen los cambios en la expresión del gen de *c-fos* después de la cópula a nivel del mensajero en el SNC.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha informado que estímulos conductuales relacionados con la reproducción tales como la monta en el caso de la rata hembra, o algunos eventos asociados al amamantamiento como la succión en el conejo, pueden inducir de manera significativa la expresión del proto-oncogen *c-fos* en el núcleo ventromedial del HYP y el POA en el caso de la rata y en el tálamo y el HYP paraventricular en el caso del conejo produciendo un aumento considerable en el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS, lo cual ha sido detectado por inmunohistoquímica. En el hámster macho, se ha observado que existe un aumento en el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS en el núcleo paraventricular del HYP, 1 h después de la monta y/o intromisión.

En el HYP, el POA la CF, se ha reportado que hay un aumento en la expresión de *c-fos* a las 13:00 del proestro, lo cual puede estar asociado con el aumento en los niveles séricos de E_2 observado entre la 11 00 h y las 13.00 h del proestro lo cual está relacionado con el aumento en la hormona liberadora de gonadotropinas que se registra poco tiempo después. (Camacho-Arroyo, et al., 1998).

En el conejo existen varias regiones del SNC involucradas de manera importante en la reproducción y en la manifestación de la conducta sexual, en las que no se conoce cuales son los cambios en la expresión del proto-oncogen *c-fos* asociados a la cópula. Debido a esto, en este trabajo se estudiaron los cambios en la expresión del proto-oncogen *c-fos* a nivel de su RNAm inducidos por la cópula, en el HYP, POA, el HI y la CF de las hembras y machos sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC) mediante el uso de la técnica de RT-PCR, que es una metodología particularmente útil para analizar RNA mensajero de baja abundancia o cuando la cantidad de muestra disponible es limitada (Piattak et al., 1993, Rashtchian et al., 1994).

Aunque el producto proteínico de *c-fos* ha sido estudiado por inmunohistoquímica en el conejo, no se conoce la secuencia de este gen ni de la proteína en esta especie. Por lo anterior, en este trabajo se realizó además, la obtención de una sonda para el proto-oncogen *c-fos* que permitió conocer de manera específica, la expresión de *c-fos* en el SNC del conejo

5. OBJETIVOS.

Conocer el efecto de la cópula sobre la expresión del proto-oncogen *c-fos* en el SNC en animales de ovulación refleja como el conejo.

Disponer de una sonda específica para la determinación de la expresión de *c-fos* en el SNC del conejo.

Determinar los cambios en la expresión del proto-oncogen *c-fos*, a nivel de la transcripción, en el hipotálamo (HI), el área preóptica (POA), el hipocampo (HI) y la corteza frontal (CF) de machos y hembras sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC).

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Animales de experimentación.

En este estudio, se utilizaron conejos adultos Nueva Zelanda machos y hembras de 3-4 kg de peso, los cuales se mantuvieron en un ciclo luz:oscuridad 14 10 h, con agua y comida disponible *ad libitum*

Para estudiar la expresión de *c-fos*, se pusieron a copular hembras adultas con machos experimentados, observando que se presentaran 2 eyaculaciones por parte del macho para asegurar que se había llevado a cabo la cópula.

Se consideraron como animales control para ambos sexos aquellos animales que no copularon (C); estos animales se sacrificaron por decapitación, al igual que los animales que copularon en las siguientes condiciones.

Inmediatamente después de haber copulado (IC) y 1 h después de la cópula (P).

De todos los animales utilizados en este estudio, se disecaron el HYP, POA, HI y CF

6.2 Extracción y electroforesis del RNA total.

El RNA total se extrajo de los diferentes tejidos disecados del SNC, de la siguiente forma:

1. En tubos nuevos y estériles, se homogenizaron 100 mg de tejido por 1ml de TRIzol (apéndice) a 4°C. Previamente se enjuagó la cuchilla del politrón con agua tratada con DEPC y la solución de TRIzol.
2. Se transfirieron las muestras homogenadas a tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado, los tubos se taparon y agitaron con un vortex por 30 seg.
3. Las muestras se mantuvieron en hielo por 5 minutos. Se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa e incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantuvieron en la interfase y en la fase orgánica respectivamente.
4. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen equivalente de isopropanol, se mantuvo la muestra a 4°C durante toda la noche.

5. Se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C, el RNA se encontró en un precipitado blanco amarillento
6. Se eliminó el isopropanol y el precipitado se lavó con etanol al 75% Se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4°C.
7. Se desechó el etanol con pipetas microvolumétricas, se pusieron los tubos boca abajo sobre una gasa estéril y se secó el precipitado a temperatura ambiente evitando que se seque por completo para evitar la insolubilidad del mismo.
8. Se disolvió la pastilla de RNA en 30 µl de H₂O-DEPC
9. Se hicieron diluciones 1 250 y se leyó la absorbencia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 310 nm. Se determinó la concentración del RNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de absorbencia a 260 nm = 40 µg/ml de RNA También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbencias obtenidas a 260 y 280 nm (260/280 nm). El valor de esta relación en el que se considera puro el RNA es entre 1.8 y 2.0

Posteriormente se preparó un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes al 1% de la manera siguiente:

	Concentración final	Cantidad
Agarosa	1 %	1.2 g
Formaldehído	6 %	19 ml
MOPS	1 X	10 ml
Agua-DEPC	----	91 ml

La agarosa se disolvió en el agua tratada con DEPC. Posteriormente se agregaron el formaldehído y el MOPS, se mezcló la solución y se vertió en un molde para el gel.

Después se prepararon las muestras para separarlas por electroforesis en las siguientes condiciones:

	Concentración final
RNA	3 µg
Formamida	50 %
Formaldehído	6.5 %
MOPS	1X
Amortiguador de carga	1X
Bromuro de Etidio	2.5 µg

El RNA de cada una de las muestras se mezcló con la formamida, el formaldehído y el MOPS y se calentó a 75°C por 5 minutos, se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos. Se le agregó el amortiguador de carga (apéndice) y el bromuro de etidio.

Posteriormente, las muestras se cargaron en el gel y se hizo la separación por electroforesis a 90 voltios por 90 minutos. Se observaron las muestras en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.3 Transcripción Reversa Acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

6.3.1. Síntesis de oligonucleótidos.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó de acuerdo a la secuencia del cDNA para el proto-oncogen *c-fos* de rata (Curran et. al 1987). La secuencia de los oligonucleótidos fue 5'-[CCC CTG TCA ACA CAC AGG AC]-3' (sentido) y 5'[CCG ATG CTC TGC GCT CTG C]-3' (contrasentido), que delimitan un fragmento de 247 pares de bases (+258 a +505) y se sintetizaron por OPERON Technologies, Inc.

Los oligonucleótidos para el gen de la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se utilizó como un control de carga de RNA, se diseñaron de acuerdo a la secuencia del cDNA para el gen de GAPDH de rata (Tso et al., 1985). La secuencia de los oligonucleótidos fue 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' (sentido) y 5'-[CAA TGC CAG CCC CAG CA]-3' (contrasentido) que delimitan un fragmento de 453 pares de bases (+517 a +969), y se sintetizaron por la compañía mencionada anteriormente.

6.3.2. RT

Se realizó la transcripción reversa del RNA total de diferentes regiones del SNC así como del útero de coneja C. Para ésto se preparó la siguiente mezcla para cada una de las muestras:

Concentración Final

RNA Total	2 µg (en un volumen máximo de 2.5 µl)
Buffer RT (5X)	50 mM Tris-HCl pH 8.3 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂
DTT (100 mM)	10 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 mM de cada dNTP
RT M-MLV (200 U/µl) (apéndice)	400 unidades
Oligo dT	0.05 µg

Al RNA se le agregó la mezcla anterior y se mantuvo durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó a 37°C por una hora. El control negativo consistió de una muestra de agua en sustitución del RNA.

6.3.3. PCR

Se realizaron varias pruebas de PCR con los productos de RT obtenidos a partir del RNA de útero de coneja C. Se utilizaron los oligonucleótidos sintetizados de *c-fos* de rata debido a que en el conejo no se ha clonado ni secuenciado *c-fos*.

Se ha reportado que las condiciones óptimas para la obtención de los productos de amplificación de *c-fos* en la rata son las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95°C, 25 ciclos de amplificación con los oligonucleótidos específicos en los que cada ciclo incluye: 1 min a 95°C, 1 min de hibridación con los oligonucleótidos iniciadores a 50°C y 1 min de extensión a 72°C. Por último se reporta un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C (Camacho-Arroyo et al. 1998).

Por lo anterior se preparó la siguiente mezcla para cada una de las muestras:

	Concentración Final
Buffer PCR 10 X	20 mM Tris-HCl pH 8.4 50 mM KCl
MgCl ₂ (50 mM)	1 mM
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
Oligo sense	0.5 mM
Oligo antisense	0.5 mM
TAQ DNA polimerasa	2.5 unidades
Agua cbp	40 µl

A 10 μ l de reacción de RT de cada una de las muestras de SNC se le agregó la mezcla de PCR. La reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 con un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores a 60°C, 1 minuto de extensión a 72°C y un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72°C.

