



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“RESPUESTA DIFERENCIAL DE LOS NÚCLEOS
PARAVENTRICULAR Y SUPRAÓPTICO HIPOTALÁMICOS AL
ESTRÉS OSMÓTICO DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALEJANDRA TINAJERO GRANADOS

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H70188

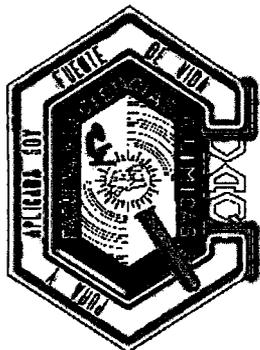
No. Título _____

Clas. TS

619.93

T 587 r

2005



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**RESPUESTA DIFERENCIAL DE LOS NÚCLEOS
PARAVENTRICULAR Y SUPRAÓPTICO HIPOTALÁMICOS AL
ESTRÉS OSMÓTICO DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ALEJANDRA TINAJERO GRANADOS

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

SINODALES

Dra. MARIA TERESA MORALES GUZMAN.
DIRECTOR

Dr. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA.
SINODAL

Q. B. SERGIO PACHECO HERNANDEZ.
SINODAL

M en C. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA.
SINODAL

OFIC-ACAD-05/373

Centro Universitario, 5 de octubre de 2005.

H. CONSEJO ACADÉMICO
FACULTAD DE QUÍMICA
P R E S E N T E .

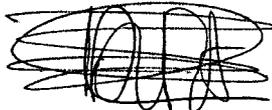
Nos permitimos informar a usted que una vez revisada la TESIS INDIVIDUAL denominada "RESPUESTA DIFERENCIAL DE LOS NÚCLEOS PARAVENTRICULAR Y SUPRAÓPTICO HIPOTALÁMICOS AL ESTRÉS OSMÓTICO DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA", presentada por la Pasante ALEJANDRA TINAJERO GRANADOS, con opción a recibir el Título de QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO, de acuerdo al Artículo 20, inciso h), del Reglamento de Titulación vigente.

Emitimos nuestro voto aprobatorio.

ATENTAMENTE
"EDUCO EN LA VERDAD Y EN EL HONOR"



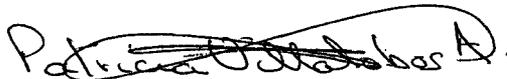
DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN



DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA



Q.B. SÉRGIO PACHECO HERNÁNDEZ



M. EN C. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA

c.c.- Archivo

atl.

DEDICATORIAS

A Dios

Que ha sido un gran amigo, que siempre ha estado conmigo y me dio fuerza en los momentos más difíciles, al cual le debo todo, momentos felices, tristeza y alegrías, el amor que recibo y el que puedo compartir, que a pesar de todo nunca me abandonó.

A mis Padres

Que en todo momento me han brindado apoyo, y confianza en alcanzar mis metas y sueños, y porque gracias a su amor, cariño y dedicación he logrado salir adelante, gracias por ser los mejores padres y por darme el regalo mas grande.

A mis tios

Alicia y Felipe que han sido mis segundos padres porque siempre me ha brindado los mejores consejos y me abrieron las puertas de su casa para lograr superarme como persona.

A la Dra. Tere

Por el gran apoyo que me ha brindado para la realización de este trabajo, por enseñarme lo que es la investigación y facilitarme herramientas necesarias y animarme en seguir superandome, y por ser una excelente doctora y una gran persona digna de admirarse.

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelos, que aunque ya no esten conmigo siempre fueron y serán siendo la fuerza para salir adelante, gracias por el gran amor, cariño y apoyo que siempre me brindaron.

A mis hermanos y primos que siempre me han apoyado y animado para salir adelante y por ser la familia que somos.

A mis amigas y amigos especialmente a Bricia, Lourdes, Wendy, Fabiola, Alma, Isaura, Gil, Andrés, Chava y Joel; gracias por el apoyo que me brindaron y confianza que me han demostrado por todo lo que vivimos juntos, y a todos mis compañeros de generacion por todos los momentos inolvidables que pasamos.

A mis sinodales, por el apoyo, el tiempo y la dedicación a mi trabajo para que este quedara cada vez mejor.

A Marú y a demás mis compañeros de laboratorio, porque siempre me han ayudado y apoyado a que mis experimentos salgan mejor cada día y porque aprenda cosas nuevas.

A la comisión Academica por ayudarme a que mi trabajo mejorará.

Al Instituto de Neurobiología, por abrirme sus puertas y permitirme realizar el presente trabajo.

Esta tesis fue realizada en laboratorio D-05 del Instituto de Neurobiología de la UNAM con la dirección de la Dra. María Teresa Morales Guzmán y fue financiada por el donativo de PAPIIT-UNAM IN-223402.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
A) Antecedentes Generales	
II.1 Ciclo Estral de la Rata	3
II.1.1 Características reproductivas de la rata	3
II.1.2 Cambios hormonales durante el ciclo	5
II.1.3 Ciclo estral de la rata	6
II.1.4 Secreción de esteroides ováricos durante el ciclo estral de la rata	8
II.2 Estrés Osmótico	9
II.2.1 Generalidades de estrés	9
II.2.2 Efectos del estrés	10
II.2.3 Ciclicidad y respuesta al estrés	11
II.2.4 Hipotálamo	13
II.2.5 Hormonas de la hipófisis posterior	14
II.2.6 Naturaleza química de la vasopresina y de la oxitocina	15
II.2.7 Vasopresina	15
II.2.7.1 Regulación de la secreción de la vasopresina	16
II.2.7.2 El sistema de retroalimentación osmorreceptores – vasopresina	17
II.2.8 Oxitocina	18
II.2.8.1 Regulación de la secreción de la oxitocina	18

II.3	Gen Temprano <i>c-fos</i> en el Sistema Nervioso Central	19
II.3.1	Generalidades del proto-oncogen <i>c-fos</i>	20
II.3.2	Estructura del proto-oncogen <i>c-fos</i>	24
II.3.3	Regulación de la expresión del proto-oncogen <i>c-fos</i>	25
II.3.4	Regulación de la expresión <i>c-fos</i> por hormonas esteroides	27
II.3.5	Uso de <i>c-fos</i> en estudios de inmunohistoquímica sobre las funciones cerebrales	28
B)	Antecedentes Específicos	
II.4	Respuesta de los Núcleos Paraventricular (PVN) y Supraóptico (SON) al Estrés Osmótico	29
II.5	Neuronas de Oxitocina en el Hipotálamo de la Rata Demuestran Inmunoreactividad a <i>c-fos</i> en Estrés Osmótico	31
II.	HIPÓTESIS	32
III.	OBJETIVOS	
IV.1	General	33
IV.2	Específicos	33
IV.	METODOLOGÍA	34
V.1	Materiales	34
V.1.1	Soluciones y Reactivos	34
V.1.2	Aparatos	35
V.2	Métodos	35
V.2.1	Procesamiento de los Tejidos e Histología	35
V.2.2	Inmunohistoquímica	36
V.2.3	Tinción de Nissl	38
V.2.4	Análisis	39
V.3	Diseño Experimental	39
V.3.1	Ruta Crítica	41
V.	RESULTADOS	44
VI.1	Referencia Anatómica del Área Analizada	44

VI.2 Respuesta Hipotalámica al Estrés Osmótico	45
VI.3 Cuantificación de la Respuesta Hipotalámica al Estrés Osmótico	48
VII. DISCUSIÓN	53
VIII. CONCLUSIONES	56
IX. BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de los cambios hormonales y ováricos durante el ciclo	6
2	Microfotografías mostrando las distintas células que se observan en un frotis vaginal durante las distintas fases del ciclo estral de la rata	8
3	Centros de control del hipotálamo	14
4	Estructura del gen <i>c-fos</i>	26
5	Microfotografías de los núcleos hipotalámicos en tinción de Nissl para referencia anatómica	44
6	Respuesta de los núcleos hipotalámicos en fase diestro	45
7	Respuesta de los núcleos hipotalámicos en fase proestro	46
8	Respuesta de los núcleos hipotalámicos en fase estro	47
9	Número de neuronas activadas por la expresión de <i>c-fos</i> en el PVN de acuerdo a la fase del ciclo estral	50
10	Número de neuronas activadas por la expresión de <i>c-fos</i> en el SON de acuerdo a la fase del ciclo estral	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Resultados de la expresión obtenida en PVN en fase diestro	48
2	Resultados de la expresión obtenida en PVN en fase proestro	48
3	Resultados de la expresión obtenida en PVN en fase estro	48
4	Resultados de la expresión obtenida en SON en fase diestro	49
5	Resultados de la expresión obtenida en SON en fase proestro	49
6	Resultados de la expresión obtenida en SON en fase estro	49

RESUMEN

Tradicionalmente, los estudios en el campo de la respuesta al estrés se han realizado en animales experimentales, como la rata macho. Reportes recientes han destacado la importancia de considerar el sexo del individuo y los esteroides gonadales cuando se analiza la respuesta al estrés y los efectos de éste en el cerebro.

En la presente tesis se investigó el efecto del estrés osmótico sobre los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo en las diferentes fases del ciclo estral de la rata hembra. Esto se realizó mediante la utilización de ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar, a las cuales se les tomaron frotis vaginales para identificar la fase del ciclo estral en la que se encuentran. El experimento consistió en la inyección intraperitoneal de solución salina hipertónica para la inducción de estrés osmótico. Los controles recibieron solución salina isotónica. Al término de 90 minutos después de la inyección, se anestesió a las ratas y se perfundieron por vía intracardíaca con una solución de paraformaldehído al 4 %. Se extrajo el cerebro y se colectaron 5 series de cortes coronales, de 30 micras de espesor, correspondientes al hipotálamo. Posteriormente, los cortes se procesaron con un método inmunohistoquímico estándar para la detección de la proteína Fos con un antisuero policlonal. Por último, se observó y detectó la activación celular en el núcleo paraventricular y supraóptico del hipotálamo, ya que en esos núcleos se encuentran las neuronas magnocelulares de vasopresina y oxitocina y se sabe que responden a cambios osmóticos.

I. INTRODUCCIÓN

Dos tercios del peso corporal corresponden al agua corporal, dicha cantidad se encuentra estrechamente ligada con la cantidad de electrólitos, los cuales son compuestos químicos simples formados por átomos que transportan una carga eléctrica positiva o una negativa. Los electrólitos se encuentran en el cuerpo disueltos en tres compartimentos principales de agua del cuerpo: el líquido en el interior de las células, el líquido en el espacio que las rodea, y la sangre. Éstos son: sales de potasio, magnesio, sodio, calcio, proteínas, fosfatos, sulfatos y en menor proporción ácidos grasos, bicarbonato y cloro. Las concentraciones normales de electrólitos varían. Algunos se encuentran en concentraciones elevadas en el interior de las células y bajas fuera de ellas. Otros se encuentran en concentraciones bajas en el interior de las células y elevadas fuera de ellas. Actúan interviniendo directamente con el comportamiento celular y en funciones específicas como en la función muscular, en la conducción de los impulsos nerviosos, la acción enzimática, el funcionamiento de la membrana celular, el funcionamiento del riñón, en la regulación de la hidratación. Por esto, el estudio de su regulación y los ajustes que un organismo realiza ante un reto osmótico es muy importante para entender la fisiología corporal.

La mayoría de los estudios experimentales sobre regulación osmótica, se han desarrollado en ratas macho. Sin embargo, existen evidencias de que los estrógenos pueden modificar la respuesta de poblaciones neuronales implicadas en dicha regulación, esto es de neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas hipotalámicas. La hiperosmolaridad es un estímulo muy potente para la secreción de dichas hormonas.

Se sabe que las neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas son moduladas por los estrógenos en las ratas, de acuerdo a la fase del ciclo estral; presentándose una intensa actividad durante la fase proestral. Estas neuronas expresan la proteína Fos cuando el organismo es sometido a estrés osmótico.

La vasopresina se sintetiza principalmente en los núcleos supraópticos, mientras que la oxitocina se produce principalmente en los núcleos paraventriculares del hipotálamo siendo éste una región cerebral compleja con características de glándula de secreción interna, que regula a la adenohipófisis y a través de ella regula asimismo varias funciones metabólicas y reproductivas. Tiene varias acciones relacionadas con la regulación neuroendocrina, autonómica y conductual, como son: lactancia, reproducción, comportamiento sexual, ingesta de alimentos y de líquidos. En coordinación con el sistema límbico, participa en el control de las emociones y es, además, un centro regulador del sistema simpático.

Varios estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* de secciones de cerebro han revelado una significativa especificidad anatómica y temporal de la expresión de *c-fos*, el cual se ha utilizado ampliamente como un marcador de actividad neuronal que ocurre en respuesta a una gran variedad de estímulos homeostáticos o sensoriales.

En este estudio nos proponemos determinar las características de la respuesta al estrés osmótico en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo en la rata hembra y la variación de dicha respuesta durante las fases del ciclo estral.

II. ANTECEDENTES

A) Antecedentes Generales

El ciclo reproductivo de los mamíferos consiste en pubertad, ovulación, fecundación, embarazo y lactancia. Dentro de este ciclo, las hembras de los mamíferos adquieren la capacidad de reproducción, gracias a la ovulación que ocurre de manera cíclica. Estos ciclos pueden ser estacionales, no estacionales; poliestrales o monoestrales. Para fines de esta tesis, se revisará la información correspondiente al ciclo estral de la rata de laboratorio, ya que es el animal que utilizaremos para la experimentación.

II.1 Ciclo Estral de la Rata

II.1.1 Características reproductivas de la rata

La rata de laboratorio posee una vida media de 2 años siendo sexualmente madura entre los 60-90 días de edad. La gestación de la hembra dura de 22 a 24 días con 8 a 12 nidadas por año. Cada nidada se conforma de 8 a 12 individuos con una supervivencia de 12 a 20 individuos por hembra al año.

Tienen el útero bicorne con la peculiaridad que poseen 2 cuellos uterinos, uno para cada cuerno, comunicados entre sí por una sola vagina. Las glándulas mamarias son 12, distribuidas de 6 en el tórax y 6 en el abdomen, son 6 pares de pezones. Las hembras nacen con el canal vaginal cerrado, este recién se abre a los 72 días de vida con un rango de 34-109 días, esta variación está influida por factores nutricionales, genéticos y ambientales.

El primer estro se da entre los 40-75 días pero la edad de mayor fertilidad es de 100-300 días y la última ovulación se da a los 12-18 meses. Uno de los signos de la maduración sexual de la hembra es el pico de LH que se libera de manera pulsátil cada 30-60 minutos lo que estimula la secreción de 17-beta estradiol que por retroalimentación positiva provoca el pico pre-ovulatorio de LH y determina el desarrollo final del ovario. La apertura vaginal, la ovulación y el consecuente ciclo estral están correlacionados, un cambio en la intensidad lumínica, una situación

estresante pueden actuar sobre la glándula pineal y las adrenales pueden alterar el orden establecido retardando o acelerando uno de los eventos (Nieto, 2000).

El ciclo ocurre como un resultado compuesto, coordinando interacciones entre el sistema nervioso central, el hipotálamo, la hipófisis, y el ovario. Específicamente ocurre como un resultado de la secreción pulsátil de la hormona estimulante de las gonadotrofinas (GnRH) por neuronas en el núcleo preóptico y arcuato del hipotálamo. La GnRH tiene que actuar en la hipófisis para estimular la liberación de gonadotrofinas, como la hormona luteinizante o luteotrópica (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). La GnRH es secretada de una manera pulsátil alrededor de 1 pulso/hora en la fase folicular y 1 pulso/2-3 horas en la fase lútea, y la amplitud y frecuencia de secreciones son influenciados por estrógenos y progesterona, además de catecolaminas, dopamina, y norepinefrina dentro del cerebro.

Los niveles de estrógenos son elevados en la fase folicular, alcanzando un pico máximo aproximadamente 24 a 36 horas después de la ovulación. Los niveles circulantes de LH se incrementan durante la mitad del ciclo, y la ovulación ocurre aproximadamente 10 a 12 horas después del pico máximo de LH (Fink, 2000).

El ovario es el órgano central del aparato reproductor de las hembras, ya que en él se producen los óvulos. Cada ovario está situado a uno de los lados de la cavidad pelviana. Su volumen aumenta de modo progresivo hasta la edad adulta y, cuando finaliza el periodo fértil ambos ovarios inician un proceso de regresión que acaba por atrofiarlos. Estructuralmente están compuestos por un tejido conectivo fibroso en su parte central (la médula), con numerosos vasos sanguíneos, y una serie de acúmulos celulares en la periferia, denominados folículos oóforos, que configuran la corteza. Los folículos están formados por un óvulo, rodeado por una serie de células nutricionales que configuran una especie de cubierta, la cual a su vez aparece tapizada y da lugar a un manto o teca.

El folículo actúa también como una célula endocrina, puesto que produce gran cantidad de estrógenos durante la etapa fértil. Cuando el folículo crece y madura,

produce un líquido que induce en la pared del ovario un rechazo contra él, con el que se desplaza hacia la periferia. Finalmente, cuando el óvulo alcanza la madurez apropiada, la pared del folículo se abre y lo libera hacia la cavidad abdominal. El óvulo expulsado inicia entonces su ciclo vital, siendo recogido por la trompa uterina. Mientras tanto, el folículo vacío se transforma en un tejido cicatrizal especial, el llamado cuerpo lúteo. Éste actúa también como una glándula endocrina que secreta otra hormona sexual, la progesterona, que preparará el útero para un posible embarazo. Si el óvulo es fecundado, el cuerpo lúteo experimenta una serie de cambios que lo transforman en el cuerpo lúteo gravídico. Si no hay fecundación, se convierte en el cuerpo lúteo menstrual, en el caso de los humanos (Nieto, 2000).

