

ANTICUERPOS DIRIGIDOS A PEQUEÑAS MOLÉCULAS DE NEUROTRANSMISORES Y PÉPTIDOS: PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DE ANTICUERPOS A DOPAMINA, SEROTONINA, GABA, VASOPRESINA, PÉPTIDO VASOACTIVO INTESTINAL, NEUROPÉPTIDO Y, SOMATOSTATINA Y SUSTANCIA P

Ruud M. Buijs y Ma. del Carmen Basualdo S.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. C.P. 04510, México, D.F.

E-mail: buijs@biomedicas.unam.mx

RESUMEN

En el presente trabajo se describe un procedimiento por medio del cual pueden ser obtenidos anticuerpos a partir de moléculas pequeñas de neurotransmisores usando glutaraldehído como agente acoplador. Este procedimiento fue desarrollado bajo la condición de que el inmunógeno usado para la preparación del anticuerpo fuera, hasta donde fuese posible, de la misma identidad que la molécula transmisora fijada al tejido. Con el fin de lograr mayor éxito, los péptidos, aminas o aminoácidos¹ fueron conjugados a una proteína acarreadora usando glutaraldehído. Los anticuerpos obtenidos fueron usados en estudios de inmunohistoquímica permitiendo la detección de estos transmisores después de un proceso de fijación con glutaraldehído o paraformaldehído para los péptidos.

Palabras Clave: Anticuerpos contra neurotransmisores, anticuerpos frente a pequeñas moléculas, neurotransmisores, péptidos, producción de anticuerpos.

ABSTRACT

In the present paper a procedure is described by which antibodies to small transmitter molecules can be obtained using glutaraldehyde as coupling reagent. This procedure was developed based on the condition that the immunogen used for the preparation of the antibody should, as much as possible, have the same identity as the transmitter molecule fixed in the tissue. In order to achieve this goal, aminergic, amino acid, or peptidergic transmitters were conjugated to a carrier protein by using glutaraldehyde. The resulting antibodies could be used in an immunocytochemical procedure which allowed the detection of these transmitters together with peptides after a single tissue fixation procedure with glutaraldehyde or paraformaldehyde.

Key Words: Antibodies to neurotransmitters, antibodies to small molecules, neurotransmitters, peptides, antibodies to small transmitter molecules.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas de tinción específicas ha contribuido mucho al conocimiento de la neuroanatomía y las funciones del Sistema Nervioso Central (SNC). Desde la introducción de la técnica de tinción de Golgi, algunos otros métodos han sido desarrollados a fin de estudiar las estructuras y conexiones neuronales.

Cuando se observó que la información del SNC era transportada vía la liberación de neurotransmisores, la atención se concentró en el desarrollo de técnicas que permitieran la localización de tales componentes, como la de Falck- Hillarp^{1,2} que pone en evidencia la presencia de aminas, las técnicas de enzima citocímica para el sistema colinérgico y la tinción de Gomori para sistemas neurosecretorios. La falta de sensibilidad y aplicabilidad de estas técnicas fue superada por la inmunohistoquímica. Esta técnica tiene un enorme potencial para estudiar la organización

de transmisores específicos en las neuronas y sus procesos utilizando anticuerpos capaces de detectar pequeñas diferencias entre moléculas. Inicialmente existía amplia creencia de que era imposible incrementar la especificidad de los anticuerpos contra moléculas tan pequeñas como una amina o un aminoácido, sin embargo, la solución a este problema empezó a vislumbrarse cuando Landsteiner³, mostró que algunos cambios en pequeñas moléculas daban como resultado cambios en el reconocimiento de estas moléculas por un anticuerpo, y más aún, que es posible obtener anticuerpos a partir de moléculas más pequeñas. Pasaron cincuenta años para que estas observaciones fueran aplicadas a la investigación neurológica. Geffard y colaboradores^{4,5} Steinbusch y Verhofstad⁶ y Storm-Mathisen y colaboradores⁷, introdujeron a la neuroanatomía el uso de anticuerpos a partir de moléculas pequeñas de transmisores. Geffard y col.^{4,5} desarrollaron una técnica que permite mantener la molécula del transmisor sin cambios a lo largo de todo el proceso de inmunohistoquímica, desde la preparación del inmunógeno para inducir anticuerpos, la fijación y la tinción del tejido logrando gran especificidad en las pruebas. Esta estrategia combinada con procedimientos prácticos es lo que nosotros describiremos en el presente trabajo.

