

910
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**" EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN *c-fos* EN
AREAS ESPECIFICAS DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL DE LA RATA DESPUES DE LA
ADMINISTRACION DE ESTRADIOL Y DURANTE
EL CICLO ESTRAL "**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA



DIRECCION DE ESTUDIOS PROPECIONALES
DIRECTOR DE TESIS:
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

1996
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA 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:
EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN c-fos EN AREAS ESPECIFICAS DEL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE ESTRADIOL
Y DURANTE EL CICLO ESTRAL.

realizado por CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

con número de cuenta 8720865-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Propietario Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Propietario M. en I.B.B. Saúl Cano Colín.

Suplente Biólogo Francisco Javier Camacho Arroyo

Suplente Biólogo Vicente Castrejón Téllez.

FACULTAD DE CIENCIAS

Coordinación General de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. IGNACIO CAMACHO
ARROYO.**



A Dios, porque día a día me enseña su grandeza y a través de El he aprendido a amar la vida.

A mi madre, por su lucha y las ganas con que enfrenta la vida, por su apoyo incondicional en todos los sentidos, por su preocupación de siempre por que fuera alguien en la vida, por que todo lo que soy y seré, es en gran parte gracias a la educación y al sentido de responsabilidad que siempre me inculcó y por su amor y cariño que siempre me ha hecho sentir.

A mi padre, porque de algún modo u otro siempre me ha brindado su apoyo y ha estado ahí.

A mis hermanos: Ramón, Silvia, Lourdes, Rosa, Lilia, Martha, Alma y Claudia; porque igual de numerosa es la alegría que he compartido con ellos.

A Carlos Eduardo, porque algún día te volveré a ver.

A José Ramón, Juan Manuel, Rocío, Beatriz, Lidia, Octavio, Karla, Xochitl, Rosa Gloria, María Luisa, Iván, Mónica, Gerardo, Susana, Fabiola y Omar, por ser la alegría y el motor de mi familia.

A Julia, porque apareció cuando más la necesitaba, porque en este tiempo se ha convertido en una parte fundamental en mi vida, por su apoyo y su ayuda incondicional y sobre todo por su amor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, director de esta tesis, porque me brindó su apoyo, su tiempo y su interés incondicional para el desarrollo de este trabajo, así como para mi superación académica y personal; por su amistad y confianza y por ser un excelente Maestro.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón por sus críticas y consejos oportunos que fueron de gran ayuda para desarrollar este trabajo. Por estar siempre al pendiente de nuestras necesidades tanto del laboratorio, como personales y tratar de suplirlas desinteresadamente.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de realizarme como individuo y como profesionista.

A la Fundación UNAM por otorgarme la beca para tesis, gracias a la cual pude realizar este trabajo.

Al M. en I.B.B. Saúl Cano Colín y a los Biólogos Francisco Javier Camacho y Vicente Castrejón por su tiempo para la revisión de éste trabajo y por sus valiosos comentarios.

A la M. en C. Adriana Mendoza por su amistad, por recibirme como su ayudante y enseñarme las técnicas de Biología Molecular con dedicación y paciencia.

A la Sra. Juanita González, Ana María, Gabriela, Andrea, Francis, Abelardo, José y demás compañeros del laboratorio por su ayuda y apoyo.

A Sara Teresa, Claudina, Magda, Claudia Verónica, Rocío García, Elizabeth (China), Mónica, Sara Sánchez y amigas que me faltaron, por su amistad y por las porras.

A Francisco, Jorge, Marco, Oscar, Chela, Chayo, Carmen y demás compañeros y amigos del CCH Sur, por los momentos y las reuniones tan *sui generis* que he pasado con ustedes, por su amistad y apoyo incondicional.

A Rafael, Alejandro, Ernesto, Fabian, Jesús, Gerardo, Fernando (Flor), Ray y demás compañeros de la Facultad por el compañerismo, la amistad y confianza que me brindaron siempre.

A mi Hermano Ramón, por echarme la mano en lo económico, por sus consejos en las etapas críticas de mi vida y por ser el ejemplo a superar académicamente.

A mi hermana Martha Patricia, por ser mi amiga y porque las barreras que han surgido entre nosotros las hemos superado, por la confianza absoluta que siempre ha tenido para mí y porque siempre me ha apoyado en todo.

A mis cuñados Luis y Pablo por el apoyo que siempre he tenido de ellos.

A Hector Manuel, mejor conocido como el Chino, por su amistad y apoyo incondicional de casi toda la vida, por las noches bien perdidas, las chelas, las terapias, los triunfos y los fracasos compartidos y por querer ser mi hermano.

A la familia Ortiz Martínez (en especial a la sra. Marina y el sr. José), a la familia Sánchez Nava (en especial a la sra. Hossana y Sara), porque nunca me hicieron sentir un extraño.

A los buenos profesores de la Facultad de Ciencias por su disposición e interés por transmitir sus conocimientos.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Ciclos Reproductivos.	4
3.2. Ciclo Estral de la Rata.	4
3.3. Generalidades de las hormonas esteroides.	9
3.3.1 Mecanismos de acción de las hormonas esteroides.	
3.4. Generalidades de los proto-oncogenes	14
3.5. <i>c-fos</i> .	14
3.5.1. Generalidades	
3.5.2. Estructura de la proteína FOS.	
3.5.3. Funciones de FOS.	
3.5.4. Funciones de <i>c-fos</i> en el Sistema Nervioso Central (SNC).	
3.6. Regulación de la expresión de <i>c-fos</i> .	20
3.6.1. Regulación de la expresión de <i>c-fos</i> por hormonas esteroides.	
3.6.2. Regulación de la expresión de <i>c-fos</i> en el SNC por hormonas esteroides.	
3.7. Expresión de <i>c-fos</i> en el SNC durante el ciclo estral de la rata.	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	27
5. OBJETIVOS.	28

6. MATERIALES Y METODOS.	29
6.1. Animales de experimentación.	29
6.2. Extracción de RNA total.	30
6.3. Electroforesis de RNA total.	32
6.4. Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	33
6.4.1. Síntesis de oligonucleótidos.	
6.4.2. Retrotranscripción (RT).	
6.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	
6.5. Electroforesis de los productos de RT-PCR.	37
6.6. Transferencia a membranas de nylon.	37
6.7. Hibridación "Southern Blot".	39
6.8. Análisis densitométrico.	43
7. RESULTADOS.	45
7.1. Extracción y caracterización de RNA total.	45
7.2. Expresión de <i>c-fos</i> en áreas del SNC después de la administración de estradiol.	47
7.3. Expresión de <i>c-fos</i> en áreas del SNC durante el ciclo estral.	54
8. DISCUSION.	60
9. CONCLUSIONES.	66
10. REFERENCIAS.	67
11. APENDICE.	79

1. RESUMEN.

En este trabajo se estudió la regulación de la expresión del proto-oncogen *c-fos* en el hipotálamo, el hipocampo y la corteza cerebral de ratas ovariectomizadas tratadas con 17 β -estradiol (5 $\mu\text{g}/100$ g de peso) y también durante el ciclo estral de animales intactos mediante el uso de la técnica de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se observó que el estradiol indujo la expresión de *c-fos* en el hipotálamo y en el hipocampo. La máxima inducción fue observada 1 h después de la administración de estrógenos, los niveles basales de la expresión de *c-fos* se registraron 3 h después y se mantuvieron así hasta las 24 h. Por el contrario, en la corteza cerebral se observó una disminución en la expresión de *c-fos* después de la administración de estradiol. El nivel de expresión más bajo se presentó 1 h después de la administración y permaneció así hasta las 24 h. A lo largo del ciclo estral el hipotálamo, el área preóptica y la corteza cerebral presentaron la mayor expresión de *c-fos* durante el estro. Durante el proestro la máxima expresión de *c-fos* se presentó a las 13:00 h. en todas las regiones estudiadas. Esta máxima expresión puede relacionarse con el incremento en la proteína de *c-fos* (FOS), que se observa con inmunohistoquímica, en la tarde del proestro (15:00-16:00 h) y que precede al pico en la concentración de la hormona liberadora de gonadotropinas en varias regiones del cerebro anterior. Estos resultados nos sugieren que la expresión del proto-oncogen *c-fos* se regula diferencialmente en el Sistema Nervioso Central de la rata en condiciones fisiológicas y farmacológicas, y que otras hormonas esteroideas sexuales o neurotransmisores participan en su regulación durante el ciclo estral.

2. INTRODUCCION.

Los estrógenos participan en diversas funciones del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, tales como la diferenciación neuronal, la organización sexual del cerebro, la reproducción, la conducta sexual y la excitabilidad neuronal. Muchas de las acciones de los estrógenos están mediadas por receptores intracelulares específicos a estrógenos que funcionan como factores de transcripción activados por el ligando que interactúan con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) que se encuentran en los genes regulados por estas hormonas. En el SNC, los estrógenos regulan la expresión de varios genes, entre ellos aquel que codifica para su propio receptor, para el receptor a progesterona y enzimas de síntesis de neurotransmisores, y neuropéptidos, así como al proto-oncogen *c-fos*.

En el SNC la expresión del proto-oncogen *c-fos* se ha utilizado como un indicador de actividad neuronal. El encendido de este gen de expresión temprana es inducido por un gran número de estímulos físicos y químicos. Los efectos del estradiol sobre la expresión de *c-fos* en el SNC se han evaluado, principalmente por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Estos estudios mostraron que en ratas ovariectomizadas la expresión de *c-fos* se indujo por estradiol en períodos cortos de tiempo (minutos y horas) en el mesencéfalo, hipotálamo y el hipocampo.

Durante el ciclo estral, el número de células inmunorreactivas a la proteína FOS (el producto de *c-fos*) en el núcleo arcuato y área preóptica es más alta en la tarde que en la mañana del proestro y esta proteína no es detectable en los otros días del ciclo. En este trabajo se evaluaron los efectos del estradiol sobre la expresión del proto-oncogen *c-fos* en el hipotálamo, el hipocampo y la corteza

cerebral de ratas, así como las variaciones en su expresión durante el ciclo estral, mediante el uso de la técnica de la retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

3. ANTECEDENTES.

3.1. Ciclos Reproductivos.

Los ciclos reproductivos en los mamíferos se definen básicamente por el tipo de ovulación: ovulación refleja y ovulación cíclica. En el primer caso, la ovulación es inducida por la cópula y la presentan el conejo y el gato, entre otros animales (Staples, 1967). 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 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 progestacional (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 (Fox, 1970).

