

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS DE INMUNOTINCIÓN PARA
LOS ANTÍGENOS GFAP, NeuN Y BrdU EN CEREBRO DE RATA**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto
Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al
título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología**

Adriana J. Saborío Arce

Cartago, Mayo, 2016



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS DE INMUNOTINCIÓN PARA
LOS ANTÍGENOS GFAP, NeuN Y BrdU EN CEREBRO DE RATA**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto
Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al
título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología**

Adriana J. Saborío Arce

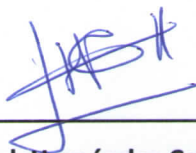
Cartago, Mayo, 2016



**Establecimiento de protocolos de inmunotinción para los antígenos GFAP, NeuN y BrdU en
cerebro de rata**

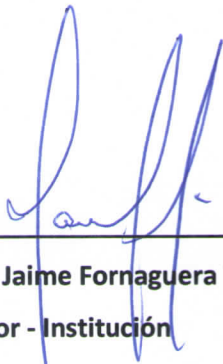
**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como
requisito parcial para optar al título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología**

Miembros del Tribunal



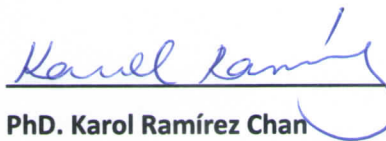
PhD. Erick Hernández Carvajal

Profesor asesor - ITCR



PhD. Jaime Fornaguera Trías

Asesor - Institución



PhD. Karol Ramírez Chan

Lectora

RESUMEN

En el Centro de Investigación en Neurociencias (CIN) de la Universidad de Costa Rica se realizan proyectos de investigación en los que se analizan variables conductuales, neuroquímicas y genéticas que involucran a ratas albinas como sujetos de experimentación. El desarrollo de técnicas y protocolos inmunohistoquímicos resulta fundamental para el estudio, la investigación y el análisis cuidadoso de los componentes celulares y moleculares del cerebro de estos roedores, de forma tal que se complementen las demás técnicas ya existentes y exitosas. Esto permite entender los cambios funcionales y estructurales ocurridos en ellos bajo ciertas condiciones y favorece la comparación entre diferentes grupos experimentales sometidos a condiciones diversas. El objetivo de esta investigación fue establecer protocolos de inmunotinción con fluorocromos para el estudio de los antígenos GFAP, NeuN y BrdU en el hipocampo de cerebros de rata, por lo que se desarrolló un protocolo para la identificación y cuantificación de células gliales y además se implementó un protocolo para la identificación y cuantificación de células neuronales. Se evidenció que no existe un protocolo ideal de detección inmunofluorescente del BrdU, y más bien, hay múltiples posibles tácticas utilizadas por los científicos para lograr detectar este marcador; por lo que se recomienda cambiar el nucleósido sintético BrdU por el nucleósido EdU, con un marcaje que involucre a Alexa Fluor 555 para poder establecer un protocolo que permita determinar la proliferación celular en cortes de tejido de cerebro de rata e indirectamente estudiar la plasticidad cerebral.

PALABRAS CLAVE: Fluorocromo, antígeno, GFAP, NeuN, BrdU, hipocampo, células gliales, células neuronales, EdU, Alexa Fluor 555, proliferación celular.

ABSTRACT

In the Neuroscience Research Center (CIN) at the University of Costa Rica, research projects are performed in which behavioral, neurochemical and genetic variables involving albino rats as experimental subjects are analyzed. The development of techniques and immunohistochemical protocols is essential for the study, research and careful analysis of the cellular and molecular components of rodents' brain, so that they complement other techniques existing and successful. This allows us to understand the functional and structural changes in them under certain conditions and enhances the comparison between different experimental groups under various conditions. The objective of this research was to establish protocols for immunostaining with fluorochromes to study GFAP, NeuN and BrdU antigens in the hippocampus of rat brains. A protocol for the identification and quantification of glial cells was developed and also a protocol for the identification and quantification of neuronal cells was implemented. It was evident that there is no ideal protocol for immunofluorescent detection of BrdU, and rather, there are multiple tactics used by scientists to detect this marker; so, it is recommended to change the synthetic nucleoside BrdU by the nucleoside EdU with Alexa Fluor 555 to achieve the implementation of the protocol to determine cell proliferation in tissue sections of rat brain and to study neuronal plasticity indirectly.

KEY WORDS: Fluorochrome, antigen, GFAP, NeuN, BrdU, hippocampus, glial cells, neuronal cells, EdU, Alexa Fluor 555, cell proliferation.