II.1.2 Cambios hormonales durante el ciclo

El ciclo está regulado por la compleja interacción de las hormonas hipofisiarias (LH y FSH) y las hormonas sexuales ováricas (estradiol y progesterona). El ciclo comienza con la fase folicular.

Los niveles bajos de estradiol y progesterona al comienzo de esta fase hacen que el revestimiento uterino (endometrio) degenera y se desprenda en la menstruación, que marca el primer día del ciclo, durante la mitad de esta fase, el nivel de FSH asciende ligeramente y estimula el desarrollo de algunos folículos, durante la última parte de esta fase, el nivel de estradiol secretado por los ovarios aumenta y estimula el espesamiento uterino. Un incremento en los niveles de LH y FSH señala el inicio de la fase ovulatoria, en el caso de los humanos (Figura 1). El nivel de estradiol llega a su punto máximo y el nivel de progesterona comienza a elevarse. Durante la fase luteínica, los niveles de LH y FSH descienden, el folículo roto se cierra después de desprender el óvulo y forma el cuerpo lúteo, que secreta progesterona (Berkow, 2000).

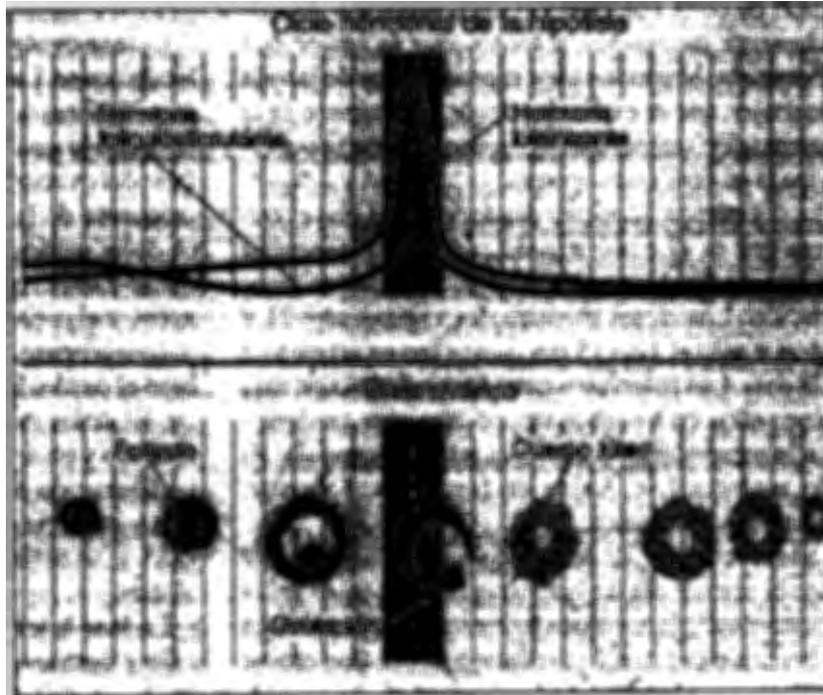


Figura 1. Esquema de los cambios hormonales y ováricos durante el ciclo

II.1.3 Ciclo estral de la rata

La rata de laboratorio tiene ciclos no estacionales, con ovulación espontánea y poliestral. Su ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días. Para denominar los estadios del ciclo entre los períodos del estro durante la etapa sexual se usan los prefijos *pro*, *di* y *met* cada uno con el subfijo estral.

La primera fase de la etapa se denomina proestro, caracterizada como el momento en el cual un animal entra al período de receptividad a la cópula (Knobil y Neill, 1994). Dura aproximadamente 12 horas; en esta etapa el pH vaginal es de 5.4; la vagina se torna seca y se comienza a producir la cornificación de las células de sus paredes; los ovarios están en plena producción folicular. El diámetro de la luz uterina es de 5 mm; en el frotis vaginal se observan escasos leucocitos (<10%), abundantes células epiteliales de núcleo redondo y voluminoso, células jóvenes (>96%) y algunas muy escasas células cornificadas (<30%) de los estratos superiores (Nieto, 2000).

El siguiente período, el estro, se describe como el tiempo en el cual la hembra puede recibir al macho y puede ocurrir el embarazo (Knobil y Neill, 1994). Dura de 9 –15 horas, la vagina se ve cornificada y seca, el pH vaginal es de 4.2 y aparece un flujo vaginal abundante y caseoso. Los estrógenos circulantes provocan cambios en el útero, aumenta la producción de FSH y LH en los 2 días siguientes. El estro se caracteriza por cambios conductuales en el animal. La ovulación ocurre 8 – 11 horas después de la aparición del estro; microscópicamente se observan escasos leucocitos (<10%), muy pocas células epiteliales (<25%) y un gran aumento de células cornificadas, con núcleo picnótico. En esta fase pueden observarse imágenes en forma de hoja de helecho, típicas de la cristalización del moco vaginal (Nieto, 2000).

Ante la ausencia de concepción, el estro es sucedido por un corto período de recuperación denominado metaestro, en el que los cambios estrales en el aparato reproductivo disminuyen (Knobil y Neill, 1994). Se divide en 2 etapas:

El metaestro I que dura 15 horas, se produce el pico de LH y la consecuente ovulación múltiple y espontánea, el pico de LH determina el final de la producción de estrógenos y comienzo de la producción de progesterona por los cuerpos lúteos, la progesterona determinará el comportamiento materno de la rata.

El metaestro II dura 6 horas, en esta etapa la vagina se ve húmeda y los óvulos liberados se encuentran en el oviducto (Nieto, 2000).

A continuación, sigue el diestro, que es cuando el aparato reproductor se prepara para recibir al huevo. Si la fertilización no se lleva a cabo, el mamífero retorna a la fase del proestro, y el ciclo se inicia nuevamente. En el campo microscópico aparecen abundantes leucocitos y muy escasas células epiteliales de la capa basal. Esta fase corresponde a la fase inactiva, de ausencia de secreción de estrógenos.

La duración de las diferentes fases del ciclo estral pueden observarse basándose en las características del moco cervical, que ya han sido descritas y que ilustramos a continuación en la Figura 2.

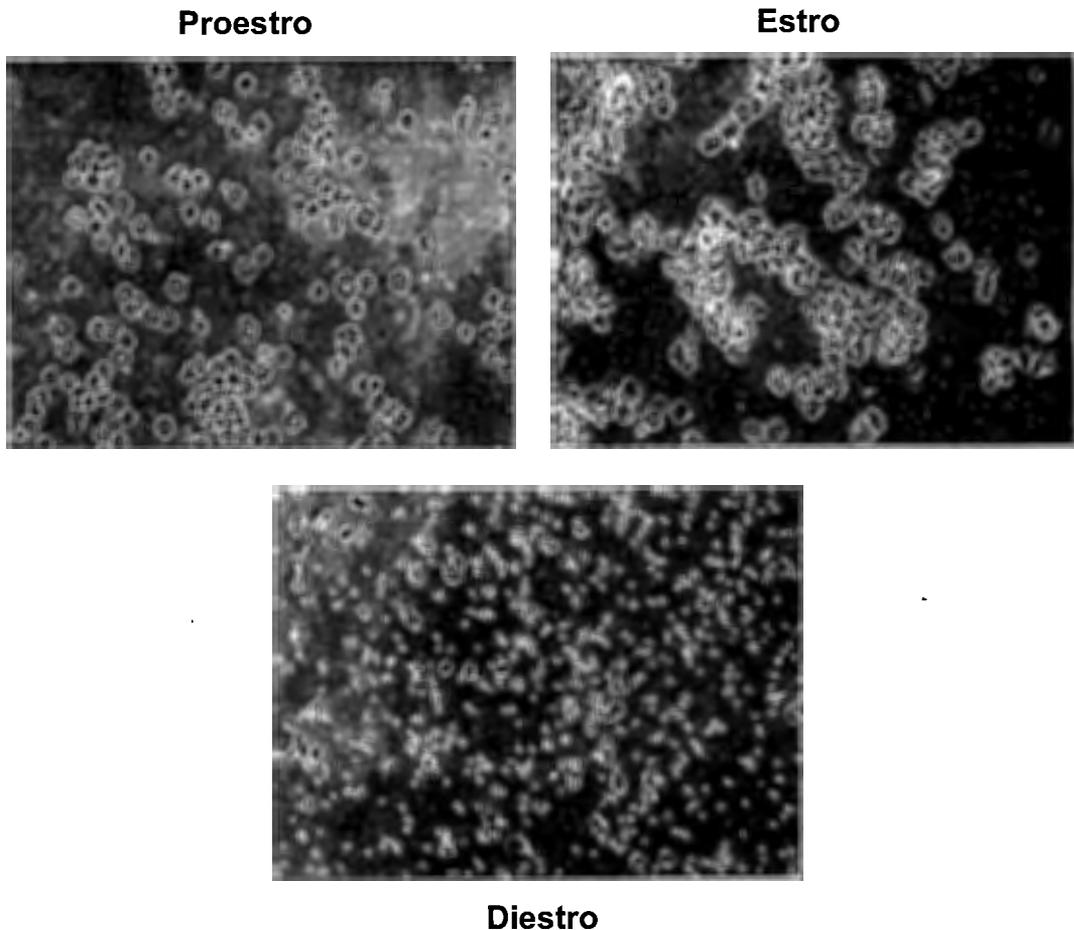


Figura 2. Microfotografías mostrando las distintas células que se observan en un frotis vaginal durante las distintas fases del ciclo estral de la rata

II.1.4 Secreción de esteroides ováricos durante el ciclo estral de la rata

El período preovulatorio del ciclo estral está caracterizado por el crecimiento de folículos ováricos, la secreción y liberación de estrógenos. La tasa de secreción de estradiol dentro del ovario hacia el torrente sanguíneo es baja durante el estro, seguido por un incremento muy significativo, de manera tardía en el metaestro

durante la mañana del diestro, alcanzando su pico máximo durante la tarde del proestro. Así, en el día 4 del ciclo estral de la rata, la concentración plasmática de estradiol se encuentra en concentraciones basales durante la fase estral. Al final del metaestro y la fase temprana del diestro, los niveles plasmáticos se incrementan. Este incremento continúa durante la fase del diestro y la etapa temprana del proestro, en la cual se alcanza el pico máximo y la meseta hacia la mitad del proestro.

La secreción de estrógenos ocurre de manera coordinada con otras hormonas que participan en el proceso de ovulación. La progesterona se secreta de manera más regular. Se ha observado un gran aumento de progesterona producida por el folículo que tiene lugar durante la tarde y noche del proestro. Este aumento es posterior al pico de estradiol y ocurre simultáneamente con las hormonas hipofisarias implicadas en este proceso, como son la LH, FSH y prolactina (PRL). La liberación de estas hormonas hipofisarias es inducida por los estrógenos actuando en neuronas hipotalámicas que contienen los factores tróficos neuroendocrinos, como el GnRH (Knobil y Neill, 1994):

II.2 Estrés Osmótico

II.2.1 Generalidades del estrés

En general el estrés puede ser definido como una situación que amenaza la integridad fisiológica de un individuo. Frecuentemente se refiere a situaciones en las cuales los niveles de glucocorticoides adrenales y catecolaminas se encuentran elevados después de una experiencia o reto. También se conoce como una experiencia subjetiva y esta podría o no corresponder a una respuesta psicológica.

El estrés involucra un “estresor” y una respuesta al estrés. El estresor podría ser un insulto físico o un trauma, o un reto fisiológico particularmente cuando el cuerpo es forzado a realizar una operación mayor a su capacidad. Los estresores físicos incluyen ruido, superpoblación, excesivo calor o frío; también incluyen conflicto interpersonal, aislamiento, eventos de vida traumática; estos tipos de estresores podrían producir respuestas conductuales e incluir consecuencias

fisiológicas semejantes a un incremento de presión, elevado ritmo cardiaco y alteración en el metabolismo.

II.2.2 Efectos del estrés

La respuesta fisiológica al estrés incluye primeramente la activación del sistema nervioso central y del hipotálamo (eje CRH-ACTH-adrenal), así como de una respuesta adrenal, incrementando los niveles tisulares de catecolaminas y glucocorticoides.

Los efectos del estrés pueden ser manifestados en cuatro diferentes dominios:

- Fisiológicos: incluyen alteraciones neuroendocrinas, sistema nervioso central y función inmune.
- Las manifestaciones conductuales de estrés incluyen respuestas agresivas, desplazamiento de actividades en animales, una relación conductual por la contaminación y el consumo de alcohol en humanos, y deficiencias en la ejecución de una tarea, estos son particularmente relevantes.
- Experiencias subjetivas durante el estrés incluyendo ansiedad, sintiendo insatisfacción, enojo, junto con ansiedad y respuestas depresivas.
- Las manifestaciones cognitivas de estrés incluyen alteraciones en el procesamiento de la información, influyendo la ejecución y la capacidad de decidir.

Dos factores pueden ser importantes en las variaciones de los efectos de estrés.

- El primero de éstos reside en la naturaleza de la experiencia estresante y las respuestas movilizadas para controlar la situación.
- En el segundo, los efectos del estrés varían según el tiempo de curso y duración. Algunas importantes diferencias en las respuestas emergen

principalmente con estimulación contraria crónica, considerando la terminación de otros efectos después de la estimulación.

Cuando las implicaciones de la investigación de salud y bienestar por estrés son consideradas, las variaciones en respuesta entre individuos son sorprendentes. Dos personas expuestas al mismo tratamiento, pueden manifestar situaciones muy diferentes sustancialmente en la magnitud y duración de respuesta de estrés, y al relacionar el estrés con problemas de salud pueden hallarse contrastes en aspectos físicos y mentales.

Algunas de estas variaciones resultan de las diferencias en temperamento, recursos sociales y eficacia de las respuestas, pudiendo los individuos soportar la transición estresante. Otras diferencias de vulnerabilidad pueden provenir de factores experimentales y genéticos.

Estudios con animales han mostrado la importancia de experiencias tempranas en la vida, como la interacción materna, el tratar tiernamente, o una separación maternal, son asociados con decremento o incremento en respuestas neuroendocrinas a una situación estresante en la vida adulta (Fink, 2000).

II.2.3 Ciclicidad y respuesta al estrés

La homeostasis es el estado de equilibrio dinámico por el que todos los seres vivos mantienen una estabilidad en las propiedades de su medio interno y por tanto de la composición bioquímica de los líquidos, células y tejidos. Por lo tanto, toda la organización estructural y funcional de los seres vivos tiende hacia un equilibrio dinámico.

En la homeostasis intervienen todos los sistemas y aparatos del organismo: desde el sistema nervioso, sistema neuroendocrino e inmune, aparato digestivo, aparato respiratorio, aparato cardiovascular, hasta el aparato genitourinario (Nieto, 2000).

Las tres propiedades que rigen un sistema homeostático son:

- Estabilidad: Sólo se permiten pocos cambios en el tiempo.
- Equilibrio: Los sistemas homeostáticos requieren una completa organización interna, estructural y funcional para mantener el equilibrio.
- Impredecible: El efecto preciso de una determinada acción a menudo tiene el efecto opuesto al esperado.

Las características principales de la homeostasis son:

1. Importancia del sistema nervioso como del endocrino en el mantenimiento de los mecanismos de regulación.
2. Nivel tónico de actividad: Los agentes tanto del medio interno como del medio externo mantienen una moderada actividad que varía ligeramente hacia arriba o abajo, como rodeando un valor medio en un intervalo de normalidad fisiológica.
3. Controles antagónicos: Cuando un factor o agente cambia un estado homeostático en una dirección, existe otro factor que tiende a contrarrestar al primero con efecto opuesto.
4. Agentes homeostáticos antagonistas en una región del cuerpo, pueden ser agonistas o cooperativos en otras regiones corporales.
5. Las situaciones en las que el cuerpo no puede mantener los parámetros biológicos dentro de su rango de normalidad, surge un estado de enfermedad que puede ocasionar la muerte (Dubravčić, 2002).

El estrés puede ser conceptualizado como un estado de discordia o de amenaza a la homeostasis, junto con la existencia de una respuesta adaptativa de un estresor o la existencia de un estresor más generalizado. Para muchos animales, el estrés del medio ambiente, o condiciones de densidad alta de población, son asociados con una falta de ovulación e infertilidad.

Los estresores que son semejantes al medio ambiente o por separación de la familia, o la ausencia de diagnósticos psiquiátricos, pueden ser ligados a anomalías del ciclo. La velocidad de las irregularidades del ciclo incrementa en proporción a estrés crónico, el cual, es bastante severo, puede completar la inhibición del sistema de reproducción femenino. De vez en cuando la naturaleza del actual estresor puede ser significativo, la respuesta del estresor individual puede ser ciertamente cognitivo, conductual, puede causar en algunas mujeres a ser más vulnerables a el estrés que se vive a diario. El impacto de estrés puede tener un rango de carencia del ciclo persistiendo en un margen cualitativo de ciclos (Fink, 2000).