3.2. Ciclo Estral de la Rata.

El ciclo estral de la rata se puede dividir en cuatro etapas que se caracterizan hormonal (figura 1) y citológicamente (figura 2): proestro, estro, diestro temprano (metaestro) y diestro tardío. Las ratas presentan ciclos estrales de cuatro días de duración. Los niveles de concentración de estradiol (E_2) en sangre son basales (17 ± 2 pg/ml) a través del estro y metaestro, mientras que

en el diestro tardío se presenta un incremento (37 ± 5 pg/ml) que continúa hasta el proestro temprano para alcanzar su valor máximo (88 ± 2 pg/ml) en la mañana del proestro. Durante la tarde del proestro los niveles de E_2 disminuyen rápidamente hasta alcanzar valores basales en las primeras horas de la mañana del estro (Brown G. et al. 1970, Butcher 1974, Naftolin 1972).

La secreción de estrógenos se lleva a cabo por los folículos de De Graf, en desarrollo. El aumento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH a su vez desencadena la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) por la pituitaria, los niveles de LH en sangre son basales (5 ± 1 a 8 ± 2 ng/ml) en el estro temprano hasta mediodía del proestro. En la tarde del proestro, entre 2:00 y 3:00 P.M., los niveles de LH presentan un rápido incremento y el máximo valor en los niveles (1534 a 1795 ng/ml) se alcanza entre las 5:00 y 7:00 P.M. Este rápido incremento de LH induce ruptura folicular y ovulación lo cual se da en las primeras horas de la mañana siguiente, es decir, en el estro, en donde los niveles de LH alcanzan valores basales (Butcher 1974, Smith 1975).

El pico en la concentración de LH es seguido por un incremento en la secreción de progesterona (P_4), y unas horas después, se presenta un comportamiento sexual característico de lordosis (receptividad sexual). Se presentan dos picos en los niveles de secreción de la P_4 . Un incremento significativo de origen folicular tiene lugar durante la mañana y la tarde del proestro (46 ± 7 ng/ml). Este incremento ocurre casi simultáneamente con el pico

de secreción de LH cuyo valor máximo se alcanza en la tarde del proestro y retorna a niveles basales (2 ± 1 a 7 ± 2 ng/ml) en la mañana del estro.

Un segundo pico de la P_4 es de origen luteal y tiene lugar cerca del mediodía del metaestro (24 ± 3 ng/ml), se prolonga a través de la mañana del diestro y regresa a niveles basales en la tarde de ese mismo día (Eto 1962, Hashimoto 1968). El aumento en los niveles de estrógenos seguido por el que ocurre en los niveles de P_4 facilita la lordosis en el estro.

El patrón de secreción de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) a través del ciclo estral, es similar al descrito para LH (pico máximo 500 ± 3 ng/ml) en el proestro (Butcher 1974, Daane 1971, Gay 1970, Smith 1975). Sin embargo, durante las primeras horas de la mañana del estro se observa un segundo aumento de FSH que alcanza otro pico poco tiempo después. Los niveles de FSH alcanzan valores basales (100 ± 7 ng/ml) en la tarde del estro.

El patrón de secreción de prolactina durante el ciclo estral es similar al descrito anteriormente para LH (Butcher 1974, Gay 1970, Smith 1975). Niveles basales (14 ± 2 ng/ml) se mantienen desde la tarde del estro hasta la mañana del proestro y en la tarde del proestro se observa un pico de prolactina (257 ± 34 ng/ml) de duración similar al de LH.

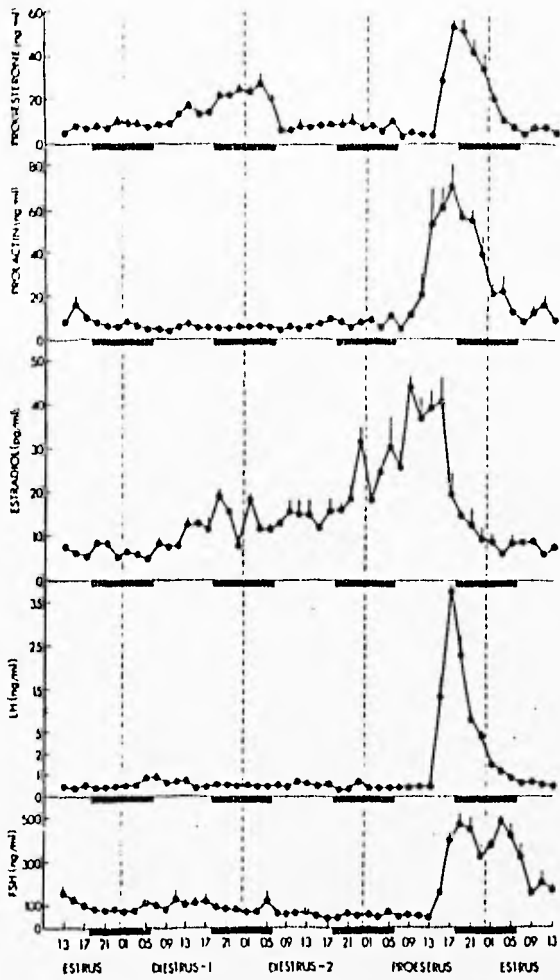
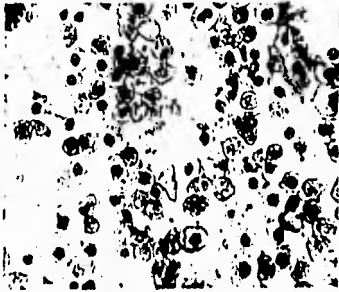
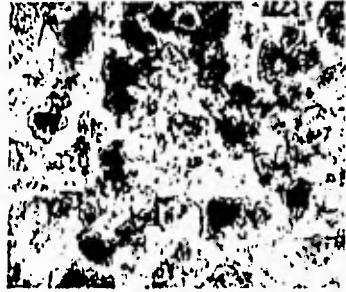


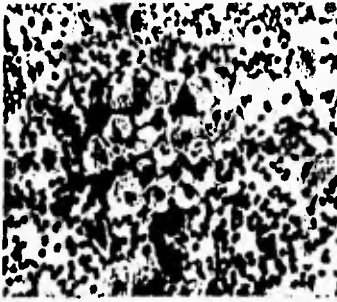
Fig. 1. Concentraciones de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma obtenido a intervalos de 2 h. a través de cada día del ciclo estral de la rata. Las barras negras indican la noche de cada día del ciclo.(Knobil 1988).



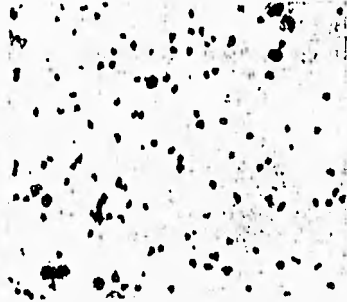
A. PROESTRO



B. ESTRO



C. METESTRO



D. DIESTRO

Fig. 2. Análisis citológico de frotis de la pared vaginal de la rata con los cuales se determinan las etapas del ciclo estral. Proestro: células epiteliales nucleadas; estro: células epiteliales cornificadas; metaestro: células cornificadas y leucocitos; diestro: únicamente leucocitos.

A lo largo del ciclo estral de la rata se observan las siguientes características citológicas en frotis vaginales: en el proestro se observan células epiteliales nucleadas, en el estro se presentan únicamente células epiteliales cornificadas, en el metaestro se observa la aparición de leucocitos y pocas células cornificadas, mientras que en el diestro tardío el frotis está compuesto únicamente por leucocitos (figura 2) (Mandl, 1951).

Es importante señalar que el ciclo estral representa un modelo fisiológico adecuado con el que se puede evaluar *in vivo* el papel de las hormonas esteroides en la regulación de la expresión de diferentes genes.

3.3. Generalidades de las hormonas esteroides.

Las hormonas esteroides son moléculas lipídicas cuya estructura básica consiste de un núcleo tetracíclico al cual se le denomina ciclopentanoperhidrofenantreno, debido a que presenta tres anillos de seis átomos de carbono (perhidrofenantreno) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclopentano) (Gorbman, 1962). El colesterol es la molécula precursora de todos los esteroides y está constituida por el núcleo tetracíclico, grupos metilo unidos a los carbonos 10 y 13 y una cadena lateral formada de ocho carbonos unida al carbono 17. La separación de los carbonos 20 y 22 de la cadena lateral da lugar a los pregnanos, esta serie incluye a las progestinas. La segmentación de los carbonos 17 y 20 de la cadena lateral origina la serie de androstanos o esteroides C19, en los cuales se ubican los andrógenos. Finalmente, la salida del grupo metilo unido al carbón 10 forma la serie de

estrano o esteroide de 18 carbonos y da origen a los estrógenos (figura 3)
(Gore-Langton and Armstrong, 1988).

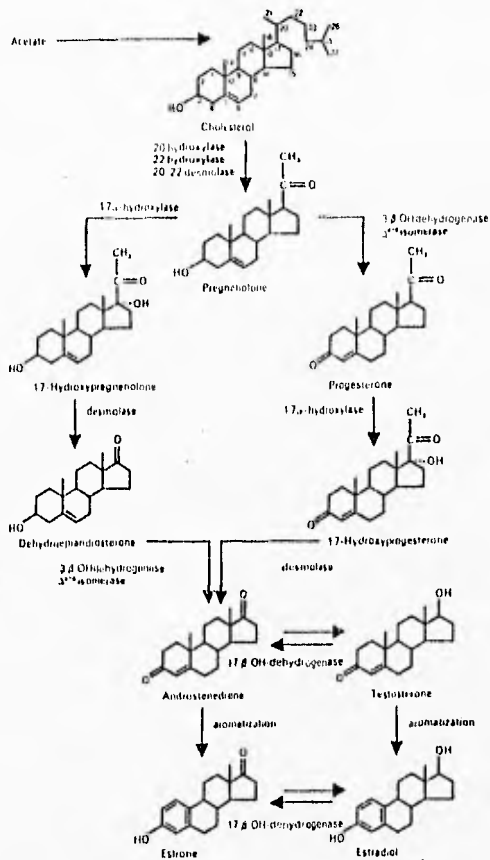


Fig. 3. Biosíntesis de hormonas sexuales a partir del colesterol, que es la molécula precursora de estas hormonas (Gore-Langton and Armstrong, 1988).

3.3.1. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides.