DEDICATORIA

*A mi familia por siempre estar presente,
A mi esposo por su apoyo y confianza en mis sueños,
por siempre estar ahí para mi y alentarme en todo momento.*

AGRADECIMIENTOS

La autora desea expresar su agradecimiento a las siguientes personas y/o instituciones por sus valiosos aportes en el desarrollo de esta investigación:

A Dios, por darme la vida, por brindarme salud y fortaleza en cada momento, y por las personas que puso en mi camino.

A mi esposo, Armando, por ser mi motor de vida, mi compañero de viaje y por apoyarme en este proceso.

A mis padres, Licda. Virginia Arce Cortés y Lic. Arturo Saborío Alfaro; por su mejor herencia: mis estudios.

Al Dr. Jaime Fornaguera Trías, director del Centro de Investigación en Neurociencias (CIN) de la Universidad de Costa Rica; por brindarme la oportunidad de realizar la práctica en el CIN y por su orientación, paciencia y labor de dirección que emprendió con sabiduría en este proceso.

Al Dr. Erick Hernández Carvajal, profesor de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica; por su apoyo incondicional, su dirección y asesoría técnica durante este trabajo.

A la Dra. Karol Ramírez Chan, investigadora del Centro de Investigación en Neurociencias; por los consejos y ayuda incondicional que hicieron posible la presente investigación.

Al Dr. Esteban Chaves Olarte, director del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales; por su anuencia y colaboración para/con el uso del microscopio Nikon Eclipse 80i.

A todas las personas que trabajan en el CIN; por su compañerismo y amabilidad.

A Vilma Rojas Garbanzo y Daniel Quesada Yamasaki, por su apoyo incondicional.

A los profesores, amigos y colegas del TEC; por sus enseñanzas y todos los momentos inolvidables que hemos vivido.

Finalmente, a todas las personas que se cruzaron en mi camino y que me dieron palabras de aliento y apoyo para lograr mis objetivos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
ÍNDICE DE APÉNDICES	xii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	2
1. Sistema Nervioso.....	2
2. Técnicas histológicas	5
3. Inmunohistoquímica	6
4. Microscopía de fluorescencia.....	10
5. Antígenos de interés	11
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
- Localización del estudio:	15
- Preparación de soluciones de trabajo y materiales:	15
- Anticuerpos y reactivos utilizados:	15
A. Estandarización de la técnica de tinción de la proteína GFAP, con inmunofluorescencia, en cortes de tejido de cerebro de rata	16
A.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno.....	17
A.2. Evaluación de la prueba de bloqueo inespecífico	18
A.3. Evaluación de la titulación de anticuerpos.....	18
B. Estandarización de la técnica de marcaje de la proteína NeuN, con inmunofluorescencia, en cortes de tejido de cerebro de rata	20
B.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno.....	20
B.2. Evaluación de la prueba de bloqueo inespecífico	21
B.3. Evaluación de la titulación de anticuerpos.....	21
C. Estandarización de la técnica de inmunotinción con fluorescencia del nucleósido BrdU, en cortes de tejido de cerebro de rata	22
C.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno.....	23
C.2. Evaluación de la titulación de anticuerpo	23
RESULTADOS	25
A. Estandarización de la técnica de tinción de la proteína GFAP con inmunofluorescencia en cortes de tejido de cerebros de rata.....	25
A.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno.....	25
A.2. Evaluación de la prueba de bloqueo inespecífico	26
A.3. Evaluación de la titulación de anticuerpos.....	26
A.4. Optimización del protocolo para la tinción de la proteína GFAP, con inmunofluorescencia, en cortes de tejido de cerebros de rata.....	29
- Evaluación del bloqueo de la autofluorescencia del tejido:	29
B. Estandarización de la técnica de marcaje de la proteína NeuN con inmunofluorescencia en cortes de tejido de cerebro de rata.	32