PREPARACIÓN DEL INMUNÓGENO

El resultado de un procedimiento de tinción Inmunohistoquímica depende de la reacción de un anticuerpo con un antígeno. Como ha sido discutido por Pool y Buijs⁸ la fijación ocupa un papel central en el proceso porque cambiará la conformación del antígeno y por tanto la especificidad y la afinidad por el anticuerpo. Especialmente en el caso de moléculas pequeñas, el inmunógeno usado para la preparación de anticuerpos debe tener, hasta donde sea posible, la misma identidad de las moléculas fijadas en el tejido donde se llevará a cabo el proceso de tinción. Por supuesto, las moléculas pequeñas necesitan ser acopladas a moléculas grandes a fin de lograr que sean buenos inmunógenos o para localizarlas en los tejidos. Siguiendo esta línea de razonamiento es necesario usar la "fijación de tejido" en la preparación de este conjugado inmune. Para este propósito es deseable usar glutaraldehído en vez de formalina por razones de velocidad de fijación y para evitar la formación de productos indeseables como se discute por Geffard y col.^{4,5} y Pool y Buijs⁹. Si el glutaraldehído es usado como un agente conjugante todas las moléculas con grupos libres pueden acoplarse a la proteína acarreadora. Sin embargo, otros grupos son también accesibles a la fijación con glutaraldehído¹⁰⁻¹².

A fin de obtener una conjugación óptima con glutaraldehído es importante tener en cuenta algunas condiciones:

1. Para obtener una respuesta suficientemente alta de anticuerpo, al menos 0.1-0.2 μmol , el hapteno debe ser conjugado a 1 mg de proteína acarreadora.
2. La concentración de glutaraldehído utilizada debe ser tan baja como sea posible. Usualmente una concentración final de 0.1% es suficiente y en ningún caso debe exceder a 0.5% a fin de evitar la polimerización. La concentración de glutaraldehído es muy importante porque una gran variedad de grupos moleculares reaccionan con el glutaraldehído a concentraciones altas. A bajas concentraciones el glutaraldehído reacciona primero con los dos grupos NH_2 de la lisina tanto en posición alfa como epsilon. Concentraciones altas de glutaraldehído durante la preparación del inmunógeno producen anticuerpos altamente inespecíficos que producen a su vez mucho fondo en las tinciones de secciones de tejido. Esto se explica por la formación de muchos anticuerpos en grupos inespecíficos que están unidos al glutaraldehído.
3. Para las catecolaminas, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ u otros agentes reductores como el ácido ascórbico deben ser adicionados a las soluciones amortiguadoras después del acoplamiento a fin de evitar oxidación en el anillo de la estructura química de las catecolaminas. El ácido ascórbico puede ser usado durante el acoplamiento.
4. Después del acoplamiento, el inmunógeno debe ser reducido por medio de NaBH_4 ¹³ a fin de prevenir la inducción de anticuerpos a los grupos cargados $\text{C}=\text{N}$ del inmunógeno (ver Figura 1). Antes del tratamiento con el borohidruro de sodio, la reacción da una mezcla de color amarillo (los grupos cargados $\text{C}=\text{N}$) y después de la reacción la mezcla se torna blanca. Si no es así deberá adicionarse más borohidruro. En el caso de anticuerpos a partir de péptidos se omitirá el uso de borohidruro o se utilizará en cantidades muy pequeñas.
5. Para cada antígeno deberán determinarse las condiciones

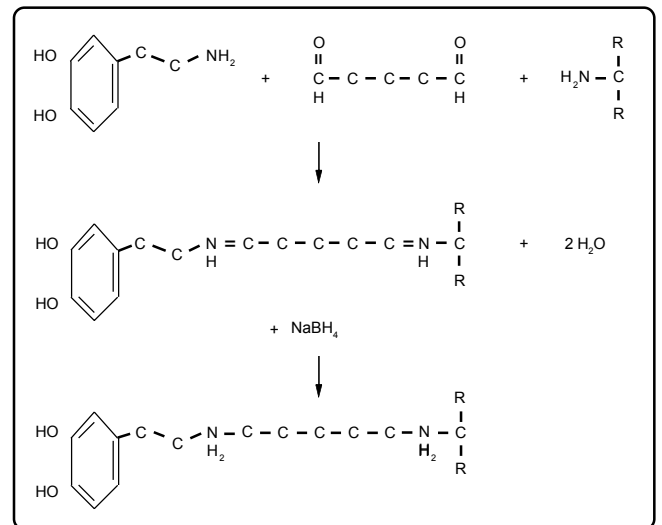


Figura 1. Secuencia de fijación de dopamina a un grupo NH_2 de una proteína acarreadora. La dopamina es fijada con su grupo NH_2 por medio de un doble enlace. Este doble enlace es reducido con borohidruro de sodio dando como resultado una cadena alifática.