Las hormonas esteroides modulan un gran número de actividades biológicas al actuar sobre sus células blanco y modifican la expresión de diferentes genes (Yamamoto, 1985). Algunos de los principales efectos de los estrógenos sobre el útero, las glándulas mamarias y otros órganos sexuales secundarios de los mamíferos son el crecimiento y la proliferación celular. El mecanismo por el cual las hormonas ejercen estos efectos es el siguiente: las hormonas esteroides se introducen a la célula de un modo pasivo hasta alcanzar al núcleo en donde son reconocidas por receptores nucleares específicos y se unen a estos. La unión del esteroide con su receptor (complejo hormona-receptor) produce un cambio conformacional en el receptor y éste aumenta su afinidad por el DNA. Este complejo tiene la capacidad de unirse a secuencias reguladoras o elementos de respuesta a hormonas (HE) a través de los cuales modula (al activar o reprimir la transcripción) la expresión de los genes sensibles a hormonas, entre los que se encuentran los proto-oncogenes. Esta regulación se ve reflejada en diversos cambios fisiológicos posteriores (Fig. 4). (Truss and Beato, 1993; Landers and Spelsberg, 1992).

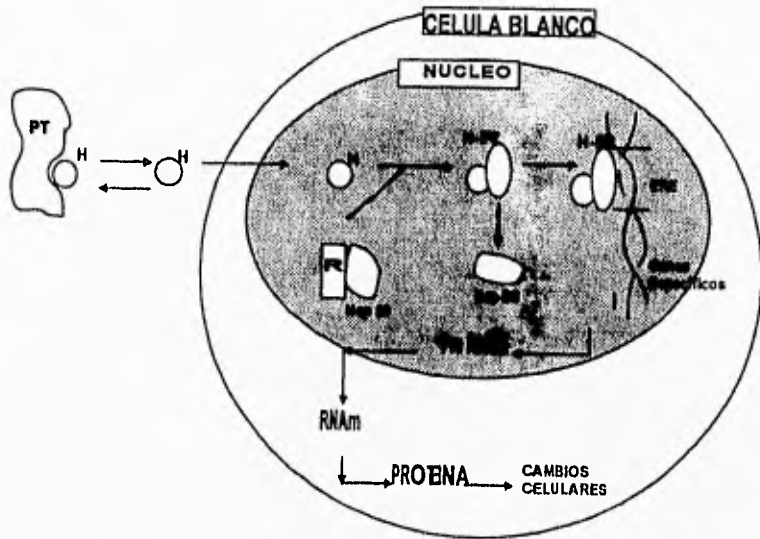


Fig. 4. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides. Los esteroides (H) son enpaquetados por proteínas transportadoras (PT) y llevados a las células a través del plasma sanguíneo, entran al núcleo y se unen a su receptor (R) el cual se separa de proteínas de choque térmico como la Hsp90. Esta unión produce un cambio conformacional en el receptor que aumenta su afinidad de unión al DNA y así el complejo receptor-ligando (H-R) interactúa con secuencias específicas (elementos de respuesta a estrógenos ERE), lo cual modifica la transcripción de varios genes (Landers and Spelberg 1992).

3.4. Generalidades de los Proto-oncogenes.

Los proto-oncogenes son genes celulares normales que al presentar mutaciones pueden transformarse en oncogenes activos. Los proto-oncogenes pueden clasificarse funcionalmente dentro de tres grandes categorías: a) factores de crecimiento y sus receptores, 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 nucleares 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 and Verma, 1990).

3.5. *c-fos*

3.5.1. 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 la 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.

3.5.2. Estructura de la proteína FOS

El producto de *c-fos* es una proteína que está constituida por 380 residuos. Esta proteína sufre extensas modificaciones postraduccionales debido a la fosfoesterificación de los residuos de serina en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Esta 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 and Struhl, 1987; Kouzarides and 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.

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).

3.5.3. Funciones de FOS

En los primeros estudios realizados sobre FOS (Curran et. al., 1985) 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 son reconocidos 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.

Estos estudios establecieron una conexión entre Fos, 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 como el producto proteínico del proto-oncogen c-jun (Sassone-Corsi et. al., 1988b). 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.

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 de la transcripción. 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.

3.5.4. Funciones 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 son importantes reguladores de las respuestas de neuronas *in vivo*. Una rápida y transitoria activación 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 drogas convulsivantes, como el pentilinetetrazol (Morgan et al. 1987; Dragunow and Robertson, 1988; Saffen et al, 1988; Watson and Milbrandt, 1989) o antagonistas de la vitamina B6 (Mizuno et al, 1989).

Esta respuesta ha sido detectada 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 and Robertson, 1987; White and Gall, 1987). Un caso más específico es el de la inmunorreactividad a la proteína 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 de *c-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 a la estimulación transináptica. 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 una significativa especificidad anatómica y temporal de la expresión de *c-fos* en el SNC (Morgan et al., 1987; Dragunow and Robertson, 1987, 1988; Sagar et al., 1988). Seguido de una actividad de ataque generalizada o estimulación "kindling", la mayor y más rápida inducción de *c-fos* ocurre en neuronas del giro dentado del hipocampo. En otras regiones del cerebro, como la corteza (piriforme y cingulada) y el sistema límbico, la máxima expresión de *c-fos* se da a los 60 min. después del estímulo (Metrazol) y recobra niveles basales a los 180 min.

La activación general de FOS durante la excitación eléctrica de neuronas detectada por técnicas inmunohistoquímicas de alta resolución puede ser de utilidad para mapear vías de excitación funcional en el SNC (Morgan et al., 1987).

Debido a la rápida y transitoria inducción de *c-fos* en el SNC por una gran variedad de estímulos como factores farmacológicos (Metrazol, cocaína,

cafeína, alcohol, morfina, etc.) y fisiológicos (estrés, estimulación eléctrica, privación de sueño, de comida, trauma, etc.), el incremento en la expresión de *c-fos* y del número de células que contienen FOS se han propuesto como marcadores de actividad neuronal y también puede usarse como herramienta para mapeo metabólico a nivel celular en el SNC. (Morgan and Curran, 1991; Sheng and Greenberg, 1990; Mistry et al., 1994; Yang et al., 1994; Kosofsky et al., 1995; Svenningsson et al., 1995).

3.6. Regulación de la expresión de *c-fos*.

El proto-oncogen *c-fos* se expresa en niveles bajos o indetectables en la mayoría de las células en crecimiento exponencial. Sin embargo, su expresión es inducida por una gran variedad de agentes, tales como mitógenos, factores de diferenciación, agentes farmacológicos específicos, estrés y choque térmico. La inducción es rápida y transitoria y ocurre a nivel de la transcripción. La expresión del gen de *c-fos* aparece pocos minutos después de la inducción, alcanza su nivel máximo entre 30-120 minutos y es prácticamente indetectable después de 3-8 horas, dependiendo tanto del estímulo como del tipo de célula estimulada. Es probable que esta inducción rápida implique modificaciones post-traduccionales de la proteína *c-fos*. La inducción de la expresión de *c-fos* se lleva a cabo aún en la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Esto sugiere que la activación de la transcripción de *c-fos* después del tratamiento mitogénico se lleva a cabo por factores previamente sintetizados (Ransome and Verma, 1990).

La inducción del gen de *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* (Fig. 5) revela la presencia de 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 ésteres de forbol, por las oncoproteínas SRC y RAS, por factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y por el factor de crecimiento neural (NGF) (Ransome and Verma, 1990). De igual manera, localizado entre las posiciones -1060 y -1300 se encuentra un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (Weisz and Rosales, 1990a).

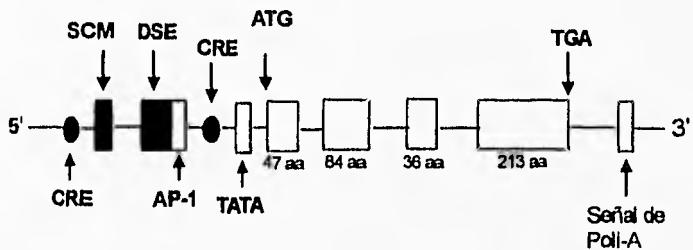


Fig. 5. Estructura del gen *c-fos* (ratón). Los exones están representados por cuadros blancos, los intrones y las regiones no traducidas 5' y 3' se representan por una línea. Debajo de cada exon se indica la longitud (en aminoácidos) del segmento de la proteína FOS que codifica. (Ransome and Verma, 1990).

3.6.1. Regulación de la expresión de *c-fos* por hormonas esteroides.

Los primeros trabajos que se realizaron para conocer el efecto modulador de los estrógenos sobre la expresión de los proto-oncogenes, demostraron que de 22 proto-oncogenes estudiados solo *c-fos*, *c-myc*, *N-myc* y *c-jun* respondieron claramente a estrógenos incrementando su transcripción. También se observó que en el útero de ratas ovariectomizadas, los estrógenos indujeron un incremento rápido (30 min) en el RNAm de *c-fos*, *c-jun* y *N-myc*, mientras que el de *c-myc* se incrementó 1.5 h después de la administración de estrógenos. Basándose en estas observaciones los autores sugirieron que los pasos iniciales en el mecanismo de la mitogénesis inducida por los estrógenos se debió a una activación directa de la expresión de *c-fos*, *c-jun* y *N-myc* (Murphy et al., 1987; Loose-Mitchel et al., 1988; Weisz and Bresciani, 1988; Weisz et al., 1990b).

3.6.2. Regulación de la expresión de *c-fos* en el SNC por hormonas esteroides.

Los estrógenos ejercen un papel modulador en el SNC de los mamíferos al participar en la formación de varios circuitos neuronales durante el desarrollo fetal y/o neonatal y en los adultos controlan diferentes funciones cerebrales (Maggi and Pérez, 1985). Estos efectos están mediados por receptores intracelulares específicos presentes en varias regiones cerebrales, entre ellas la corteza, el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, la amígdala y el mesencéfalo (Blaustein, 1992).

Estudios con métodos inmunohistoquímicos han mostrado que el número de células que presentan la proteína FOS aumenta después de la administración de E₂ en el área preóptica (POA) medial, núcleo medial de la amígdala y el núcleo ventral del hipotálamo de la rata; estas regiones son ricas en receptores a estradiol (RE). Dependiendo de la región el incremento se observa entre las 12 y 24 h después de la administración de E₂. En regiones que presentan baja densidad de RE, como el núcleo arcuato, no hay cambios en el número de células que contienen FOS, después de la administración de estrógenos (Insel, 1990).

En otros estudios inmunohistoquímicos, se observó que en neuronas GnRHérgicas (hipotálamo y área preóptica) (Hoffman et. al., 1990), así como en el mesencéfalo (Gibbs, 1990) no se presentan cambios en la señal de la proteína FOS después de la administración de E₂; pero al administrar E₂ con P₄, ésta aumenta en las neuronas GnRHérgicas de rata (Hoffman et. al., 1990; Wu et. al. 1992).