B.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno.....	32
B.2. Evaluación de la prueba de bloqueo inespecífico	33
B.3. Evaluación de la titulación de anticuerpos.....	33
B.4. Optimización del protocolo para el marcaje de la proteína NeuN, con inmunofluorescencia, en cortes de tejido de cerebro de rata	36
- Evaluación del bloqueo de la autofluorescencia del tejido:.....	36
C. Estandarización de la técnica de inmunotinción con fluorescencia del nucleósido BrdU, en cortes de tejido de cerebro de rata.	38
C.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno.....	38
C.2. Evaluación de la titulación de anticuerpo	38
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA.....	52
ANEXO 1.- Protocolo para realizar perfusión intracardiaca en rata.....	58
ANEXO 2.- Protocolo para el revestimiento de portaobjetos con gelatina, Sulfato de Cromo y Potasio	59
ANEXO 3.- Preparación de Solución PBS y Solución de citrato de sodio 10 mM	60
ANEXO 4.- Protocolo para el corte de cerebros de rata utilizando el criostato Leica CM3050 S.....	61
APÉNDICE 1.- Protocolo para la detección inmunohistoquímica de la proteína GFAP en cortes de tejido de cerebro de rata	62
APÉNDICE 2.- Protocolo de marcaje inmunohistológico de la proteína NeuN en cortes de tejido de cerebro de rata.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Tipo de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la implementación del marcaje inmunohistoquímico de los antígenos GFAP, NeuN, BrdU y del núcleo celular.....	16
Cuadro 2.- Optimización de la técnica de inmunotinción con fluorescencia del nucleósido BrdU, en cortes de tejido de cerebro de rata y sus resultados experimentales	39
Cuadro 3.- Resultados obtenidos en la prueba de titulación de anticuerpos para el marcaje inmunohistoquímico de la proteína GFAP (Fotografía 9).....	44
Cuadro 4.- Resultados obtenidos en la prueba de titulación de anticuerpos para el marcaje inmunohistoquímico de la proteína NeuN (Fotografía 16)	44
Cuadro 5.- Características de los fluorocromos utilizados en el desarrollo de este proyecto	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación esquemática de la neurona, algunas células neurogliales y otros elementos neuronales	2
Figura 2.- Vista en 3D de la región hipocámpal y su ubicación dentro de un cerebro de rata.....	4
Figura 3.- Estructura de una molécula de inmunoglobulina	7
Figura 4.- Anticuerpos monoclonales reaccionando con un epítipo específico en un antígeno.....	8
Figura 5.- Anticuerpos policlonales uniéndose a varios epítipos de un antígeno.	8
Figura 6.- Método de marcaje directo: El anticuerpo primario marcado reacciona con el antígeno del tejido	10
Figura 7.- Método de marcaje indirecto: El anticuerpo secundario marcado reacciona con el anticuerpo primario unido al antígeno del tejido	10
Figura 8.- Comparación de la reacción "click", entre el grupo etinil del EdU incorporado en el ADN de doble cadena y Alexa Fluor 488 azida, y el marcaje inmunofluorescente de BrdU, inaccesible sin el proceso de desnaturalización del ADN de doble cadena	47

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.- Cerebro fijado de rata adulta, tomado en el Centro de Investigación en Neurociencias.	3
Fotografía 2.- Corte coronal de cerebro de rata, observado a través del microscopio óptico.	5
Fotografía 3.- Cerebro de rata utilizado durante el trabajo experimental.....	17
Fotografía 4.- Cortes coronales consecutivos de cerebro de rata de 30 µm de grosor, adheridos a un portaobjetos gelatinizado con una solución de sulfato de cromo y potasio.	17
Fotografía 5.- Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i, propiedad del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Universidad de Costa Rica (UCR)	19
Fotografía 6.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno GFAP en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, tomado a una magnificación de 10X.	25
Fotografía 7.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno GFAP en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, tomado a una magnificación de 40X.	26
Fotografía 8.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno GFAP en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, con y sin el procedimiento con bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno, tomado a una magnificación de 10X.....	27
Fotografía 9.- Microscopía de epifluorescencia que muestra la titulación del anticuerpo primario monoclonal (clon 2.2B10) producido en rata, reactivo para la proteína GFAP (Invitrogen: 13-0300), y del anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de rata (Invitrogen: A-21434) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 555. Tomado a una magnificación de 10X.....	28
Fotografía 10.- Control negativo del protocolo de estandarización de la técnica de tinción de la proteína GFAP con inmunofluorescencia, en un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor; tomado a una magnificación de 20X.	29
Fotografía 11.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno GFAP en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, con y sin el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido, utilizando una solución de acetato de amonio 50 mM y sulfato de cobre 1 mM, a pH 5; tomado a una magnificación de 10X..	30
Fotografía 12.- Control negativo del protocolo de estandarización de la técnica de tinción de la proteína GFAP con inmunofluorescencia en cortes de tejido de cerebros de rata, utilizando el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido; tomado a una magnificación de 20X.	31
Fotografía 13.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno NeuN en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de	

antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, tomado a una magnificación de 10X..	32
Fotografía 14.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno NeuN en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, tomado a una magnificación de 60X..	33
Fotografía 15.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno NeuN en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, con y sin el procedimiento con bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno, tomado a una magnificación de 10X.....	34
Fotografía 16.- Microscopía de epifluorescencia que muestra la titulación del anticuerpo primario monoclonal (clon A60) producido en ratón, reactivo para la proteína NeuN (Millipore: MAB377) y el anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de ratón (Invitrogen: A-11029) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 488. Tomado a una magnificación de 10X.....	35
Fotografía 17.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno NeuN en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, con y sin el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido, utilizando una solución de acetato de amonio 50 mM y sulfato de cobre 1 mM, a pH 5; tomado a una magnificación de 10X.	37
Fotografía 18.- Controles negativos del protocolo de estandarización de la técnica de tinción de la proteína NeuN con inmunofluorescencia, en un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor; tomado a una magnificación de 10X..	37
Fotografía 19.- Microscopía de epifluorescencia de la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, probando el protocolo de inmunomarcaje del nucleósido BrdU. Tomado a una magnificación de 10X.....	38
Fotografía 20. Microscopía de epifluorescencia que muestra diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal (clon MoBU-1) conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 555. Tomado a una magnificación de 10X	39
Fotografía 21.- Cortes coronales de cerebro de rata de 30 µm de grosor, recolectados en una placa de cultivo multipozos, con solución de PBS, para el trabajo <i>free floating</i>	40

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1.- Protocolo para realizar perfusión intracardiaca en rata (Modificado de: Gerfen 1997)	58
ANEXO 2.- Protocolo para el revestimiento de portaobjetos con gelatina, Sulfato de Cromo y Potasio (Fornaguera 1995; Das et al. 2013)	59
ANEXO 3.- Preparación de Solución PBS y Solución de citrato de sodio 10 mM (Modificado de: Gerfen 1997)	60
ANEXO 4.- Protocolo para el corte de cerebros de rata utilizando el criostato Leica CM3050 S (Leica 2000)	61

ÍNDICE DE APÉNDICES

APÉNDICE 1.- Protocolo para la detección inmunohistoquímica de la proteína GFAP en cortes de tejido de cerebro de rata.....	62
APÉNDICE 2.- Protocolo de marcaje inmunohistológico de la proteína NeuN en cortes de tejido de cerebro de rata	63

INTRODUCCIÓN

La histología es una disciplina morfológica, que se fundamenta en la observación e identificación de las células, su contenido, y su entorno extracelular (Geneser 2000). Gracias a los avances en la tecnología, ejemplificados en el microscopio, y al gran desarrollo de algunas ramas de la ciencia como la bioquímica, la fisiología, la inmunología y la patología, la histología ha ampliado su campo de acción hacia áreas como la histoquímica, la histofisiología, la inmunohistoquímica e histopatología, entre otras (Junqueira y Carneiro 2005). En la histología del sistema nervioso (neurohistología) se fusionan todas estas áreas, facilitando el estudio de los componentes estructurales de este complejo sistema.

En el Centro de Investigación en Neurociencias (CIN) de la Universidad de Costa Rica se realizan una serie de proyectos de investigación en los que se analizan variables conductuales, neuroquímicas y genéticas que involucran a ratas albinas como sujetos de experimentación. Resulta fundamental, por tanto, el desarrollo de técnicas y protocolos inmunohistoquímicos para el estudio, la investigación y el análisis cuidadoso de los componentes celulares y moleculares del sistema nervioso, de forma tal que complemente las demás técnicas ya existentes y exitosas. Además, que se perfila como una necesidad del CIN, el abordar los proyectos de investigación de una forma más integral, incluyendo otros niveles de análisis.

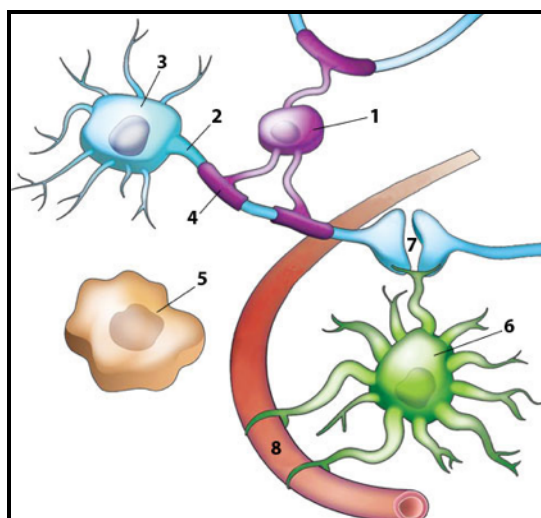
Con la presente investigación se pretende establecer una técnica de inmunomarcaje con fluorocromos para el estudio de los antígenos GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*), NeuN (*Neuronal Nuclei*) y BrdU (Bromodesoxiuridina) en regiones específicas del cerebro de ratas albinas, en el Laboratorio de Histología del CIN de la Universidad de Costa Rica.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Sistema Nervioso