6.3.4 Electroforesis de los productos de RT-PCR

Una vez que se realizó el RT-PCR, se realizó la separación por electroforesis de los productos obtenidos. Se migraron por separado 50 μ l de los productos de RT-PCR del útero de coneja y 30 μ l de los productos de RT-PCR de las muestras de SNC con amortiguador de carga 6X para DNA (apéndice) en un gel de agarosa al 2% preparado con TBE 0.5 X (apéndice).

Se prepararon 180 ml de gel, se pesó la agarosa y se le agregó el TBE 0.5 X y 4 μ l de bromuro de etidio 10 mg/ml (0.2 μ g/ml concentración final). Las muestras se separaron a 90 voltios por 1.5 h en el amortiguador TBE 0.5 X.

El gel que contenía las muestras de SNC se lavó con agua estéril y se desnaturalizó en una solución 0.5 N de NaOH y 1.5 M de NaCl por 45 minutos en agitación constante; después se enjuagó con agua estéril y se neutralizó con una solución Tris-HCl 1 M pH 7.4 y 1.5 M de NaCl por 45 minutos.

Una vez neutralizado el gel, se cortó un pedazo de membrana de nylon y dos de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño que el gel. Se colocaron durante 10 min en SSC 10X (apéndice).

Posteriormente se colocó un pedazo de papel Whatman 3 MM sobre un soporte más ancho y largo que el gel, se colocó dentro de un recipiente y se llenó con SSC 10 X. Cuando el papel Whatman que se encontraba sobre el soporte se mojó completamente, se eliminaron las burbujas de aire con una varilla de vidrio.

Después se colocó el gel sobre el papel encima del soporte en posición invertida, se eliminaron las burbujas entre el gel y el papel Whatman con una varilla de vidrio. Se cortó la esquina del gel para señalar el primer carril.

En seguida se colocó la membrana de Nylon sobre el gel y se le cortó la misma esquina que al gel, se eliminaron las burbujas entre la membrana y el gel y sobre la membrana se pusieron dos pedazos de papel Whatman y se eliminó el aire con una varilla de vidrio.

Posteriormente se cortaron toallas de papel del mismo tamaño que el gel y se colocaron encima del papel Whatman hasta alcanzar una altura de 8 a 10 centímetros. Se

colocó un soporte de vidrio encima de las toallas de papel y encima del vidrio 500 g de peso muerto.

Después se transfirieron los productos de RT-PCR por capilaridad durante 18 horas. Al pasar este tiempo se quitaron las toallas y el papel Whatman. Se marcaron los pozos del gel en la membrana con un lápiz. La membrana se retiró del gel y se eliminó el exceso de sales sumergiéndola en SSC 6 X a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se colocó la membrana sobre papel Whatman y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Una vez seca la membrana se colocó sobre un pedazo de papel Whatman y se utilizó un entrecruzador (Cross-Linker UV Stratagene) para fijar los productos de RT-PCR a la membrana por 50 segundos a 254 nm.

6.3.5 Obtención y purificación de la sonda de *c-fos* a partir del RNA total del útero de coneja.

Después de haber realizado el RT-PCR y la electroforesis de las muestras de útero de coneja C, se realizó la purificación de los productos de amplificación obtenidos.

Se aislaron los fragmentos del gel de agarosa, donde se encontraba la banda de *c-fos* aproximadamente de 250 pares de bases, posteriormente se cortaron finamente y se introdujeron en un tubo eppendorf de 500 μ l al que previamente se había hecho un orificio en la base y se le había puesto fibra de vidrio estéril empaquetada.

El tubo de 500 μ l se introdujo así, en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se realizó una centrifugación a 14000 rpm por 15 min a temperatura ambiente.

A la solución recuperada se le realizó una extracción fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Se separó el sobrenadante y se desechó la fase orgánica.

Al sobrenadante se le agregaron 2.0 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA a -20°C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C .

Se secó el DNA recuperado, a temperatura ambiente y se resuspendió en 8 μ l de H_2O HPLC estéril y se almacenó a -20°C .

6.4. Hibridación "Southern blot".

1 Se preparó el amortiguador de prehibridación el mismo día que se utilizó

El amortiguador está constituido por:

	Concentración final
Formamida	40%
SDS 10X	0.2%
EDTA 0.5 M	0.01 M
Reactivo Denhardt 100X	4X
PB 0.6M (apéndice)	0.12 M
DNA de espermatozoos de salmón	100 µg/ml
SSC 20X	2X

Se prepararon 0.15 ml de solución por cm² de membrana.

El DNA de espermatozoos de salmón se disolvió en 1 ml de agua estéril tratada con DEPC y se calentó a 100°C por 5 minutos. En seguida se colocó en hielo por 5 minutos, posteriormente se le agregó a la mezcla.

2 Se colocó la membrana de nylon dentro de un tubo de hibridación. Se añadió la solución de prehibridación dentro del tubo y se selló perfectamente con parafilm para evitar escurrimientos. Se colocó el tubo en un horno con agitación constante a 42°C por un periodo de 24 h.

3. Los productos de PCR de *c-fos* de útero de conejo purificados y del gen de GAPDH se marcaron radiactivamente, con [α -³²P] dCTP por el método de iniciadores aleatorios.

Para esto se preparó la siguiente mezcla:

	Concentración final
4µl DNA de <i>c-fos</i> de conejo	2 ng
15µl Buffer de iniciadores aleatorios	15 µl
2µl dATP	0.02 mM
2µl dGTP	0.02 mM
2µl dTTP	0.02 mM
4µl [α - ³² P] dCTP	8×10^{-4} mCi
1µl Fragmento Klenow de la DNA polimerasa	0.06 U
Agua HPLC estéril	20 µl

En el caso de la sonda de GAPDH se utilizó 1 μ l de sonda (100 ng) y se ajustó el volumen de la mezcla a 50 μ l con agua HPLC estéril

4. Se mezcló el cDNA en agua y se desnaturalizó a 100°C por 5 minutos. Se sacó e inmediatamente se colocó en hielo otros 5 minutos

5. Al cDNA se le agregó el buffer de iniciadores aleatorios, el dATP, dGTP y el dTTP

6. En la campana de extracción y detrás de una pantalla de acrílico se le agregó el [α -³²P] dCTP y se mezcló con la punta de la pipeta. Se agregó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa y se mezcló con la punta de la pipeta

7. Se dejó incubar la mezcla 2 horas a temperatura ambiente dentro de un blindaje de plomo en la campana detrás de la pantalla de acrílico.

8. Media hora antes de que terminara la incubación se prepararon unas columnas de Sephadex G-50 para separar el ³²P no incorporado. Para esto se colocó en el fondo de una jeringa de insulina un poco de fibra de vidrio estéril y después se llenó la jeringa con el Sephadex usando una pipeta Pasteur estéril. Se centrifugaron las columnas a 1500 rpm por 3 minutos a 4°C.

9. Dentro de un tubo de centrifuga se colocó un tubo eppendorf sin tapa y rotulado. Dentro de este mismo tubo se colocó la columna de Sephadex.

10. Transcurridas 2 horas, se agregaron a la mezcla, en la campana y detrás de la pantalla de acrílico, 5 μ l de amortiguador de inactivación del fragmento Klenow y 100 μ l de TE pH 8.

11. Se colocaron los 155 μ l de mezcla dentro de la columna de Sephadex y se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos a 4°C. Con el contador Geiger se midió la cantidad de radiactividad que se quedó en la columna y la que se incorporó a las sondas. El porcentaje mínimo de incorporación en todos los casos fue del 50%.

12. Con unas pinzas se sacó el tubo eppendorf del tubo de centrifuga y se tapó. Se hirvió la sonda por 5 minutos detrás de la pantalla de acrílico.

13. Se colocó la sonda en hielo 5 minutos

14. Con una pipeta microvolumétrica se adicionó dentro del tubo que contenía la membrana la sonda marcada y se selló el tubo con papel aislante para hibridar la membrana a 42°C por 24 h

15. Transcurrido este tiempo, en la campana y detrás de la pantalla de acrílico se vació el amortiguador de prehibridación con la sonda, dentro de un tubo Falcon rotulado. El tubo se colocó en un blindaje de plomo y se guardó en el congelador ya que la sonda puede ser

reutilizada en otra hibridación.

16. La membrana se lavó con 10 ml de solución SSC 2X en el tubo de hibridación. Se desechó esta solución en el recipiente para desechos radiactivos. Se colocó la membrana en un recipiente con SSC 2X. Se agitó durante 0.5 h a temperatura ambiente. Se cambió la solución por una nueva de SSC 2X y se dejó agitando 30 minutos como en el paso anterior.

17. Se cambió la solución por otra de SSC 0.1X + SDS 0.1%. Se colocó el recipiente en un baño de agua a 50°C y se lavó por 0.5 h. Se sacó la membrana y se verificó con el contador Geiger la radiactividad incorporada.