II.2.4 Hipotálamo

El hipotálamo es la parte del diencefalo situada en el piso del tercer ventrículo, detrás del quiasma óptico y por delante del borde posterior de los tubérculos mamilares. En la parte inferior tiene conexión con la hipófisis por el tallo hipofisiario; y por una vía vascular de tipo portal hacia la adenohipófisis, que permite la conexión humoral que regula su función secretora.

El hipotálamo es una estructura compleja con características de glándula de secreción interna, que regula a la adenohipófisis y a través de ella regula asimismo varias funciones metabólicas y reproductivas.

Tiene varias acciones relacionadas con la regulación neuroendocrina, autonómica y conductual, como son: lactancia, reproducción, comportamiento sexual, ingesta de alimentos y de líquidos. Como parte del sistema límbico, participa en el control de las emociones y es, además, un centro regulador del sistema simpático.

La Figura 3 Muestra un corte sagital del hipotálamo, y las múltiples actividades que se estimulan o inhiben cuando se estimulan los correspondientes núcleos hipotalámicos.

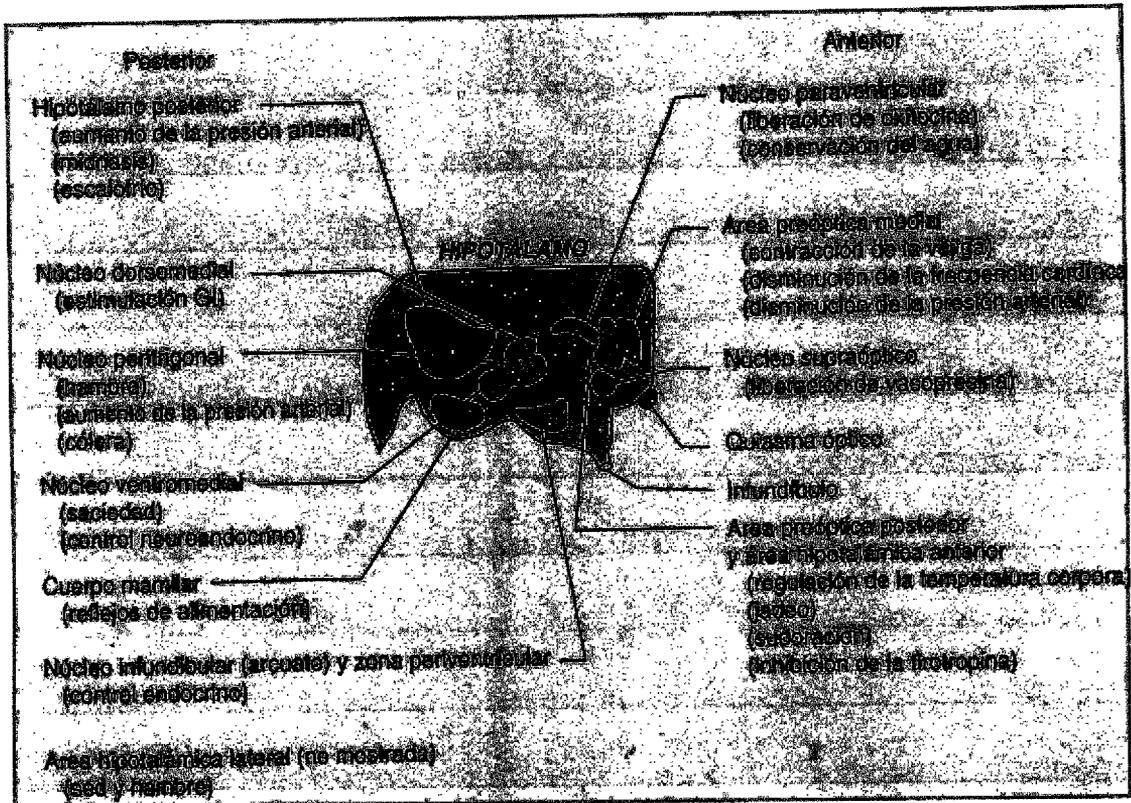


Figura 3. Centros de control del hipotálamo

I.2.5 Hormonas de la hipófisis posterior

Las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular hipotalámicos, producen dos hormonas: la vasopresina, también conocida como hormona antidiurética (ADH), relacionada con la conservación del agua corporal, y la oxitocina que participa en la salida de la leche de la glándula mamaria y el mantenimiento del trabajo de parto. Ambas son nonapéptidos, que se almacenan y circulan asociadas a un acarreador específico: la neurofisina I para la oxitocina y neurofisina II para la vasopresina.

La vasopresina se sintetiza principalmente en los núcleos supraópticos, mientras que la oxitocina se produce principalmente en los núcleos paraventriculares. Cada uno de estos núcleos puede sintetizar como máximo una sexta parte de la segunda hormona en relación con su hormona primaria.

Ambas hormonas son un ejemplo claro de neurosecreción, ya que cuando los impulsos nerviosos se transmiten a lo largo de las fibras desde los núcleos

supraóptico y paraventricular, la hormona es liberada inmediatamente de los gránulos secretores en las terminaciones nerviosas por los mecanismos secretores habituales de exocitosis y es absorbida por los capilares adyacentes. Se excretan conjuntamente tanto la neurofisiña como la hormona pero, dado que su unión es laxa, la hormona se separa casi inmediatamente. Las neurofisinas no tienen una función conocida una vez que abandonan las terminales nerviosas.

II.2.6 Naturaleza química de la vasopresina y de la oxitocina

Tanto la oxitocina como la vasopresina son nonapéptidos. Sus secuencias de aminoácidos son las siguientes:

Vasopresina:

Cis-Tir-Fen-Gln-Asn-Cis-Pro-Arg-GliNH₂

Oxitocina:

Cis-Tir-Ile-Gln-Asn-Cis-Pro-Leu-GliNH₂

La secuencias de aminoácidos de ambas hormonas son casi idénticas (Guyton y Hall, 1997).

II.2.7 Vasopresina

La hormona vasopresina es sintetizada como un precursor molecular por neuronas magnocelulares en el hipotálamo, almacenada en vesículas en los axones terminales en la hipófisis posterior, y liberada dentro de la circulación sistémica en respuesta a estresores específicos alterando el balance hidromineral y homeostasis cardiovascular. La vasopresina se une a receptores tipo VI en el músculo vascular liso para la producción de vasoconstricción y receptores tipo II en el riñón para incrementar la reabsorción de agua y antidiurésis. La síntesis de vasopresina en otras neuronas parvocelulares en el cerebro principalmente a través de receptores tipo VI media varias funciones, modulando la excitabilidad neuronal vía autocrina, paracrina, o transmisión de mecanismos, aumentando la relación de hormona adrenocorticotropina en la hipófisis anterior durante el estrés, inhibiendo respuestas febriles e influenciando cognición y complejo social conductual (Fink, 2000).

II.2.7.1 Regulación de la secreción de vasopresina

La vasopresina está regulada por dos estímulos principales: la osmolaridad del plasma y el volumen circulante. El primero es el más importante: los cambios de osmolaridad en un rango de 1 a 2% de la cifra normal o sea un incremento mayor a 280 mOsm/l (umbral osmótico), aumentan progresivamente la secreción de vasopresina. Los receptores de cambios osmóticos se localizan en regiones irrigadas por la carótida interna, probablemente en las propias neuronas secretoras, o áreas cercanas.

Cuando los núcleos supraóptico y paraventricular son estimulados por los cambios de osmolaridad u otros factores, los impulsos nerviosos descienden por estas terminaciones nerviosas alterando la permeabilidad de la membrana y aumentando la entrada de calcio. La vasopresina liberada es posteriormente conducida por la sangre capilar de la hipófisis posterior a la circulación sistémica. La secreción de vasopresina en respuesta a un estímulo osmótico es tan rápida que sus niveles en sangre pueden duplicarse varias veces en minutos, lo que constituye una rápida vía para modificar la excreción renal de agua.

Una segunda zona importante a la hora de controlar la osmolaridad plasmática y la secreción de vasopresina es una región amplia ubicada a lo largo de la pared anteroventral del tercer ventrículo, llamada región AV3V.

En la parte superior de la misma hay una estructura que recibe el nombre de órgano subfornical y en la parte inferior otra que recibe el nombre de órgano vasculoso de la lámina terminal. Entre estas dos estructuras se encuentra el núcleo preóptico mediano, que tiene múltiples conexiones nerviosas con ellos, así como con el núcleo supraóptico y con los centros de control de la presión arterial del bulbo raquídeo. La lesión de la región AV3V da lugar a múltiples alteraciones en el control de la secreción de vasopresina, de la sed, del apetito de sodio y de la presión arterial. La estimulación eléctrica de esta región, así como por la angiotensina II, pueden modificar la secreción de vasopresina, la sed y el apetito de sodio.

En la vecindad de esta región AV3V y del núcleo supraóptico existen neuronas que son estimuladas por pequeños aumentos de la osmolaridad del

líquido extracelular; de ahí que se emplee el término osmorreceptores para referirse a estas neuronas. Dichas células envían señales nerviosas al núcleo supraóptico para controlar su activación y la secreción de vasopresina. También es probable que provoquen sed como respuesta al aumento de la osmolaridad del líquido extracelular.

Tanto el órgano subfornical como el órgano vasculoso de la lámina terminal tienen una vascularización que carece de la característica barrera hematoencefálica, presente en cualquier parte del cerebro. Esta característica facilita la difusión de la mayoría de los iones desde la sangre al tejido cerebral. Esto permite que los iones y otros solutos pasen desde la sangre al líquido intersticial de esta región.

En consecuencia, los osmorreceptores ubicados en esas áreas, responden a los cambios de la osmolaridad del líquido extracelular, ejerciendo un intenso control sobre la secreción de vasopresina y sobre la sed.

II.2.7.2 El sistema de retroalimentación osmorreceptores-vasopresina

1.- El aumento de la osmolaridad del líquido extracelular (que en términos prácticos supone un incremento en la concentración plasmática de sodio) hace que se contraigan unas células nerviosas especializadas células osmorreceptoras, situadas en el hipotálamo anterior próximas al núcleo supraóptico.

2.- La contracción de las células osmorreceptoras hace que estas se disparen y envíen señales nerviosas a las neuronas del núcleo supraóptico, que a su vez transmiten estas señales a través del tallo hipofisiario a la hipófisis posterior.

3.- Estos potenciales de acción conducidos a la hipófisis posterior estimulan la liberación de vasopresina, que está almacenada en gránulos (o vesículas) secretorios en las terminaciones nerviosas.

4.- La vasopresina entra en el torrente circulatorio y llega a los riñones, donde aumenta la permeabilidad al agua en la porción terminal de los túbulos distales, en los túbulos colectores medulares.

5.- Este aumento de permeabilidad en los segmentos de la nefrona distal ocasiona un aumento en la reabsorción de agua y la excreción de un pequeño volumen de orina concentrada (Guyton y Hall, 1997).

II.2.8 Oxitocina

II.2.8.1 Regulación en la secreción de oxitocina

La síntesis de la oxitocina se lleva a cabo en las neuronas magnocelulares de los núcleos supraópticos (SON) y paraventricular (PVN) del hipotálamo. Esta hormona es liberada de las terminales a nivel de la hipófisis posterior hacia la circulación. Las principales acciones descritas para la oxitocina son las contracciones uterinas durante el parto y la salida de la leche de la glándula mamaria durante la lactancia. Asimismo, la oxitocina es también producida por las neuronas parvocelulares localizadas primeramente en el núcleo paraventricular hipotalámico. Estas neuronas envían proyecciones a todo el cerebro y la médula espinal. La oxitocina es liberada desde estas terminales asumiendo varias funciones de neurotransmisión, incluyendo la iniciación de la conducta sexual y materna y, efectos sobre la memoria, humor, ansiedad, nocicepción, olfacción, y apetito de sal.

Estos efectos son mediados por receptores específicos para oxitocina. El receptor de oxitocina es un miembro de la familia de receptores acoplados a la proteína G y de señales primarias en el acoplamiento para una proteína G del tipo Gq/11. Los receptores de oxitocina exhiben, en muchas de las especies estudiadas, un patrón específico de distribución en el cerebro y es altamente regulado en un sitio específico en respuesta a los esteroides gonadales y durante el desarrollo.

Dado que el patrón de distribución en la expresión del gen para los receptores a oxitocina es una determinante importante de la acción central de la oxitocina, las variaciones de los marcadores en las diversas especies con respecto a esta distribución excluye extrapolaciones simples de los roedores para los humanos. No obstante, se ha propuesto que la oxitocina es un modulador de conductas específicas relacionadas con las interrelaciones personales.

Considerando estas hipótesis sobre las acciones de la oxitocina en el sistema nervioso central, se ha propuesto que esta hormona puede estar involucrada en patologías conductuales en los humanos, tales como autismo, depresión, personalidad obsesivo compulsiva (Donald y col., 2002).

II.3 Gen Temprano *c-fos* en el Sistema Nervioso Central

Los genes de respuesta temprana fueron originalmente descritos en el campo de la regulación del crecimiento. Estos son rápidamente inducidos por estímulos extracelulares y codifican proteínas necesarias para eventos que ocurrirán en la célula (Curran y Morgan, 1995). A la fecha han sido identificadas principalmente 4 proteínas de la familia Fos: *c-Fos*, FosB, Fra-1 y Fra-2 (Greenberg y Ziff, 1984; Zerial y col., 1989; Cohen y Curran, 1988; Nishina y col., 1990). Estas proteínas son codificadas por genes que contienen cuatro exones y tres intrones (Van Beveren y col., 1983). Poseen un cierre de leucina que promueve la heterodimerización con miembros de la familia Jun (*c-jun*, JunB y JunD) para formar un factor de transcripción llamado proteína activadora-1 (AP-1 por sus siglas en inglés), (Hughes y Dragunow, 1995).

La inducción de la expresión de *c-fos* en el SNC se ha determinado tanto a nivel del RNAm, como a nivel de la proteína mostrando resultados similares tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Estímulos que inducen la expresión de *c-fos* son la actividad eléctrica intracerebral en las células granulares del hipocampo (Dragunow y Robertson, 1987); la estimulación sensorial periférica en neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Hunt y col., 1987) o por privación de agua durante 24 horas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo que participan en el control de la sed (Sagar y col., 1988).

Varios estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* de secciones de cerebro han revelado una significativa especificidad anatómica y temporal de la expresión de *c-fos*, permitiendo mapear vías de excitación en el sistema nervioso central. Por ejemplo se ha observado que en regiones de la corteza (piriforme y cingulada) y en el sistema límbico, la máxima expresión de *c-fos* se da a los 60

minutos después del estímulo con metrazol y regresa sus niveles basales a los 189 minutos (Dragunow y Robertson, 1987; Sagar y col., 1988).

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, privación de alimento, trauma, etc.), el incremento en la expresión del gen *c-fos* y su proteína Fos se han propuesto como marcadores de actividad neuronal o como herramienta para el mapeo metabólico a nivel celular (Sheng y Greenberg, 1990; Morgan y Curran, 1991; Mistry y col., 1994; Svenningsson y col., 1995).

II.3.1 Generalidades del proto-oncogen *c-fos*

Los proto-oncogenes son genes celulares normales que al presentar mutaciones pueden transformarse en oncogenes activos.

Si una mutación en un gen de proliferación causa la sobreexpresión o la hiperactividad de su producto, tendremos como resultado una proliferación celular excesiva característica del cáncer. En estos casos se clasifica el gen mutante como un oncogén (es decir un gen que provoca cáncer) y el gen de proliferación normal se denominará proto-oncogen. Los genes de respuesta rápida mejor estudiados, son los proto-oncogenes *fos* y *jun*, los cuales codifican proteínas reguladoras de genes que actúan como homo o heterodímeros (Bruce y col., 1994).

Los proto-oncogenes se clasifican funcionalmente en tres grandes categorías:

- a) Factores de crecimiento y sus receptores
- b) Mediadores de las vías de transducción de las señales intracelulares y
- c) Factores de transcripción (Bishop, 1987)

La interacción y la cooperación entre los productos de las diferentes clases de proto-oncogenes juegan un papel muy importante durante el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo celular. Algunos proto-oncogenes que codifican para proteínas nucleares son: *myc*, *myb*, *fos*, *jun*, *erbA*, *ski*, *rel* y E1A.

El proto-oncogen *c-fos* originalmente fue descrito como el homólogo celular del oncogen presente en el retrovirus murino FBJ-MuSV (Van Beveren y col., 1983). *c-fos* pertenece a una familia de genes conocidos como genes de expresión temprana, esto 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 es 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 (Curran y Franza, 1998).

Este heterodímero (Fos/Jun) funciona como un factor de transcripción, el cual se une específicamente a una secuencia del ADN. Al unirse al ADN se activa el sitio AP-1, el cual regula la expresión de varios genes relacionados con el crecimiento, la reparación y la replicación del genoma. Las proteínas Fos y Jun son miembros de una gran familia de factores de transcripción, los cuales al coordinar grupos y subgrupos de genes posibilitan a las células para responder a las demandas ambientales (Ganong, 1998).

Existen dos características de la expresión de *c-fos* que ponen a este gen de acción temprana como una excelente herramienta de mapeo:

- 1.- Los bajos niveles de transcripción de *c-fos* bajo condiciones basales y
- 2.- Su inductibilidad ante un amplio rango de estimulación trans-sináptica/transcripcional.