Hapteno	Concentración del hapteno	Concentración final del glutaraldehido	Tiempo de reacción
DA	1.22mg/ml	0.1%	30min
5HT	2.5mg/ml	0.1%	10min
GABA	0.6mg/ml	0.1%	30min
Péptidos	+/- 5mg/ml	0.15%	3-4h

Tabla I. Preparación de inmunógenos para diferentes transmisores.

óptimas de acoplamiento con glutaraldehido. Esto se hace adicionando antígeno tritado a fin de establecer el tiempo óptimo de reacción para la preparación del inmunógeno. Es necesario hacer notar que cada proteína acarreadora tiene diferente número de sitios de unión para glutaraldehido y como consecuencia de esto, un número diferente de antígenos que pueden ser acoplados. Por lo tanto, deberán hacerse curvas de unión por separado para cada antígeno y para cada proteína acarreadora (ver Tabla I).

Las siguientes soluciones deben ser adicionadas subsecuentemente:

0.1 ml hapteno, 0.8 ml tiroglobulina en concentración de 2.5 mg/ml, 0.1 ml de glutaraldehido en amortiguador de fosfatos pH 6 (Tabla I).

La reacción fue detenida adicionando aproximadamente 5 mg de borohidruro de sodio. Para los péptidos no es necesaria la etapa de reducción con borohidruro, porque esta sustancia puede destruir el hapteno y favorecer la producción de anticuerpos en grupos no deseados. Posteriormente el inmunógeno fue dializado a 4°C contra una solución de Na₂S₂O₅ al 0.2% en amortiguador de fosfatos pH 6.

Con esta estrategia se produjeron anticuerpos a partir de: serotonina (5HT), dopamina (DA), ácido gama amino butírico (GABA), o péptidos como vasopresina (VP), somatostatina (SOM), péptidos intestinales vasoactivos (VIP), neuropéptido Y (NPY) y sustancia P (SP).

INMUNIZACIÓN

Para inmunizar a los conejos: 1 ml del inmunógeno debe ser mezclado fuertemente con 1 ml de adyuvante completo de Freund e inyectado por vía subcutánea e intramuscular. Si se hacen repetidas inmunizaciones, la segunda inmunización se hará después de una semana, seguida por un esquema de inmunizaciones dos veces por semana usando adyuvante incompleto de Freund. Se tomará una muestra de sangre heparinizada después de la sexta semana y una semana después de la última inmunización. Dados los efectos inflamatorios del adyuvante completo de Freund muchos investigadores han buscado sustancias alternativas^{14,15}, sin embargo, ninguna ha

resultado tan efectiva como el adyuvante completo de Freund y por esta razón nosotros lo utilizamos en nuestro trabajo. Para algunos haptenos, se investigó la respuesta con una sola inmunización. Inicialmente se probó si una sola inmunización con serotonina conjugada con glutaraldehido era suficiente para dar una respuesta inmune adecuada. Así, un animal recibió una sola inmunización con 40 µmol de serotonina conjugada a 2 mg de tiroglobulina. Tres y cinco meses después este animal recibió una inmunización adicional. Otro animal recibió repetidas inmunizaciones con el mismo inmunógeno. El título de los anticuerpos se siguió por intensidad de tinción usando 100 pg de serotonina fijadas con glutaraldehido a una matriz de nitrocelulosa y gelatina (Fig. 2). Esta figura muestra claramente que las inmunizaciones repetidas son poco efectivas. Si realmente se requieren múltiples inmunizaciones deberán hacerse con adyuvante incompleto de Freund, el cual carece de sustancias inflamatorias. Sin embargo, nosotros hemos demostrado recientemente que estas sustancias inflamatorias son esenciales para inducir una buena respuesta de los anticuerpos¹⁶. Los resultados indican que no en todos los casos son necesarias repetidas inmunizaciones para obtener una respuesta inmune, una sola inmunización puede ser suficiente. Ya que los péptidos son mucho más caros que las aminos o los aminoácidos, repetidas inmunizaciones con péptidos pueden elevar mucho el costo de operación. Nosotros pensamos que puede ser mucho más rentable restringirnos a una sola inmunización para la mayoría de los péptidos. Para todos los péptidos se utilizó el mismo protocolo de conjugación. Se realizaron inmunizaciones contra somatostatina (SOM), colecistocinina (CCK), neuropéptido Y (NPY), factor natriurético atrial (ANF), factor liberador de corticotrofina (CRF), Péptido intestinal vasoactivo (VIP) y sustancia P (SP).