Se ha observado que los niveles de FOS aumentan entre 1 y 3 h después de la administración de E₂ en el área preóptica media, hipotálamo medio dorsal y amígdala media de rata (Auger and Blaustein, 1995). En ovejas ovariectomizadas los niveles FOS aumentan en neuronas GnRHérgicas en el POA, hipotálamo anterior y ventrolateral después de que se presentó el pico en la concentración de LH producido por la administración de estrógenos (24-30 h después) (Moenter, 1993).

En cuanto a la expresión del gen *c-fos*, se presentó un aumento en los niveles del RNAm en el hipocampo y el mesencéfalo de ratas ovariectomizadas, desde 0.5 h después de la administración de E₂, presentándose la máxima expresión a la hora en ambos casos, y retornando a niveles basales a las 3 h. También se notó en el mesencéfalo y en el útero, un segundo aumento a las 24 h que fué mayor al que se presentó a la hora, lo que indica que hubo una regulación bifásica por los estrógenos, sobre la expresión de *c-fos* (Cattaneo and Maggi, 1990).

También existen informes en los cuales se identificó un aumento en el RNAm y en la proteína FOS en ratas hembras que se pusieron a copular y que fueron tratadas con E₂ + P₄. Además, en ratas con estimulación cervico-vaginal y tratadas con E₂ + P₄, la proteína aumentó en el POA, el núcleo paraventricular del hipotálamo, el núcleo ventral del hipotálamo y la amígdala media (regiones ricas en RE), sin embargo, también aumentó en la neocorteza y el tálamo (regiones con baja densidad de RE) (Pfaus, 1993). Hasta el momento no existen datos reportados sobre la regulación de la expresión de *c-fos* por estrógenos en la corteza frontal de la rata.

3.7. Expresión de *c-fos* en el SNC durante el ciclo estral.

Un sistema neuroendócrino que comprende a la GnRH, provee de la vía final común en la regulación de la secreción de gonadotropinas. La liberación de GnRH cambia durante el ciclo estral y se ha observado un incremento al mismo tiempo en el que se presenta el pico de LH, pero no en otros días del ciclo, por lo que este incremento se ha asociado con un aumento en la estimulación de neuronas GnRHérgicas, lo cual sugiere que las neuronas GnRHérgicas pueden expresar similarmente FOS en el tiempo que se presenta el pico de LH, que es en el día del proestro (Lee et. al., 1990).

Por medio de estudios inmunohistoquímicos se ha observado que la proteína FOS sólo está presente en la tarde del proestro y no se observa en ningún otro día del ciclo estral en neuronas GnRHérgicas del hipotálamo y el área preóptica de la rata. El mayor nivel de FOS se observa entre las 15:00 y 16:00 h del proestro antecediendo al pico de LH. Del total de la población de neuronas GnRHérgicas, el 40% presentan FOS en el POA, el hipotálamo anterior y el órgano vasculoso de la lámina terminal.

Posteriormente se estudiaron por métodos inmunohistoquímicos los niveles de FOS en neuronas GnRHérgicas del hamster durante el proestro, en donde también se midieron los niveles plasmáticos de hormonas durante este día. Se observó la presencia de picos en la concentración de LH, FSH y E₂ a las 15:00 h del proestro y un pico de P₄ a las 18:00 h. FOS se expresó en niveles basales durante las primeras horas del proestro y alcanzó los máximos

niveles a las 18:00 h, es decir, después del pico de LH (Doan and Urbanski 1994).

Se ha informado que la proteína FOS presenta niveles altos en el POA rostral/medial y la banda de Broca (BB), durante el estro, mientras que se encuentra en niveles basales durante los otros días del ciclo estral del hamster evaluados a las 07:00 h de cada día. Mientras que en el POA caudal se presentan niveles altos que no presentan cambios durante el ciclo estral (Berriman, 1992).

En neuronas noradrenérgicas (núcleo medial del tracto solitario) de la rata, FOS se presenta de manera significativa durante el proestro y el estro sin grandes variaciones, mientras que en el diestro la expresión es baja (Jennes, 1992).

Lloyd (1994) ha informado que existe una diferencia entre los niveles de la proteína FOS en neuronas GnRHérgicas y la edad de las ratas. La expresión es mayor en ratas jóvenes mientras que en ratas viejas disminuye. También existe una diferencia en los niveles del pico de LH en plasma, en ratas jóvenes los niveles son mayores que en ratas viejas, aunque el pico se da al mismo tiempo (14:00 h del proestro).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha observado que el estradiol induce la expresión del proto-oncogen *c-fos* en algunas regiones del SNC de la rata, entre ellas el hipotálamo y el hipocampo en períodos de tiempo cortos (minutos y horas), los estudios realizados para observar esta inducción, en su mayoría, han sido por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

Por otro lado, hasta el momento no se tiene informe alguno sobre la regulación de la expresión de *c-fos* por estradiol en la corteza cerebral de la rata, por lo que en este estudio se evaluó el papel del estradiol en la regulación de la expresión del proto-oncogen *c-fos* a través de la cuantificación de su RNAm en el hipotálamo, el hipocampo y la corteza cerebral.

Se ha observado que el número de células que contienen FOS en el núcleo arcuato y el POA se incrementa en la tarde del proestro y no se presenta en otros días del ciclo; no hay informes sobre la expresión de *c-fos* a nivel de su mensajero, en ninguna región del SNC durante el ciclo estral. Por lo que en este trabajo se estudiarán los cambios en la expresión de *c-fos* en regiones que participan en la reproducción, así como en el despliegue de la conducta sexual, tales como el hipotálamo, el POA y la corteza cerebral, para posteriormente relacionar la expresión del gen *c-fos* a nivel de su RNAm con la proteína en estas áreas, en los diferentes días del ciclo estral y durante todo el día del proestro, ya que en este día es cuando se presentan los cambios más importantes en los niveles plasmáticos de las hormonas esteroideas y, como ya se mencionó *c-fos* es un gen regulado por estas hormonas.

5. OBJETIVOS.

Evaluar el efecto del E₂ sobre la expresión de *c-fos* en el SNC de la rata, mediante el uso de la técnica de RT-PCR.

Determinar la expresión del proto-oncogen *c-fos*, valorando los niveles de su mensajero, en áreas específicas del SNC de la rata durante el ciclo estral y a lo largo del día del proestro y relacionarla con los niveles de su proteína.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Animales de experimentación.

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas hembras de la cepa Long-Evans de 200-250 g que se mantuvieron en un ciclo luz:oscuridad 12:12, con agua y comida *ad libitum*.

Para estudiar la expresión de *c-fos* se ovariectomizaron ratas que diez días después de la cirugía fueron tratadas: a) con 17- β estradiol por vía intraperitoneal en una dosis de 5 $\mu\text{g}/100$ g de peso corporal ó b) con vehículo que representó al lote control (90 % solución salina, 10 % etanol). Las ratas se sacrificaron después de la administración de los compuestos, a los tiempos de 0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 24 h y se disecaron la corteza frontal, el hipotálamo y el hipocampo.

Para estudiar la expresión de *c-fos* durante el ciclo estral, las ratas se dividieron en dos grupos: en el primero se determinó la etapa del ciclo estral en la que se encontraban, por medio del análisis citológico de frotis vaginales y se sacrificaron las ratas en proestro, estro, metaestro y diestro a las 11:00 h de cada día. En el otro grupo, se ciclaron ratas las cuales se fueron sacrificando a las 09:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 19:00 h del día del proestro. En ambos grupos se disecaron la corteza frontal, el hipotálamo y el área preóptica.

6.2. Extracción de RNA total.

El RNA total se extrajo de los tejidos provenientes de los diferentes grupos de ratas en estudio, de la siguiente manera:

1. En tubos nuevos y estériles, se homogenizaron 100 mg de tejido por 1 ml 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 vortex por 30 seg.
3. 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 incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantienen 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 una pastilla blanca amarillenta.

6. Se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 75%. Se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4°C.

7. Se removió el sobrenadante y se volvió a lavar el precipitado con etanol al 80%. Se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4°C.

8. Se removió el sobrenadante con pipetas microvolumétricas, se pusieron los tubos boca abajo sobre una gasa estéril y después se metieron a un horno con vacío a temperatura ambiente sin que se secase por completo la pastilla para evitar la insolubilidad de la misma.

9. Se disolvió la pastilla de RNA en 50 μ l de H₂O-DEPC.

10. Se hicieron diluciones 1:100 y se leyó la absorbencia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 310 nm. Se determinó la concentración de RNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de absorbencia a 260 nm = 40 μ g/ml de RNA. También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbencias obtenida 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.

6.3 Electroforesis del RNA total.

1. Se preparó un gel desnaturalizante de agarosa 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 la cámara .

2. Para el corrimiento electroforético se prepararon las muestras de la siguiente manera :

	Concentración final.
RNA	3 µg
Formamida	50 %
Formaldehído	6,5 %
MOPS	1 X
Amortiguador de carga	1 X
Bromuro de Etidio	2.5 µg

6.3 Electroforesis del RNA total.

1. Se preparó un gel desnaturante de agarosa 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 la cámara .

2. Para el corrimiento electroforético se prepararon las muestras de la siguiente manera :

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

El RNA 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.

3. Se cargaron las muestras en el gel y se corrieron a 90 voltios por 90 minutos. Se observaron las muestras en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.4. Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RT-PCR

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido muy utilizada para estudiar la expresión de genes amplificándolos a partir de sus secuencias de RNA. Esta técnica requiere de la conversión del RNA mensajero a DNA complementario (cDNA) por medio de una Transcripción Reversa (RT) y amplificación del DNA complementario por PCR (RT-PCR) (Rappolee et. al. 1988, Kawasaki 1989). El RT-PCR es ahora una metodología especializada para detectar genes cuya expresión es muy baja. Este método es particularmente útil para analizar RNAs mensajeros de baja abundancia o cuando la cantidad de muestra disponible es limitada (Piattak et. al. 1993, Rashtchian 1994).

La técnica de PCR es un método enzimático para amplificar fragmentos específicos de DNA *in vitro*. La PCR se basa en el uso de dos oligonucleótidos como iniciadores para la síntesis catalizada por la DNA polimerasa, desde cadenas opuestas, a través de una región determinada por los sitios de estos dos oligonucleótidos. Por repetición de ciclos de desnaturalización de las cadenas del DNA, unión de los oligonucleótidos iniciadores y síntesis del DNA, se puede alcanzar un incremento exponencial de un fragmento discreto de DNA (Saiki 1985, Mullis 1987).