En condiciones basales, el RNA mensajero (RNAm) de *c-fos* y la proteína Fos se encuentran en niveles muy bajos (Hughes y col., 1992). En cultivos celulares así como en varias regiones cerebrales *in vivo* el RNAm es inducido en un par de minutos después del estímulo y el pico se encuentra entre 30 y 60 minutos. El nivel máximo de la proteína Fos ocurre entre 1 y 3 horas y desaparece gradualmente del núcleo celular entre 4 y 3 horas después del tratamiento (Sonnenberg y col., 1989;

Chan y col., 1993; Imaki y col., 1993; Ding y col., 1994; Ikeda y col., 1994; Cullinan y col., 1995; Kovács y Sawchenko, 1996; Kovács, 1998).

Se considera que la inducción de Fos refleja la actividad funcional de las neuronas (Sagar y col., 1988; Dragunow y Faull, 1989; Duncan y col., 1993). Sin embargo, áreas con altos niveles de actividad neuronal, por ejemplo la corteza visual (Kaczmarek y Chaudhuri, 1997) o células neurosecretoras magnocelulares durante la succión (Fenelon y col., 1993), no muestran una expresión significativa de *c-fos*; por lo tanto, parece que la sola actividad no es suficiente para inducir la respuesta de este gen. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la expresión de *c-fos* depende de las características temporales de los patrones de disparo de los potenciales de acción. En cultivos de células ganglionares de la raíz dorsal, incrementos grandes y sostenidos del calcio intracelular o altos niveles de calcio separados por largos intervalos de disparos producen muy poca expresión de *c-fos*. La activación de este gen fue inversamente correlacionada con el intervalo de disparo de los potenciales de acción (Fields y col., 1997).

A nivel de sistema, la estimulación de entradas sensoriales (aferencias), como la visual, a una intensidad normal no provoca la inducción de *c-fos*. Así mismo la estimulación en la corteza visual provoca expresión de *c-fos* solo después de un periodo de privación sensorial y cuando las ratas son expuestas a un objeto novedoso (Kaczmarek y Chaudhuri, 1997). Una estimulación auditiva a diferentes intensidades no activa la expresión de *c-fos* en comparación con una situación de ruido de fondo, pero esta expresión está activada de una forma dependiente de la intensidad en estructuras relacionadas a la audición (Campeau y Watson, 1997).

El patrón de expresión de Fos es específico para el tipo de estímulo aplicado. Por ejemplo, en experimentos donde se inyectan ratas con una solución hipertónica y se sacrifican después de 30 minutos, se han localizado muchas células inmunoreactivas a Fos en el órgano subfornical, estructura circunventricular del cerebro involucrada en la regulación de los fluidos corporales (Giovannelli y Bloom, 1992).

De manera similar se ha observado en investigaciones sobre tareas motoras o hipertermia en ratas, que después del estímulo hay una gran cantidad de neuronas inmunoreactivas a Fos en regiones cerebrales implicadas con esos estímulos y no en otras áreas (Scammell y col., 1993).

Lo anterior pone de manifiesto que las regiones donde la actividad neuronal es detectada, por la expresión de la proteína Fos, depende del tipo de estímulo aplicado. Por lo tanto, la detección de las proteínas producidas por genes tempranos como *fos*, refleja las regiones neuronales involucradas en el procesamiento neuronal de un estímulo determinado.

Existe un número de factores que inducen la expresión de *c-fos*:

1. Factores neurotróficos
2. Neurotransmisores
3. Despolarización
4. Incremento del flujo de calcio de elevación del calcio intracelular e intranuclear

Los genes de respuesta temprana (IEGs, por sus siglas en inglés); *c-fos* y otros genes incluyendo *c-jun*, *junF* y *zif/268* (*erg-1*), son fuerte y rápidamente inducidas en respuesta a una variedad de estímulos neurales.

La falta de expresión y niveles altos de inducción contribuyen a una alta sensibilidad de la inmunohistoquímica para la detección de *c-fos* y más recientemente la hibridación *in situ* para sus mRNA por lo que éstas son herramientas de gran utilidad para mapear células y circuitos activados por los neurotransmisores, drogas, factores de crecimiento, citocinas y por daños. El mayor problema con el uso de IEGs para mapear la activación celular son la falta de respuesta de éstos a neurotransmisores inhibidores, la observación de que no todas las células tipo expresan *c-fos* (Zigmond y col., 1999).

Así, la detección inmunohistoquímica del producto del oncogen *c-fos*, se ha utilizado ampliamente como un marcador de actividad neuronal que ocurre en

respuesta a una gran variedad de estímulos homeostáticos o sensoriales, por todas las características mencionadas anteriormente (Kovács, 1998).

II.3.2 Estructura del proto-oncogen *c-fos*

La proteína que es codificada por el gen de *c-fos* es una fosfoproteína nuclear que está constituida por 380 aminoácidos. La proteína tiene una vida media corta (20-90 minutos) y contiene un dominio en el que se repiten periódicamente cada 7 aminoácidos un residuo de leucina. A este dominio se le denomina "zipper" de leucina. Adyacente al zipper se encuentra un dominio rico en aminoácidos básicos. Cuando la región del zipper de leucina es arreglada en una α -hélice, los residuos de leucina quedan alineados a lo largo de una cara de la hélice. Los residuos de leucina de una α -hélice interaccionan con los residuos de leucina presentes en 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, tales como las proto-oncoproteínas Fos, Myc, y Jun, los factores de transcripción de la levadura GCN4 y AP-1 y la proteína que se une al elemento de respuesta a cAMP (CREB). Esta región conservada está compuesta por dos estructuras: una región rica en aminoácidos básicos (arginina y lisina) y el zipper de leucina (Hope y Struhl, 1987; Kouzarides y Ziff, 1998; Dang y Lee, 1989).

Se ha demostrado que el dominio del zipper de leucina es necesario para que Fos forme un heterodímero con miembros de la familia Jun llamado AP-1 (Sassone-Corsi y col., 1988). Sin embargo la presencia de un zipper de leucina no es un factor suficiente para la formación de dímeros. Fos forma homodímeros y ni Fos ni Jun pueden formar dímeros con GCN4. Todas las proteínas de la familia de Jun (*c-Jun*, JunB y JunD) pueden formar tanto dímeros como heterodímeros, mientras que las proteínas de la familia de Fos (*cFos*, FosB, Fra1 y Fra2) no son capaces de asociarse entre sí, solamente se asocian con las proteínas de la familia de Jun.

Todos los diferentes complejos que se forman reciben el nombre de AP-1 (O'Shea y col., 1989).

En Fos se han localizado en el extremo carboxilo-terminal, después de la región del zipper de leucina, tres regiones involucradas en la transactivación de la transcripción. Dos de estas regiones son homólogas a dos de las regiones de activación de Jun ubicadas hacia el extremo amino-terminal y reciben el nombre de HOB1 y HOB2 (Homology Box 1 y 2) (Sutherland, 1992). Adicionalmente a las tres regiones mencionadas anteriormente se ha determinado otro dominio de transactivación en Fos ubicado en el extremo amino-terminal (Jooss y col., 1994).

II.3.3 Regulación de la expresión del proto-oncogen *c-fos*

La expresión del proto-oncogen *c-fos* es inducida por una gran variedad de agentes y estímulos, tales como mitógenos, factores de diferenciación y de crecimiento, agentes farmacológicos específicos (ésteres de forbol, bario y ácido fosfatídico) así como por estrés y choque calórico. La inducción es rápida y transitoria y ocurre a nivel de la transcripción. La expresión del gen *c-fos* aparece pocos minutos después del estímulo, alcanzando su nivel máximo entre 30 - 120 minutos y es indetectable después de 3 a 8 horas dependiendo del tipo celular que se trate y del estímulo (Ransone y Verna, 1990). La expresión de *c-fos* se lleva a cabo aún en la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas; se ha observado que el tratamiento con estos inhibidores resulta en la superinducción de *c-fos* debido a la estabilización del RNA mensajero (RNAm) y a la eliminación de la autorepresión de la transcripción (Angel y Karin, 1991).

Se conoce que algunos de los agentes que inducen la expresión de *c-fos* activan las vías de transducción de señales que involucran tanto a la proteína cinasa C como a la proteína cinasa A dependiente de AMP cíclico (cAMP).

El análisis de la región promotora del gene *c-fos* de la rata (Wang y Howells, 1994), ver Figura 4, revela la presencia de un elemento de respuesta dependiente de cAMP (CREs) entre las posiciones -60 a -35 (respecto al sitio de inicio de la transcripción) el cual es requerido para la inducción de *c-fos* por agonistas de la vía del adenilato ciclasa.

Localizado entre las posiciones -308 a -289 se encuentra el elemento de respuesta a suero (SRE), es esencial para la inducción por suero así como por diversos factores de crecimiento: epidérmico (EGF), de fibroblastos (FGF), derivado de plaquetas (PDGF) y el nervioso (NGF). También por esteroides de forbol, por luz ultravioleta y por los oncogenes *src* y *ras* (Ransone y Verma, 1990).

La proteína de 67 KDa que se une al SRE es llamada factor de respuesta al suero (SRF), actuando como dímero y requiere de fosforilaciones para la activación transcripcional de genes que contienen en su región promotora SRE. Otra proteína de 62 KDa también ha sido implicada en la unión a SRE ya que forma un complejo terciario con SRF. Inmediatamente hacia el extremo 3' de SRE, entre las posiciones -288 a -282, hay un sitio AP-1 capaz de unir los complejos Fos/Jun. El elemento inducible-sis (SIE) se encuentra entre las posiciones -341 a 327, a este sitio se le une el factor inducible-sis, el cual se activa en respuesta al tratamiento con *c-sis*/PDGF. Una secuencia similar al GRE se encuentra entre las posiciones -268 a -254. la secuencia de la región 5' del gen de *c-fos* está altamente conservado: en el gen de rata es de 93% idéntico al del ratón y 77% idéntico al del humano (Weisz y Rosales, 1990; Hyder y col., 1991).

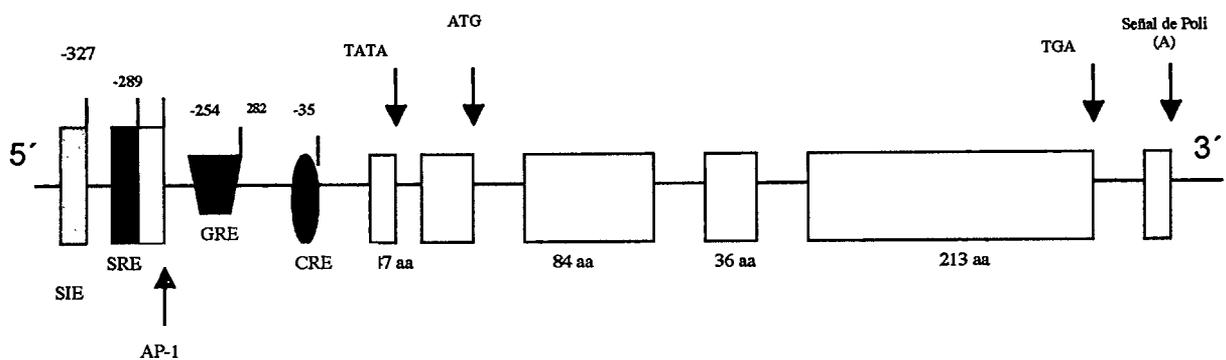


Figura 4. Estructura del gen *c-fos*. Diagrama esquemático del proto-oncogen *c-fos* de la rata en el que se presenta la localización de diferentes elementos reguladores: SIE, elemento inducible-sis; SER, elemento de respuesta a suero; GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides; CRE, elemento de respuesta a *cAMP*; AP-1, elemento de respuesta a la proteína activadora-1 (Wang y Howells, 1994).

II.3.4 Regulación de la expresión de *c-fos* por hormonas esteroideas

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 controlando diferentes funciones cerebrales (Maggi y Pérez, 1985).

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 al estímulo hormonal incrementando su transcripción (Loose-Mitchell y col., 1998).

Se ha observado que el útero de las ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas con 17 β -estradiol se induce la expresión de los proto-oncogenes nucleares *c-myc*, *n-myc* (Murphy y col., 1987), *c-fos*, *c-jun*, *jun-B* y *jun-D* (Cicatiello y col., 1992). En el caso de estos proto-oncogenes su RNAm comienza a incrementarse de 15 a 30 minutos después del tratamiento hormonal, en el caso de *c-fos*, *n-myc*, *c-jun* y *jun-D*; y para *c-myc* y *jun-B*, el incremento se observa de 60 a 90 minutos después de la administración de la hormona. Con estas observaciones se ha buscado una explicación al efecto modulador de los estrógenos sobre los proto-oncogenes.

En el caso de *c-fos* se ha observado que presenta un primer pico máximo de expresión (10 a 40 veces) de 30 a 180 minutos después del tratamiento con E₂, bajando los niveles basales a las 18 horas y registrándose un segundo pico de expresión (5 a 8 veces) de las 24 a las 33 horas después de la administración hormonal en el útero y en el cerebro de rata OVX (Loose-Mitchell y col., 1998; Cattaneo y Maggi, 1990). La explicación para este segundo pico de expresión se podría deber a la inducción tardía de estos proto-oncogenes por factores de crecimiento (Huet-Hudson y col., 1990; Curtis y col., 1996).

Los efectos de los estrógenos sobre la regulación de la expresión de proto-oncogenes nucleares son tejido-específico, ya que se ha determinado que la expresión de algunos proto-oncogenes no es inducida por E₂ en pulmón, riñón, hígado, músculo, bazo, corazón e intestino grueso (Murphy y col., 1987; Weisz y

Rosales, 1990). Estas diferencias entre los diversos tejidos puede ser debido a los requerimientos de factores de transcripción tejido-específico importantes para su regulación (Schuchard y col., 1993). Así mismo se ha observado, que estos efectos también son hormona específicos, ya que mientras los estrógenos inducen la expresión de algunos proto-oncogenes (incluido *c-fos*) en el útero de las ratas OVX, otras hormonas como glucocorticoides, andrógenos o progesterona no inducen la expresión de estos genes (Loose-Mitchell y col., 1998).

Se ha detectado la proteína Fos en otras áreas del cerebro que no son blanco principal para los estrógenos durante el ciclo estral de algunos roedores, como en las neuronas noradrenérgicas del núcleo medial del tracto solitario de la rata donde la expresión de Fos se presenta de manera significativa durante el proestro y el estro, mientras que en el diestro la expresión es baja (Berriman y col., 1992; Jennes y col., 1992).

II.3.5 Uso de *c-fos* en estudios de inmunohistoquímica sobre las funciones cerebrales

Muchas neuronas son conocidas por expresar *c-fos* solamente durante la activación sináptica; por lo tanto, el RNAm o la proteína producto (Fos) del gene *c-fos* puede usarse como un marcador de la activación neuronal en el cerebro. La proteína resultante es especialmente útil porque es fácilmente detectada por anticuerpos específicos dirigidos contra ella. Este marcaje inmunohistoquímico permitió a los investigadores determinar cuales de las neuronas son activadas en el cerebro en respuesta a estímulos específicos dados en animales de experimentación.

Por ejemplo, las neuronas magnocelulares que producen vasopresina y oxitocina expresan *c-fos* en respuesta a un alcance extenso de un estímulo excitatorio, incluyendo la hiperosmolaridad, hipovolemia, hipotensión, estrés, administración sistémica de colecistoquinina (CCK). Muchos de los estudios iniciales de estos estímulos localizaron simplemente la expresión de IEGs en las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico y del núcleo paraventricular, pero

estudios posteriores usaron anticuerpos contra proteínas localizadas en el citoplasma, además de anticuerpos contra los productos IEGs y mostraron que los productos IEGs fueron también localizados en el núcleo (Donald y col., 2002).

B) Antecedentes Específicos

II.4 Respuesta de los Núcleos Paraventricular y Supraóptico al Estrés Osmótico

La expresión de *c-fos* es activada por la estimulación osmótica en varias neuronas, (Giovannelli y col., 1990). En condiciones normales las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) sintetizan principalmente vasopresina y oxitocina. La estimulación osmótica puede evocar la expresión de Fos en el PVN y SON (Kiss y col., 2004).

El estrés osmótico induce la expresión de *c-fos* en las neuronas oxitocinérgicas en el PVN y SON del cerebro de la rata macho, que se comprobó por medio de una inyección de solución salina hipertónica con la cual se indujo la expresión de *c-fos* en los núcleos PVN y SON hipotalámicos (Giovannelli y col., 1992). Las técnicas de doble marcaje revelaron que la mayoría de las ratas tratadas con salina hipertónica fueron positivas a *c-fos* en el SON y PVN en un lapso de 90 minutos después del estímulo osmótico; exhibiendo actividad citoplasmática para oxitocina (Giovannelli y col., 1990). Después de los 30 minutos del estímulo, cerca del 80 % de las células oxitocinérgicas mostraron la expresión de *c-fos*, en el PVN mostrando la expresión de Fos tanto en la división magnocelular como parvocelular, aproximadamente un 53 % en las neuronas magnocelulares y un 67 % en la división parvocelular (Giovannelli y col., 1992). Aproximadamente el 70 % de las neuronas oxitocinérgicas en el SON contienen inmunoreactividad a *c-fos*, y el 60 % de las neuronas oxitocinérgicas fueron observadas en el PVN (Giovannelli y col., 1990).

