

# **Estandarización metodológica de la determinación inmunohistoquímica de la subunidad-1 del receptor N-metil-D- aspartato (NMDR-1) en las neuronas productoras de la hormona liberadora de las hormonas gonadotrofinas (GnRH) en el hipotálamo del ovej**

## **Methodological standardization of the immunohistochemistry determination of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit-1 (NMDAR-1) in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the sheep hypothalamus**

**ANA Z RUIZ E<sup>1</sup>, JESÚS ROJAS<sup>1</sup>, GISELA GARCÍA<sup>2</sup>**

### **Resumen**

Se estudió inmunohistoquímicamente la presencia de la subunidad-1 del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR-1) en neuronas productoras de la hormona liberadora de las hormonas gonadotrofinas (GnRH) en muestras de hipotálamo fijadas en parafina, provenientes de cinco ovejnos no castrados. Se evaluaron diferentes condiciones para las inmunoreacciones: sin y con recuperación antigénica (térmica y enzimática), diferentes diluciones de anticuerpos primarios (anti-NMDAR-1 y anti-GnRH), tiempos de incubación de anticuerpos y sistemas de amplificación y revelado. Se evaluó la recuperación térmica (recuperador Dako pH 6 y recuperador citrato pH 4) y la recuperación enzimática (incubación con tripsina). Las diluciones de anticuerpos primarios fueron; 1/100 para anti-GnRH y 1/25 y 1/50 para anti-NMDAR-1, respectivamente. Los resultados se analizaron según una escala de cruces que estimó cualitativamente la intensidad del inmunomarcaje de los tejidos. Se seleccionaron la recuperación antigénica térmica con citrato, dilución 1/25 del anticuerpo anti-NMDAR-1 y tiempo de incubación de 12 h, como condiciones óptimas para las inmunoreacciones con el anticuerpo anti-NMDAR-1. Usando estas condiciones se detectó la presencia de la NMDAR-1 en membrana plasmática y citoplasma de las células reactivas de la región preóptica hipotalámica. Para el anticuerpo anti-GnRH, hubo buen marcate con dilución 1/100 del anticuerpo, sin recuperación antigénica e incubación durante 1 h y aplicación del sistema de revelado con peroxidasa. Los resultados demuestran la posibilidad de usar muestras de tejido hipotalámico parafinado de ovinos para estudios inmunohistoquímicos del receptor NMDA.

**Palabras clave:** Receptor N-metil-D-aspartato, inmunohistoquímica, hipotálamo, ovino.

<sup>1</sup> Cátedra de Fisiología Animal.

<sup>2</sup> Histología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal N° 4563, Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela. Número telefónico 011584160432802. Número Fax 01158243-5506250.  
E-mail: ruizz11@yahoo.com

**Abstract**

A study was conducted to demonstrate the presence of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit-1 (NMDAR-1) in gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons, in samples of hypothalamus fixed with paraffin from five non-castrated sheep. Different conditions for immune-reactions were assessed: with and without antigenic recovery (thermal and enzymatic); several primary antibody (anti-NMDAR-1 and anti-GnRH) dilutions, antibody incubation times; and amplification and development systems. Thermal (Dako recovering, pH 6 and citrate, pH 4), and enzymatic recoveries (trypsin incubation) were tested. The dilutions for primary antibodies were: 1/100 for anti-GnRH; and dilutions for NMDAR-1 were 1/25 and 1/50, respectively. Results were analyzed using a cross scale, allowing the estimation of the immune-labeling intensity of the structures studied. The thermal antigenic recovery with citrate (pH 4), a 1/25 dilution of the antibody against the NMDAR-1, and a 12 h incubation time were selected as the optimum conditions to perform the immune-reactions with anti-NMDAR-1 antibody. Under these conditions, it was possible to detect the presence of NMDAR-1 at the plasma membrane level and in the cytoplasm of the reactive cells of the hypothalamic pre-optic region. Regarding the anti-GnRH antibody, a good labeling of the immunoreactions was observed with a 1/100 dilution of the primary antibody without antigenic recovery, 1 h incubation; and carried out with the development system using peroxidase. The results show the likelihood of using paraffin-dipped samples of sheep hypothalamus for the immune-histochemical study of the NMDA receptor.