En los mamíferos, el sistema nervioso es un sistema bioeléctrico complejo cuyas células presentan el más alto grado de diferenciación y especialización celular (Kandel et al. 2001, Purves et al. 2007). Poseen particularidades como la excitabilidad y conductividad, que le permiten recibir estímulos físicos y químicos, transformándolos en potenciales eléctricos que permite conducirlos a zonas particulares, donde son interpretados y redirigidos a los órganos efectores para dar las respuestas adecuadas. Estas funciones son llevadas a cabo por las *neuronas* que, junto con las *células neurogliales* y el material extracelular, forman el sistema nervioso (Figura 1) (Allen y Barres 2009, Kandel et al. 2001, Purves et al. 2007).

Figura 1.- Representación esquemática de la neurona, algunas células neurogliales y otros elementos neuronales. (1) Oligodendrocito, (2) axón, (3) soma, (4) mielina, (5) Microglia, (6) Astrocito, (7) sinapsis, (8) vaso sanguíneo.



Modificado de: Allen y Barres 2009

La neurona es la célula responsable de transmitir el impulso nervioso, procesar la información y elaborar una respuesta (Kandel et al. 2001). La neuroglia (gr. *glía*, pegamento), además de darle sostén a las neuronas, participan de forma activa también en la transmisión sináptica, ayudando a modular el impulso nervioso, recapturando neurotransmisores, controlando la concentración de iones, y más recientemente se ha visto que liberan sustancias químicas (gliotransmisores) que se propone tienen función reguladora (Allen y Barres 2009, Araque et al. 1999, 2014, Butt et al. 2005, Laming et al. 2000, Verkhratsky y Butt 2007, Wang y Bordey 2008). Desde 1846, cuando Virchow

describió por primera vez la glía, asignándole un papel de “cemento neuronal” (*nerve glue*), han sido numerosos los trabajos que permitieron conocer los aspectos morfológicos y funcionales de las células gliales, aunque quedan todavía muchas incógnitas por resolver. En las primeras décadas de este siglo fueron fundamentales los trabajos que desarrollaron primero Santiago Ramón y Cajal, citado por Felipe y Jones (1992) y posteriormente Río Hortega, citado por Fariña y Escalona (2005) acerca de la morfología de las células gliales. Se distinguen varios subgrupos de células gliales teniendo en cuenta el tamaño, forma y función: los astrocitos, los oligodendrocitos, las células NG2, las células de Schwann y la microglia (Allen y Barres 2009, Butt et al. 2005, Verkhratsky y Butt 2007).

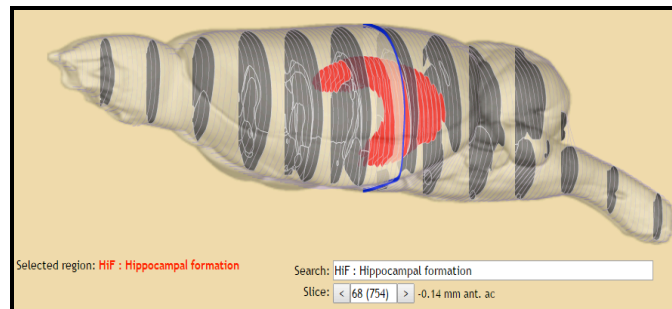
El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia y en el desarrollo, producción y/o control de medicamentos, alimentos y otros insumos. En la actualidad, se han desarrollado y perfeccionado una gran variedad de modelos animales, a fin de cubrir las exigencias y necesidades de los investigadores para llevar a cabo experimentos cada vez más sofisticados (Hernández 2006, Rodríguez 2007). Existen varias razones por las que la rata es el sujeto más utilizado en la investigación en el campo de las Neurociencias; entre estas se puede mencionar que: 1) son individuos con un tamaño adecuado, es decir, son lo suficientemente pequeños lo que permite su fácil manipulación en el laboratorio, y poseen un cerebro lo suficientemente grande lo que facilita la localización estereotáxica de ciertas áreas cerebrales; 2) son individuos muy resistentes a las infecciones; y 3) por sus características cerebrales, anatómicas y bioquímicas, similares a las del ser humano, se constituyen en buenos modelos experimentales (Fotografía 1) (Paxinos y Watson 1998).

Fotografía 1.- Cerebro fijado de rata adulta, tomado en el Centro de Investigación en Neurociencias, que muestra su tamaño (25.28mm de largo).