18. Se colocó la membrana dentro de una bolsa de plástico y esta se selló.

Posteriormente las membranas se expusieron a películas sensibles X-OMAT (Kodak) durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se revelaron las placas manualmente utilizando revelador Kodak, GBX (apéndice) por 3 min, posteriormente se enjuagaron con agua y después se pasaron al fijador Kodak, GBX (apéndice) por 5 minutos. Después de este tiempo se lavó con agua y se dejó secando por unos minutos. La señal obtenida en las placas se cuantificó por densitometría en un analizador Scan Jet 3 C (Hewlett Packard).

Una vez obtenidos los resultados de la expresión relativa *c-fos*/GAPDH en cada una de las áreas del SNC y en cada grupo de animales se realizó un análisis de varianza seguido de la prueba de t de student.

En la Figura 5 se resume el método que se describió anteriormente.

METODO

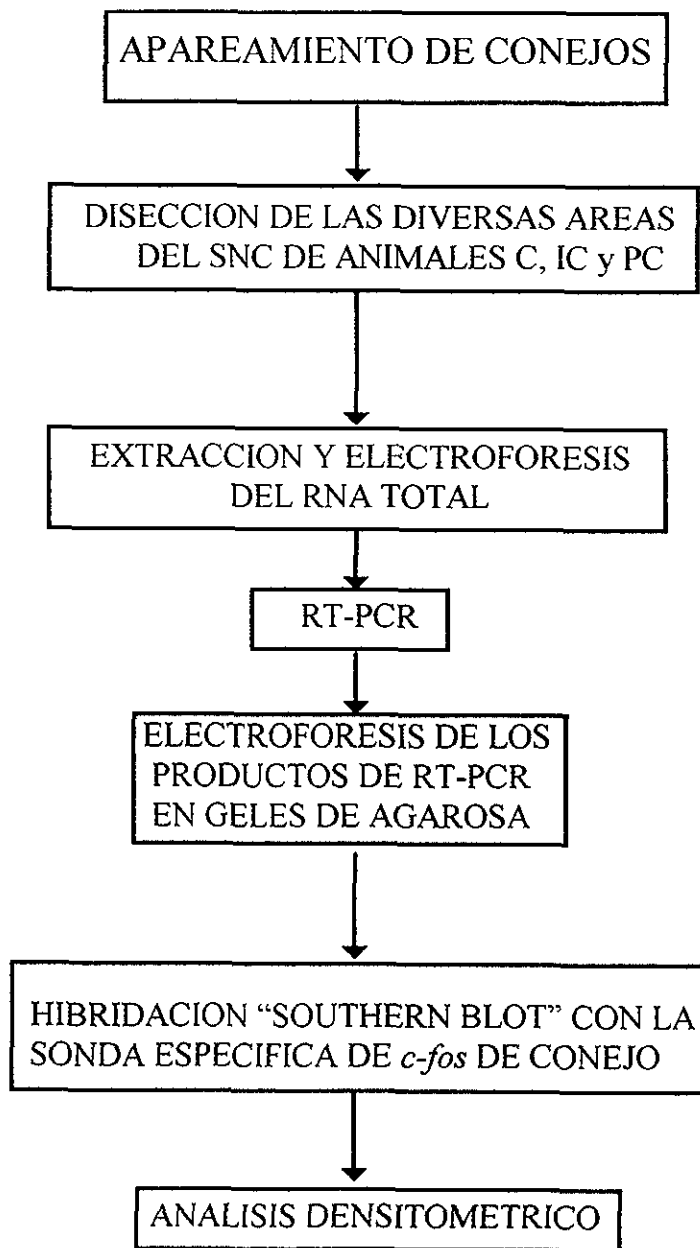


FIG 5.

7.RESULTADOS.

7.1. Obtención y características del RNA total.

Una vez obtenido el RNA total de los diversos tejidos del SNC así como del útero de coneja se realizó una electroforesis para conocer las condiciones en las que se encontraba.

En la figura 6 se muestra la electroforesis en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes de los RNAs totales (5 μ g) extraídos de las diferentes regiones del SNC del conejo. Se observan dos bandas que corresponden a las subunidades 28s y 18s de los RNAs ribosomales y no se observa material degradado lo cual indica que el RNA obtenido se encontraba íntegro.

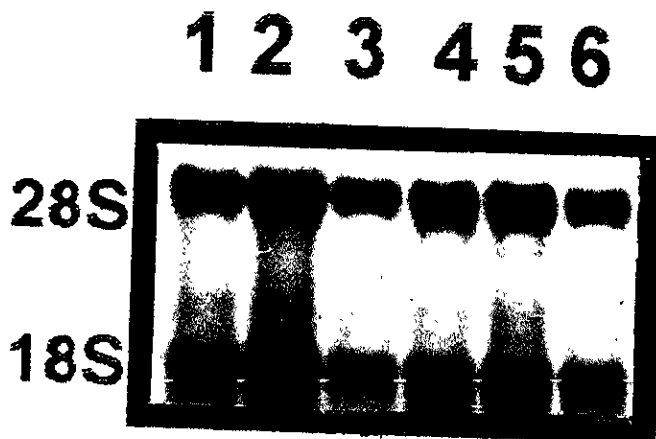


Fig. 6. Electroforesis del RNA total (5 μ g) en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes extraído del HYP de las hembras C, IC y PC (carriles 1-3) y de los machos C, IC y PC (carriles 4-6) Se observan las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18s y 28s, lo que indica que el RNA se encuentra en buen estado.

7.2. Obtención de la sonda específica de *c-fos* a partir del RNA total de útero de coneja.

Con el fin de conocer las condiciones óptimas para la obtención de la mayor cantidad del producto de amplificación de *c-fos* en el conejo, así como para disminuir la posibilidad de obtener productos inespecíficos en la amplificación, se modificaron el número de ciclos, así como las temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos de rata en las pruebas de PCR para la amplificación de *c-fos* en el conejo.

Las temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos específicos de rata probadas en el conejo fueron: 50°C, 55°C, 58°C y 60°C y se utilizaron 30 ciclos de amplificación (Fig 7). Considerando las condiciones óptimas de amplificación de *c-fos* en el útero de coneja se realizó la PCR con la temperatura de unión de los oligonucleótidos a 60°C de las muestras de SNC así como también la amplificación del gen de GAPDH

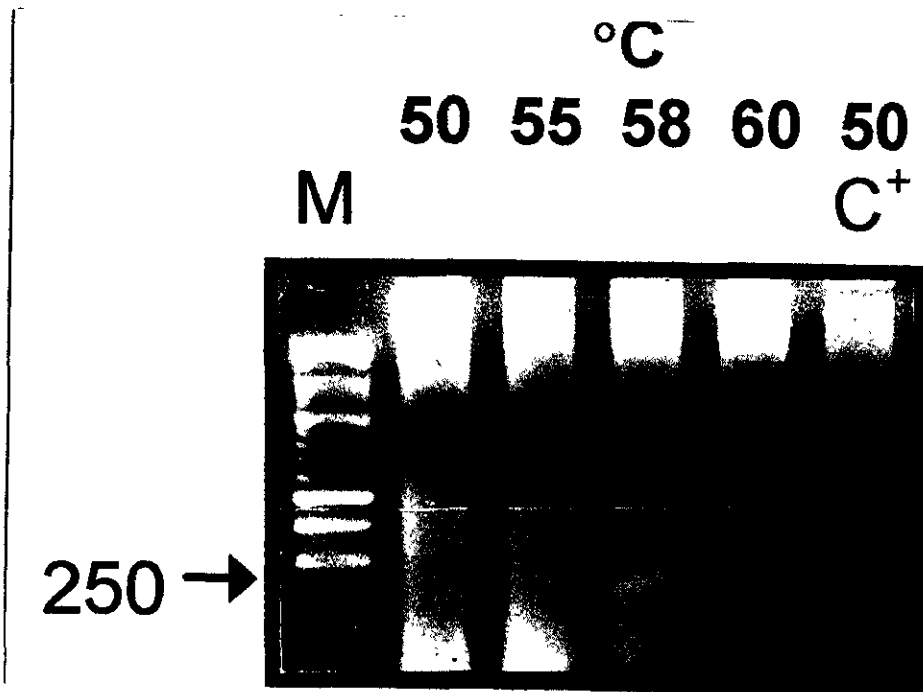


Fig 7. Electroforesis de los productos de RT-PCR de útero de coneja sin copular (C) con las diferentes temperaturas de hibridación (50, 55, 58 y 60 °C) probadas para la amplificación del fragmento de *c-fos* con los oligonucleótidos de rata M muestra el marcador de peso molecular de 100 pb. C⁺ muestra el producto de amplificación de *c-fos* obtenido a partir del RNA del útero de rata (250 pb)

7.3. Expresión de *c-fos* en el SNC después de la cópula.

7.3.1. Cambios en la expresión de *c-fos* en el SNC de la hembra después de la cópula.

Para determinar la expresión del proto-oncogen *c-fos* en las diferentes áreas del SNC del conejo tales como el hipotálamo (HYP), el área preóptica (POA), el hipocampo (HI) y la corteza frontal (CF) se obtuvo el RNA total de estos tejidos de animales sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC) para llevar a cabo la técnica de RT-PCR y con los productos obtenidos se hizo la hibridación "Southern blot" con el cDNA de *c-fos* y GAPDH marcados radiactivamente