**Key words:** N-methyl-D-aspartate Receptor, immunohistochemistry, hypothalamus, sheep

**Introducción**

El receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), pertenece a la familia de los receptores del glutamato. Estos receptores son canales catiónicos tetraméricos que incluyen las subunidades NMDAR-1, NMDAR-2 y posiblemente NMDAR-3 (Zarain-Herzberg y col., 2005). La subunidad NMDAR-1 es esencial para la conformación funcional del receptor (Monyer y col., 1992, Karp y col., 1993), mientras que la NMDAR-2 y NMDAR-3 solo juegan un papel modulador (Zarain-Herzberg y col., 2005). Se han encontrado receptores de L-glutamato en algunos núcleos hipotalámicos tales como el ventromedial, paraventricular, supraquiasmático, magnocelular, supraóptico, arcuato, área hipotalámica lateral y eminencia media (Urbanski y col., 1994; Brann y Mahesh, 1997; Mahesh y col., 1999; Eyigor y col., 2001). Este aminoácido juega un papel importante en la regulación de la secreción de la hormona luteinizante (LH), mediante la estimulación de la secreción de la hormona estimuladora de la liberación de las hormonas gonadotrópicas (GnRH), liberada por el núcleo periventricular del hipotálamo a través de las terminaciones nerviosas (Urbanski y Ojeda, 1987; Gay y Plant, 1987; Carbone y col., 1992; Bucholtz y col., 1996; Yin y col., 2006). El área preóptica (APO) del hipotálamo es considerada como la posible región donde el L-glutamato ejerce su acción sobre la secreción de la GnRH. El núcleo anteroventral-periventricular (AVPV) del APO envía información directa a las neuronas secretoras de GnRH (Brann, 1995; Kus y col., 1995; Gu y Simerly, 1997; Gu y col., 1999; Kia y col., 2002; Ottem y col., 2002). La activación exógena de los receptores NMDA produce la liberación de GnRH desde el hipotálamo y la subsiguiente liberación de LH desde la glándula pituitaria en roedores

(Urbanski y Ojeda, 1987; Carbone y col., 1992), primates (Gay y Plant, 1987) y ovejas (Bucholtz y col., 1996). El incremento de la secreción de LH inducida por administración de un análogo del N-metil-D, L-aspartato (NMA) fue completamente bloqueado por una administración previa de un antagonista de la GnRH en ratones machos (Strobl y col., 1993) y en monos (Gay y Plant, 1987). El grado de distribución de la NMDAR-1 sobre las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo depende de la especie animal, edad, sexo, estado reproductivo, etc (Gore y col., 1996; Gore y col., 2000). Yin y col. (2006), evaluaron la localización ultra-estructural de las NMDAR-1 en las terminaciones nerviosas de las neuronas productoras de GnRH de las ratas, detectando extensa colocalización de la GnRH y de la NMDAR-1 en las mismas vesículas localizadas a nivel de los terminales neurosecretores. Gu y col. (1999) evaluaron la localización sub-celular de la NMDAR-1 en las neuronas del AVPV de la rata mediante inmunoreacciones, y encontraron un denso plexo en las sinapsis axonales sobre los procesos dendríticos marcados o no, con las inmunoreacciones. Además, evidenciaron inmunoreacciones post-sinápticas para la NMDAR-1 en las dendritas. Yin y col. (2006) reportaron que las subunidades NMDAR-1 están colocalizadas en o sobre las grandes y densas agrupaciones de vesículas en los neuroperfiles y terminales nerviosos en la eminencia media. Estudios enfocados sobre la translocación y plasticidad sináptica en el hipocampo indican que las subunidades del NMDAR son probablemente sintetizadas y ensambladas en el retículo endoplasmático y luego transportadas a través del aparato de Golgi, hasta la membrana post-sináptica (Pérez Otano y Ehlers, 2004). La distribución y colocalización de los receptores del L-gluta-