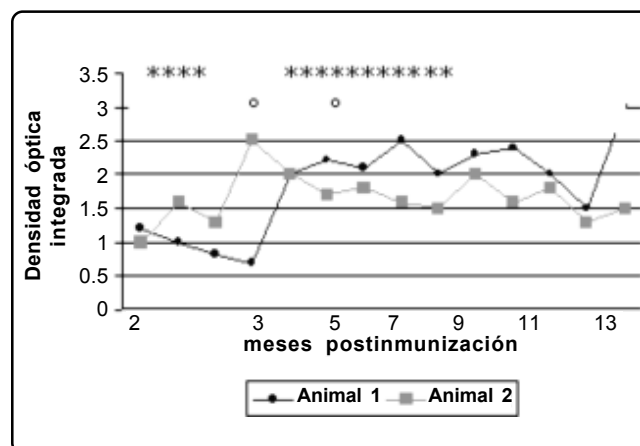


Figura 2. Puede apreciarse la intensidad de la densidad óptica integrada (DOI) de 100 pg de serotonina en secciones de tejido después de las inmunizaciones. El conejo 1 recibió múltiples inmunizaciones (*). El conejo 2 recibió sólo 3 inmunizaciones (°). Nótese que después de la primera inyección del animal 2 el título de anticuerpos se eleva considerablemente y en la segunda inmunización la DOI tiene una baja importancia.

Todas las inmunizaciones produjeron anticuerpos al inmunógeno utilizado, aunque el título de ANF y CRF fue demasiado bajo para permitir una aceptable detección por inmunohistoquímica en tejido fijado. Con los demás péptidos, una sola inmunización con 0.5 mg de péptido produjo un título de anticuerpos suficiente para la localización del antígeno en tejido fijado con glutaraldehído por inmunohistoquímica. También puede ser usado paraformaldehído como fijador especialmente para péptidos.

PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE ANTICUERPOS

La especificidad del anticuerpo debe ser probada por diferentes caminos, los cuales se discuten ampliamente por Pool y Buijs⁹. Para el control del título y la especificidad inicial pueden ser usados diferentes procedimientos en los cuales es fundamental probar con el antígeno fijado al tejido con glutaraldehído en vez de usar antígeno libre.

Nosotros desarrollamos el siguiente sistema de prueba para evaluar la potencia y especificidad del antisuero.

Hojas de membrana de nitrocelulosa (poro de 0.1µm) fueron incubadas por 1 h en una solución de gelatina (2g/lit a razón de 0.5ml/cm²) a 40°C con agitación suave. Se lavaron por 4 veces con agua y se dejaron secar al aire. Utilizando este procedimiento, las membranas retuvieron cantidades reproducibles de gelatina de aproximadamente 50µg/cm². La cantidad de gelatina y el tamaño del poro parecen ser cruciales, ya que ambos influyen en la eficacia de la fijación y la detección por inmunohistoquímica. Un microlitro de solución de antígeno que contiene 5-100 pg/µL se aplicó a la matriz de nitrocelulosa-gelatina. Subsecuentemente, una hoja de papel filtro (Whatman 3 mm) fue remojada en una solución de glutaraldehído al 5% en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.6 y secado hasta que el incremento de peso del papel fue del 30%, se colocó encima del papel de nitrocelulosa y se presionó por 5 min (ver detalles en ^{17,18}). Después la membrana de nitrocelulosa con el antígeno fijado se sometió a las mismas condiciones de tinción por inmunohistoquímica que las secciones de tejido fijado.

Después de la adición de 3,3 diaminobencidina (DAB), se midió la densidad óptica de las manchas y se expresó como densidad óptica integrada.