El conteo de células en los núcleos PVN y SON en diferentes tiempos después de la estimulación mostró que las células oxitocinérgicas en ambos

núcleos son activadas 30 minutos después de la inyección con salina hipertónica, en un tiempo de 15 minutos después del estímulo la respuesta a *c-fos* es baja, y el efecto desaparece de 3 a 6 horas no únicamente en los núcleos PVN y SON, sino también en el resto del sistema oxitocinérgico. Tanto en los núcleos PVN y SON la máxima activación que se alcanzó fue en un rango de 30 a 90 minutos. En el PVN la expresión de *c-fos* disminuye significativamente a los 180 minutos, en comparación con el SON donde el porcentaje de activación de células oxitocinérgicas a los 180 minutos ya es inmóvil. Bajo las mismas condiciones 30 minutos después del cambio osmótico, las neuronas vasopresinérgicas también muestran una elevada expresión de *c-fos*.

Un alto porcentaje de neuronas oxitocinérgicas expresan Fos sobre la estimulación osmótica en el SON y PVN, con 92 % y 59 % respectivamente. En el PVN, las neuronas oxitocinérgicas representan cerca del 40 % de las células que expresan Fos 30, 45 y 90 minutos después de la inyección hipertónica. En el SON el porcentaje de células marcadas para Fos donde las células oxitocinérgicas son cerca del 30 % a los 30 y 45 minutos, 70 % a los 90 minutos y 30 % a los 180 minutos. Las neuronas oxitocinérgicas experimentan una activación metabólica sobre la estimulación osmótica en todas las regiones nucleares del hipotálamo de la rata (Giovannelli y col., 1992).

La lactancia está asociada con un complejo de cambios morfológicos y fisiológicos del sistema neurohipofisial hipotalámico, y su relación dentro del núcleo SON y PVN puede servir como un signo de comunicación entre el núcleo magnocelular y la lactancia de las ratas. La reducción de los osmorreceptores de los sistemas oxitocinérgico y vasopresinérgico, en ratas lactando es reflejado por la reducción de la relación de oxitocina dentro del SON hipotalámico después de la estimulación osmótica. Aunque la pre-estimulación de los niveles de oxitocina difiere significativamente entre los animales vírgenes y lactantes, está incrementada en ambos después de la estimulación. El incremento de oxitocina en el SON alcanza una relación estadísticamente significativa en ratas lactando, pero no en ratas virgen, ni en ratas macho (Neumann y col., 1995).

II.5 Neuronas de Oxitocina en el Hipotálamo de la Rata Demuestran Inmunorreactividad a *c-fos* en Estrés Osmótico.

Se ha estudiado a la oxitocina y la expresión de la proteína *c-fos* en el cerebro por medio de doble inmunomarcaje para evaluar las respuestas al estrés osmótico de las neuronas oxitocinérgicas *in vivo*. La inmunorreactividad de *c-fos* fue detectada en un subgrupo de neuronas oxitocinérgicas, también en otras neuronas sin inmunorreactividad para oxitocina, a los 90 minutos después de la inyección intraperitoneal de solución hipertónica salina. La expresión de *c-fos* se encontró en aproximadamente 70% de neuronas inmunorreactivas de oxitocina en el SON, en la subcomisura lateral y en el PVN. El porcentaje máximo de la expresión de inmunorreactividad similar de *c-fos* en neuronas oxitocinérgicas con estrés osmótico se encontró en el 80% en el SON y PVN y en la subcomisura lateral, 60 % en el PVN y 50 % en el área preóptica media. Fueron encontradas neuronas oxitocinérgicas activadas tanto en las divisiones magnocelulares como en las parvocelulares del sistema. Estos datos demuestran que los núcleos hipotalámicos de oxitocina en la rata son activados diferentemente por estrés osmótico. Ello sugiere el papel de la oxitocina en la respuesta central y humoral para los cambios de osmolaridad plasmática (Giovannelli y col., 1990).

III. HIPÓTESIS

Los estrógenos van a aumentar la respuesta de las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas ante la presencia de estrés osmótico, por lo que esperamos detectar variaciones durante el ciclo estral de la rata, especialmente en la fase del proestro.

IV. OBJETIVOS

IV. 1 General

Analizar la expresión de *c-fos* en los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico, como indicador de activación neuronal en respuesta ante un estrés osmótico sistémico, y determinar si existen variaciones a dicha respuesta durante las diferentes fases del ciclo estral de la rata.

IV.2 Específicos

- Determinar la expresión de *c-fos* en los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico, en respuesta al estrés osmótico.
- Determinar la expresión de *c-fos* en núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico, en las diferentes fases del ciclo estral.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales:

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cajas de Petri
- Micropipetas

V.1.1 Soluciones y Reactivos:

- Hidrato de cloral 35 mg/kg (anestésico)
- Solución salina al 0.9 %
- Buffer de fosfatos 0.02 M (KPBS)
- Solución de paraformaldehído al 4 % en buffer de boratos 0.1 M (pH 9.5, 10 °C)
- Sacarosa al 10 % en buffer de fosfatos 0.02 M
- Solución de tritón al 0.3 % en KPBS
- Anticuerpo primario (Ab de conejo α *c-fos*, Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz) en dilución 1 :5000 en KPBS + Tritón 0.3 % + Suero Normal de Cabra (NSG)
- Anticuerpo secundario biotinilado (antisuero biotinilado de cabra anti-conejo, Vector Laboratories) en dilución 1 :200 en KPBS + 0.3 % Tritón + Suero Normal de Cabra (NSG) a temperatura ambiente
- Complejo Avidina-Biotina (Kit Elite, Vector)
- Buffer de acetato de sodio
- Solución de Diaminobencidina
- -D(+)-Glucosa
- Cloruro de amonio
- Sulfato de níquel amonio (NAS)
- Glucosa oxidasa
- Adhesivo poli-lisina-L

- Alcohol al 50 %, 70 %, 95 % y 100 %
- Xileno
- Resina Entellan
- Colorante Cristal-Violeta al 0.25 %
- Acido acético

V.1.2 Aparatos:

- Congelador
- Horno
- Microscopio de la marca Zeiss
- Microscopio con cámara digital integrada (Optronics) y computadora

V.2 Métodos:

V.2.1 Procesamiento de los Tejidos e Histología

Después del experimento correspondiente, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (35 mg/Kg) y perfundidos vía intracardíaca con solución salina seguida de 200-300 ml de paraformaldehído al 4 % en buffer de boratos 0.1 M (pH 9.5, 10 °C), esto se realizó con el fin de prevenir procesos de autólisis y el ataque bacteriano, así como el de evitar los cambios de forma y de volumen de los tejidos y la preservación de los mismos para permitir su procesamiento y su conservación sin pérdida o modificación de la estructura.

Los cerebros fueron postfijados y crioprottegidos en solución de sacarosa al 10 % en buffer de fosfatos durante 24 horas a 4°C. El hipotálamo fue obtenido y cortado en rebanadas coronales de 30 micras de espesor (5 series). Estos tejidos fueron preservados en solución crioprotectora fría y almacenados a -20°C hasta el procesamiento histoquímico.

V.2.2 Inmunohistoquímica.

La detección inmunohistoquímica de la proteína Fos se realizó usando un antisuero policlonal (Santa Cruz, California, EUA) purificado por afinidad, inducido en conejo contra un péptido sintético correspondiente a los residuos 4-17 de la porción N-terminal de la proteína Fos humana, el cual no muestra actividad cruzada con cualquier antígeno identificado que esté relacionado con la proteína Fos.

El revelado de la proteína *c-fos* se realizó usando una técnica convencional de peroxidasa asociada con avidina-biotina ya que da una mayor sensibilidad en términos de la cantidad de marca enlazada al sitio antigénico.

Esta técnica se realizó de la siguiente manera:

1. Los cortes de tejido se lavaron en Buffer de fosfatos 0.02 M (KPBS) dos veces durante 10 minutos.
2. Después se colocaron en una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 10 minutos.
3. Se lavaron en KPBS dos veces durante 10 minutos.
4. Se colocaron en una solución de borohidruro de sodio al 1% en KPBS durante 6 a 8 minutos.
5. Después se lavaron en KPBS cada 5 minutos (5 veces).
6. Se lavaron en KPBS cada 10 minutos hasta lograr la desaparición total de burbujas.
7. Se colocó el tejido en el Ab primario por 48 hrs. a 4°C en dilución 1:5000.
8. Luego se lavó en KPBS dos veces durante 10 minutos.
9. El tejido se puso en el Ab secundario biotinilado, y se incubó por 45 a 60 minutos a temperatura ambiente.
10. Se colocó en KPBS dos veces durante 10 minutos.
11. Luego, el tejido se colocó en el complejo Avidina-Biotina (ABC) Kit Elite (Vector Laboratories). Se incubó a temperatura ambiente por una hora.

12. Se realizó un enjuague en KPBS dos veces durante 10 minutos.
13. Después se lavó en buffer de acetato de sodio 0.1 M a pH 6.0, 2 veces por 10 minutos.
14. Se colocó el tejido en la solución de diaminobencidina 0.05% (DAB), Glucosa Oxidasa 0.0015%, D-Glucosa 0.1 M, Cloruro de Amonio 7.5 mM, Sulfato de Níquel 5% en buffer de acetato de sodio 0.1 M hasta que cambió a un color púrpura / café ligero.
15. Se detuvo la reacción con lavados en buffer de acetato de sodio 0.1 M a pH 6.0
16. Posteriormente se lavó en acetato de sodio 0.1 M a pH 6.0, 2 veces por 10 minutos.
17. Se lavó en KPBS 2 veces por 10 minutos.
18. Finalmente, se montó el tejido en laminillas gelatinizadas.
19. Estas se dejaron secando durante la noche en el horno a 37°C.

Después se realizó una deshidratación y eliminación de grasa en el tejido siguiendo el procedimiento siguiente:

1. Las laminillas se dejaron en agua durante 3 minutos.
2. Después se pasaron a una solución de alcohol al 50% durante 3 minutos.
3. Luego, a una de alcohol al 70% por 3 minutos.
4. Se colocaron en alcohol al 95%, 2 veces durante 3 minutos.
5. Finalmente, se colocaron en alcohol al 100%, 3 veces durante 3 minutos, llevándose a cabo una deshidratación completa.
6. La eliminación de grasa se llevó a cabo colocando las laminillas en xileno durante 3 minutos y después con más xileno durante 10 a 15 minutos.
7. A continuación, se cubrieron las laminillas con resina Entellan colocando el cubreobjetos, esto con el propósito de que no se dañe la

preparación al estarla observando al microscopio, por lo que se dejaron secar bien.

8. El análisis se determinó mediante imágenes obtenidas con un microscopio al cual se le conectó una cámara digital y computadora.

V.2.3 Tinción de Nissl

Una de las series de tejido colectadas fue procesada con la tinción de Nissl para referencia anatómica como se indica. El tejido se sacó de la solución anticongelante y se lavó 2 veces con KPBS por 10 minutos. Se montó en laminillas gelatinadas y se dejaron secar una noche.

La tinción se efectuó de la siguiente manera:

1. Se llevó a cabo la deshidratación del tejido como se mencionó anteriormente en soluciones crecientes de alcohol (50-100%).
2. Después se eliminó la grasa con xileno con dos cambios; primero se dejaron 5 minutos y después 30 minutos.
3. Luego se pusieron dos minutos en cada una de las soluciones de manera inversa, hasta el punto número 1.
4. Se sumergieron de 8 a 20 veces en el colorante cristal-violeta 0.25%.
5. Finalmente, se sumergieron 20 veces en agua, alcohol al 50%, alcohol al 70% y seis minutos en alcohol al 95%.
6. Si era muy fuerte el color, se colocaban en ácido acético de uno a cinco minutos, sólo si era necesario.
7. Si era muy claro el color se realizó de nuevo la tinción.
8. Por último, se dejaron en alcohol al 100% por 3 minutos y después en xileno durante tres minutos dos veces.
9. Se cubrieron con resina Entellan y cubreobjetos.

V.2.4 Análisis

Se determinaron los niveles relativos de expresión de *c-fos* con el uso de un microscopio marca Zeiss y se tomaron fotografías de secciones representativas de las áreas cerebrales que mostraron activación. Esto se realizó con el uso de una cámara marca Optronics y las imágenes se procesaron con el programa Adobe Photoshop 6.0

V.3 Diseño Experimental

Se utilizaron 37 ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar (37 ratas), adultas y con peso corporal de 200 a 250 g, se mantuvieron en condiciones estándar de luz/oscuridad y temperatura, con agua y comida *ad libitum* en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

a) Animales que se Incluyeron en el Estudio

Se realizaron citologías de frotis vaginales a cada una de las ratas, ello con el fin de identificar la fase del ciclo estral en la cual se encontraban. Ya que como se planteo, este es el criterio que se aplicó para formar los diferentes grupos de ratas. En esta etapa se controlaron situaciones como la luz, la dieta, y la temperatura.

b) Inducción de Choque Osmótico.

A las ratas se les inyectó intraperitonealmente solución salina hipertónica. El grupo control recibió el mismo volumen de solución salina normal. Este trabajo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

c) Extracción de Cerebros.

Después de 90 minutos se anestesió a las ratas y se les perfundió con una solución de paraformaldehído al 4%. Se extrajo el cerebro para procesarlo para histología.

d) Cortes.

Se colectaron 5 series de cortes coronales de 30 micras de espesor con un microtomo de congelación. Se colectó principalmente la región correspondiente al hipotálamo.

e) Inmunohistoquímica.

Este proceso se realizó en secciones flotantes con el método descrito previamente (Sawchenko y col., 1990).

f) Montaje.

Continuando con el procedimiento, los cortes obtenidos fueron colocados en los portaobjetos, cuidando el seguimiento y la distribución de las estructuras anatómicas del cerebro de la rata.

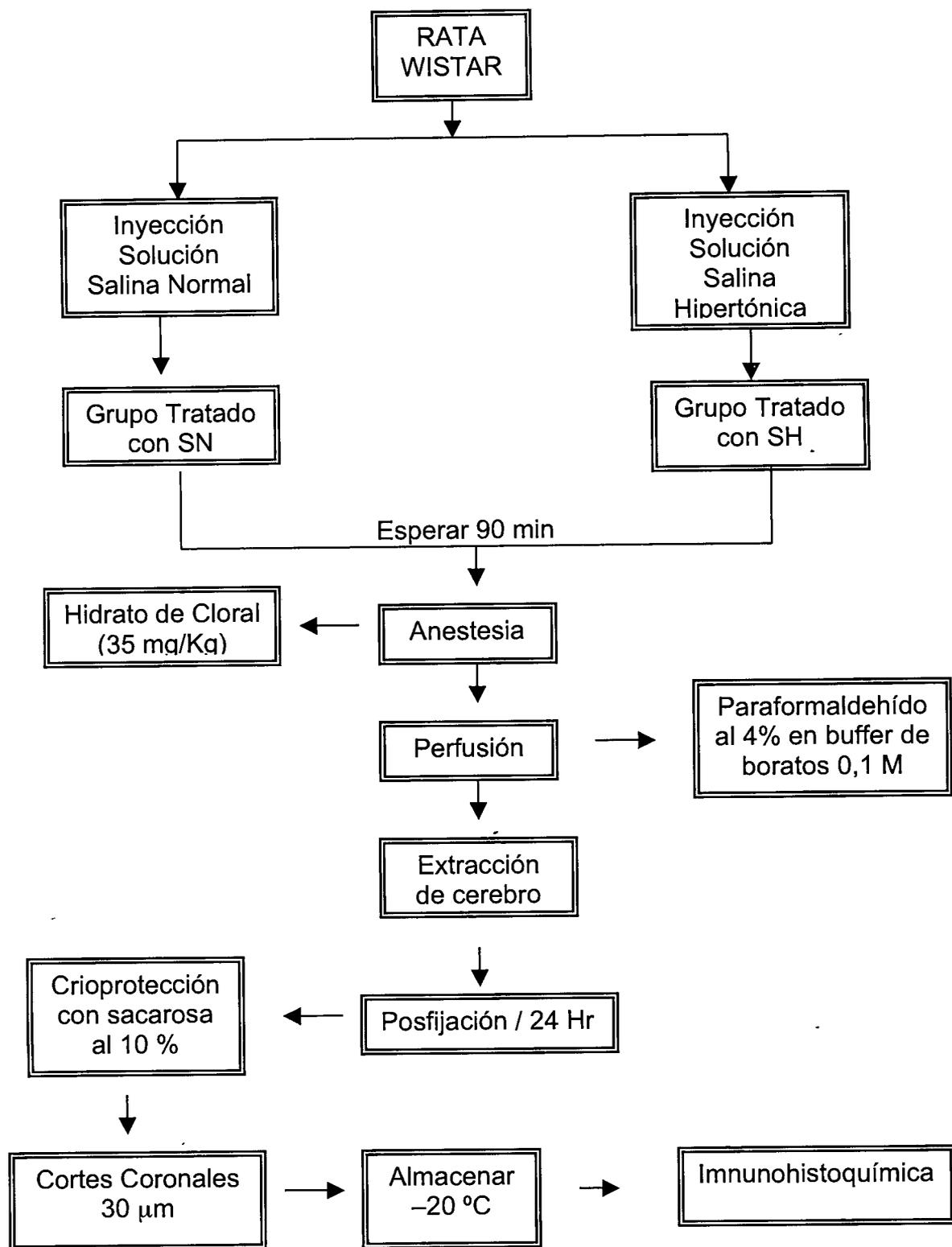
g) Deshidratación de los Cortes.