mato han sido ampliamente evaluadas empleando la técnica de inmunocitoquímica (Gu y col., 1999; Adams y col., 2001; Chakraborty y col., 2003; Yin y col., 2006) usando como segundo anticuerpo ya sea una inmunoglobulina G biotilada/reacción de la enzima peroxidasa (Gu y col., 1999; Adams y col., 2001; Chakraborty y col., 2003) o una Inmunoglobulina-G conjugada con tiocianato de fluoresceína (Gore y col., 2000). Esta técnica inmunocitoquímica requiere que los tejidos a evaluar sean perfundidos por largos períodos, así como del uso de grandes volúmenes de soluciones crioprotectoras para mantener la inmunoreactividad y la morfología de las muestras de tejidos, por lo que el uso de muestras parafinadas empleadas en la técnica de inmunohistoquímica podría representar una alternativa para la evaluación de este receptor en muestras de tejido nervioso. La técnica de inmunohistoquímica requiere que el tejido a evaluar este previamente fijado, siendo el formol tamponado neutro al 10% el fijador universal usado. Este fijador induce la formación de enlaces intermoleculares entre las proteínas, lo cual podría provocar la alteración de la antigenicidad de algunos epítopes de interés (Riera, 1999). El grado de alteración de los epítopes producida por el formol es directamente proporcional a la duración de la fijación. La recuperación antigénica podría disminuir este efecto (Evers y Uylings, 1997; Shiurba y col., 1998). Como consecuencia de lo arriba expuesto, este trabajo se planteó evaluar el uso de cortes de hipotálamo de ovejos incluidos en parafina, para demostrar mediante inmunoreacciones, la presencia de la subunidad-1 del receptor N-metil-D-aspartato en las neuronas productoras de GnRH, lo cual se realizó a través de la determinación de las condiciones óptimas de las inmunoreacciones, utilizando los anticuerpos policlonales anti-NMDAR-1 y anti-GnRH.

## Materiales y métodos

### TOMA DE MUESTRAS

Se emplearon 5 ovejos mestizos adultos (7-12 meses de edad). Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UCV, y tratados de acuerdo al Protocolo de Bioética de la Facultad. La alimentación consistió de heno y alimento concentrado comercial y agua *ad libitum*. Los animales se sacrificaron mediante la administración de una sobredosis de pentotal sódico (100 mg/Kg e.v; *Fort Dodge Lab, Sleepway, IA, EUA*) e inmediatamente después, se procedió a la extracción de los hipotálamos. Las muestras de hipotálamos fueron fijadas en solución amortiguadora de formol neutro al 10% v/v durante 48 h. Posteriormente, cada hipotálamo fue cortado en tres bloques (1, 2, 3 en dirección rostral-caudal) de 50 mm x 1 cm x 1 cm.

Cada bloque fue colocado en un porta muestra, para ser nuevamente colocado en solución amortiguadora de formol al 10% v/v durante 72 h. Luego, las muestras fijadas fueron finalmente incluidas en parafina.

### ESTANDARIZACIÓN DE LAS INMUNOREACCIONES EN MUESTRAS DE HIPOTÁLAMO

Se determinaron las condiciones óptimas de las inmunoreacciones para dos anticuerpos: el anticuerpo policlonal anti subunidad-1 del receptor NMDA de humano producido en conejo (H-300: sc-9058; *Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*); y el anticuerpo policlonal anti GnRH del ovejo producido en conejo (NB-200555; *Novus Biologicals Inc, Littleton, CO, EUA*). Para ello, se probaron ambos anticuerpos en muestras de tejido hipotalámico, las diferentes condiciones de recuperación antigénica, las diferentes diluciones de los anticuerpos primarios utilizados, los diferentes tiempos de incubación de los anticuerpos primarios y los sistemas de amplificación y revelado. Los epítopes de los antígenos que se deseaban revelar (receptor NMDA y GnRH) se recuperaron antigénicamente, bien sea por vía térmica o enzimática. Se probó la recuperación térmica: Recuperador Dako pH 6 y recuperador citrato pH 4, y la recuperación enzimática (incubación con tripsina). En cuanto a las diluciones de los anticuerpos primarios probadas fueron: para el anti-GnRH 1/100, mientras que para el anti-receptor NMDA diluciones evaluadas fueron 1/25 y 1/50, respectivamente. Los tiempos de incubación de los anticuerpos primarios ensayados tanto para el anti-GnRH como para el anti-NMDA fueron: 1 h, 12 h (toda una noche) y 48 h. En cuanto a los sistemas de amplificación y revelado ensayados estos fueron los siguientes: Envisión-fosfatasa alcalina-rojo permanente y Envisión-peróxidasa-diaminobencidina. Se trabajaron con secciones de 2-3  $\mu\text{m}$  del hipotálamo, colocadas sobre láminas portaobjetos impregnadas con Poli-Lisina diluida 1/10, para mejorar la adhesión de las secciones al vidrio. Las secciones así obtenidas se desparafinaron en forma secuencial en una batería de xilenos (Xileno I, II, III, IV y V), incubando las láminas durante 5 min en cada Xileno. Posteriormente, las secciones desparafinadas se hidrataron en una batería de etanoles (etanol I, II, III, IV y V) y agua corriente (agua I, II y III), incubando las láminas durante 5 min en cada baño. En el primer caso, las secciones se incubaron durante 35 min a 98 °C en soluciones recuperadoras de citrato pH 4 o Dako pH 6, precalentadas a 98 °C en una vaporera (Marca Oster). Una vez culminada la recuperación, las láminas conteniendo las secciones se enjuagaron con buffer Tris-salino, que contenía Tween 20 (TBST) durante 3 min. Posteriormente, se procedió a bloquear