En la figura 8 se muestra una autorradiografía representativa de la hibridación "Southern Blot" de los productos de RT-PCR de *c-fos* en el HYP de las hembras C, IC y PC así como del gen de GAPDH, que se utilizó como un control de carga de RNA. La obtención de una sola banda del tamaño esperado en la autorradiografía, mostró que la sonda de *c-fos* obtenida de los productos de RT-PCR del útero de coneja, es específica

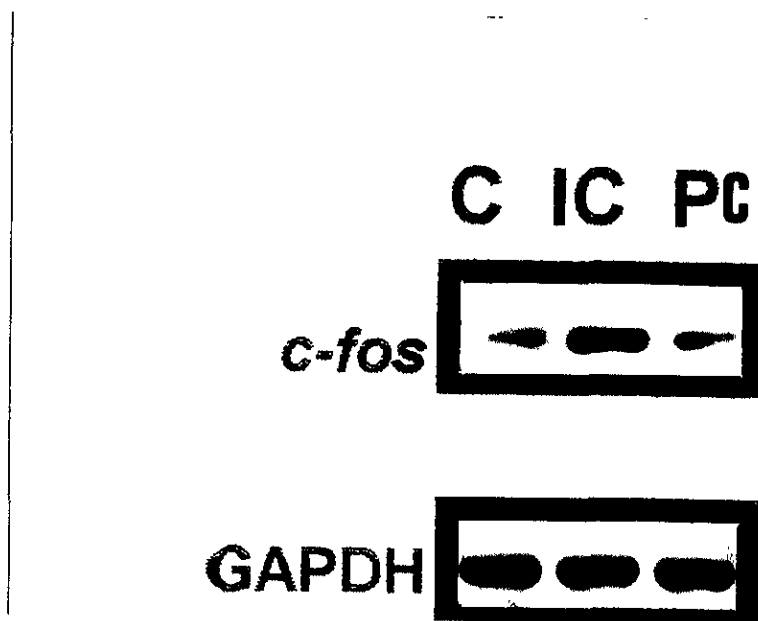


Fig. 8. Autorradiografía del "Southern Blot" representativo de la expresión de *c-fos* en el HYP de la coneja en hembras que no copularon (C), inmediatamente después de la cópula (IC), y 1 h después de la misma (PC). También se presenta la expresión del gen de GAPDH que fue utilizado como un control de carga de RNA.

En el HYP de las hembras (Fig 9) se observó un aumento significativo en la expresión de *c-fos* en el grupo IC el cual disminuyó en los animales PC a niveles cercanos a los del grupo C.

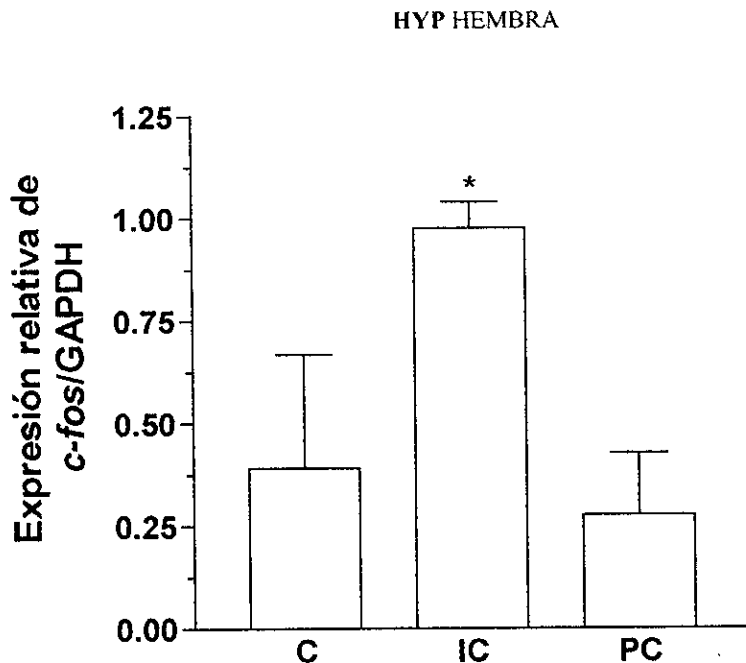


Fig 9. Cambios en la expresión del proto-oncogen *c-fos* en el hipotálamo (HYP) de las conejas s sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC) Los valores de *c-fos* se corrigieron con respecto a los valores obtenidos para GAPDH que se utilizó como control de carga de RNA. Los resultados se expresan como la media \pm ES. * $P < 0.05$ al comparar la expresión de *c-fos* en el grupo de hembras IC con los otros grupos experimentales.

En el hipocampo (HI) y la corteza frontal (CF) de las hembras (Figs 10 y 11 respectivamente) aunque los cambios en la expresión de *c-fos* no fueron significativos se observó una tendencia al aumento en la expresión de *c-fos* en los animales IC. La expresión en los animales PC disminuyó respecto a IC.

HI HEMBRA

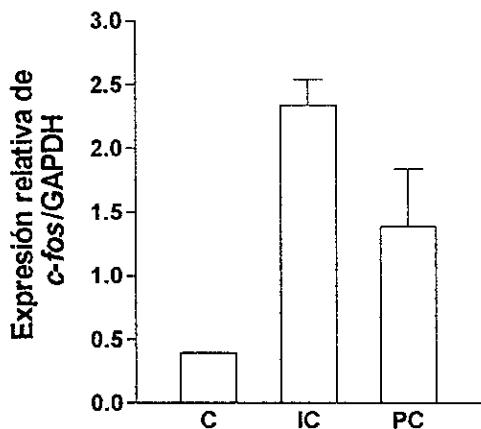


Fig 10. Expresión relativa del proto-oncogen *c-fos* en el hipocampo (HI) de la hembra sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC). La expresión relativa se obtuvo mediante la corrección de la expresión del gen *c-fos* sobre la expresión del gen de GAPDH que se usó como control de carga de RNA. Las diferencias en la expresión del grupo IC no fueron significativas con respecto a los otros grupos.

CF HEMBRA

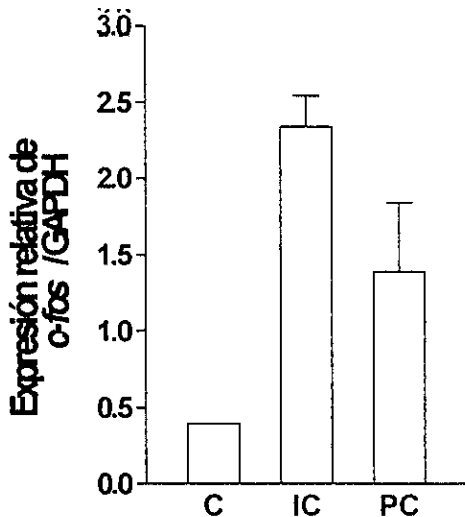


Fig 11. Expresión relativa del proto-oncogen *c-fos* en la Corteza frontal (CF) de la hembra. La expresión fue corregida como en la figura anterior. Las diferencias en la expresión no fueron significativas entre los grupos experimentales.

En la figura 12 se muestra la expresión de *c-fos* en POA. En esta región aunque los cambios no fueron significativos, se observa una notable tendencia a la disminución en la expresión de *c-fos* en las hembras que copularon (IC y PC) con respecto a C.

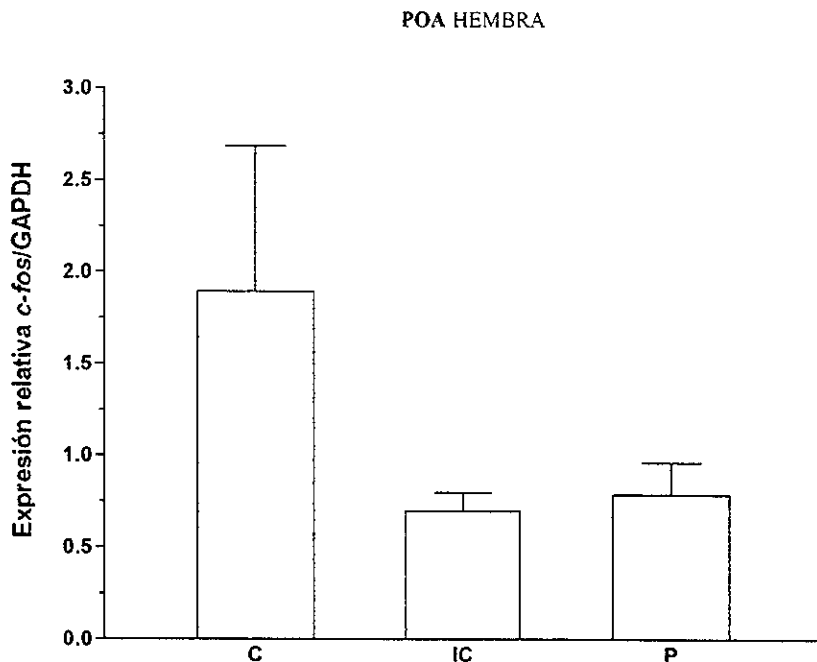


Fig. 12. Expresión relativa de *c-fos* en el área preóptica (POA) de las hembras sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC) Las diferencias en la expresión de *c-fos* no fueron significativas entre los grupos experimentales.