En esta fase se deshidrataron y aclararon los cortes que ya estaban teñidos y marcados. Se cubrieron con una resina para una preparación permanente

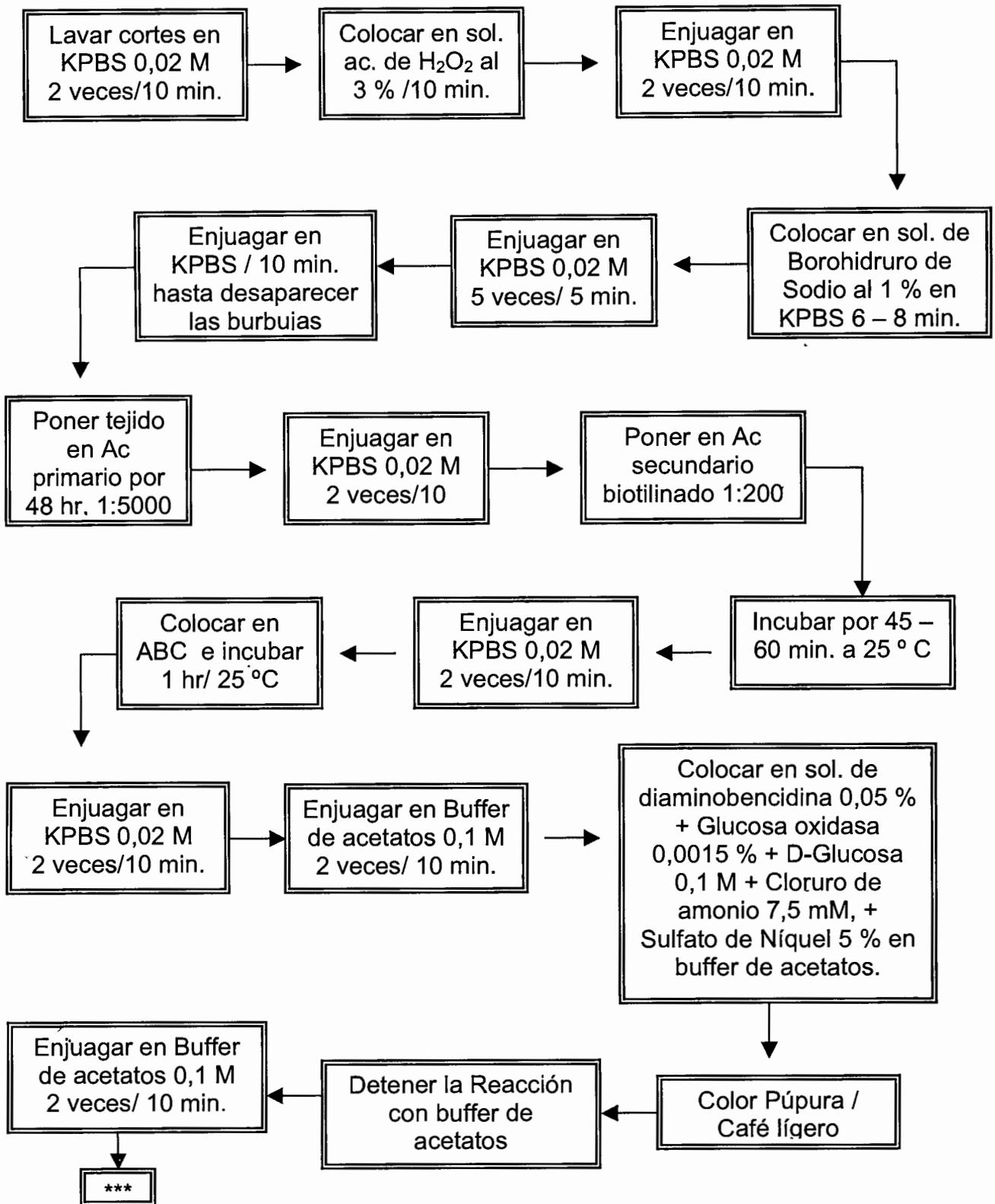
h) Microscopía y Fotografía.

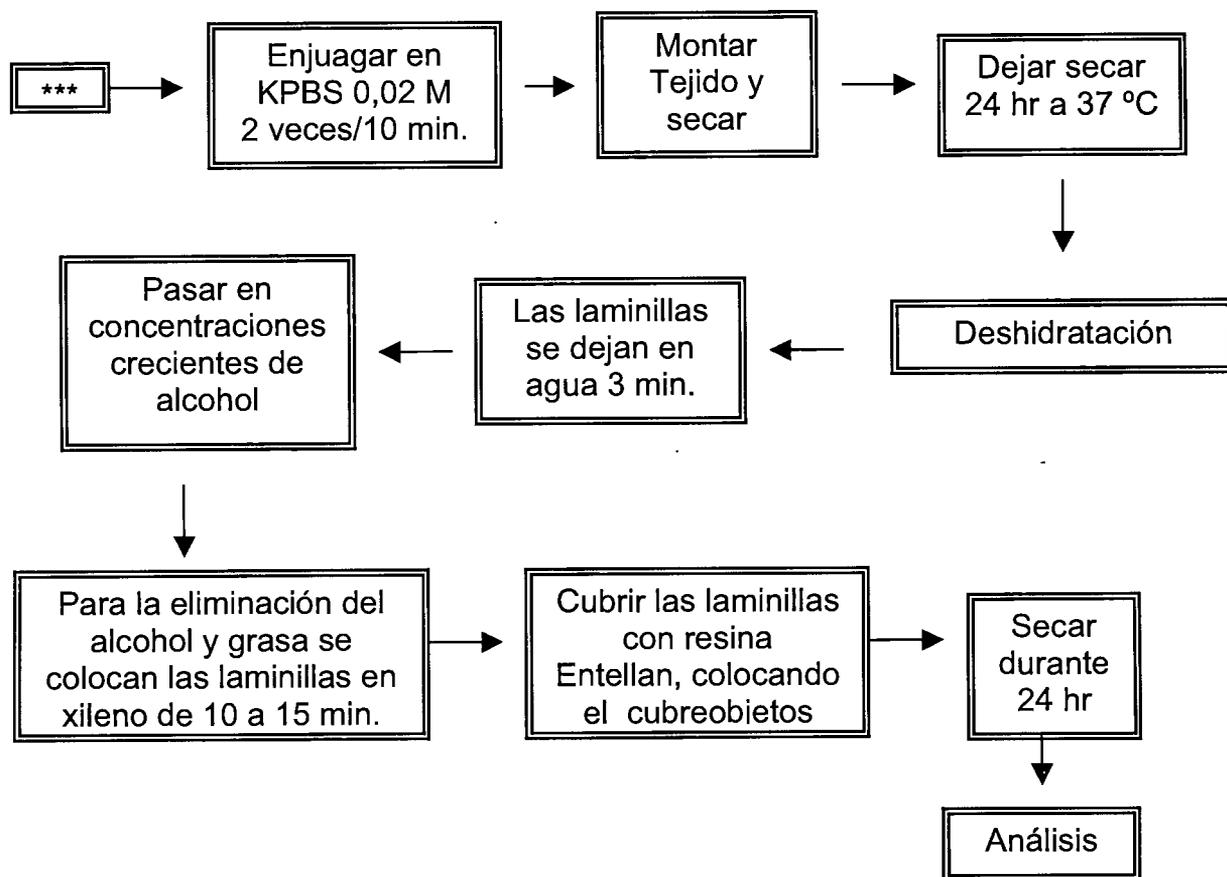
La última fase, fue con el uso del microscopio, se observaron y detectaron si efectivamente hubo activación celular con la consecuente expresión de *c-fos*. Se tomaron microfotografías de cada corte.

V.3.1 Ruta Crítica



Inmunohistoquímica





VI. RESULTADOS

Las ratas incluidas en este trabajo de tesis se clasificaron en grupos correspondientes a cada fase del ciclo: diestro, proestro, estro, utilizando las citologías de frotis vaginales como referencia del día del ciclo estral en que se encontraban. Además, de cada fase del ciclo estral se hicieron dos grupos con una n de 5 animales: el grupo control, recibió una inyección intraperitoneal (IP) de solución salina normal; y el grupo experimental recibió una inyección IP de solución salina hipertónica (0.5 M, 4 mL c/u).

VI.1 Referencia Anatómica del Área Analizada.

Las siguientes microfotografías de los núcleos hipotalámicos en tinción de Nissl fueron tomadas con el fin de mostrar la ubicación como referencia anatómica de los núcleos paraventricular y supraóptico.

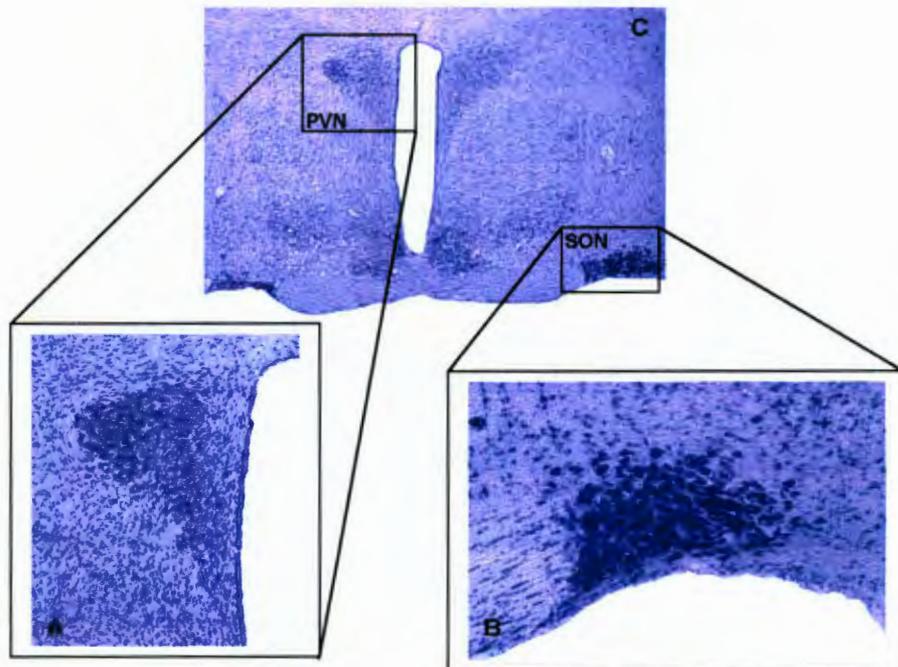


Figura 5. Microfotografías de los núcleos hipotalámicos en tinción de Nissl para referencia anatómica. Secciones correspondientes que muestran la ubicación del PVN (A) y SON (B). Magnificación: 40X (C); 100X (A,B). PVN: núcleo paraventricular; SON: núcleo supraóptico.

VI.2 Respuesta Hipotalámica al Estrés Osmótico

Las siguientes microfotografías son representativas de la respuesta de neuronas del PVN y SON del hipotálamo donde se ilustra la expresión de *c-fos* inducida por estrés osmótico del hipotálamo de las ratas en las diferentes fases del ciclo estral.

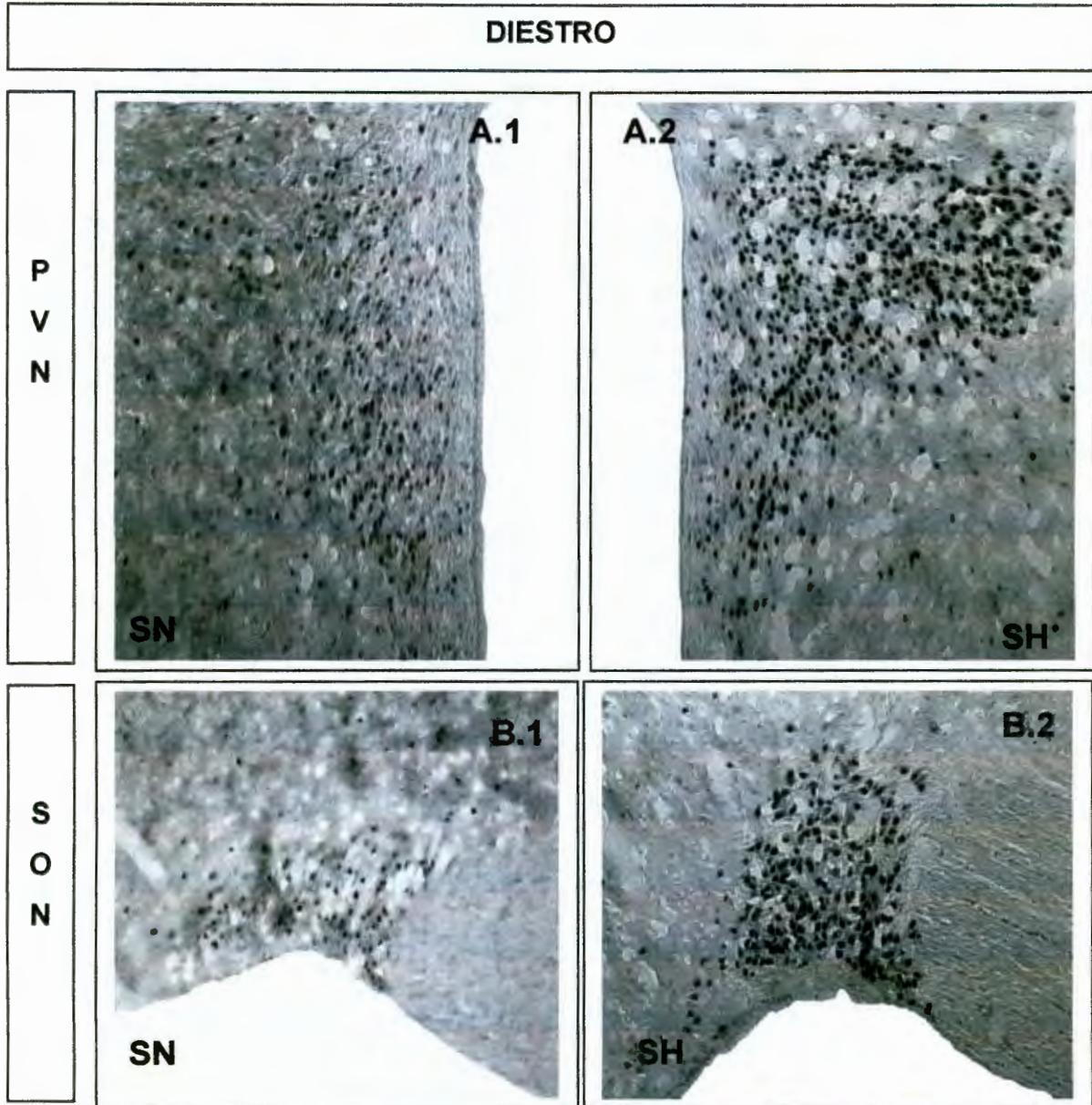


Figura 6. Respuesta de los núcleos hipotalámicos en fase diestro. (A.1, A.2) respuesta en el PVN; (B.1, B.2) respuesta en el SON. Paneles izquierdos: ratas tratadas con SN. Paneles derechos: ratas tratadas con SH. Magnificación: 100X.

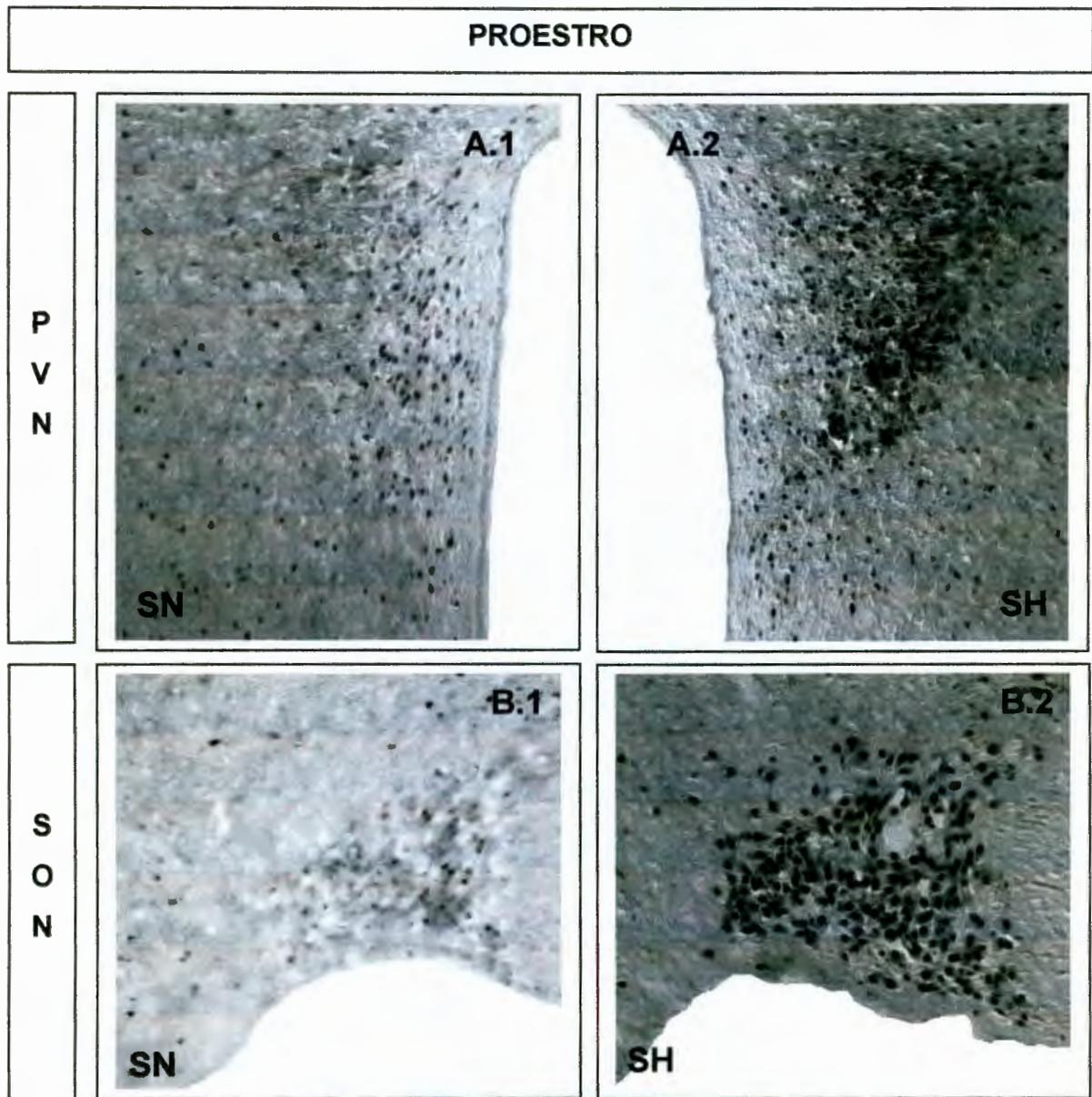


Figura 7. Respuesta de los núcleos hipotalámicos en fase proestro. (A.1, A.2) respuesta en el PVN; (B.1, B.2) respuesta en el SON. Paneles izquierdos: ratas tratadas con SN. Paneles derechos: ratas tratadas con SH. Magnificación: 100X.