la enzima peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 min, en el caso de que se estuviese usando el revelado con diaminobencidina. Cuando se utilizó la biotina endógena (*Dako Biotin Blocking System, lab*), el bloqueo tuvo una duración de 20 min y se usó en este caso el revelado con Rojo permanente. Las posibles interacciones hidrofóbicas de los anticuerpos con las proteínas en los tejidos se bloquearon por incubación con una solución bloqueante de proteínas (*Dako Protein Block Serum-Free, Ready to Use*) durante 10 min. Las láminas procesadas, se incubaron en distintos tiempos con las diluciones de los anticuerpos primarios en solución diluyente de anticuerpos (*Zymed, Lab*). Los excesos de anticuerpos se eliminaron por lavados con solución TBST. La ocurrencia de las reacciones antígeno-anticuerpo se amplificó por incubación durante 1 h con el sistema LSAB2 (*Dako*) en el caso de revelado con fosfatasa alcalina y el sistema EnVisión (*Dako*) o SuperPicture (*Zymed*), en el caso del revelado con peroxidasa. Las reacciones se revelaron incubando las secciones de tejido, previamente lavadas con solución TBST, con los sustratos cromogénicos de Peróxido de hidrógeno-diaminobencidina o Rojo permanente. El contraste nuclear se llevó a cabo por 3 inmersiones profundas en Hematoxilina de Harris (*Sigma, St. Louis MO, EUA*), seguido por lavados en agua corriente, deshidratación en una batería de 5 etanoles, aclarado en una batería de 5 xilenos y montaje con medio de montaje permanente.

#### INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL NMDAR-1 Y NEURONAS PRODUCTORAS DE GnRH

Se utilizaron secciones seriadas de 2-3  $\mu\text{m}$  de la porción (bloque) más craneal del hipotálamo de los animales, para realizar las diferentes inmunorreacciones. Las secciones histológicas coloreadas fueron observadas en un microscopio de luz blanca.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

Los resultados obtenidos en cada una de las condiciones ensayadas se evaluaron según una escala de cruces, permitiendo estimar cualitativamente la intensidad del inmunomarcaje de las estructuras tisulares estudiadas, para de esta forma establecer cuales eran las condiciones óptimas para este par de anticuerpos primarios evaluados.