7.3.2. Expresión de *c-fos* en el SNC del macho después de la cópula

En el caso de los machos, en ninguna de las regiones del SNC se registraron cambios significativos en la expresión de *c-fos*, sin embargo en el hipotálamo (HYP) se observó una tendencia al aumento en la expresión de *c-fos* en los animales del grupo IC con respecto al grupo C. Los niveles en el grupo PC presentan una tendencia a la disminución y fueron semejantes a los del grupo C. (Fig 13).

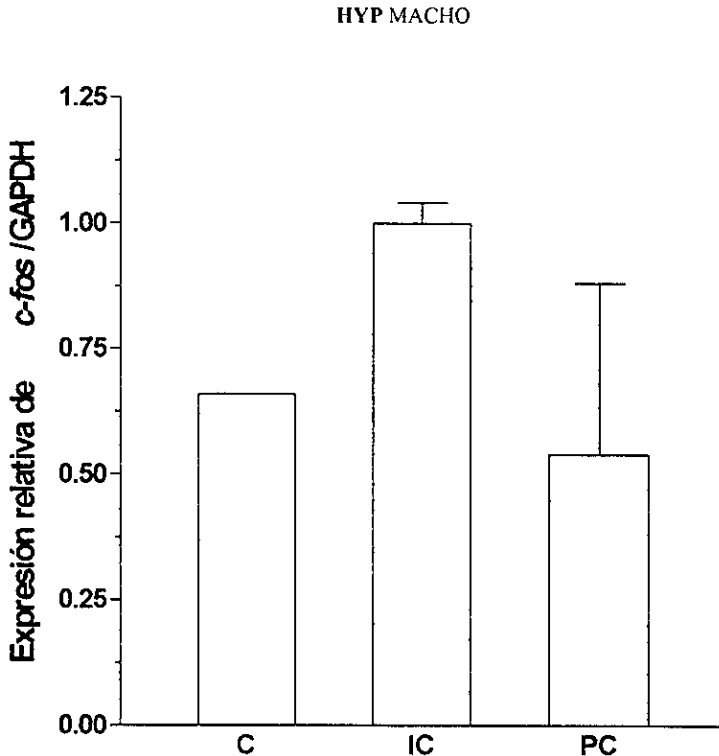


Fig. 13 Expresión relativa de la expresión de *c-fos* en el hipotálamo (HYP) de los machos sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1h después de la misma (PC). Los valores de *c-fos* se corrigieron con respecto a los valores obtenidos para GAPDH que se utilizó como control de carga de RNA. Los resultados se expresan como la media \pm ES. Las diferencias en la expresión no fueron significativas entre los tres grupos de machos.

En la figura 14 y 15 se muestra la expresión de *c-fos* en el área preóptica (POA) y la corteza frontal (CF) de los machos respectivamente. En estas regiones se presentó también una tendencia al aumento en la expresión de *c-fos* aunque a diferencia del HYP, los niveles de expresión del grupo PC fueron muy semejantes a los del grupo IC.

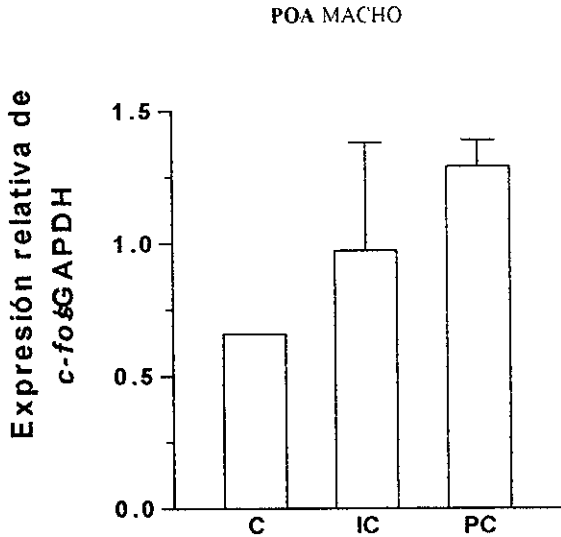


Fig. 14. Expresión relativa del proto-oncogen *c-fos* en el área preóptica (POA) de los machos sin copular (C), inmediatamente después de la copula (IC) y 1 h después de la misma (PC). Las diferencias en la expresión no fueron significativas entre los grupos de machos.

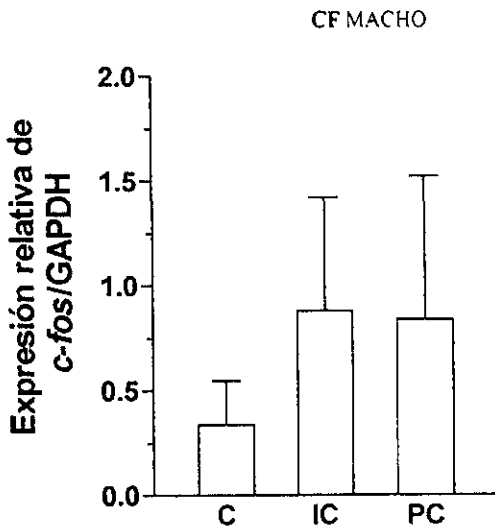


Fig. 15. Expresión relativa de *c-fos* en la corteza frontal (CF) de los machos sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC). Los cambios en la expresión de *c-fos* no son significativos entre los grupos de machos.

En la figura 16 se muestra la expresión de *c-fos* en el hipocampo (HI) de los machos donde se muestra que no hubo diferencias significativas en la expresión de *c-fos* entre ninguno de los grupos experimentales al igual que en las demás regiones del SNC, sin embargo, en esta región no se observa ninguna tendencia al aumento o a la disminución de la expresión de *c-fos* entre ninguno de los grupos de machos, a diferencia de las otras regiones del SNC en las que la expresión tiende al aumento en los animales del grupo IC

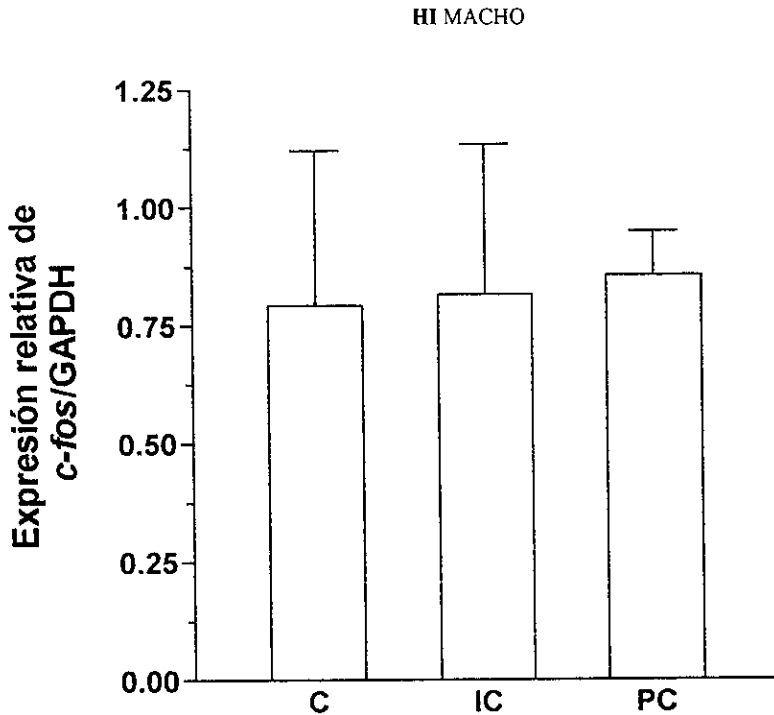


Fig. 16. Expresión relativa de la expresión de *c-fos* en el hipocampo (HI) de los machos sin copular (C), inmediatamente después de la cópula (IC) y 1 h después de la misma (PC). No se observaron tendencias al aumento o disminución en la expresión relativa de *c-fos* entre los grupos de machos

8. DISCUSION

En esta tesis se demostró que la cópula induce significativamente la expresión de *c-fos* en el HYP de la coneja inmediatamente después de que ésta sucede y que en regiones como la CF y el HI la cópula induce notablemente la expresión de *c-fos*, no así en POA donde hay una disminución considerable en la expresión de este gen en las hembras que copularon

En el caso de los machos se mostró que hay una inducción en la expresión de *c-fos*, inmediatamente después de la cópula en el HYP, POA y CF, no así en el HI donde la expresión de *c-fos* no se modifica en los animales que copularon respecto al control.