La ventaja de este método es que el procedimiento de tinción y fijación para la evaluación de la especificidad es idéntico al utilizado para el tejido. Un ejemplo de estos resultados se da en la Figura 3 la cual ilustra que el anticuerpo a serotonina prácticamente no muestra reacción cruzada con noradrenalina (NA) o DA y que el anticuerpo en dopamina casi no cruza con 5HT o NA. Estos resultados confirman que el procedimiento aquí detallado produce anticuerpos altamente específicos y sensibles. Por supuesto, la prueba final para demostrar la sensibilidad y afinidad de los anticuerpos fue llevada a cabo en el tejido.

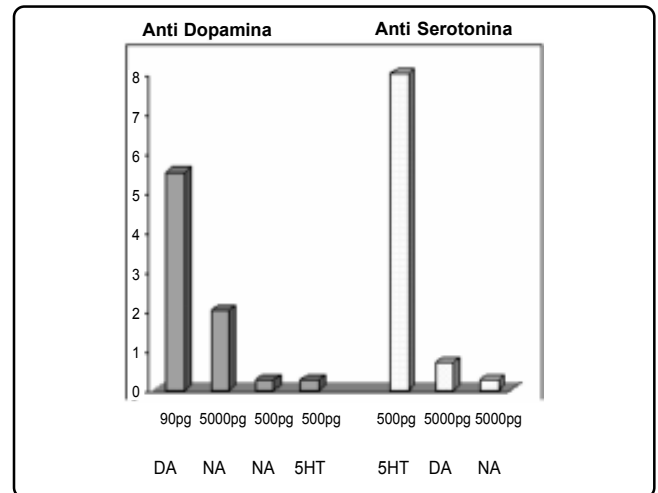


Figura 3. Se muestra la intensidad de la tinción en las manchas frente a diferentes concentraciones de aminas utilizando un anticuerpo contra dopamina o serotonina. Con el anticuerpo en dopamina sólo una mancha de 5,000pg de noradrenalina es capaz de hacer una reacción cruzada detectable. Con antiserotonina sólo 5,000pg muestran una reacción detectable.

FIJACIÓN DEL TEJIDO

La fijación de pequeñas moléculas de transmisores en el tejido produce algunas veces problemas de consideración. En general estas moléculas son altamente difusibles. Algunas veces hay pérdida de ellas bajo condiciones hipóxicas. A fin de asegurar una rápida fijación es necesario emplear un sistema de perfusión a presión utilizando primero 50 ml de solución salina isotónica y en seguida introducir el fijador en el cerebro. Se puede utilizar como fijador una solución de concentración alta de glutaraldehído algunas veces junto con paraformaldehído al 1% para mejorar la preservación de las ultraestructuras. El glutaraldehído se diluye en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 o si es necesario en solución amortiguadora de citratos o acetatos pH 4, sobre todo con las catecolaminas debido a las propiedades antioxidantes de estas sustancias.

El ácido ascórbico puede ser adicionado para proteger el anillo de las catecolaminas. Se puede hacer una postfijación dejando el tejido en el mismo fijador otras 2 h.

De aquí en adelante el anillo catecolamina de la dopamina debe ser protegido por adición de un agente reductor; usualmente se agrega 1% de Na₂S₂O₅ a la solución de lavado y a la solución de incubación del primer anticuerpo.

Dependiendo de las propiedades del antígeno en las secciones de tejido puede someterse éste, a condiciones reductoras con borohidruro de sodio a fin de obtener un mejor reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo (ver Tabla II y Figura 4).

Además, si se utiliza glutaraldehído en el proceso de fijación es posible detectar un gran número de diferentes antígenos desde

	Glutaraldehido pH4	Glutaraldehido pH7	Necesidad de Borohidruro después de la fijación	Formalina
DA	+++	+++	NO	-
5HT	+++	+++	SI	-
GABA	++	+++	NO	-
Vasopresina	++	+++	NO	+++
Sustancia P	+++	++	NO	+++
VIP	++	+	SI	+++
NPY	++	+	SI	+++
Somatostatina	++	+	NO	+++

El número de cruces indica la intensidad de la tinción: - no hay tinción, + débil, ++ buena, +++ intensa.

Tabla II. Relativo reconocimiento del antígeno en tejido fijado con diferentes sustancias.