### Resultados y Discusión

#### ESTANDARIZACIÓN DE LAS INMUNOREACCIONES

En el caso de las inmunorreacciones con el anti-

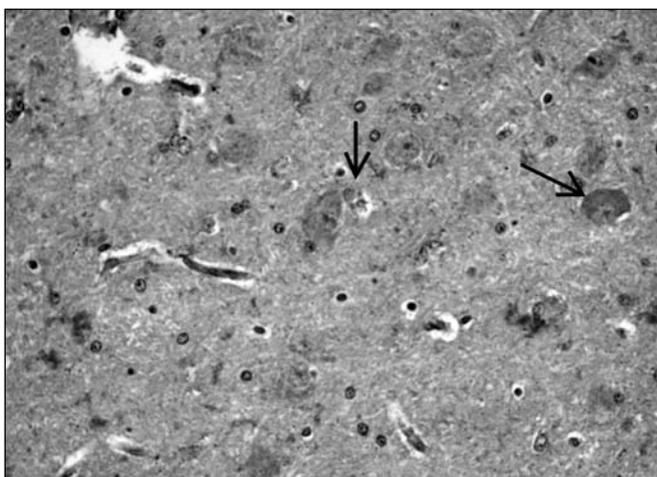
cuerpo anti-receptor NMDA sin recuperación o con recuperación antigénica con Dako o usando la enzima tripsina, se obtuvieron marcajes leves (Tabla I y Figuras 1 al 4). Taylor y col. (1996) evidenciaron que la recuperación antigénica a través de una digestión enzimática no solo digirió los enlaces causados por la fijación con formol, sino que también rompió las uniones normales de las proteínas nativas, pudiendo causar la reducción de la intensidad o pérdida de la inmunoreactividad. Se probó la recuperación antigénica térmica con citrato a pH 4, dilución del anticuerpo anti-receptor NMDA de 1/25 y tiempo de incubación de 12 h (toda la noche), seleccionándose éstas como las condiciones óptimas para el anticuerpo anti-receptor NMDA (Tabla I y Figura 5). Catoretti y col. (1992), Baas y col. (1994) y Hazelbag y col. (1995) utilizaron el buffer citrato en la recuperación antigénica no enzimática, demostrando que este buffer es una solución útil para una gran cantidad de los antiseros empleados en la rutina diagnóstica. A través de las inmunorreacciones, se pudo detectar la presencia de la NMDAR-1 tanto a nivel de la membrana plasmática como a nivel del citoplasma de las células reactivas de la región preóptica hipotalámica (Figuras 1, 3 y 5). Estos resultados coinciden con los reportados por Yin y col. (2006), los cuales detectaron las subunidades del NMDA-R en vesículas secretoras de los terminales nerviosos de las neuronas productoras de GnRH en la eminencia media. Las condiciones ensayadas con el sistema de amplificación y revelado basado en la fosfatasa alcalina para detectar GnRH, determinaron mucha coloración de fondo por lo cual se descartó para los próximos ensayos (Figura 6). En el caso de las inmunorreacciones realizadas con el sistema de revelado usando la enzima peroxidasa, se obtuvo un marcaje intenso con el anticuerpo anti-GnRH a la dilución de 1/100, sin recuperación antigénica e incubación durante 12 h. Por esta razón, se decidió modificar sólo el tiempo de incubación del anticuerpo primario, llevándolo a 1 h y fijando las demás condiciones antes descritas (Figura 7). De lo anterior, se puede concluir que las condiciones óptimas a las cuales trabajan los anticuerpos primarios policlonales evaluados en muestras de tejidos parafinados son: recuperación antigénica térmica con citrato a pH 4, dilución de 1/25 y tiempo de incubación de 12 h, para el receptor NMDA y sistema de revelado usando la enzima peroxidasa, dilución de 1/100, sin recuperación antigénica e incubación durante 1h, para las neuronas GnRH, respectivamente. Además, los resultados anteriores demuestran la posibilidad de usar muestras de tejido parafinado en el estudio inmunohistoquímico del receptor NMDA.

Tabla I

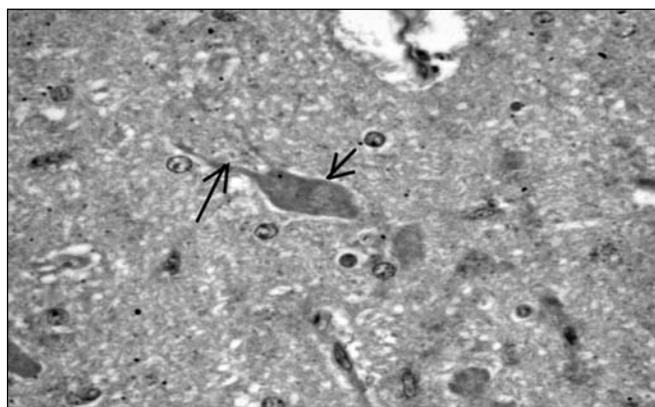
**Evaluación de las inmunorreacciones bajo diferentes condiciones para la NMDAR-1 en muestras de hipotálamo de ovejoes no castrado (enteros)**

Condición	Fondo	Núcleo (soma)	Neurona (Axón)	Neurona	Neuropilo	Vasos sanguíneos (músculo liso)	Células Epéndimo
Sin recuperación antigénica y dilución 1:25	++	+++	Grupos Nissl (+++)	+++	+	+++	++ (Membrana apical)
Sin recuperación antigénica y dilución 1:50	++	+++	Grupos Nissl (++)	++	+	++	+++ (Membrana apical)
DAKO pH 6,8 y dilución 1:25	+++	+++	Grupos Nissl (++)	++	++	+++	+++ (Membrana apical)
DAKO pH 6,8 y dilución 1:50	+++	++	Grupos Nissl (++)	++	+	+++	+++ (Membrana apical)
Citrato pH 4 y dilución 1:25	+++	+++	Grupos Nissl (+++)	+++	+	++++	++++ (Membrana apical)
Citrato pH 4 y dilución 1:50	++	+++	Grupos Nissl (+++)	+++	+	+++	+++ (Membrana apical)
Tripsina dilución 1:25	+++	+++	Grupos Nissl (++)	++	+	+++	++ (Membrana apical)
Tripsina dilución 1:50	+++	+++	Grupos Nissl (++)	++	+	+	+ (Membrana apical)