Estudios previos empleando la técnica de inmunohistoquímica han permitido el reconocimiento de las regiones del SNC en las que *c-fos* es inducido por la cópula tanto en los ovuladores espontáneos (Baum, M. J. y Everitt, B. J. 1992; Kollack, S. S. y Newman, S. W 1992, Oboh et al , 1995) como en los ovuladores reflejos como los hurones (Lambert et al., 1992). En el conejo esta técnica ha permitido recientemente la localización de neuronas que expresan FOS después de la cópula (Caba et al., 1998). Este trabajo permitió la ampliación de estos estudios usando la técnica de RT-PCR seguida de "Southern Blot" para conocer la concentración de mRNA de *c-fos* en el SNC del conejo antes y después de la cópula tanto en hembras como en machos

El uso de la técnica de RT- PCR en este estudio permitió conocer los cambios en la expresión de *c-fos* ya que es muy sensible en la detección de mRNA de baja abundancia o cuando la cantidad de tejido disponible es limitada. La técnica de PCR se realizó empleando 30 ciclos asegurando de esta forma, que la amplificación se encontrara en la fase exponencial. El gen de la enzima GAPDH empleada como control de carga de RNA y para

determinar la expresión relativa de *c-fos*, es adecuado ya que esta enzima participa en la etapa de oxido-reducción de la glucólisis y no interviene en los procesos de reconocimiento sexual ni en las rutas neuroendocrinas involucradas directamente con la cópula (Lehninger et al. 1993)

Al realizar la electroforesis de los productos de RT-PCR de ambos genes obtenidos de HI y CF tanto de las hembras como de los machos, se observó que los productos de amplificación de GAPDH no presentaban diferencias en la concentración; sin embargo se obtuvo muy poca amplificación de *c-fos* en estas regiones y no se observaron bandas en el gel y una vez que se realizó la hibridación con la sonda de *c-fos* específica del conejo obtenida en este trabajo (Fig 7), si se observaron las bandas correspondientes al fragmento de *c-fos*. De esta forma pudo conocerse la expresión relativa de *c-fos* en estas regiones en ambos sexos. La obtención de una sola banda como resultado de la hibridación, mostró la especificidad de la sonda obtenida.

La temperatura de 60°C utilizada para la hibridación con los oligonucleótidos específicos de rata reveló únicamente un solo fragmento amplificado, con lo cual se mostró que las condiciones de PCR fueron las adecuadas ya que los tamaños de los fragmentos obtenidos fueron los esperados. 250 pb para *c-fos* considerando que no se ha clonado ni secuenciado *c-fos* en esta especie. y 480 pb para GAPDH. En los controles negativos de PCR, es decir muestras sin RNA o cDNA no se obtuvo ningún producto de amplificación, lo cual indica que la reacción ocurrió sin contaminación y los resultados son confiables.

La cópula induce significativamente la expresión de *c-fos* en el HYP de la hembra inmediatamente después de la cópula con respecto al grupo control (Fig. 9) Esto puede correlacionarse con la presencia de células GnRHérgicas que presentan inmunoreactividad a FOS detectados recientemente por doble inmunohistoquímica (Caba et al , 1998) en el HYP anterior y en el HYP medio basal 90 min después de la cópula

En el HI y CF de la hembra se observó que hay una tendencia al aumento en la expresión de *c-fos* inmediatamente después de la cópula (Figs 10 y 11 respectivamente). Esta tendencia sugiere que en estas regiones la expresión de *c-fos* también es activada por la conducta sexual y específicamente por la cópula, aunque en los ovuladores reflejos no se conocen los mecanismos por los que sucede esta activación. Ramírez y Beyer (1988), han propuesto que los estímulos copuloceptivos pueden seguir varias rutas, particularmente a nivel del tallo cerebral y que estas pueden tener conexiones sinápticas en varias regiones cerebrales, incluyendo estructuras telencefálicas, AMG, y el HI. Considerando que entre las estructuras telencefálicas se encuentran la corteza cerebral, los ganglios basales y el bulbo raquídeo además de las mencionadas anteriormente, si los impulsos provocados por la cópula siguen las conexiones sinápticas que inervan estas estructuras se podría explicar el aumento de *c-fos* registrado en la CF y el HI una vez que ocurrió la cópula.

Sorprendentemente en el POA de la hembra además de los resultados anteriores, se observó una tendencia a la disminución de *c-fos* en las hembras que copularon respecto al control (Fig 12). Estos resultados difieren con los reportados por Lambert (1992) en el hurón hembra en donde se mostró que en el POA ocurre un aumento en el número de células inmunoreactivas a FOS y a LHRH detectadas por doble inmunohistoquímica. Este aumento detectado en los hurones hembra puede ser el resultado de cambios post-transcripcionales que permiten la detección del aumento en las células inmunoreactivas a FOS. La regulación de *c-fos* en el SNC de los ovuladores reflejos, probablemente podría ser especie-específica, lo cual podría explicar parcialmente los resultados obtenidos, sin embargo, es necesario realizar un mayor número de experimentos para corroborarlos. Se ha reportado que la estimulación vaginal en la coneja puede provocar la liberación de gonadotropinas y por tanto la ovulación. Cuando la ovulación ocurre por este mecanismo se presentó un incremento en la actividad de neuronas del núcleo arcuato, preamilar y del HYP posterodorsal, sin embargo en POA se observó una disminución en la actividad neuronal (Vincent et al., 1970). Por lo tanto, las condiciones de cópula pueden influir de manera importante en la activación neuronal y podrían relacionarse con la disminución en la

expresión de *c-fos* observada en el POA de las hembras que copularon a diferencia de la hembra control que no tuvo contacto con el macho y por tanto no recibió estimulación vaginal

En el caso de los machos se observó que la cópula produce una notable tendencia al aumento en la expresión de *c-fos* en el HYP, el POA y la CF (Fig 13 a 15 respectivamente) No sucede así en el HI donde la expresión de *c-fos* no se modifica en los animales que copularon (Fig 16) El aumento en la expresión de *c-fos* en los machos no es significativo, sin embargo la tendencia al aumento muestra que hay una activación neuronal en las regiones mencionadas anteriormente. En el hurón macho se ha reportado que no se modifica el número de células que presentan inmunoreactividad a FOS y a LHRH en el POA e HYP (Lambert et al., 1992) lo cual podría deberse también a una diferencia especie-específica. A pesar de la expresión de *c-fos* detectada en los machos, recientemente otros autores han mostrado que en el conejo no se presenta inmunoreactividad a FOS o a GnRH en POA, el área septal, HYP anterior y el HYP medio basal aunque sí en otras regiones hipotalámicas y límbicas (Caba, 1998) Sin embargo en la rata macho y el hámster macho, se ha reportado que en el HYP y POA ocurre un incremento en la expresión de *c-fos* cuando se presenta contacto físico directo con hembras sexualmente receptivas o cuando machos castrados tratados con testosterona son expuestos a secreciones vaginales de la hembra (Baum, M. J. y Everitt, B. J. 1992; Baum, M. J. y Wersinger, S. R. 1993; Kollack, S. S. y Newman, S. W. 1992, Fiber et al., 1993). Esto concuerda con las observaciones de este trabajo, lo que sugiere que la cópula activa también ciertas regiones del SNC en el macho

Estos resultados sugieren que en el SNC del macho, probablemente ocurre una regulación diferencial de la expresión de *c-fos* ya que en el HI no se encontró modificación en la expresión de *c-fos* como resultado de la cópula, mientras que en el HYP, el POA y la CF que son regiones involucradas en la conducta sexual, si se presentan modificaciones en la expresión de *c-fos*. En la rata macho la inducción de la expresión de *c-fos* en el POA puede estar directamente relacionada con el tipo de estímulos recibidos, ya que se ha reportado que

la inducción depende de una previa activación de estructuras como la mAM, así como de la región Tegmental Central (CTF). Estas estructuras reciben proyecciones de las células del bulbo olfatorio que es una estructura más directamente relacionada con el reconocimiento de estímulos externos. Los estímulos somatosensoriales podrían también participar en la inducción de *c-fos* en estas áreas ya que se presenta un aumento en el número de células inmunoreactivas a FOS cuando los machos tienen intromisión peneana, a diferencia de los machos que reciben tratamientos con lidocaína en el pene para provocar efectos anestésicos (Baum, M. J. y Everit, B. J., 1992).

La obtención de los resultados anteriores muestra que probablemente tanto en las hembras como en los machos ocurre una regulación diferencial de la expresión de *c-fos* por la cópula, sin embargo, es necesario realizar mayor número de experimentos para corroborar los resultados de la expresión de este proto-oncogen, principalmente en el POA de la hembra. El reconocimiento de algunos de los núcleos específicos del SNC en los que se induce FOS una vez que ha ocurrido la cópula, pueden ser detectados con mayor precisión empleando técnicas como la inmunohistoquímica (Caba et al., 1998) o la hibridación *in situ* para detectar el mRNA.