6.4.1. Síntesis de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se sintetizaron en el Laboratorio de Hormonas y Reproducción del Hospital de Bicêtre, Francia. 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 son 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).

Los oligonucleótidos para el gen de ciclofilina se diseñaron de acuerdo a la secuencia del cDNA para el gen de ciclofilina humana (Haendler and Hofer, 1987). Cada uno consiste de 22 y 24 pares de bases no complementarias entre ellos, que delimitan un fragmento de 568 pares de bases (-54 a -622).

6.4.2. Retrotranscripción (RT)

Se realizó la retrotranscripción del RNA total. Para ésto se preparó la siguiente mezcla para la reacción:

	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 d-T	0.05 μg

El RNA se calentó a 75°C por 5 minutos y se puso en hielo por otros 5 minutos. Se le agregó la mezcla y se incubó a 38°C por una hora. El control negativo consistió de una muestra de agua en sustitución del RNA.

6.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El proto-oncogen *c-fos* y el gen de ciclofilina se amplificaron por medio de la técnica de PCR. Para ésto se preparó la siguiente mezcla para una reacción:

	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 I	0.5 mM
Oligo II	0.5 mM
TAQ DNA polimerasa	2.5 unidades
Agua	cbp 40 µl

A 10 µl de reacción de RT se le agregó la mezcla de PCR. La reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer Cetus Modelo 9600 con un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 1 minuto a 95° C, 1 minuto de hibridación de los oligos iniciadores a 50°C, 1 minuto de extensión a 72° C y un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72° C.

6.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El proto-oncogen *c-fos* y el gen de ciclofilina se amplificaron por medio de la técnica de PCR. Para ésto se preparó la siguiente mezcla para una reacción:

	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 I	0.5 mM
Oligo II	0.5 mM
TAQ DNA polimerasa	2.5 unidades
Agua	cbp 40 µl

A 10 µl de reacción de RT se le agregó la mezcla de PCR. La reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer Cetus Modelo 9600 con un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de 1 minuto a 95° C, 1 minuto de hibridación de los oligos iniciadores a 50°C, 1 minuto de extensión a 72° C y un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72° C.

6.5. Electroforesis de los productos de RT-PCR

Una vez que se realizó el RT-PCR, se corrió una electroforesis de los productos obtenidos. Se corrieron 15 μ l de producto de RT-PCR 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). El gel se corrió a 90 voltios por 1.5 h en un amortiguador TBE 0.5 X. Posteriormente el gel 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.

6.6. Transferencia a membranas de Nylon.

1. Se enjuagó el gel con agua estéril varias veces, 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 minutos en SSC 10 X (apéndice).

2. 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.

3. 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.

4. 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, sobre la membrana se pusieron dos pedazos de papel Whatman y se eliminó el aire con una varilla de vidrio.

5. 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 una pesa de 500 g.

6. Los productos de RT-PCR se transfirieron 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 .

7. 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.

8. Se colocó la membrana en dos pedazos de papel Whatman y se utilizó un entrecruzador (Cross-Linker UV Stratagene) para fijar los productos de RT-PCR a la membrana.

6.7. 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 esperma de salmón	100 µg/ml
SCS 20X	2X

Se prepararon 0.2 ml por cm² de membrana.

El DNA de esperma 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 una bolsa de hibridación. Se añadió la solución de prehibridación dentro de la bolsa y se eliminó todo el aire. Se selló la bolsa y se colocó en un baño de agua con agitación a 42°C y se mantuvo en prehibridación por 24 h.

3. Se marcaron radiactivamente, con [α - 32 P] dCTP por el método de iniciadores aleatorios, el cDNA de *c-fos* y productos de PCR del gen de la ciclofilina. Para esto se preparó la siguiente mezcla:

cDNA de <i>c-fos</i> o ciclofilina	100 ng
Buffer de iniciadores aleatorios	15 μ l
dATP	0.1 mM
dGTP	0.1 mM
dTTP	0.1 mM
[α - 32 P] dCTP	5 μ l (0.05 mCi)
Fragmento Klenow de la DNA polimerasa	3 Unidades
Agua	cbp 50 μ l

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 - ^{32}P] 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 ^{32}P 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 1,500 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 μl de amortiguador de inactivación del fragmento Klenow y 100 μl de TE pH 8 y se mezcló.

11. Se colocaron los 155 μl de mezcla dentro de la columna de Sephadex y se centrifugaron a 1,500 rpm por 3 minutos a 4°C. Con el contador Geiger se midió la cantidad de radioactividad 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. Para ésto se colocó un vaso de precipitado con agua sobre una parrilla eléctrica la cual se puso detrás de la pantalla de acrílico.

13. Se colocó la sonda en hielo 5 minutos. Se sacó la membrana de nylon del baño de agua y se le hizo un pequeño corte a la bolsa por el cual se sacó la mitad del amortiguador de hibridación. Se sacó el aire que se pudo haber formado dentro de la bolsa.

14. Con una pipeta microvolumétrica se metió dentro de la bolsa la sonda marcada. Se selló la bolsa y se colocó dentro de una caja de acrílico con tapa. Se metió la caja de acrílico en un baño de agua y se dejó hibridando a 40°C por 24 h.

15. Transcurrido el tiempo, la hibridación se sacó del baño de agua. En la campana y detrás de la pantalla de acrílico se abrió la bolsa por una esquina. Se vació el amortiguador de prehibridación con la sonda dentro de un tubo Falcon. 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. Se pusieron en la bolsa 10 ml de solución SSC 2X y se lavó la membrana. Se desechó esta solución en el recipiente para desechos radiactivos. Se abrió la bolsa y 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.

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

6.8. Análisis densitométrico.

Las membranas se expusieron a películas sensibles X-OMAT (Kodak) durante 2 h y se revelaron en una máquina de revelado automático. Las bandas obtenidas en las películas se cuantificaron por densitometría en un espectrofotómetro DU 600 (Beckman) a 420 nm.

En la figura 6 se resume el método que se describió anteriormente.

METODO

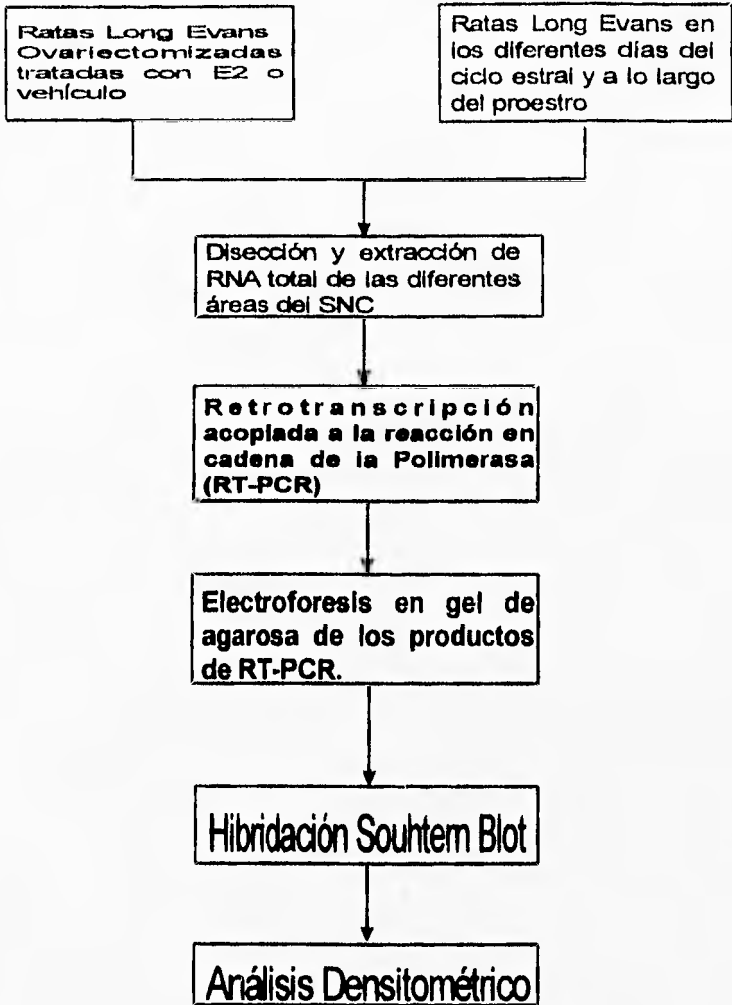


Fig.6. Método.

7. RESULTADOS

7.1. Extracción y caracterización de RNA total.

Se realizó la extracción del RNA total de los tejidos del SNC de las ratas de los diferentes grupos experimentales y se cuantificó su concentración. La pureza de los RNAs obtenidos se determinó por medio de la relación de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. De los animales tratados con E₂ se procesaron la corteza frontal, el hipotálamo y el hipocampo y para el estudio durante el ciclo estral y proestro se trabajó con la corteza frontal, el hipotálamo y el área preóptica.

En la figura 7 se muestra la electroforesis en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes de los RNAs totales (3 µg) extraídos de las diferentes regiones del SNC de la rata. Se observan dos bandas que corresponden a las subunidades 28s y 18s de los RNAs ribosomales y no se observa material producto de degradación, lo cual indica que el RNA obtenido se encontraba íntegro.



Fig. 7. Electroforesis de RNA total (3 μ g) en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes extraído de la corteza frontal de la rata después de la administración de estradiol (carriles 1-8) o vehículo (carriles 9-15). 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. Expresión de c-fos en áreas del SNC después de la administración de E₂.

Para determinar la expresión del proto-oncogen c-fos en las diferentes áreas del SNC de la rata (hipotálamo, hipocampo y corteza frontal) se obtuvo el RNA total de estos tejidos a diferentes horas, después del tratamiento con E₂ 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 ciclofilina marcados radiactivamente. En la figura 8 se muestra una autoradiografía representativa de la hibridación de los productos de RT-PCR de c-fos en ratas tratadas con E₂ y su control (Veh), así como del gen de ciclofilina (CF), que se utilizó en ambos casos como un control de expresión constitutiva. En el hipocampo de la rata donde se observó que hay un aumento significativo desde los 30 minutos después de la administración de E₂, se alcanzó la máxima expresión a la hora, posteriormente a las 2 h disminuyó la expresión y se mantuvo constante en las siguientes horas después del tratamiento (3, 6, 9, 12 y 24 h).

Como el gen de ciclofilina es un control de expresión constitutiva y se observaron variaciones en su expresión en los diferentes tiempos, tanto de las ratas tratadas con E₂ y vehículo, los resultados de la expresión de c-fos de cada muestra se presentaron como la proporción relativa entre el resultado obtenido del análisis densitométrico de c-fos y ciclofilina (c-fos/ciclofilina).