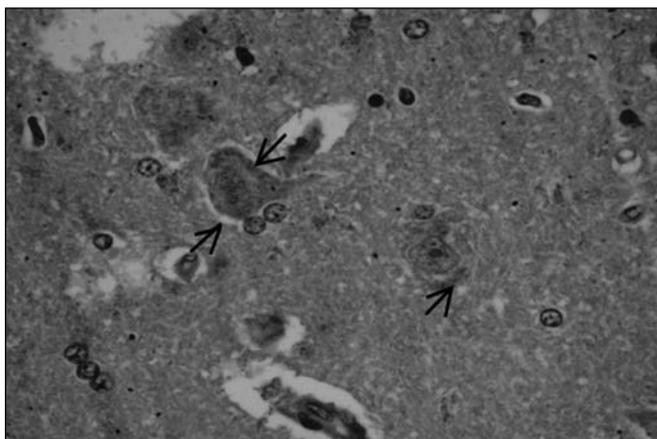
Escala de intensidad de marcaje: 0 + ++ +++ +++++



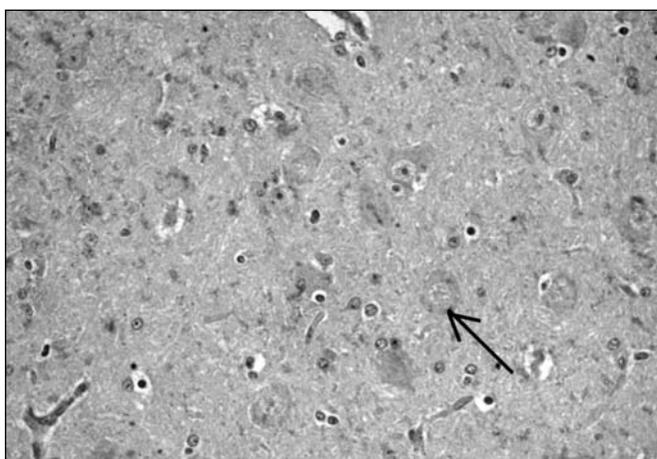
**Figura 1.** Inmunorreacciones en muestra de hipotálamo del ovejoes con anticuerpo anti-receptor NMDA, sin recuperación antigénica y dilución de 1:25. 20X. La flecha señala el receptor NMDA en la membrana plasmática e intracitoplasmático. Contraste nuclear con Hematoxilina de Harris.



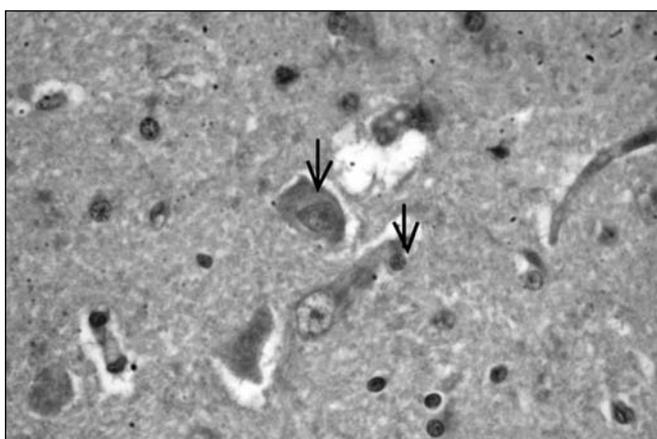
**Figura 2.** Inmunorreacciones en muestra de hipotálamo del ovejoes con anticuerpo anti-receptor NMDA, recuperación antigénica con Dako y dilución de 1:25. 40X. La flecha señala el receptor NMDA en la membrana plasmática. Contraste nuclear con Hematoxilina de Harris.



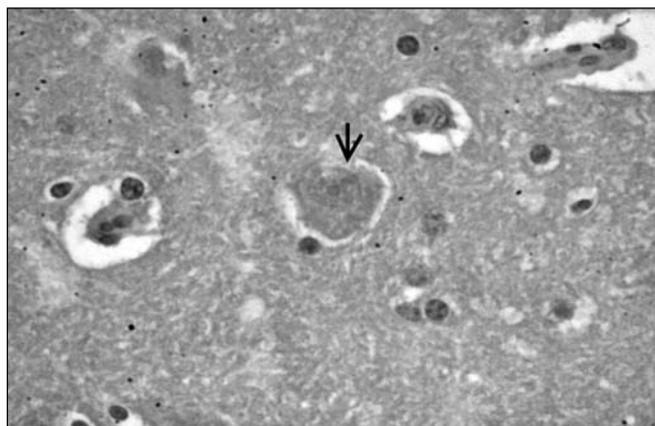
**Figura 3.** Inmunoreacciones en muestra de hipotálamo del ovejo con anticuerpo anti-receptor NMDA, recuperación anti-génica con Dako y dilución de 1:50. 40X. La flecha señala el receptor NMDA en la membrana plasmática e intracitoplasmático. Contraste nuclear con Hematoxilina de Harris.