Aunque existen muchas áreas cerebrales que podrían ser de interés para estudiar la morfología del sistema nervioso, en este estudio la de mayor interés es la región hipocampal (Figura 2), puesto que en el Centro de Investigación en Neurociencias se realizan investigaciones que involucran funciones asociadas con esta región cerebral. La zona del hipocampo o cuerno de Amón es una estructura comprendida entre la corteza cerebral y el tálamo, ubicada en ambos hemisferios cerebrales, en la que interactúan diferentes neurotransmisores importantes, entre estos la serotonina, la acetilcolina, el glutamato y la glutamina (Andersen et al. 2007, Oja et al. 2007). Esta región cerebral juega un papel fundamental en la memoria, el aprendizaje, el control de las emociones y la orientación espacial (Andersen et al. 2007, Bird y Burgess 2008, Florian y Rouillet 2004, Redish 1999).

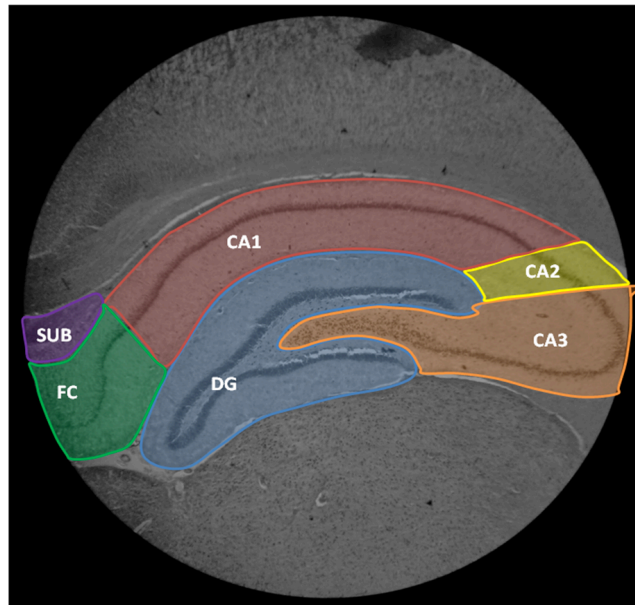
Figura 2.- Vista en 3D de la región hipocampal y su ubicación dentro de un cerebro de rata



Bakker et al. 2015

Anatómicamente, el hipocampo se constituye de áreas dispuestas en capas; se subdivide en las siguientes regiones: el giro dentado, la capa CA1, CA2, CA3, el subcúbulo, el presubcúbulo, el parasubcúbulo, fasciola cinereum y el córtex entornial (Escobar 2007). El giro dentado (DG), se compone de tres capas: la capa molecular, la capa granular y la capa de células polimórficas (Fotografía 2). Las células madre ubicadas en la zona subgranular dan lugar a neuronas granulares, que maduran en células redondeadas y densamente apiladas y que se integran funcionalmente a la circuitería del hipocampo, un proceso conocido como neurogénesis adulta, a través del que nuevas neuronas se siguen produciendo hasta la edad adulta a una tasa fisiológica constante en varias especies de mamíferos, incluyendo la rata (Aimone et al. 2006, Amaral et al. 2007, Andersen et al. 2007, Kempermann et al. 2004).

Fotografía 2.- Corte coronal de cerebro de rata, observado a través del microscopio óptico, que muestra, de manera general, la región hipocampal, y las diferentes secciones que lo componen: Giro Dentado (DG), Fasciola Cinereum (FC), Subcubículo (SUB), Cornu Ammonis 1 (CA1), Cornu Ammonis 2 (CA2) y Cornu Ammonis 3 (CA3). Aumento 4X



2. Técnicas histológicas

Las técnicas histológicas han sido mejoradas con el pasar del tiempo, gracias al avance tecnológico, y esto ha permitido optimizar el quehacer científico en esta área. Se trata de técnicas que incluyen en forma general los procesos de fijación, rescate, inclusión, corte, y marcaje del tejido (Junqueira y Carneiro 2005, Vaquero 2007).

La *fijación* permite dar tratamiento a los tejidos con sustancias químicas, las cuales tienen como fin mantener las estructuras, al generar la formación de enlaces entre las proteínas constituyentes del tejido, logrando la conservación de los tejidos, aumentando su dureza e interrumpiendo los procesos celulares dinámicos que ocurren con la muerte celular (Farmilo y Stead 2006). La fase de fijación del material para inmunohistoquímica es esencial; una fijación inadecuada impide cualquier resultado fiable (Vaquero 2007). Para mantener la calidad de la técnica en inmunohistoquímica, se recomienda como fijador el formaldehído en un rango de 4%-10% tamponado a pH 7.4; y el periodo ideal de fijación que no sea menor de 24 horas (Beresford 2000, Vaquero 2007).