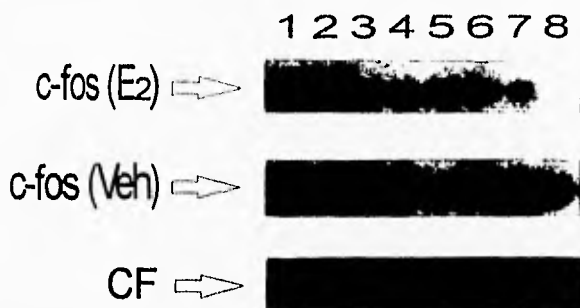


Fig. 8. Patrón de expresión de *c-fos* en el hipocampo de la rata después de la administración de E_2 . "Southern blot" representativo de la expresión de *c-fos* en el hipocampo de la rata después de la administración de (E_2) o vehículo (Veh) a 0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12 y 24 h. (carriles 1-8 respectivamente). También se observa la expresión del gen de ciclofilina (CF) que se utiliza como control de expresión constitutiva.

Las autoradiografías se analizaron densitométricamente con el uso de un densitómetro. Se obtuvieron los valores de absorbancia para c-fos y ciclofilina de las ratas tratadas con E₂ y vehículo y se hizo la relación c-fos/ciclofilina. Posteriormente con estos valores se hizo una relación entre el valor obtenido para el tratamiento con E₂ y el obtenido con el vehículo (E₂/vehículo) para cada muestra.

En la figura 9 se muestra la expresión del proto-oncogen c-fos en el hipocampo de la rata a diferentes horas después del tratamiento con E₂, donde el valor del vehículo es 1. Se observó que la expresión de c-fos a los 30 min. después de la administración de E₂ estuvo por debajo de la que presentó el control, mientras que a la hora tuvo un aumento significativo, representando este punto su máximo valor. A las 2 h la expresión disminuyó, pero fué aún mayor que el valor para el vehículo; a las 3 hr la expresión de c-fos continuó disminuyendo encontrándose por debajo del valor del control. Estos valores se mantuvieron hasta las 24 hr.

En la figura 10 se muestra la expresión de c-fos en el hipotálamo de la rata. Los datos son los obtenidos de la relación c-fos/ciclofilina y con el vehículo. Se observó un ligero incremento en la expresión de c-fos respecto al valor del vehículo a los 30 min. después del tratamiento con E₂, mientras que a la hora se presentó un claro aumento, alcanzándose en este tiempo su máximo valor; posteriormente, la expresión disminuyó a las 2 h, aunque fue mayor respecto al del vehículo. A las 3 h la expresión de c-fos se encontró

por debajo del valor para el control y se mantuvo en estos niveles en las siguientes horas (6, 9, 12 y 24 h).

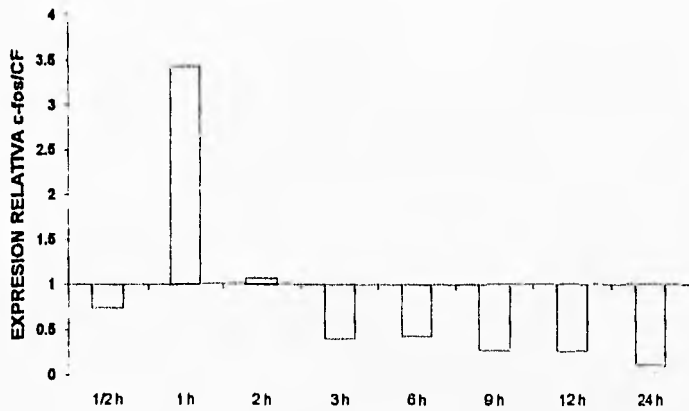


Fig. 9. Expresión de c-fos en el hipocampo de la rata después de la administración de E₂. La expresión de c-fos se indujo 1 h después de la administración de E₂ y posteriormente disminuyó en las horas siguientes. Los efectos de E₂ en la expresión de c-fos se determinaron con relación a los del vehículo y se corrigieron respecto a los datos obtenidos con ciclofilina que se utilizó como control de expresión constitutiva.

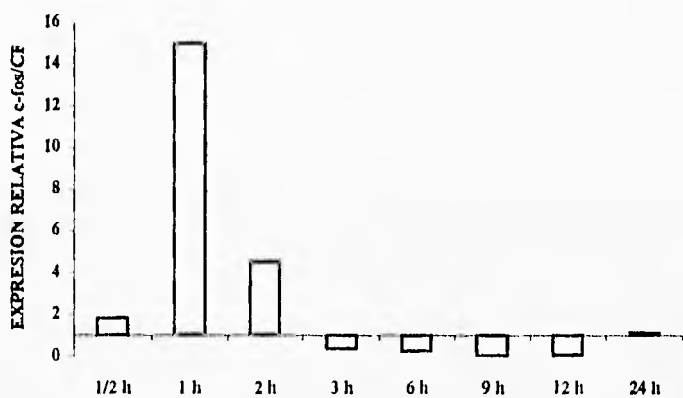


Fig. 10. Expresión de c-fos en el hipotálamo de la rata después de la administración de E₂. La expresión de c-fos se indujo por E₂ 1 h después de su administración en esta área del SNC y disminuyó en las horas siguientes.

Como se pudo observar, tanto en el hipocampo como en el hipotálamo, el patrón de expresión de c-fos fué similar (fig. 9 y 10), en ambos casos la máxima expresión de c-fos ocurrió 1 h después de la administración de E₂, posteriormente disminuyó y a las 3 h los niveles de expresión estuvieron por debajo del valor del vehículo; sin embargo, a las 24 h, la expresión de c-fos disminuyó en el hipocampo mientras que en el hipotálamo se observó un ligero incremento.

Como se muestra en la figura 11, la expresión de c-fos en la corteza frontal, por el contrario, disminuyó significativamente desde los 30 min. después de la administración de E₂, en comparación con la expresión de c-fos en las ratas tratadas con vehículo. Una hora después del tratamiento c-fos alcanzó el nivel más bajo de expresión en la corteza, a las 2 h presentó un pequeño aumento, pero éste siguió siendo menor al encontrado después del tratamiento con el vehículo; a las 3 hr tendió a disminuir nuevamente y se mantuvo en niveles bajos en las horas siguientes (6, 9, 12 y 24 h)

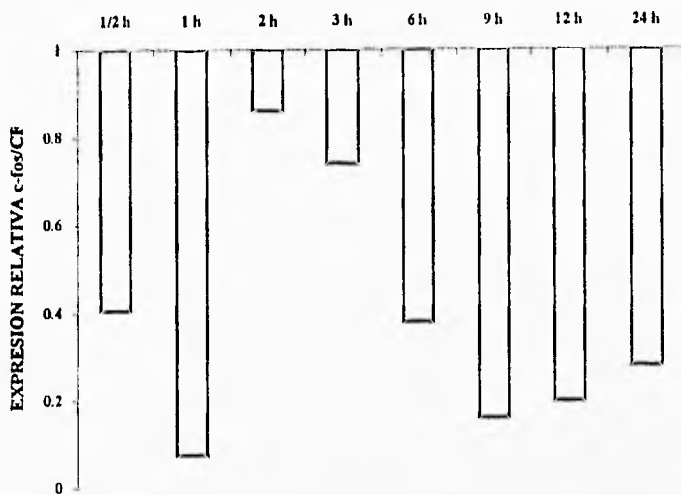


Fig. 11. Expresión de c-fos en la corteza frontal de la rata después de la administración de E₂. La expresión de c-fos disminuyó después de la administración de E₂ y se mantuvo en estos niveles en las horas siguientes. Los datos se presentan como se indicó en la gráfica anterior.

Como se observó, el patrón de expresión de c-fos en la corteza frontal fue diferente al que presentaron el hipocampo y el hipotálamo de la rata, ya que mientras en estas áreas aumentó la expresión de manera significativa después de la administración de E₂, presentándose la máxima expresión a la hora, en la corteza, la expresión de c-fos después del tratamiento con E₂ se encontró por debajo de la expresión para el vehículo, en todos los tiempos, presentándose los niveles más bajos 1 h después del tratamiento.

7.3. Expresión de c-fos en áreas del SNC durante el ciclo estral.

Para determinar los niveles de expresión del proto-oncogen c-fos durante el ciclo estral en el SNC de la rata, se utilizaron ratas de la cepa Long Evans que presentaron ciclos regulares de 4 días de duración, se determinó la etapa del ciclo en la cual se encontraban por medio del análisis citológicos de frotis vaginales y se sacrificaron a las 11:00 h del día de cada etapa del ciclo (proestro, estro, metaestro y diestro). Por otro lado, se ciclaron ratas en la etapa del proestro y se sacrificaron a diferentes horas del día de esta etapa (9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 19:00 hrs.); se disectaron la corteza frontal, el hipotálamo y el área preóptica y se extrajo el RNA total de estas áreas, posteriormente a este RNA se le aplicó la técnica de RT-PCR para amplificar el proto-oncogen c-fos y el gen de ciclofilina, con los productos obtenidos se realizó una hibridación "Southern blot" con el cDNA de c-fos y ciclofilina (respectivamente) marcados radiactivamente.

En la figura 12 se muestra la expresión del proto-oncogen c-fos en áreas específicas del SNC de la rata durante las diferentes etapas del ciclo estral. Se observó que la expresión de c-fos tuvo un aumento a las 11:00 h del estro que es donde presentó su máxima expresión en la corteza frontal, el hipotálamo y en el área preóptica, en comparación a la que se observó en el proestro. Posteriormente, en el metaestro disminuyó esta expresión y en la etapa de diestro los niveles se mantuvieron bajos en la corteza frontal y el área preóptica, mientras que en el hipotálamo presentó un ligero incremento durante el diestro.

En la figura 13 se muestra una autoradiografía representativa de la expresión de c-fos y ciclofilina en el área preóptica de la rata. Se observó un aumento significativo durante el proestro a las 13:00 hrs y disminuyó en las siguientes horas de este día.