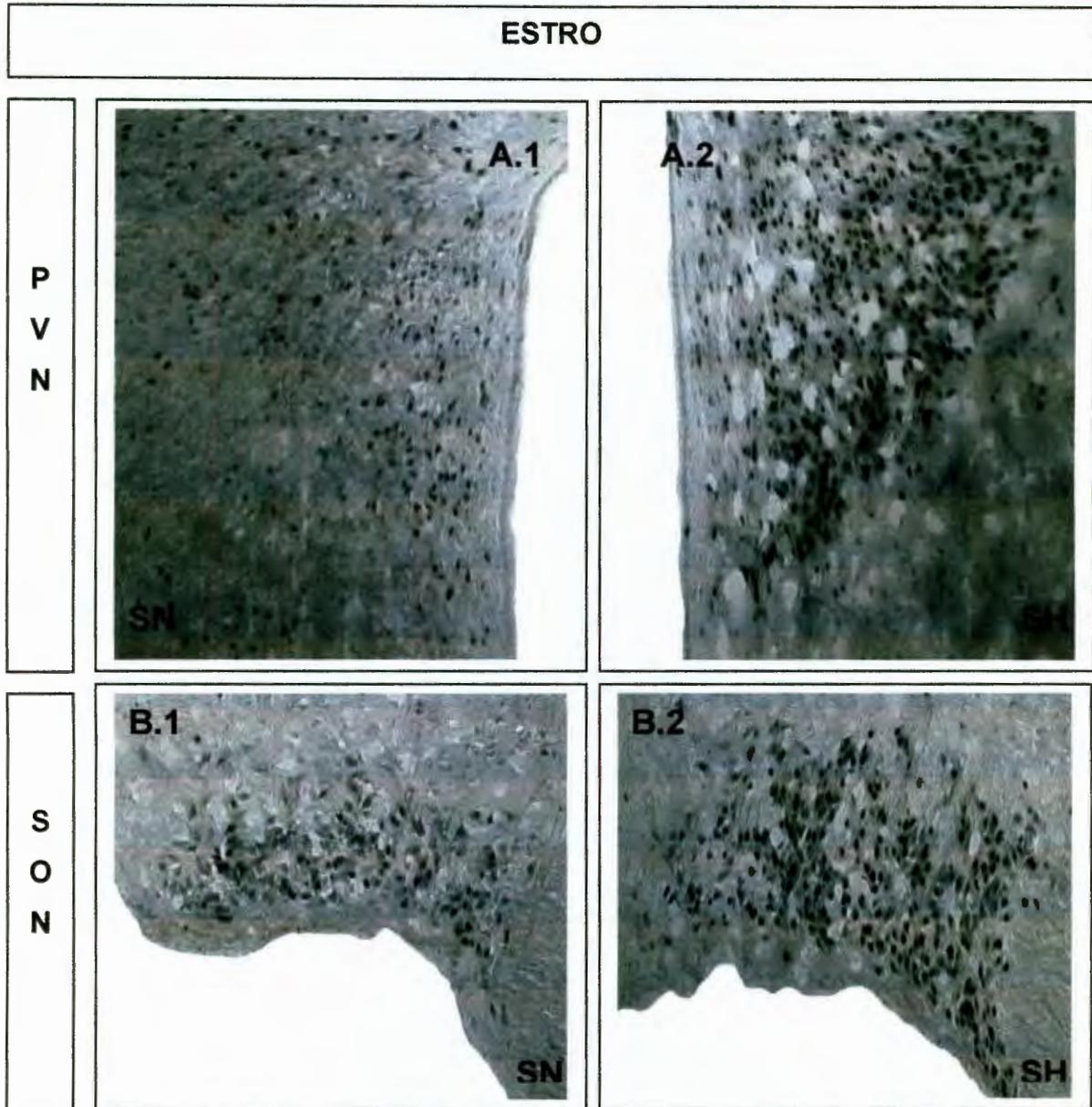


Figura 8. Respuesta de los núcleos hipotalámicos en ratas en fase estro. (A.1, A.2) respuesta en el PVN; (B.1, B.2) respuesta en el SON. Paneles izquierdos: ratas tratadas con SN. Paneles derechos: ratas tratadas con SH. Magnificación: 100X.

Abrev. PVN: Núcleo Paraventricular; SON: Núcleo Supraóptico; SN: Solución Salina Isotónica; SH: Solución Salina Hipertónica.

VI.3 Cuantificación de la Respuesta Hipotalámica al Estrés Osmótico

Las ratas del grupo control tratadas con solución salina isotónica en las diferentes fases del ciclo estral, mostraron una baja expresión a *c-fos* en ambos núcleos. En contraste en ratas tratadas con SH, se observó un incremento en la expresión de *c-fos* tanto en el PVN como en el SON, en las diferentes fases del ciclo estral de la rata.

El número de células de las ratas tratadas con solución salina isotónica (SN) y las tratadas con solución salina hipertónica (SH), que presentaron expresión de *c-fos* en el núcleo paraventricular con respecto a las diferentes fases que presenta su ciclo estral se muestran en las siguientes tablas:

DIESTRO/SN		DIESTRO/SH	
<i>Datos</i>	<i># Células</i>	<i>Datos</i>	<i># Células</i>
Promedio	430.33	Promedio	1280.00
Error Estándar	142.48	Error Estándar	52.76

Cuadro 1. Resultados de expresión obtenida en el PVN en fase diestro

PROESTRO/SN		PROESTRO/SH	
<i>Datos</i>	<i># Células</i>	<i>Datos</i>	<i># Células</i>
Promedio	181.25	Promedio	930.25
Error Estándar	71.07	Error Estándar	138.92

Cuadro 2. Resultados de expresión obtenida en el PVN en fase proestro

ESTRO/ SN		ESTRO/SH	
<i>Datos</i>	<i># Células</i>	<i>Datos</i>	<i># Células</i>
Promedio	105.33	Promedio	950.50
Error Estándar	20.37	Error Estándar	204.12

Cuadro 3. Resultados de expresión obtenida en el PVN en fase estro

El número de células de las ratas tratadas con solución salina normal (SN) y las tratadas con solución salina hipertónica (SH), que presentaron expresión de *c-fos* en el núcleo supraóptico en base a las diferentes fases que presenta su ciclo estral se muestran en las siguientes tablas:

DIESTRO/SN		DIESTRO/SH	
<i>Datos</i>	<i># Células</i>	<i>Datos</i>	<i># Células</i>
Promedio	57.67	Promedio	512.40
Error Estándar	14.00	Error Estándar	39.82

Cuadro 4. Resultados de expresión obtenida en el SON en fase diestro

PROESTRO/SN		PROESTRO/SH	
<i>Datos</i>	<i># Células</i>	<i>Datos</i>	<i># Células</i>
Promedio	77.00	Promedio	650.25
Error Estándar	26.59	Error Estándar	63.71

Cuadro 5. Resultados de expresión obtenida en el SON en fase proestro

ESTRO/ SN		ESTRO/SH	
<i>Datos</i>	<i># Células</i>	<i>Datos</i>	<i># Células</i>
Promedio	57.00	Promedio	372.67
Error Estándar	10.17	Error Estándar	95.73

Cuadro 6. Resultados de expresión obtenida en el SON en fase estro

En las figuras 9 y 10 se muestran las gráficas de los resultados presentados en los cuadros 1-3 y 4-6 respectivamente; como se puede observar el número de neuronas activadas por la expresión de *c-fos* en los núcleos hipotalámicos de acuerdo a la fase del ciclo estral de las ratas.

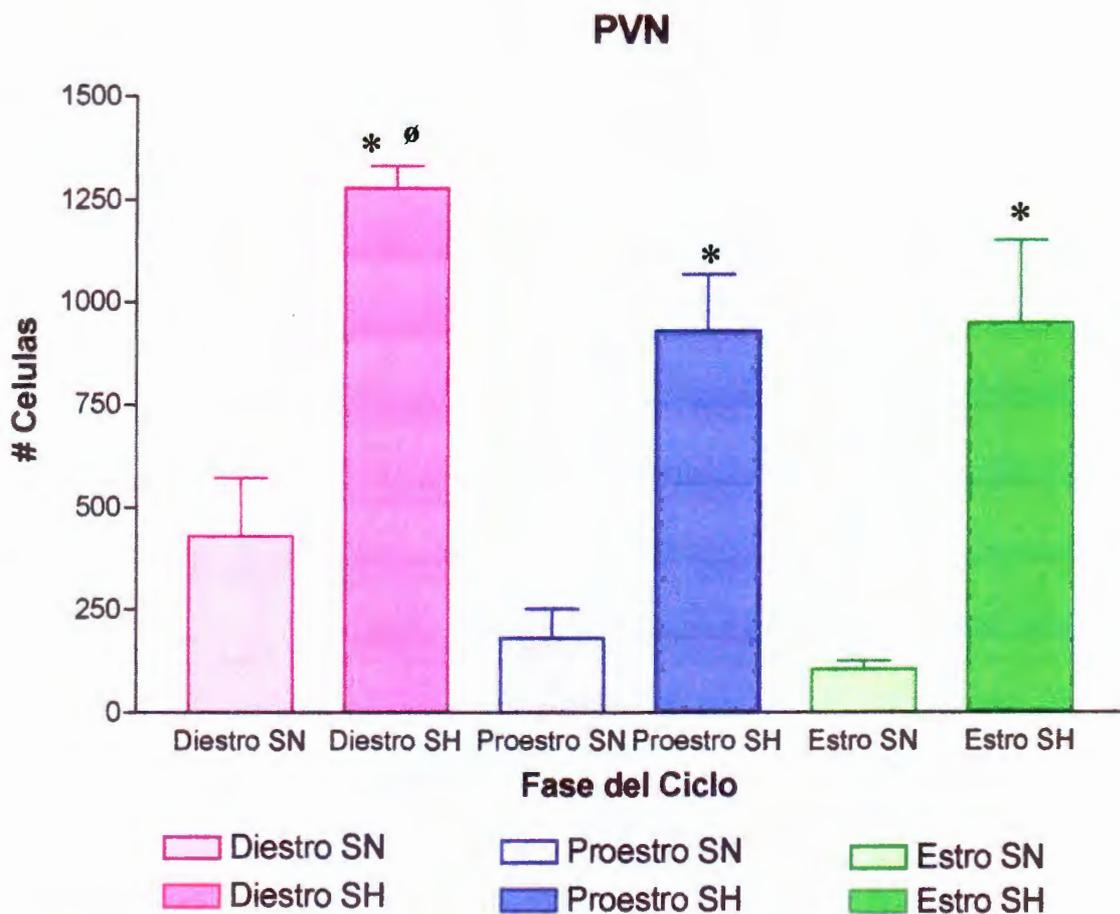


Figura 9. Número de neuronas activadas por la expresión de *c-fos* en el PVN de acuerdo con la fase del ciclo estral. En esta gráfica se observa que las ratas tratadas con SH muestran una mayor expresión de *c-fos* en el PVN de ratas en la fase de Diestro y una menor expresión en la fase de Proestro. La expresión de *c-fos* en grupos control fue escasa en las diferentes fases del ciclo estral. * $P < 0.001$ - $P < 0.01$ vs control correspondiente; Ø $P < 0.05$ vs Proestro SH.

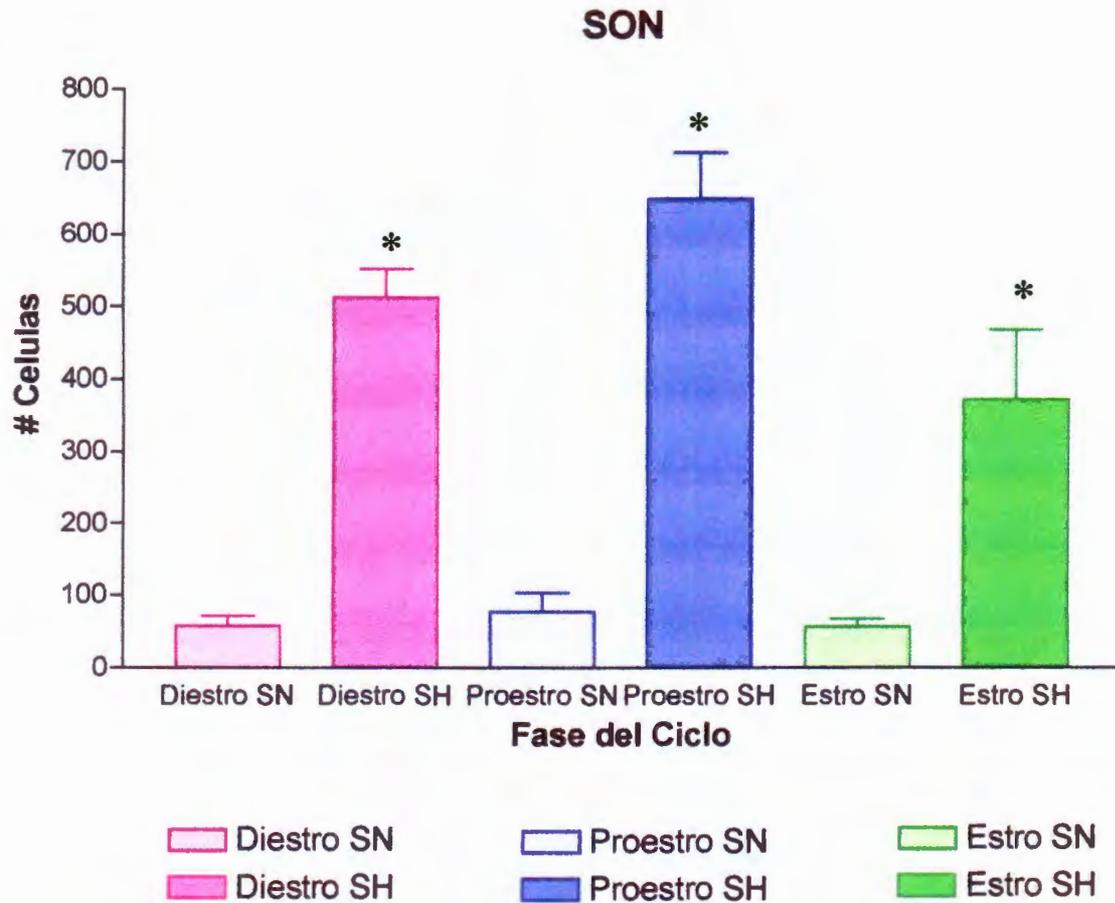


Figura 10. Número de neuronas activadas por la expresión de *c-fos* en el SON de acuerdo a la fase del ciclo estral. Se observa que las ratas en la fase de Proestro y tratadas con SH mostraron una tendencia a una mayor respuesta y una tendencia menor en las de la fase de Estro. La expresión de *c-fos* en grupos control fue escasa en las diferentes fases del ciclo estral. * $P < 0.001$ - $P < 0.01$ vs control correspondiente.

En todas las fases del ciclo estral la expresión de *c-fos* en ratas tratadas con SH, fue significativamente mayor en comparación con las ratas tratadas con SN. La principal diferencia que observamos fue la mayor activación del PVN inducida por el choque osmótico de ratas en diestro. En el SON solo observamos una tendencia a aumentar en el proestro, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas.

VII. DISCUSIÓN

En la presente tesis se analizó la expresión de *c-fos* en los núcleos hipotalámicos, paraventricular y supraóptico en respuesta al estrés osmótico, en relación con la fase del ciclo estral de la rata.

La detección de la expresión de *c-fos*, el RNAm o el producto, la proteína Fos, se ha empleado ampliamente en respuesta a una gran variedad de estímulos; entre ellos el estrés (Kovács, 1998), como un marcador general de actividad neuronal.