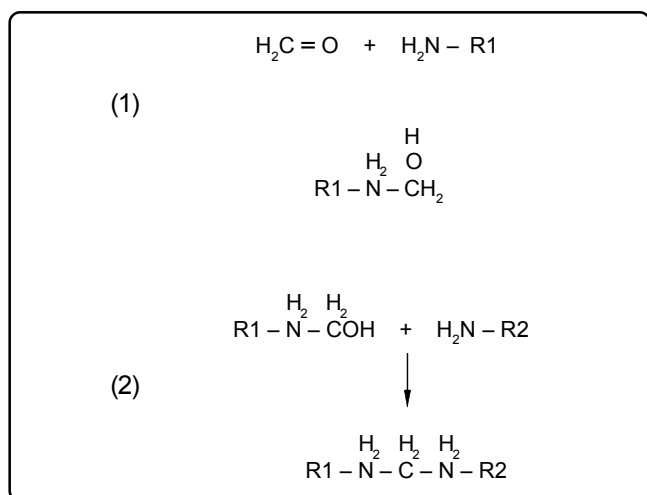


Figura 4. Se muestra una posible secuencia de fijación con formalina reaccionando con grupos NH₂. La primera unión forma un grupo metilol reactivo (1) el cual puede reaccionar con otro grupo NH₂ (2).

aminas y aminoácidos hasta neuropéptidos. Como puede observarse en la Tabla II, las aminas y aminoácidos no pueden ser detectados tras la fijación con formalina en contraste a los neuropéptidos. GABA y 5HT pueden ser fijados con formalina aunque a mucha más baja velocidad que con glutaraldehído¹⁹ (Figura 5).

Este resultado puede ser explicado porque los anticuerpos formados contra antígenos conjugados con glutaraldehído sólo reconocen este antígeno cuando está acoplado a glutaraldehído. La alta afinidad del glutaraldehído por estas aminas en comparación a la formalina permite, sin embargo, la adición de pequeñas concentraciones de formalina durante la fijación sin una notable reducción en la intensidad de la tinción.

En el caso de los péptidos, la fijación con formalina permite una mejor detección y esto puede ser explicado porque la adición de la relativamente pequeña molécula de glutaraldehído no modifica el sitio antigénico de forma considerable. Los anticuerpos

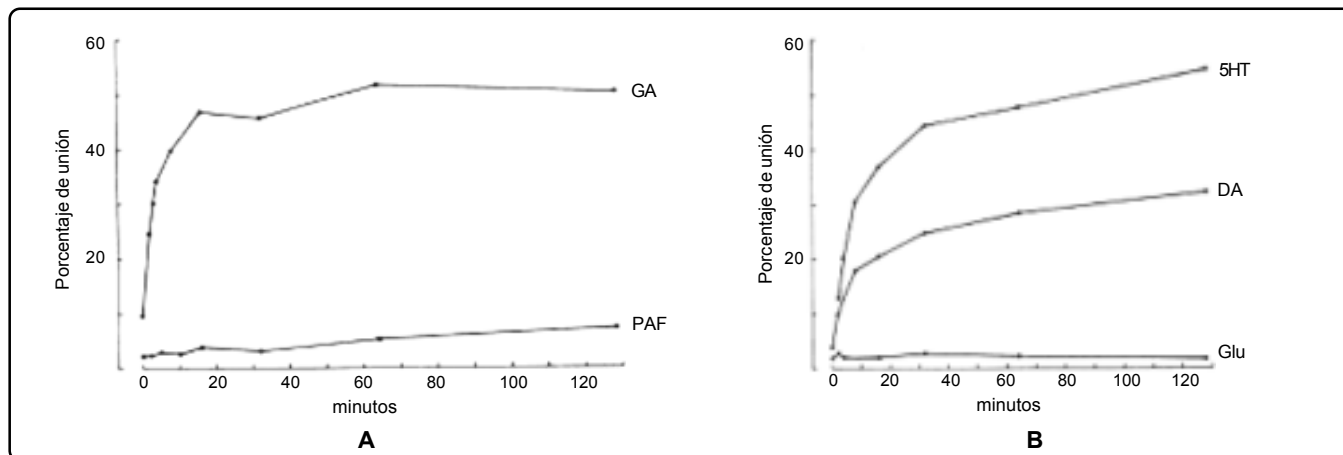


Figura 5. A) Muestra la velocidad de fijación de la serotonina (5HT) por Glutaraldehido (GA) o paraformaldehido (PAF) a la proteína acarreadora tiroglobulina. La cantidad de transmisor unido a la proteína se expresa en tiempo. B) Muestra la relativa velocidad de fijación de la serotonina (5HT), dopamina (DA) y glutamato (Glu) a una proteína acarreadora con glutaraldehído. La cantidad de transmisor unido a la proteína se expresa en tiempo.

generados no son necesariamente dirigidos a la parte de la molécula conjugada al glutaraldehído. Esta fijación expone probablemente grupos que quizá también son accesibles después de la fijación con formalina. En resumen, la fuerte fijación con glutaraldehído probablemente dificulta la penetración de los anticuerpos y algunas veces puede disminuir la intensidad de la tinción, cosa que no sucede con la formalina.