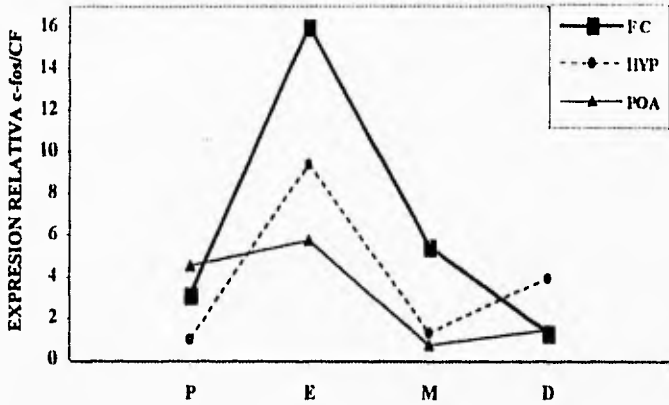


Fig. 12. Expresión del gen de c-fos durante el ciclo estral. Se presentan los niveles de expresión de c-fos en las áreas estudiadas: corteza frontal (FC), hipotálamo (HYP) y área preóptica (POA) de la rata a las 11:00 h de los diferentes días del ciclo estral: proestro (P), estro (E), metaestro (M) y diestro (D). Los datos se corrigieron con el valor para cicloflina que se utiliza como un control de expresión constitutiva.

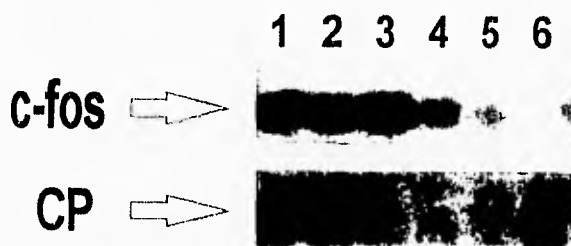


Fig. 13. Expresión del proto-oncogen *c-fos* durante el proestro en el área preóptica. Se presenta un "Southern blot" representativo donde se observa el patrón de expresión de *c-fos* en el área preóptica durante el proestro (9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 19:00 h; carriles 1-6 respectivamente). El gen de ciclofilina (CP) se utiliza como control de expresión constitutiva.

En la figura 14 se muestra la expresión de c-fos durante el proestro en las diferentes áreas del SNC. Se observó que el patrón de expresión para la corteza frontal, el hipotálamo y el área preóptica fue similar. A las 9:00 h los niveles de expresión de c-fos son bajos y disminuyen a las 11:00 h en el hipotálamo y en área preóptica; mientras que en la corteza se mantuvieron. A las 13:00 h se observó un aumento súbito en las tres áreas. Posteriormente, a las 15:00 h se observó una disminución en las áreas estudiadas. A las 17:00 h se presentó un aumento en la expresión de c-fos en el hipotálamo que continuó hasta las 19:00 h, en el área preóptica se mantuvieron los niveles de expresión, mientras que en la corteza disminuyeron a las 17:00 h y empezaron a aumentar nuevamente a las 19:00 h

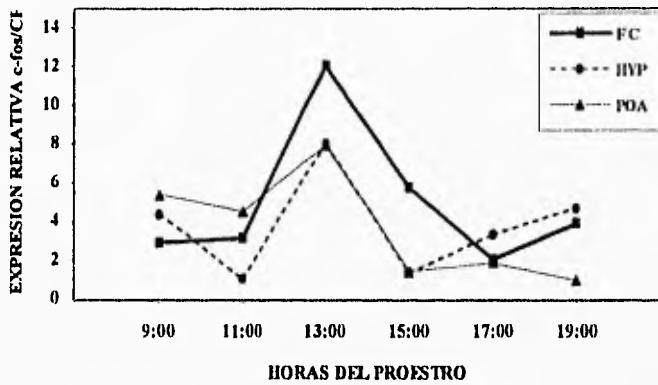


Fig. 14. Expresión de c-fos durante el proestro. Se presentan la expresión de c-fos en las diferentes áreas estudiadas del SNC: corteza frontal (FC), hipotálamo (HYP) y área preóptica (POA) a lo largo del día de proestro (9:00-19:00 h). La expresión de c-fos se corrigió respecto a la de ciclofilina como se indicó anteriormente.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se mostró que existe una regulación diferencial de la expresión de *c-fos* por E₂ en el hipotálamo y el hipocampo, en comparación con la que se presentó en la corteza frontal de la rata y que hubo también cambios en la expresión de este gen durante el ciclo estral. Estudios previos han mostrado que el 17β-estradiol activa la transcripción del proto-oncogen *c-fos*, de manera rápida y transitoria, en varias regiones del cerebro anterior, incluyendo el hipotálamo y el hipocampo (Cataneo and Maggi 1990, Lee et. al. 1990, Insel 1990). Se han ampliado estos estudios usando la técnica de retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y análisis por "Southern blot", para valorar la expresión del proto-oncogen *c-fos* a través del RNAm no sólo después de la administración de E₂ sino también durante el ciclo estral.

Se utilizó la técnica de RT-PCR ya que es una técnica muy sensible y una metodología especializada para detectar expresión de genes, particularmente para analizar RNAs mensajeros de baja abundancia o cuando la cantidad de muestra disponible es limitada (Piattalk et. al. 1993, Rashchian 1994). En este tipo de análisis es necesario utilizar un control de expresión constitutiva para poder determinar que los resultados obtenidos sean confiables, en este caso se utilizó el gen de ciclofilina ya que su expresión no se ve alterada por hormonas esteroides (Haendler and Hofer, 1987).

Al realizar la electroforesis de los productos de RT-PCR de ambos genes se observan grandes diferencias en la intensidad de las bandas de *c-fos*, y aunque estas diferencias indican cambios en la expresión de *c-fos*, es necesario realizar la hibridación con la sonda marcada radiactivamente de *c-fos* y ciclofilina ya que es muy poca la amplificación que se tiene de este último gen y no se observan bandas en el gel, sino hasta la hibridación se tiene una señal en la autoradiografía y se puede hacer la corrección de los resultados con el control de expresión constitutiva.

Las condiciones en las que se realizó esta técnica son las adecuadas para amplificar tanto el proto-oncogen *c-fos* como el gen de ciclofilina, ya que se obtuvieron los fragmentos de los tamaños esperados (un fragmento por gen) y, por otro lado, al analizar la electroforesis de los controles negativos de RT y PCR (muestras sin RNA o cDNA) no se observó ningún barrido, ni bandas de algún producto de amplificación, lo que indica que no hay contaminación con algún RNA o DNA que no fuera el de las muestras que se estudiaron y que éstas fueron manejadas correctamente.

La técnica de RT-PCR es una herramienta poderosa en biología molecular para estudiar la expresión de genes, como se observó en este trabajo. Sin embargo para poder determinar de manera más específica como se modifica la expresión de un gen en los distintos núcleos del SNC se requiere de métodos más finos como hibridación *in situ*.

Se observó que el E₂ induce la expresión del gen de *c-fos* con el mismo patrón en el hipotálamo y el hipocampo y que la máxima inducción en ambos tejidos se presentó 1 h después de la administración de la hormona. Estos resultados se pueden correlacionar con el incremento en el número de células inmunorreactivas a la proteína FOS que se observa en varios núcleos hipotalámicos de 2-3 h después de la administración de E₂ (Insel 1990, Moenter et. al. 1993, Auger and Blaustein 1995). De manera interesante, en algunas regiones del cerebro anterior esta activación se ha observado en neuronas con o sin receptor a estrógenos (Shivers 1983, Sullivan 1995). En células que no contienen receptores a estrógenos, como las neuronas GnRHérgicas, la activación de FOS puede estar mediada por mecanismos multisinápticos en los cuales neuronas que contienen receptor a estrógenos son activadas primero. Jennes (1992) propone que las neuronas de la región A2 localizadas en el tallo cerebral, a través de la secreción de norepinefrina desde la eminencia media, estimulan la secreción de GnRH durante el proestro, por lo tanto es en parte responsable de mediar la señal del E₂ a las neuronas GnRHérgicas.

Por otro lado, en otro informe (Van Der Beek, 1994), se ha descrito que el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), que es sintetizado en neuronas de la parte ventrolateral del núcleo supraquiasmático, está implicado en la liberación de GnRH. Existen contactos de fibras que contienen VIP con neuronas GnRHérgicas y éstos son más abundantes en el área preóptica. La población de neuronas GnRHérgicas innervadas por fibras que contienen VIP

es relativamente constante, esto sugiere que el Sistema Nervioso Central puede modular directamente la actividad de neuronas GnRHérgicas a través de VIP. Sin embargo, los mecanismos moleculares que participan en estos procesos no se han aclarado.

De manera contraria a la inducción de *c-fos* observada en el hipotálamo y el hipocampo después de la administración de E₂, en la corteza frontal se observó que esta hormona reduce la expresión de *c-fos*. Esta reducción se observa 0.5 h después de la administración y se mantiene durante 24 h. Esta diferencia en la expresión de *c-fos* puede deberse a factores de transcripción tejido-específicos que median la acción de E₂ en el SNC. El significado fisiológico de esta reducción se desconoce.

Por otro lado, para poder correlacionar la expresión temporal del proto-oncogen *c-fos* con cambios fisiológicos en la concentración de E₂ y en la actividad de varios grupos neuronales, se evaluó la expresión de *c-fos* durante el ciclo estral, ya que, como se mencionó anteriormente, el ciclo estral representa un modelo adecuado en el que en condiciones fisiológicas se puede evaluar el papel de las hormonas esteroideas en la regulación de la expresión de diferentes genes, entre éstos *c-fos*. Se realizó el estudio de la expresión de *c-fos* en las mismas áreas que se estudiaron anteriormente (hipotálamo, hipocampo y corteza frontal) y también se estudió el área preóptica ya que presenta una gran población de neuronas GnRHérgicas. A pesar de que el estudio se realizó en dos ocasiones los resultados obtenidos para el hipocampo fueron confusos y por lo tanto no confiables por lo que se decidió omitirlos.

La máxima expresión de *c-fos* durante el ciclo estral se presenta en el día del estro, en las tres regiones estudiadas (hipotálamo, área preóptica y corteza frontal) (Fig. 12), o sea, 24 h después del pico de estradiol que se presenta en proestro. Estos resultados sugieren que otras hormonas esteroides como la progesterona o neurotransmisores como la noradrenalina o neuropéptidos como el VIP pueden estar participando en la regulación de la expresión de *c-fos*, o por otro lado, que el E₂ induce la expresión de *c-fos* en periodos a largo plazo. A pesar de que no se encontró una inducción de *c-fos* a largo plazo, se ha informado que en el hipotálamo se presenta una segunda inducción de *c-fos* por E₂ 24 h después de su administración (Cattaneo and Maggi 1990). Por inmunohistoquímica se ha demostrado que la activación de la expresión de *c-fos* por E₂ en varios núcleos del hipotálamo aumenta significativamente cuando se administra progesterona (Hoffman et. al. 1990, Wu 1992). Es posible que el aumento en los niveles de progesterona en plasma que se presenta en la tarde del proestro y permanecen hasta la noche del estro (Knobil 1988) puedan inducir la transcripción de *c-fos* en el SNC por lo que se presentan altos niveles de RNAm de *c-fos* en las regiones estudiadas en la mañana del estro (11:00 h).