Para conocer con mayor detalle la regulación de *c-fos* por la cópula en el SNC del conejo sería conveniente realizar experimentos con hembras que se encontraran en el periodo de ovulación es decir, 10 a 12 h después de la cópula y conocer la expresión del gen de GnRH o bien de receptores a hormonas esteroideas relacionadas más directamente con la reproducción, como el receptor a progesterona (RP) y el receptor a estrógenos (RE) durante las condiciones experimentales de este trabajo y durante la ovulación. Un estudio a más largo plazo estaría enfocado a la clonación y secuenciación de *c-fos* en el conejo, lo cual abriría muchas posibilidades de estudio ya que, como se mencionó anteriormente, no se ha realizado la caracterización de este gen en esta especie.

9. CONCLUSIONES

-La cópula induce de forma significativa la expresión de *c-fos* en el hipotálamo de la coneja inmediatamente después de la cópula y provoca una tendencia al aumento en su expresión en el hipocampo y la corteza frontal

-La cópula provoca una regulación diferencial en la expresión de *c-fos* en el SNC del macho ya que muestra una tendencia al aumento en la expresión de *c-fos* inmediatamente después de la cópula en el hipotálamo, el área preóptica y la corteza frontal sin modificar su expresión en el hipocampo

-El aumento significativo en la expresión de *c-fos* en el hipotálamo de la hembra puede estar relacionado con el aumento en la concentración de GnRH, el cual a su vez está relacionado con la inducción de la ovulación en la coneja

10. REFERENCIAS.

- Allingham, K., Saldern, C., Brennan, P., Distel, H and Hudson, R. (1998). Endogenous expression of c-Fos in hypothalamic nuclei of neonatal rabbits coincides with their circadian pattern of suckling-associated arousal. *Brain Res.* **783** 210-218.
- Auger, A. P., and Blaustein, J. D. (1995) Progesterone enhances an estradiol-induced increase in Fos immunoreactivity in localized regions of female rat forebrain. *J. Neurosci* **15**: 2272-2279.
- Baum, M. J. and Everitt, B. J. (1992) Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience*. **50**. 627-646
- Baum, M. J. and Wersinger, S. R. (1993) Equivalent levels of Mating-Induced Neural c-fos Immunoreactivity in Castrated Males Rats Given Androgen, Estrogen, or No Steroid Replacement. *Biol. Reprod* **48** 1341-1347
- Beyer, C., Velásquez, J., Larson, K and Contreras, J. L. (1980). Androgen regulations of the motor copulatory pattern in the male New Zealand white rabbit. *Hormones and Beh.* **14**: 179-190.
- Bishop, J. M. (1987). The molecular genetics of cancer. *Science* **235**: 305-310.
- Blaustein, J. D., Lehman, M. N., Turcotte, J. C., and Greene, G. (1992). Estrogen receptors in dendrites and axon terminals in the guinea pigs hypothalamus. *Endocrinology* **131**: 281-290.
- Brown, K., Elkabit, D and Fink, G. (1968) The effect of mating on pituitary luteinizing hormone and thyrotropic hormone content in the female rabbit. *J. Endocrinology*. **41**. 91-94.
- Caba, M., González-Mariscal G, González, A. y Silver, R. (1998). XLI *Memorias del Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas*, A. C. Resumen C-157
- Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., Dominguez, R., Mendoza, A., Cruz, E and Cerbón M. A. (1998). c-fos expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during proestrus. *Life Sci.* **62**. 1153-1159.

- Challis, J., Davies, J and Ryan, K (1973) The concentrations of Progesterone, Estrone and Estradiol-17 β in the plasma of pregnant rabbits *Endocrinology* **93** 971-976
- Curran, T., Abate, C, Cohen D.R, MacGregor P F, Rauscher III, Sonnenberg, J L., Connor, J A., Morgan, J I (1990). Inducible proto-oncogen Transcription Factors: Third messengers in the brain? *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume LV Cold Spring Harbor
- Curran, T., Van Beveren, C., Ling, N, Verma, I. M. (1985). Viral and cellular fos proteins are complexed with a 39,000 KD cellular protein. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 167-172.
- Curran, T., Gordon, M.B., Rubino, K L, and Sambucetti, L. C. (1987). Isolation and characterization of the *c-fos* (rat) cDNA of post-translational modification *in vitro*. *Oncogene* **2**: 79-84.
- Curran, T., Franza, B R, (1988) Fos and Jun: The AP-1 connection. *Cell* **55**. 395-401
- Dragunow M., and Robertson H A (1987). Generalized seizures induce *c-fos* protein(s) in mammalian neurons *Neurosci. Lett* **82**. 157-161.
- Dragunow M., and Robertson H A (1988). Brain injury induces *c-fos* protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain. *Brain Res* **455**: 295-299.
- Erskine, M. (1993) Mating-induced Increases in FOS protein in Preoptic Area and Medial Amygdala of Cycling Female Rats *Brain Res Bull* **32**: 447-451.
- Fiber, J., Adames, P and Swann J. (1993) Pheromones induce *c-fos* in limbic areas regulating male hamster mating behavior. *NeuroReport* **4**: 871-874.
- Flanagan-Cato, L. M, McEwen, B. S. (1995). Pattern of FOS and Jun expression in the female rat forebrain after sexual behavior. *Brain Res.* **673**: 53-60.
- Flanagan, L., Pfau, J, Pfaff, D and McEwen. (1993). Induction of FOS immunoreactivity in oxytocin neurons after sexual activity in female rats *Neuroendocrinology*. **58**: 352-358.
- Fox, R. R. and Lair, C. W. (1970). *Sexual Cycles. In Reproduction and Breeding Techniques for laboratory Animals*. The State University, New Brunswick. U.S.A.
- Fuchs, A., Cubile, L and Dawood, M. (1981). Effect of mating on plasma levels of oxytocin and prolactin in male and female rabbits. *J Endocrinology*. **90**. 245-253

- Gonzales, G A , Yamamoto, K K , Fisher, W H , Karr, D , Menzel, P , et al (1989) A cDNA for cAMP-regulated nuclear factor CREB predicts multiple phosphorylation sites *Nature* **337**:749-752
- González-Mariscal, G., Díaz, V , Melo, A , Beyer, C and Rosenblat, J (1994) Maternal behavior in New Zeland white rabbits Quantification of somatic events, motor patterns and steroid plasma levels *Physiol. and Beh* **55** 1081-1089.
- González-Mariscal, G., Albonetti, M E , Cuamatzi, E and Beyer, C (1997) Transitory inhibition of scent marking by copulation in male and female rabbits. *Animal Beh.* **53**:323-333
- Hillard, T and Eaton, L. (1971). Estradiol-17 β , progesterone and 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one in rabbit ovarian venous plasma. II From mating through implantation. *Endocrinology.* **89**: 522-527
- Hoffman, G E , Lee, W-S , Attardi, B , Yann, V , and Fitzsimmons, M D. (1990). Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express *c-fos* antigen after steroid activation. *Endocrinology* **126**: 1736-1741
- Hope, I. A., and Struhl, K. (1987) GCN4, a eucaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA *EMBO J.* **6** 2781-2784.
- Hunt, S. P., Pini, A., and Evan, G (1987) Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation *Nature* **328**: 632-634.
- Hyder, S.M., Cram, L.F. y Loose-Mitchell, D.S. (1991a) Sequence of a 1.4-kb region in the 3'-flanking region of the murine *c-fos* proto-oncogene which contains an estrogen-response element *Gene.* **105**: 281.
- Hyder, S M., Stancel, G.M y Loose-Mitchell, D.S. (1991b) Presence of an estradiol response region inthe mouse *c-fos* oncogene *Steroid* **56**, 498
- Joppa, M.A., Miesel, R.L and Garber, M.A (1995). *c-fos* expression in female hamster brain following sexual and aggressive behaviors. *Neuroscience.* **68**:783-792.
- Kollack, S.S and Newman, S W. (1992). Mating behavior induces selective expression of Fos protein within the chemosensory pathways of the male Syrian hamster brain. *Neurosci. Lett* **143**: 223-228.
- Kosofsky, E. B., Genova, M L , Hyman, E. S. (1995). Postnatal age defines specificity of immediate early gene induction by cocaine in developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* **351**. 27-40

- Kouzarides, T., and Ziff, E. (1988) The role of leucine zipper in the fos-jun interaction *Nature* **336** 646-651
- Lambert, G., Rubin, B. and Baum, M. (1992). Sex difference in the effect of mating on c-fos expression in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the ferret forebrain. *Endocrinology*. **131**: 1473-1480
- Landers, J. P., and Spelsberg, T. C. (1992). New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes and the cascade model of steroid regulation of gene expression *Critical Review Eukariot Gene Expression* **2** (1): 19-63
- Landschultz, W.H., (1988) The leucine zipper protein: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding protein. *Science* **240** 1759-1764.
- Lehman, M.N., Powers, J.B. and Winans, S.S. (1983). Stria terminalis lesions alter the temporal pattern of copulatory behavior in the male golden hamster. *Beh. Brain Res* **8**:109-128
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. 1993 Principles of Biochemistry Worth Publishers. pp. 400-411.
- Loose-Mitchel, D. S., Chiappetta, C., and Stancel, G. M. (1988). Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinology* **2**: 946-951
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook J. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mistry, M. A., Helferich, W., and Romsos, R. D. (1994). Elevated neuronal c-fos-like immunoreactivity and messenger ribonucleic acid (mRNA) in genetically obese (*ob/ob*) mice. *Brain Res*. **666**: 53-60.
- Mizuno, A., Mizobuchi, T., Ishibashi, Y., and Matsuda, M. (1989). c-fos mRNA induction under vitamin B6 antagonist-induced seizure. *Neurosci Letters* **98**: 272-275.
- Moenter, S. M., Karsch, F. J., and Lehman, M. N. (1993). Fos expression during the estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge of the ewe: induction in GnRH and other neurons. *Endocrinology* **133**: 896-903
- Morali, G. and Beyer, C. (1992). Motor aspects of masculine sexual behavior in rats and rabbits *Adv in the study beh.* **21**: 201-220.
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., and Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* **237**: 192-197