Por otra parte, los anticuerpos formados contra inmunógenos conjugados a formalina no necesariamente detectan antígenos en tejido fijado con glutaraldehído. El hecho de que algunas veces el tejido necesita ser reducido con borohidruro para una óptima detección del antígeno y a veces no, sólo indica que en ocasiones las cargas positivas resultado de las dobles ligaduras presentes, impiden la unión exitosa del anticuerpo y el antígeno. Si la reducción no es necesaria, el anticuerpo probablemente reconozca la parte de la molécula que no está afectada por las dobles ligaduras, o la unión del anticuerpo no se vea bloqueada por las dobles ligaduras.

De los datos de la tabla II puede concluirse que la fijación con glutaraldehído a un pH bajo da como resultado una mejor detección de péptidos que la fijación con glutaraldehído a pH alto. Este resultado puede explicarse porque gran variedad de grupos moleculares reaccionan con glutaraldehído a pH 7, pero a pH 4 la afinidad por glutaraldehído de la mayoría de estos grupos es baja, excepto para grupos NH_2 alfa y epsilon de lisina^{10,11}. Seleccionando el pH al que se realiza la fijación también es posible seleccionar los grupos que reaccionan con el glutaraldehído. Si se utilizan concentraciones bajas de glutaraldehído los grupos con más alta afinidad como los grupos NH_2 alfa y epsilon de lisina se conjugarán de forma preferencial.

Aparte de la sensibilidad y especificidad que presenten los anticuerpos, una de las grandes ventajas de usar un solo proceso de fijación es que estos anticuerpos pueden detectar aminas, aminoácidos y péptidos en el mismo tejido. Ejemplos de este procedimiento puede verse en Buijs y col.¹⁹

Para la localización de péptidos algunas veces es necesario el uso de Triton X-100, porque sin el detergente generalmente no pueden verse en la tinción las terminales axonales (ver discusión en ²⁰). Para algunos péptidos puede usarse postfijación con OsO_4 para después hacer tinción de cortes ultrafinos de tejido incluidos en resina plástica^{21,22}. Esto debe ser revisado para cada péptido por separado, sin embargo, en nuestra experiencia, la tinción de cortes ultrafinos incluidos en resina plástica es posible cuando el péptido está presente en concentraciones altas, por ejemplo en la eminencia media o en la hipófisis, pero la concentración de péptido en terminales axonales en otras partes del cerebro es demasiado baja para ser detectada.

Hemos observado que para GABA, así como para otros aminoácidos, la fijación con OsO_4 no destruye la antigenicidad



Figura 6. Localización ultraestructural de GABA en un material postfijado con OsO_4 . Esta figura ilustra una terminal conteniendo GABA y formando una sinapsis con un pituicito en el lóbulo neural. El aminoácido GABA se puede visualizar por los pequeños puntos de 10 nm de partículas de oro unidas al anticuerpo secundario anti GABA.²⁴

de la molécula siempre que el OsO_4 sea removido por corrosión de la capa de resina antes de la inmunohistoquímica^{19,23}. La posibilidad de usar OsO_4 para estos antígenos puede explicarse porque estas moléculas no pueden oxidarse, no poseen dobles ligaduras y consecuentemente no cambiarán por la fijación con OsO_4 (Fig. 6).

De ahí que el perfecto reconocimiento antigénico en un tejido depende de la óptima fijación que permita preservar las ultraestructuras.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado parcialmente por CONACyT (proyecto 79797) y DGAPA (proyecto IN-215308).

REFERENCIAS

1. Carlsson, A., Falck, B., Hillarp, N.A., Thieme, G. & Torp, A. A new histochemical method for visualization of tissue catechol amines. *Med. Exp. Int. J. Exp. Med.* **4**, 123-125 (1961).
2. Falck, B., Hillarp, N.A., Thieme, G. & Torp, A. Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *Brain Res. Bull.* **9**, 11-15 (1982).
3. Landsteiner, K. & Van der Scheer, J. The specificity of serological reactions. *J. Exp. Med.* **63**, 325-338 (2009).
4. Geffard, M., Buijs, R.M., Seguela, P., Pool, C.W. & Le Moal, M. First demonstration of highly specific and sensitive antibodies against dopamine. *Brain Res* **294**, 161-165 (1984).
5. Seguela, P., Geffard, M., Buijs, R.M. & Le Moal, M. Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunocytochemical results. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3888-3892 (1984).
6. Steinbusch, H.W., Verhofstad, A.A. & Joosten, H.W. Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience* **3**, 811-819 (1978).