Durante la fijación con formaldehído se producen puentes metilo entre las proteínas y se forman compuestos cálcicos adyacentes. Estos compuestos afectan también las zonas antigénicas y deben eliminarse para obtener un resultado óptimo en inmunohistoquímica (Vaquero 2007). Para esto se utiliza el método de *recuperación antigénica*, o método de rescate, y se realiza mediante la incubación con calor, aproximadamente a 100 °C, en buffer de citrato, Tris-HCl, o EDTA (Farmilo y Stead 2006, Key y Boenisch 2006, Montero 2003, Shi et al. 2011).

En la *inclusión* o impregnación los tejidos se envuelven en una sustancia de consistencia firme, que permite obtener cortes suficientemente finos para ser observados al microscopio; las sustancias usadas para este fin son la celoidina, el polietilenglicol y la parafina (Beresford 2000).

El siguiente paso en el procesamiento histológico es el *corte* o sección de la muestra, en el cual se corta el tejido en láminas lo suficientemente delgadas (0,5 – 30 μm) como para permitir, en el microscopio, el paso de la luz a través de él; las secciones finas y parejas se obtienen con un micrótomos (Beresford 2000). El micrótomos es un instrumento de gran precisión que proporciona cortes de espesor graduable (Gartner y Hiatt 2002, Leica 2000). Hay muchos tipos de micrótomos, el criostato es un equipo que consta de un micrótomos incluido en una cámara de congelación por gas freón, de temperatura regulable que normalmente se utiliza a -20 °C (Leica 2000). Finalmente, la última etapa del proceso histológico consiste en el *marcage* de los cortes; este paso permite la visualización de los tejidos y en algunas ocasiones la cuantificación de sus componentes al microscopio (Gartner y Hiatt 2002). La estandarización de cada uno de los pasos, desde la toma del tejido hasta la valoración final del resultado obtenido, es clave para obtener una inmunotinción confiable (Vaquero 2007).

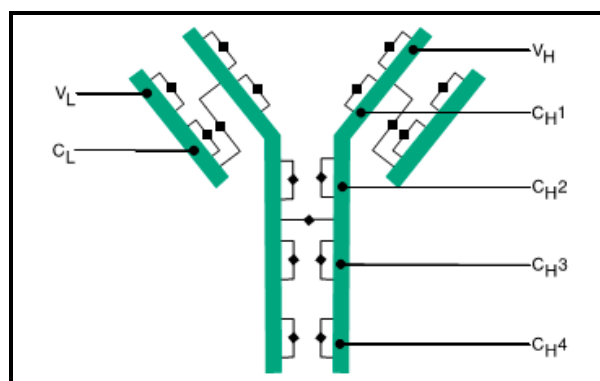
3. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica de detección que utiliza anticuerpos asociados con compuestos fluorescentes o complejos enzimáticos, que se unen específicamente a una molécula de interés (antígeno) y que puede ser identificada posteriormente por microscopía (Chemicon s.f.). El objetivo de la inmunohistoquímica es poner de manifiesto una molécula o familia de moléculas presentes en una sección histológica y estudiar su distribución tisular "*in situ*" (Molist et al. 2011). Gracias a la oferta comercial de anticuerpos y a la estandarización de protocolos, se ha convertido

en un método sencillo y rápido (Boenisch 2006a). Además, la conjugación o combinación de los anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes, permite detectar cantidades muy pequeñas de moléculas presentes en el tejido (Boenisch 2006a, Montero 2003).

El reactivo fundamental común a todas las técnicas inmunohistoquímicas es el *anticuerpo* (Figura 3). Los anticuerpos pertenecen a un grupo de proteínas llamadas inmunoglobulinas (Ig), que abarcan cinco clases: IgG, IgA, IgM, IgD y IgE; de éstas, IgG y IgM son las más utilizadas en inmunohistoquímica (Chemicon s.f.). Cada Ig está compuesta por dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas livianas idénticas (L). Las cadenas H difieren en las propiedades antigénicas y estructurales y determinan la clase y subclase de la molécula. Los puentes disulfuro unen en forma covalente las cadenas L a H y H a H, y le confieren mayor estabilidad a la molécula al participar en la estructura terciaria (Boenisch 2006a). La molécula, además, puede dividirse en dominios variables (V) y dominios constantes (C). En el dominio variable de la cadena liviana (V_L) y en el dominio variable de la cadena pesada (V_H) se localizan las porciones amino terminales de la molécula de Ig. V_L y V_H forman juntos el sitio de unión con el antígeno (en el antígeno la unión se da en su determinante antigénico denominado, epítipo). Cada cadena L también tiene un dominio constante (C_L), mientras que las cadenas H tienen varios dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}) (Boenisch 2006a, Chemicon s.f.).