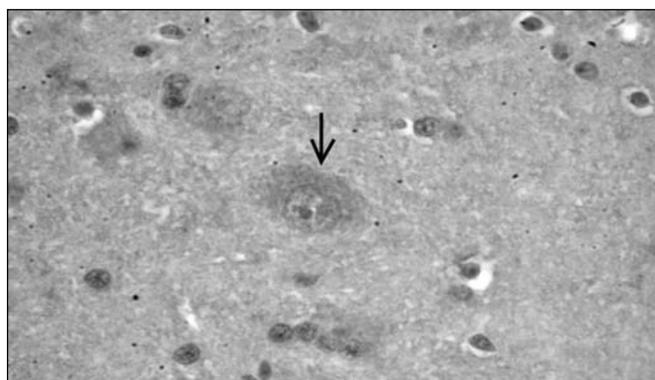
**Figura 4.** Inmunoreacciones en muestra de hipotálamo del ovejo con anticuerpo anti-receptor NMDA, con recuperación antigénica con Tripsina, dilución de 1:50. 20X. La flecha señala el receptor NMDA en la membrana plasmática. Contraste nuclear con Hematoxilina de Harris.



**Figura 5.** Inmunoreacciones en muestra de hipotálamo del ovejo con anticuerpo anti-receptor NMDA, dilución de 1:20, con recuperación antigénica con citrato. 40 X. La flecha señala el receptor NMDA en la membrana plasmática e intracitoplasmático. Contraste nuclear con Hematoxilina de Harris.



**Figura 6.** Inmunoreacciones en muestra de hipotálamo del ovejo con anticuerpo anti-GnRH, dilución de 1:100, incubado durante 48 h, y usando fosfatasa alcalina. 40X. La flecha señala la neurona productora de la GnRH. Contraste nuclear con Hematoxilina de Harris.



**Figura 7.** Inmunoreacciones en una muestra de hipotálamo del ovejo con anticuerpo anti-GnRH, incubado durante 1 h, y usando Dako y peroxidasa-diaminobencidina. 40X. La flecha señala la neurona productora de la GnRH. Contraste nuclear con Hematoxilina de Harris.

## Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la UCV, Proyecto N° G-11-005635-2004. También, se agradece a los Drs. Céspedes Ghislaine, Alipio Hernández y Marcello Rossi del Instituto Anatómopatológico «Dr. José A. O'Daly», Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV), Venezuela, por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

## Referencias Bibliográficas

- Adams MM, Oung T, Morrison JH, Gore AC. 2001. Length of postovariectomy interval and age, but not estrogen replacement, regulate N-methyl-D-aspartate receptor mRNA levels in the hippocampus of female rats. *Exp Neurol* 170:345-56.
- Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ. 1994. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 172:54-12.