7. Storm-Mathisen, J. *et al.* First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature* **301**, 517-520 (1983).
8. Pool, C.W. & Buijs, R.M. Antigen identity in immunocytochemistry. Van Leeuwen, F.W., Buijs, R.M., Pool, C.W. & Pach, O. *Molecular Neuroanatomy*, 233-266 (2009).
9. Pool, C.W. & Buijs, R.M. Antigen identity in immunocytochemistry. Van Leeuwen, F.W., Buijs, R.M., Pool, C.W. & Pach, O. *Molecular Neuroanatomy*, 233-266 (1988).
10. Bowes, J.H. & Cater, C.W. The interaction of aldehydes with collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* **168**, 341-352 (1968).
11. Habeeb, A.J. & Hiramoto, R. Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 16-26 (1968).
12. Riederer, B.M. Antigen preservation tests for immunocytochemical detection of cytoskeletal proteins: influence of aldehyde fixatives. *J Histochem. Cytochem.* **37**, 675-681 (1989).
13. Lillie, R.D. & Pizzolato, P. Histochemical use of borohydrides as aldehyde blocking reagents. *Stain Technol.* **47**, 13-16 (1972).
14. Mallon, F.M., Graichen, M.E., Conway, B.R., Landi, M.S. & Hughes, H.C. Comparison of antibody response by use of synthetic adjuvant system and Freund complete adjuvant in rabbits. *Am J Vet. Res.* **52**, 1503-1506 (1991).
15. Smith, D.E., O'Brien, M.E., Palmer, V.J. & Sadowski, J.A. The selection of an adjuvant emulsion for polyclonal antibody production using a low-molecular-weight antigen in rabbits. *Lab Anim Sci.* **42**, 599-601 (1992).
16. Buijs, R.M., Van, D., V, Garidou, M.L., Huitinga, I. & Escobar, C. Spleen vagal denervation inhibits the production of antibodies to circulating antigens. *PLoS. ONE.* **3**, e3152 (2008).
17. Van Der Sluis, P.J., Pool, C.W. & Sluiter, A.A. Pressblotting on nitrocellulose membranes: A method for a sensitive quantitative immunodetection of peptides after gel isoelectric focusing. *J. Immunol. Methods* **104**, 65-71 (1987).
18. Van Der Sluis, P.J., Pool, C.W. & Sluiter, A.A. Immunochemical detection of peptides and proteins on press-blot after direct tissue gel isoelectric focussing. *Electrophoresis* **9**, 654-661 (1988).
19. Buijs, R.M., Wortel, J. & Hou, Y.X. Colocalization of gamma-aminobutyric acid with vasopressin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* **358**, 343-352 (1995).
20. Voorn, P. & Buijs, R.M. An immuno-electronmicroscopical study comparing vasopressin, oxytocin, substance P and enkephalin containing nerve terminals in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Brain Res* **270**, 169-173 (1983).
21. Beauvillain, J.C. & Tramu, G. Immunocytochemical demonstration of LH-RH, somatostatin, and ACTH-like peptide in osmium-postfixed, resin-embedded median eminence. *J Histochem. Cytochem.* **28**, 1014-1017 (1980).
22. Shioda, S., Nakai, Y., Ochiai, H., Nakada, H. & Sano, Y. Simultaneous identification of two different neuropeptides using a combined PAP and protein A-gold technique in the rat neurohypophysis. *J Electron Microsc. (Tokyo).* **33**, 72-75 (1984).
23. Somogyi, P., Hodgson, A.J., Chubb, I.W., Penke, B. & Erdei, A. Antisera to gamma-aminobutyric acid. II. Immunocytochemical application to the central nervous system. *J Histochem. Cytochem.* **33**, 240-248 (1985).
24. Buijs, R.M., van Vulpen, E.H. & Geffard, M. Ultrastructural localization of GABA in the supraoptic nucleus and neural lobe. *ns* **20**, 347-355 (1987).