De manera interesante, en todas las regiones estudiadas se presentó un incremento muy marcado en la expresión de *c-fos* a las 13:00 del proestro (Fig. 12). Este aumento transitorio en la expresión de *c-fos* es previo al incremento en el número de células inmunorreactivas que contienen la proteína (FOS) en la

tarde del proestro (15:00-16:00 h) que coincide con el aumento en la expresión del gen de GnRH en el hipotálamo y área preóptica y que precede al pico de hormona liberadora de gonadotropinas en varias regiones del cerebro anterior (Lee 1990, Gore 1995). Estos datos sugieren que la corteza cerebral también es activada antes del pico de GnRH y participa en la regulación de la ovulación o de la conducta sexual. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la expresión del proto-oncogen *c-fos* es regulada diferencialmente por E₂ en el SNC de la rata y que bajo condiciones fisiológicas como en el ciclo estral, la regulación de la expresión de *c-fos* no esté dada solamente por las hormonas esteroides sino que es posible que participen otros factores en su regulación.

tarde del proestro (15:00-16:00 h) que coincide con el aumento en la expresión del gen de GnRH en el hipotálamo y área preóptica y que precede al pico de hormona liberadora de gonadotropinas en varias regiones del cerebro anterior (Lee 1990, Gore 1995). Estos datos sugieren que la corteza cerebral también es activada antes del pico de GnRH y participa en la regulación de la ovulación o de la conducta sexual. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la expresión del proto-oncogen *c-fos* es regulada diferencialmente por E₂ en el SNC de la rata y que bajo condiciones fisiológicas como en el ciclo estral, la regulación de la expresión de *c-fos* no esté dada solamente por las hormonas esteroides sino que es posible que participen otros factores en su regulación.

9. CONCLUSIONES

La expresión del proto-oncogen *c-fos* está regulada de manera diferencial por E₂ en el hipotálamo, el hipocampo y la corteza frontal de la rata. En los dos primeros el E₂ induce la expresión de *c-fos* mientras que en la corteza cerebral la inhibe.

Durante el ciclo estral de la rata la máxima expresión de *c-fos* en todas las regiones estudiadas se presentó en el día del estro, 24 h después del pico en la concentración de E₂ plasmático que ocurre en el proestro.

La máxima expresión de *c-fos* durante el proestro se presenta a las 13:00 h en todas las regiones estudiadas, previo al incremento en la concentración de la proteína FOS que antecede al pico de GnRH.

10. REFERENCIAS.

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. Neuroscience* 15: 2272-2279.

Berriman, S. J., Wade, G. N., and Blaustein, J. D. (1992). Expression of Fos-like proteins in gonadotropin-releasing hormone neurons of syrian hamsters: effects of estrous cycles and metabolic fuels. *Endocrinology* 131: 2222-2228.

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-Grant, K., Exley, D., and Naftolin, F. (1970): Peripheral plasma estradiol and luteinizing hormone concentrations during the estrous cycle of the rat. *J. Endocrinol.* 48:295-296.

Butcher, R. L., Collins, W. E., and Fugo, N. W. (1974). Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94: 1704-1708.

Cattaneo, E., and Maggi, A. (1990). *c-fos* induction by estrogen in specific rat brain areas. *Eur. J. Phar.* 188: 153-159.

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 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.

Daane, T.A., and Parlow, A.F. (1971). Periovarian patterns of rat serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the normal estrous cycle: effects of pentobarbital. *Endocrinology* 88: 653-663.

Doan, A., and Urbanski, H. F. (1994). Diurnal expression of Fos in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of syrian hamsters. *Biology of Reproduction* 50: 301-308.

Dragunow M., and Robertson H. A. (1987a). Kindling stimulation induces *c-fos* protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329: 441-442.

Dragunow M., and Robertson H. A. (1987b). Generalized seizures induce *c-fos* protein(s) in mammalian neurons. *Neurosci. Lett.* 82: 157-161.

Dragunow M., and Robertson H. A. (1988). Brian injury induces *c-fos* protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain. *Brain Res.* 455: 295-299.

Eto, T., Masuda, H., Suzuki, Y., and Hosi, T. (1962). Progesterone and preg-4-en-20 alpha-ol-3-one in rat ovarian venous blood at different stages in reproductive cycle. *Jpn. J. Anim.Reprod.* 8: 34-40.

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.

Gay, V. L., Midgley, A. R., Jr., and Niswender, G.D. (1970). Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. *Fed. Proc.* 29: 1880-1887.

Gibbs, R. B., Mobbs, C. V., and Pfaff, D. W. (1990). Sex steroids and Fos expression in rat brain and uterus. *Mol. and Cell. Neurosciences* 1: 29-40.

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.

Gorbman, A., Bern, H. (1962). Steroid hormones and steroidogenesis. In: A textbook of comparative endocrinology. 9: 230-246. Wiley J. and Sons, Inc. New York. USA.

Gore-Langton, R. E., Armstrong, D. T. (1988). Follicular steroidogenesis and its control. In: Physiology of reproduction. Knobil E., Neil J. D., et al (Eds) Vol. 1. pp. 331-335. Raven Press Ed. New York.

Gore, C. and Roberts, L. J.(1995) Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Expression in the Rat during the Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology* 136: 889-896.

Haendler, T., Hofer-Warbinck, R., Hofer, E. (1987). Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO J.* 6: 947-950.

Hashimoto, I., Hendricks, D. M., Anderson, L. L., and Melampy, R. M. (1968). Progesterone and pregn-4-en-20 alpha-ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* 82: 333-341.

Hoffman, G. E., Lee, W.-S., Altardi, 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.

Insel, T. R. (1990). Regional induction of *c-fos*-like protein in rat brain after estradiol administration. *Endocrinology* 126: 1849-1853.

Jennes, L., Jennes, E. Purvis, C. and Nees, M. (1992). *c-fos* expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroids hormone treatments. *Brain Research* 586: 171-175.

Kawasaki, E. S. and Wang, A. M. (1989). Detection of gene expression. In *PCR Technology, principles, and applications for DNA amplification* (ed. H.A.Erlich), pp. 89-97. Stockton Press, New York.

Knobil, E., Neill, J., et al. (1988). *The Physiology of Reproduction*. pp. 1893-1927. Raven Press. Ltd., New York.

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. Neuro.* 351: 27-40

Kouzarides, T., and Ziff, E. (1988). The role of leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336: 646-651.

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. *Crit. Rev. Euk. Gen. Exp.* 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.

Lee, W., Smith, S. M., and Hoffman, G. E. (1990). Luteinizing hormone-releasing hormone neurones express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5163-5167.

Lloyd, J. M., Hoffman, G. E., and Wise, P. M. (1994). Decline in immediate early gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurones during proestrus in regularly cycling, middle-aged rats. *Endocrinology* 134: 1800-1805.

Loose-Mitchel, D. S., Chiappetta, C., and Stancel, G. M. (1988). Estrogen regulation of *c-fos* messenger ribonucleic acid. *Mol. Endocrinology* 2: 946-951.

Maggi, A. and Pérez, J. (1985). Role of female gonadal hormones in the CNS, clinical and experimental aspects. *Life Sci.* 37: 893-899.

Mandl, A.M., (1951). The phases of the estrous cycle in the adult white rat. *J. Exp. Biol.* 28: 576-584.

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. Lett.* 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.

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*. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 421-451.

Mullis, K. B., and Fallona, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.

Murphy, L. J., Murphy, L. C., and Friesen H. G. (1987). Estrogen induction of *N-myc* and *c-myc* proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology* 120: 1882-1888.

Naftolin, F., Brown-Grant, K., and Corker, C. S. (1972). Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrus cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle. *J. Endocrinol.* 53: 17-30.

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.

Ransone, L. J., and Verma, I. M. (1990). Nuclear proto-oncogenes Fos and Jun. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 539-557.

Rappolee, D. A., Mark, D., Baanda, M. J., and Werb, Z. (1988). Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241: 708-710.

Rashtchian, A. (1994). Amplification of RNA. In PCR methods and applications. 4:pp S83-S91. Cold Spring Harbor Laboratory.

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.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. A. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnostics of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C., Verma, I. M. (1988a). Transcriptional autorregulation of the proto-oncogen 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.

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.

Shivers, B. D., Harlan, R. E., Morrell, J. I., and Pfaff, D. W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of GNRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304: 345-347.

Smith, M. S., Freeman, M. E., and Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnacy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated whit rescue of the corpus luteum of psedopregnacy. *Endocrinology* 96: 219-226.

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

Sullivan, A. K., Witkin, W. J., Ferin, M., Silverman, A. N., (1995). Gonadotropin-releasing hormone neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Research* 685: 198-200.

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. of Neurosci.* 15(5): 3583-3593.

Truss, M., and Beato, M.(1993). Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.* 14: 459-479.

Van Der Beek, E., Van Oudheusden, Buijs, M., Van Der Donk, A., Van Der Hurk, R., Wiegant, M., (1994). Preferential Induction of *c-fos* Immunoreactivity in Vasoactive Intestinal Polipeptide-Innervated Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons during a Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surge in the Female Rat. *Endocrinology* 134: 2636-2644.

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. *Brain 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.

Yamamoto, K. R. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 19: 209.

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.

11. APENDICE

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

Tiocianato de guanidina

Fenol

β -mercaptoetanol

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.

TBE 5X.

0.5 M Tris base.

0.5 M ácido bórico.

10 mM EDTA.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

SSC 20X

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

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. Esterilizar por autoclave.

DTT (1 M)

Disolver 3.09 g de DTT (Ditiotreitol) en 20 ml en acetato de sodio 0.01 M pH 5.2. Esterilizar por filtración, hacer alícuotas y guardar a -20 °C.

EDTA 0.5 M

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

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

0.25 % azul de bromofenol.

0.25 % Cianol Xileno.

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 % Cianol Xileno.

RT M-MLV (Gibco BRL)

Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murino de Moloney

200 U/ μ l.

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.

PB

0.6 M Na₂HPO

0.6 M KH₂PO₄

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

Reactivo Denhardt 100 X.

10 g Ficol tipo 400.

10 g de polivinilpirrolidona.

10 g de albúmina de suero bovino.

Filtrar y guardar a -20 °C.

TE (Tris-EDTA).

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

1 mM EDTA (pH 8.0).