- Brann DW. 1995. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 61: 213-225.
- Brann DW, Mahesh VB. 1997. Excitatory amino acid: Evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocrine Rev* 18: 678-700.
- Bucholtz DC, Vidwans NM, Herbosa CG, Schillo KK, Foster D L. 1996. Metabolic interfaces between growth and reproduction: pulsatile luteinizing secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinology* 137: 601-607. 25.
- Carbone S, Szwarcfarb B, Otero-Losada ME, Moguilevsky JA. 1992. Effects of ovarian steroids on gonadotropin response to N-methyl-D-aspartate and on hypothalamic excitatory amino acid levels during sexual maturation in female rats. *Endocrinology* 130: 365- 1370.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB2) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:357-363.
- Chakraborty TR, Laurie NG, Gore AC. 2003. Colocalization and hormone regulation of estrogen receptor  $\alpha$  and N-methyl-D-aspartate receptor in hypothalamus of female rat. *Endocrinology* 144:299-305.
- Evers P, Uylings HB. 1997. An optimal antigen retrieval method suitable for different antibodies on human brain tissue stored for several years in formaldehyde fixative. *J Neurosci Methods* 72:197-207.
- Eyigor O, Centers A, Jenes L. 2001. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 434:101-124.
- Gay V, Plant TM. 1987. N-methyl-D-aspartate elicits hypothalamic gonadotropin-releasing hormone released in prepubertal male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 120:2289-2296.
- Gore AC, Wu TJ, Rosenberg JJ, Roberts JL. 1996. Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. *J Neuroscience* 1:17:5281-5289.
- Gore AC, Yeung G, Morrison J H, Oung T. 2000. Neuroendocrine aging in the female rat: The changing relationship of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons and N-methyl-D-aspartate receptors. *Endocrinology* 141: 4757-4767.
- Gu GB, Simerly RB. 1997. Projection of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J Comp Neurol* 384:142-164.
- Gu GB, Varoqueaux F, Simerly RB. 1999. Hormone regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 19:3213-3222.
- Hazelbag HM, van den Broek LJ, van Dorst EB. 1995. Immunostaining of chain-specific keratins on formalin-fixed-paraffin embedded tissues: A comparison of various antigen retrieval systems using microwaves heating and proteolytic pretreatments. *Histochem Cytochem* 43:429-437.
- Karp S, Masu M, Eki T, Ozawa K, Nakanishi S. 1993. Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. *Biol Chem* 268:3728-3733.
- Kia HK, Yen G, Krebs CJ, Pfaff DW. 2002. Colonization of estrogen receptor alpha receptor and NMDA- 2D mRNAs in amygdaloid and hypothalamic nuclei of the mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 104:47-54.
- Kus L, Handa R, Sanderson J, Kerr J, Beitz A. 1995. Distribution of NMDAR-1 receptor subunit m-RNA and (1125) MK-801 in the hypothalamus of intact, castrated and castrated DHTP treated male rats. *Mol. Brain Res* 28:55-60.
- MaheshVB, Zamorano P, De Sevilla L, Lewis D, Brann DW. 1999. Characterization of ionotropic glutamate receptor in rat hypothalamus, pituitary and immortalized gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons (GT<sub>1,1</sub> cells). *Neuroendocrinology* 69:397-407.
- Monyer H, Sprengel R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. 1992. Heteromeric NMDA receptor: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217- 1221.
- Ottm E, Godwin JG, Petersen SL. 2002. Glutamatergic signaling through the N-methyl-D-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effect of estradiol on LHRH gene expression. *Endocrinology* 143:4837-4845.
- Pérez-Otano I, Ehlers MD. 2004. Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals* 13:175-189.
- Riera VJR. 1999. Estandarización y control de calidad en inmunohistoquímica (1ª parte) Problemas de fijación y procesamiento de los tejidos: la recuperación antigénica como solución. *Rev Esp Patol* 32: 573-581.
- Shiurba RA, Spooner ET, Ishiguro K. 1998. Immunocytochemistry of formalin-fixed human brain tissues: Microwave irradiation of free-floating sections. *Brain Res Brain Res Protoc* 2:109-119.
- Strobl FJ, Luderer U, Besecke L, Wolfe A, Schwartz NB, Levin JE. 1993. Differential gonadotropin response to N-methyl-D-L-aspartate in intact and castrated male rat. *Biol Reprod* 48:876-873.
- Taylor CR, Shi SR, Cote RJ. 1996. Antigen retrieval for immunohistochemistry: Status and need for greater standardization. *Appl immunohistochem*. 4:144-167.
- Urbanski HF, Ojeda R. 1987. Activation of luteinizing hormone releasing hormone release advances the onset of female puberty. *Neuroendocrinology* 46: 273-276.
- Urbanski HF, Fahy MM, Daschel Fahy, Meshul C. 1994. N-methyl-D- aspartate receptor gene expression in the hamster hypothalamus and in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *J Reprod Fertil* 100:5-9.
- Yin W, Mendenhall JM, Bratton SB, Oung T, Jassen WG, Morrison JH, Gore AC. 2006. Novel localization of NMDA receptor within neuroendocrine gonadotrophin releasing hormone terminals. *Exp Biol Med* 232:662-673.
- Zarain-Herzberg A, Lee-Rivera I, Rodríguez G, López-Colome AM. 2005. Cloning and characterization of the chick NMDA receptor subunit-1 gene. *Mol Brain Research* 137: 235-251.

Recibido: 1 de marzo de 2010  
Aceptado: 1 de noviembre de 2010