

1.- DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA.

En este trabajo hemos utilizado distintas técnicas en función de los objetivos a resolver. Si bien el estudio con técnicas histológicas ha sido exhaustivo puesto que teníamos por objetivo estudiar todos los detalles del desarrollo que conducen a las diferencias existentes en el animal adulto de los diferentes grupos con el estudio ultraestructural sólo quisimos poner de manifiesto detalles subcelulares de interés a lo largo del desarrollo. No así, fue el estudio ultraestructural en el lóbulo tuberal, donde nuestro objetivo fue saber si las células TSH-ir observadas a microscopía óptica eran similares a las TSH-ir presentes en el lóbulo anterior. No utilizamos para ello técnicas inmunoquímicas puesto que sólo observamos una morfología de célula con gránulos y la única célula diferenciada en ese estadio fueron las células TSH-ir.

Otro dato que quisimos obtener con la ultraestructura fue la presencia o no de vasos en el lóbulo intermedio lo cual pudimos confirmar. Si bien estos vasos no están localizados en medio de un grupo celular el estudio previo de los cortes semifinos nos sirvió para ver que estos vasos proceden de finos septos de tejido conjuntivo que entran en el lóbulo.

Las técnicas inmunohistoquímicas las utilizamos con dos fines diferentes: demostrar el inicio en el desarrollo de la síntesis de las distintas hormonas y de factores implicados en distintos aspectos de su diferenciación funcional, y por otro lado para el estudio de la proliferación celular.

Esto nos llevó según el caso a utilizar técnicas inmunoenzimáticas simples reveladas con distintos reveladores, dobles marcajes con inmunoenzimática, inmunofluorescencia o hibridación-inmunofluorescencia e hibridación-inmunoenzimática.

Para la detección de hormonas y péptidos hemos utilizado anticuerpos utilizados por miembros de nuestro grupo durante muchos años procentes del Dr. G. Tramu de la Universidad de Burdeos y cuya especificidad ha sido probada en numerosos trabajos. Por otra parte han sido siempre los mismos anticuerpos utilizados por nosotros ya en al menos cuatro grupos de vertebrados lo que nos permite realizar más objetivamente la comparación de resultados.

En otros casos se han utilizado anticuerpos comerciales la mayor parte monoclonales y en algún caso de distinta procedencia para descartar su falta de especificidad.

Para el estudio de proliferación celular hemos usado una técnica utilizada por muchos autores consistente en el marcaje de las células en división con bromodeoxiuridina. Esta molécula es incorporada por la DNA polimerasa III durante la replicación del DNA en la fase S del ciclo celular.

Fue inyectada a ratonas gestantes así como a postnatales y adultos en dosis entre 5 y 10 mgrs. por kilo de peso corporal. Entre 2 y 3 horas después de la inyección los animales fueron sacrificados para su estudio. La dosis empleada de bromodeoxiuridina así como los tiempos de acción de esta se tomaron de acuerdo a experimentación previa descrita en la bibliografía.

El estudio de este material se llevó a cabo utilizando una técnica inmunoenzimática indirecta que permitió poner de manifiesto en cortes histológicos la presencia de bromodeoxiuridina mediante el uso de un anticuerpo monoclonal (anti-BrdU Isotipo IgG1, Kappa). Esta técnica por sí sola, nos permitió poner de manifiesto el patrón de proliferación celular durante todo el desarrollo hasta el estado adulto. Además en combinación con la inmunoenzimática indirecta para la detección de células secretoras adenohipofisarias, nos permitió poner de manifiesto la presencia de células diferenciadas en división. La utilización de esta técnica combinada de doble marcaje planteó una serie de problemas: en primer lugar todo el material utilizado para este estudio hubo de ser fijado con Fijador Clarke (Etanol:acético 3:1) puesto que en la literatura es el que ha proporcionado mejores resultados. Sin embargo este fijador es incompatible con algunos de los antisueros frente a las hormonas adenohipofisarias. Por otro lado, la detección inmunohistoquímica de la bromodeoxiuridina sólo es posible si esta se encuentra en forma libre, o en forma de cadena simple si se halla incorporada al DNA, como es nuestro caso, lo cual exige un paso previo de desnaturalización del DNA. En los protocolos existentes, la desnaturalización se realiza por tratamiento con una solución de HCl 2N en el tampón correspondiente durante un tiempo estimado que esta en función del grosor de los cortes, generalmente entre 10 y 15 minutos. Los primeros experimentos no permitieron la detección posterior de las hormonas adenohipofisarias. El uso de la reacción en orden inverso, es decir detectando en primer lugar la hormona y en segundo lugar la bromodeoxiuridina, resultó inadecuado, puesto que el tratamiento de los cortes con la solución de HCl eliminaba completamente el precipitado de color de la primera reacción inmunohistoquímica, incluso cuando se utilizaban reveladores permanentes como la diaminobenzidina (DAB) ó la combinación de DAB con sulfato de níquel amonio. Se ensayaron alternativas que permitieran la desnaturalización del DNA sin alterar la antigenicidad de otros componentes cuya presencia nos interesaba poner de manifiesto. Estas técnicas fueron el tratamiento de las secciones con calor y con soluciones de NaOH a diferente concentración. De los diferentes ensayos, obtuvimos resultados satisfactorios sobre aquellas secciones que habían sido tratadas con soluciones de NaOH entre 1N y 0.5N de concentración. No obstante a pesar de haber solucionado este problema, sólo pudimos realizar estudios de proliferación-diferenciación para dos de los tipos celulares presentes en la hipófisis, las células corticotropas y

las células somatotropas, debido a la incompatibilidad, como ya señalamos anteriormente, de los demás antisueros con el fijador Clarke. No obstante pensamos que con resultados al menos en un tipo celular podíamos resolver nuestro objetivo.

La técnica de hibridación *in situ* nos ha permitido estudiar la expresión durante el desarrollo embrionario de uno de los genes implicados en el desarrollo hipofisario, el Otlx 2 ó Pitx 2. En este caso, se utilizó como sonda una secuencia de RNA antisentido complementaria a la secuencia del gen Pitx 2. La sonda se obtuvo mediante un proceso de transcripción *in vitro* a partir de un cDNA clonado en un vector de expresión. El marcaje se llevó a cabo durante el proceso de síntesis utilizando digoxigenina acoplada a uno de los nucleótidos trifosfato, posteriormente la sonda se aisló y se utilizó en la reacción de hibridación *in situ*. La detección de la sonda se llevó a cabo mediante inmunoenzimática usando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina.

El clonaje y caracterización del fragmento correspondiente al cDNA del gen Otlx 2 utilizado en este estudio ha sido publicado en el trabajo de investigación (Mucchielli y col. 1.996).