La respuesta hipotalámica al estrés osmótico se ha analizado en diferentes condiciones experimentales por varios grupos de investigación usando a la rata o al ratón como modelo experimental (Giovannelli y col., 1990; Giovannelli y Bloom, 1992; Xiong y Hatton, 1996; Kovács, 1998). Se ha observado que el estrés osmótico induce la activación de *c-fos* mRNA e inmunoreactividad de *c-fos* en varias áreas del cerebro (Giovannelli y Bolom, 1992; Cullinan y col., 1995; Summy-Long, 1997), pero en mayor proporción en los núcleos hipotalámicos PVN y SON (Kovács, 1998; Kiss y col., 2004). Se sabe que las neuronas magnocelulares que producen vasopresina y oxitocina expresan *c-fos* en respuesta a un estímulo excitatorio por hiperosmolaridad (Donald y col., 2002; Xiong y Hatton, 1996; Kiss y col., 2004).

Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido realizados en animales del sexo masculino y poco se ha estudiado en hembras. Existe evidencia de que los estrógenos pueden modificar la respuesta de poblaciones neuronales del hipotálamo de neuronas magnocelulares vasopresinérgicas y oxitocinérgicas (Caligioni y Franci, 2002; Greer y col., 1986).

Trabajos de Giovannelli y col. (1990), en ratas hembras tratadas con solución salina hipertónica mostraron que la expresión de *c-fos* es rápidamente activada por

la estimulación osmótica en una variedad de neuronas; aproximadamente el 70 % de las neuronas oxitocinérgicas en el SON son positivas a *c-fos*.

En el PVN y SON, se han reportado cambios en la actividad y síntesis de las neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas a lo largo del ciclo estral en respuesta a las variaciones de los esteroides gonadales (Greer y col., 1986). Por otro lado, se ha visto que un estímulo osmótico no altera el contenido de oxitocina en el SON, durante las diferentes fases del ciclo. Si bien, la respuesta del PVN es distinta ya que el contenido de oxitocina aumenta durante el proestro y se observa una reducción del contenido de oxitocina, durante el diestro, lo cual coincide con una liberación alta de oxitocina al plasma (Caligioni y Franci, 2002).

Los resultados de esta tesis mostraron una respuesta diferencial al estrés osmótico de los núcleos PVN y SON del hipotálamo, que se relaciona con el día del ciclo estral.

Encontramos que en el PVN, las ratas tratadas con solución salina hipertónica (SH) mostraron una mayor diferencia significativa en la expresión de *c-fos* en la fase de diestro y una menor expresión en la fase de proestro. En contraste, en el SON las ratas tratadas con SH mostraron una tendencia a una mayor expresión de *c-fos* en fase de proestro y menor en diestro. Las ratas del grupo control tratadas, con solución salina isotónica, mostraron una baja expresión a *c-fos* en ambos núcleos.

Es posible que esta respuesta diferencial entre el PVN y el SON se deba a una sensibilidad diferente de las poblaciones neuronales que integra cada núcleo. En el PVN pueden distinguirse las subdivisiones parvocelular, formada principalmente por neuronas que sintetizan CRH (Hormona Liberadora de Corticotropina), TRH (Hormona Liberadora de Tirotrópina) y vasopresina; y la subdivisión magnocelular, donde se sintetizan la vasopresina y la oxitocina.

Mientras que el SON está formado principalmente por neuronas magnocelulares que sintetizan vasopresina y oxitocina. Esto puede relacionarse con los estudios realizados por Caligioni y Franci (2002), quienes reportaron que cuando la rata es sometida a estrés osmótico hay un incremento en la síntesis de oxitocina en el PVN en la fase de diestro. Por lo que va a haber mayor cantidad de neuronas oxitocinérgicas que expresen *c-fos* en esta fase.

En el SON, se ha reportado que el estrés osmótico no altera el contenido de oxitocina en dicho núcleo, por lo que podemos especular que son las neuronas vasopresinérgicas las que estén mostrando esta tendencia. Sin embargo hace falta demostrar este aspecto.

En suma, estos resultados sugieren que las poblaciones neuronales del PVN y SON participan de manera distinta en la regulación osmótica ya que responden de manera distinta frente a una demanda de estrés osmótico. Los esteroides gonadales podrían modular mecanismos osmoreceptores relacionados con el funcionamiento de las neuronas del PVN y del SON, o la expresión de *c-fos* por estas neuronas.

Los resultados de esta tesis plantean varios estudios que se pueden continuar.

1. Aumentar el número de animales en cada fase del ciclo estral.
2. Realizar inmunohistoquímica de *c-fos*-vasopresina y *c-fos*-oxitocina.
3. Cuantificación de las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas en los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico que expresan Fos por medio de la inducción de un estímulo osmótico.
4. La comparación de los resultados obtenidos en ambos núcleos, con animales en diferentes fases de reproducción y en ratas ovariectomizadas.

VIII. CONCLUSIONES

Con base en los presentes resultados se puede concluir lo siguiente:

1. El estrés osmótico induce la activación de *c-fos* en los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico.
2. En el PVN las ratas tratadas con SH muestran una mayor expresión de *c-fos* en la fase de diestro y una menor expresión en la fase de proestro.
3. En el SON las ratas tratadas con SH revelan una mayor expresión de *c-fos* en la fase de proestro y menor en estro.
4. La expresión de Fos en los núcleos PVN y SON es diferencial y depende de la fase del ciclo estral.
5. Los esteroides gonadales pueden influir en la expresión de *c-fos* en el ciclo estral de la rata cuando es sometida al estrés osmótico.
6. Los esteroides gonadales podrían modular mecanismos osmoreceptores relacionados con la secreción de oxitocina y vasopresina.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Angel P., Karin M. 1991.** The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 2:129-57.
- Berkow R. 2000.** Manual Merck de Información Médica para el Hogar. Océano. Barcelona: 1109-1112.
- Berriman S.J., Wade G.N., 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*. Vol. 5:2222-8.
- Bioshop J.M., 1987.** The Molecular Genetics of cancer. *Science*. Vol. 235(4786):305-311.
- Bruce A., Bray D., Lewis J., Raff M., Keith R., Watson J. 1994.** *Molecular Biology of the Cell*. 3° ed, Garland Publishing, London: 134-213
- Caligioni C.S., Franci C.R. 2002.** Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. *Life Science*. Vol. 24:2821-2831.
- Campeau S., Watson S.J. 1997.** Neuroendocrine and behavioural responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *Journal of Neuroendocrinology*. Vol. 9: 577-588.
- Cattaneo E., Maggi A. 1990.** c-fos induction by estrogen in specific rat brain areas. *Eur J Pharmacol*. Vol. 2:153-9.
- Chan R.K.W., Brown E.R., Ericsson A., Kovács K.L., Sawchenko P.E. 1993.** A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *Journal of Neuroscience*. Vol. 13: 5126-5138.
- Cicatiello L., Ambrosino C., Coletta B., Scalona M., Sica V., Bresciani F., Weisz A. 1992.** Transcriptional activation of jun and actin genes by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Vol.3:523-8.
- Cohen D., Curran T., 1988.** Fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a Fos-related antigen. *Molecular Cell Biology*. Vol. 8: 2063-2069.

- Cullinan W.E., Herman J.P., Battaglia D.F., Akil H., Watson S.J. 1995.** Pattern and time course of immediate-early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. Vol. 64: 477-505.
- Curran T., Franza B.R. 1988.** Fos and Jun: The AP-1 Connection. *Cell*. Vol. 55(3)395-397.
- Curran T., Morgan J.I. 1995.** Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *Journal of Neurobiology*. Vol. 26: 403-412.
- Curtis S.W., Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, Korach KS. 1996.** Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 22:12626-30.
- Dang C.V., Lee W.M. 1989.** Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem*. Vol. 30:18019-23
- Darnell J., Lodish H., Baltimore D. 1993.** *Biología Celular y Molecular*, Omega S.A, Barcelona: 360-364, 453-458
- Ding J.M., Carver W.C., Terracio L, Buggy J. 1994.** Proto-oncogene c-fos and the regulation of vasopressin gene expression during dehydration. *Molecular Brain Research*. Vol. 21: 247-255.
- Donald W., Arthur P. Arnold, Anne M. Etgen, Susan E. Fahrbach and Robert T. 2002.** *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press. Printed in United States of America. Vol. 3:35-59
- Dragunow M., Faull R.L. 1989.** The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway. *J. Neurosci. Methods*. Vol. 29: 261-265.
- Dragunow M., Robertson H.A. 1987.** Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Neurosci Lett*. Vol.2:157-61.
- Dubravcic L.A., 2002.** Equilibrio acido-base- ecuación de Henderson- hasselbalch. *Critical Care & Shock*. San Francisco Xavier de Chuquisaca. Bolivia. Vol.2:59-63.
- Duncan G.E., Johnson K.B., Breese G.R. 1993.** Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose and expression of Fos-like immunoreactivity. *Journal of Neuroscience*. Vol. 13: 3932-3943.

- Fenelon V.S., Poulain D.A., Theodosios D.T. 1993.** Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience*. Vol. 53: 77-89.
- Fields R.D., Eshete F., Stevens B., Itoh K. 1997.** Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in Ca^{2+} , camp-responsive element binding proteins and mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Neuroscience*. Vol. 17: 7252-7266.
- Fink G. 2000.** Enciclopedia of stress, Academic Press, San Diego. Vol. 1:14-16; 45-46; 712-713. Vol. 2: 18-19; 109-114; 205-207; 650-655. Vol. 3: 425-433; 508-509; 510-519.
- Ganong F. M. 1998.** Fisiología Médica, 16ª ed. El manual moderno S.A. de C.V. México: 25-27, 210-225.
- Giovannelli L., Shiromani J.P., Jirikowski F.G., Bloom E.F. 1990.** Oxytocin neurons in the rat hypothalamus exhibit c-fos immunoreactivity upon osmotic stress. *Brain Research*. Vol. 531: 299-303.
- Giovannelli L., Bloom F.E. 1992.** c-Fos protein expression in the rat subfornical organ following osmotic stimulation. *Neuroscience letter*. Vol. 139: 1-6.
- Giovannelli L., Shiromani J.P., Jirikowski F.G., Bloom E.F. 1992.** Expression of c-fos protein by immunohistochemically identified oxytocin neurons in the rat hypothalamus upon osmotic stimulation. *Brain Research*. Vol. 588: 41-48.
- Greenberg M.E., Ziff E.B. 1984.** Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*. Vol. 311: 433-438.
- Greer R.E., Caldwell J.D., Johnson M.F., Prange A.J., Pedersen C.A. 1986.** Variations in concentration and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. *Life Science*. Vol. 38: 2311-2318.
- Guyton, C.A., Hall E.J., 1997.** Tratado de Fisiología Médica. 9ª ed., Interamericana McGraw-Hill, México:756-767, 983-989.
- Hope I.A., Struhl K. 1987.** GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J*. Vol. 9:2781-4

- Huet-Hudson** Y.M., Chakraborty C., Suzuki Y., Andrews G.K., Dey S.K. **1990**. Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol*. Vol.3:510-23.
- Hughes** P., Dragunow M. **1995**. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews*. Vol. 47: 133-178.
- Hughes** P., Lawlor P., Dragunow M. **1992**. Basal expression of Fos, Fos-related Jun and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Molecular Brain Research*. Vol. 13: 355-357.
- Hunt** S.P., Pini A., Evan G. **1987**. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*. Vol. 328 (6131):632-634.
- Hyder** S.M., Cram L.F., Losse-Michell D.S. **1991**. Sequence of a 1.4-kb region in the 3'-flanking region of the murine c-fos proto-oncogene which contains an estrogen-response element. *Gene*. Vol. 2:281-2.
- Ikeda** J., Nakajima T., Osborne O.C., Mies G., Nowak T.S. **1994**. Coexpression of c-fos and hsp70m RNAs in gerbil brain after ischemia: Induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. *Molecular Brain Research*. Vol. 26: 249-258.
- Imaki** T., Shibasaki T., Hotta M., Demura H. **1993**. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induce c-fos mRNA expression in brain regions related to stress response: comparison with patters of c-fos m RNA induction after stress. *Brain Research*. Vol. 616: 114-125.
- Jennes** L., Jennes M.E., Purvis C., Nees M. **1992**. c-fos expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. *Brain Res*. Vol.1:171-5.
- Jooss** K.U., Funk M., Müller R. **1994**. An autonomous N-terminal transactivation domain in Fos protein plays a crucial role in transformation. *EMBO J*. Vol. 6:1467-75
- Kaczmarek** L., Chaudhuri A. **1997**. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Research Reviews*. Vol. 23: 237-256.

- Kiss A., Pirnik Z., Mravec B. 2004.** Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (PVN) and supraóptico (SON) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Neurochemistry International*. Vol. 45: 597-607.
- Knobil E., Neill J.D. 1994.** *The Physiology of Reproduction* Raven Press. New York: 613-655.
- Kouzarides T., Ziff E. 1988.** The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature*. Vol. 336:646-51.
- Kovács K.J. 1998.** C-Fos as a transcription factor: a stressful, review from a functional map. *Neurochemistry International*. Vol. 33: 287-297.
- Kovács K.J., Sawchenko P.E. 1996.** Sequence of stress induced alteration in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *Journal of Neuroscience*. Vol. 16. 262-273.
- Loose-Mitchell D.S., Chiappetta C., Stancel G.M. 1988.** Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol*. Vol. 10:946-51.
- Maggi A., Perez J. 1985.** Role of female gonadal hormones in the CNS: clinical and experimental aspects. *Life Sciences*. Vol. 10:893-906.
- Mistry A.M., Helferich W., Romsos D.R. 1994.** Elevated neuronal c-Fos-like immunoreactivity and messenger ribonucleic acid (mRNA) in genetically obese (ob/ob) mice. *Brain Res*. Vol. 1:53-60.
- Morgan J.I., Curran T. 1991.** Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Neurosciences*. Vol.14:421-51.
- Murphy L.J., Murphy L.C., Friesen H.C. 1987.** Estrogen induction of N-myc and c-myc proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology*. Vol. 5:1882-8.
- Neumann I., Landgraf R., Bause L., Pittman J.Q. 1995.** Osmotic Responsiveness and Cross Talk Involving Oxytocin, but Not Vasopressin or Amino Acids, between the supraoptic Nuclei in Virgin and Lactating Rats. *Neuroscience* Vol. 15: 3048-3417.
- Nishina H., Sato H., Suzuki T., Sato N., Iba H. 1990.** Isolation and characterization of Fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 87: 3619-3623.

- Nieto S. 2000.** Enciclopedia Temática Autoevaluativa, Ciencias Naturales. Guipuzcoa Ediciones. España. Tomo 3: 326-341.
- O'Shea E.K., Rutkowski R., Stafford W.F., Kim P.S. 1989.** Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science*. Vol. 245:646-8.
- Ransone L.J., Verma I.M. 1990.** Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol*. Vol. 6:539-57.
- Sagar S.M., Sharp F.R., Curran T. 1988.** Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*. Vol. 240: 1328-1331.
- Sassone-Corsi P., Ransone L.J., Lamph W.W., Verma I.M. 1988.** Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature*. Vol. 336:692-5.
- Sawchenko P.E., Cuningham, E.T. Jr., Mortrud, M.T., Pfeiffer, S.W., Gerfen, C.R. 1990.** Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde axonal transport technique. En: *Methods in neurosciences*. Conn, P.M. Academic Press. New York. Vol. 3.
- Scammell T.E., Price K.J., Sagar S.M. 1993.** Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area. *Brain Res*. Vol. 2: 303-307.
- Schuchard M., Landers J.P., Sandhu N.P., Spelsberg T.C. 1993.** Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocrinology*. Vol. 6:659-69.
- Sheng M., Greenberg M.E. 1990.** The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. Vol.4:477-85.
- Sonnenberg J.L., Rausher F., Morgan J.I, Curran T. 1989.** Regulation of proenkephalin by fos and jun. *Science*. Vol. 246; 1622-1624.
- Summy-Long Y.J., Gestl S., Terrell M.L., Wolz G., Kadakaro M. 1997.** Osmoregulation of the magnocellular neuroendocrine system during lactation. *The American Journal of Physiology*. Vol. 272: 275-288.
- Sutherland B. 1992.** Ground-state correlations of one-dimensional quantum many-body systems. *Phys Rev B Condens Matter*. Vol. 2:907-912.
- Svenningsson P., Strom A., Johansson B., 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 Neurosciences*. Vol. 15:3583-93.

- Van Beveren C., Van Straaten F., Curran T., Muller R., Verna I. 1983.** Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell*. Vol. 32 (4):1241-1255.
- Wang W.W., Howells R.D. 1994.** Sequence of the 5'-flanking region of the rat c-fos proto-oncogene. *Gene*. Vol. 2:261-4.
- Weisz A., 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.* Vol.17:5097-106
- Xiong J.J., Hatton G.I. 1996.** Differential responses of oxytocin and vasopressin neurons to the osmotic and stressful components of hypertonic saline injections: a Fos protein double labeling study. *Brain Res.* Vol. 1-2: 143-153.
- Zerial M., Toschi L., Ryseck R., Schuermann M., Muller R., Bravo R. 1989.** The product of a novel growth activated gene, fosB, interacts with jun proteins enhancing their DNA binding affinity. *EMBO Journal*. Vol. 8: 805-813.
- Zigmond M.J., Jedema H.P., Sved A.F. , Finlay J.M. 1999.** Sensitization of norepinephrine release in medial prefrontal cortex: effect of different chronic stress protocols. *Brain Res.* Vol. 2: 211-217