- Morgan, J. I., and Curran, T. (1991) Stimulus transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Ann. Rev. Neurosci.* **14**: 421-451
- Oboh, M. A., Paredes, R. G. and Baum, M. J. (1995). A Sex Comparison of Increments in FOS Immunoreactive in Forebrain Neurons of Gonadectomized, Testosterone-Treated Rats after Mating an Estrous Female. *Neurobiol. Learn Mem* **63**: 66-73.
- Pfaus, J. G., Kleopoulos, S. P., Mobbs, C. V., Gibbs, R. B., and Pfaff, D. W. (1993) Sexual stimulation activates *c-fos* within estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. *Brain Res.* **624**: 253-267.
- Piattak, M., Saag M. S., Yang, L. C., et. al. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**: 1749-1754.
- Polston, E.K and Erskine, M.S. (1995) Patterns of induction of the immediate-early genes *c-fos* and *egr-1* in the female rat brain following differential amounts of mating stimulation. *Neuroendocrinology* **62**: 370-384.
- Ramirez, V. D. and Beyer, C. (1988). The ovarian cycle of the rabbit: its neuroendocrine control. In Knobil, E. and Neill, J. The Physiology of Reproduction. Raven Press New York. pp. 1873-1892.
- Ramirez, V. D. and Lin, W. (1994). The neuroendocrine control of the rabbit ovarian cycle. In Knobil, E. and Neill, J. The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York. pp. 585-611.
- Ransome, D. A. and Verma, I. M. (1990). Nuclear proto-oncogenes *Fos* and *Jun*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**: 539-557.
- Rashtchian, A. (1994). Amplification of RNA. In PCR methods and applications. **4**: pp. S83-S91 Cold Spring Harbor Laboratory.
- Robertson, G. S., Pfaus, J. G., Atkinson, L. J., Matsumura, H., Phillips, A. G., Fibiger, H. C. (1991). Sexual behavior increases *c-fos* expression in the forebrain in the male rat. *Brain Res.* **564**: 352-357.
- Saffen, D. W., Cole, A. J., Worley, P. F., Chisty, B. A., Ryder, K., and Baraban, J. M. (1988). Convulsant-induced increase in transcription factors messenger RNAs in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7795-7799.
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., and Curran, T. (1988) Expression of *c-fos* protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* **240**: 1328-1331.

Sassone-Corsi, P., Sisson, J C., Verma, I M. (1988a). Transcriptional autorregulation of the proto-oncogen *c-fos*. *Nature* **334** 314-319.

Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J., Lamph, W.W., Verma, I.M. (1988b). Direct interaction between Fos and Jun nuclear oncoproteins: role of the leucine zipper domain. *Nature* **336** 692-695

Sawyer, C. H., Markee, J. E. and Hollinshead, W. H. (1947). Inhibition of ovulation in the rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine *Endocrinology* **41**. 395-402.

Sheng, M., and Greenberg, M. E (1990). The regulation and function of *c-fos* and other immediated early genes in the nervous system. *Neuron* **4**: 477-485.

Spies, H., Pau, K., Yang, S. (1997) Coital and estrogens signals. A contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and Rhesus monkeys *Biol. Reprod* **56**:310-319

Staples, R. E (1967). Behavioural induction of ovulation in the oestrus rabbit. *J. Reprod. Fertil.* **13**. 429-435

Svenningsson, P., Ström, A., Johansson, B., and Fredholm, B B (1995). Increased expression of *c-jun*, *junB*, *AP-1*, and preproenkephalin mRNA in rat striatum following a single injection of caffeine. *J. Neurosci.* **15**(5): 3583-3593.

Tso, J Y., Sun, X. H., Kao, T. H., Reece, K. S. and Wu, R. (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phospate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* **13**: 2485-2502.

Vincent, J D., Duffy, B., and Faure, J. M. A. (1970). Effects of vaginal stimulation on hypothalamic single unit activity in unanesthetized rabbits. *Experientia* **26**: 1266-1267.

Watson, M. A., and Milbrandt, J. (1989). The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4213-4219.

Weisz, A., and Bresciani, F. (1988). Estrogen induces expression of *c-fos* and *c-myc* proto-oncogenes in rat uterus. *Mol. Endocrinology* **2**: 816-824.

Weisz, A., and Rosales, R. (1990) Identification of an estrogen response element upstream of the human *c-fos* gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5097-5106.

White, J D , and Gall, C. M (1987). Differential regulation of neuropeptide and proto-oncogene mRNA content in the hippocampus following recurrent seizures *Bram Res* 427: 21-29.

Wu, T J , Segal, A Z , Miller, G M., Gibson, M J., and Silverman, A. J. (1992). Fos expression in gonadotropin-releasing hormone neurons: enhancement by steroid treatment and mating. *Endocrinology* 131: 2045-2050

Yang, K , Mu, X. S , Xue, J. J., Whitson, J , Salminen, A., Dixon, C. E., Liu, P. K., Hayes, R. L. (1994). Increased expression of *c-fos* mRNA and AP-1 transcription factors after cortical impact injury in rats. *Brain Res.* 664: 141-147

Yang, S., Pau, F., Hess, D and Spies, H. (1996) Sexual Dimorphism in secretion of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and norepinephrine after coitus in rabbits. *Endocrinology.* 137:2683-2693.

11. APENDICE

Amortiguador de carga para DNA 6X (Loading Buffer):

0.25 % azul de bromofenol.

0.25 % Xilen Cianol.

30.0 % Glicerol en agua.

Guardar a 4°C

Amortiguador de carga para RNA 6X (Loading Buffer).

50 % Glicerol.

1 mM EDTA (pH 8.0)

0.25 % azul de bromofenol.

0.25 % Xilen Cianol

EDTA 0.5 M

Agregar 186.1 g de EDTA (Etilendiaminotetraacetato) a 800 ml de H₂O destilada, agitar hasta que se disuelva. Ajustar el pH a 8.0, aforar a 1000 ml y esterilizar por autoclave.

Fijador (Kodak, Wash System Cleaner)

Diluir 100 ml de fijador en 400 ml de H₂O destilada. Almacenar en frascos ámbar.

H₂O-DEPC.

Mezclar 1 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) en 9 ml de alcohol etílico absoluto y aforar a 1000 ml con H₂O destilada. Poner en baño de temperatura constante a 37°C por dos horas y esterilizar por autoclave

MOPS

0.1 M MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanesulfónico).

40 mM acetato de sodio.

5 mM EDTA

Preparar con H₂O+DEPC y esterilizar por filtración.

PB (Amortiguador de Fosfatos)

0.6 M Na₂HPO

0.6 M KH₂PO₄

Preparar 500 ml de cada solución, mezclar y llevar a pH 6.5. Esterilizar por autoclave.

PBS (Amortiguador de fosfatos)

Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO y 0.24 g de KH₂PO₄ en 800 ml de H₂O destilada. Ajustar pH a 7.4, aforar a 1000 ml y esterilizar por autoclave.

Reactivo Denhardt 100 X.

10 g Ficoll tipo 400.

10 g de polivinilpirrolidona.

10 g de albúmina de suero bovino

Filtrar y guardar a -20 °C.

Revelador (Dektol. Kodak, GBX)

Diluir 100 ml de revelador en 400 ml H₂O destilada. Almacenar en frascos ámbar.

RT M-MLV (Gibco BRL)

Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murino de Moloney

200 U/μl

SDS 10 %

Disolver 100 g de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) en 900 ml de H₂O destilada. Calentar a 68 °C hasta que se disuelva completamente. Ajustar pH a 7.0 Aforar a 1000 ml.

Sephadex G-50

Pesar 10 g de sephadex G-50; lavar varias veces con agua destilada estéril. Llevar a un volumen final de 160 ml y equilibrar con TE pH 8 y esterilizar por autoclave.

SSC 20X

Disolver 175.3 g de NaCl y 88.2 g de Citrato de Sodio en 800 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH 7.0 Aforar a 1000 ml y esterilizar por autoclave.

TBE 5X.

0.5 M Tris base.

0.5 M ácido bórico.

10 mM EDTA.

TE (Tris-EDTA).

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

1 mM EDTA (pH 8.0).

TRIzol Reactivo para la extracción de RNA (Gibco BRL).

Tiocianato de guanidina

Fenol

β-mercaptoetanol