Figura 3.- Estructura de una molécula de inmunoglobulina, que incluye dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas livianas idénticas (L) cada una compuesta por dominios constantes (C) y variables (V), y unidas entre sí por puentes disulfuro.

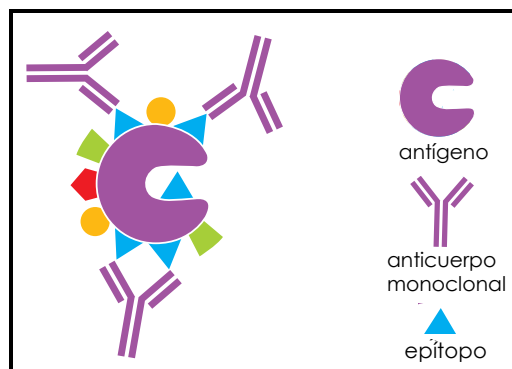


Modificado de: Boenisch 2006a

Los anticuerpos pueden ser poli o monoclonales (Boenisch 2006a, Chemicon s.f.). Los anticuerpos monoclonales son el producto de un clon individual de células plasmáticas; se obtienen mediante el método de hibridoma de Kohler que consiste en la fusión de células esplénicas de un ratón

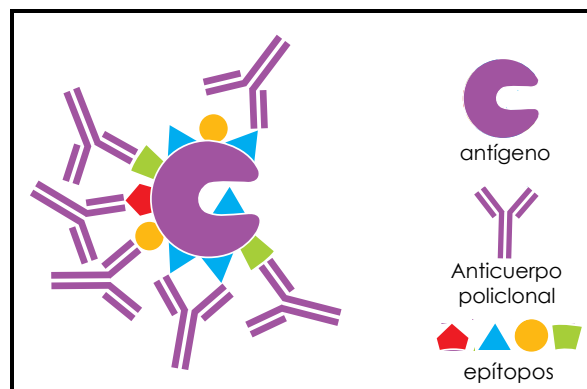
inmunizado con una línea celular de mieloma no secretor murino (Vaquero 2007). Los anticuerpos de un clon dado son idénticos inmunoquímicamente y reaccionan con un epítipo específico en el antígeno contra el cual han sido originados (Figura 4) (Boenisch 2006a). Por otra parte, los anticuerpos policlonales son producidos por diferentes células plasmáticas y, por tanto, son diferentes inmunohistoquímicamente; reaccionan con varios epítipos sobre el antígeno para el que fueron originados (Figura 5) (Boenisch 2006a). Los anticuerpos monoclonales poseen ciertas ventajas sobre sus contrapartes policlonales: alta homogeneidad, ausencia de anticuerpos inespecíficos, facilidad de caracterización, ausencia de variabilidad de lote a lote, alta especificidad de unión al antígeno y afinidad uniforme (Boenisch 2006a). No obstante, se puede rescatar de los anticuerpos policlonales, que una población de éstos contiene un espectro relativamente continuo de afinidades con varios epítipos de un antígeno dado; por esto, durante el desarrollo de un protocolo de tinción no es probable que un lavado excesivo resulte en una pérdida apreciable de los mismos (Chemicon s.f., Montero 2003, Vaquero 2007).

Figura 4.- Anticuerpos monoclonales reaccionando con un epítipo específico en un antígeno.



Modificado de: Boenisch 2006a

Figura 5.- Anticuerpos policlonales uniéndose a varios epítipos de un antígeno.



Modificado de: Boenisch 2006a

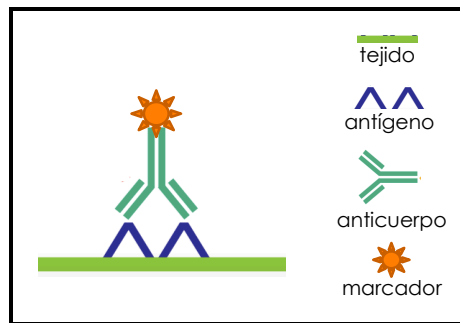
Existen ciertos factores a considerar sobre el uso de anticuerpos. Las diluciones y punto de dilución óptima (titulación) de anticuerpos, así como el pH, el tiempo de incubación y la temperatura, están relacionados estrechamente con sus efectos sobre la calidad de las coloraciones o tinciones inmunohistoquímicas (Boenisch 2006c). Estos factores pueden cambiarse independientemente o de forma complementaria, para lograr diferencias significativas en la calidad de la coloración. Al hacer cualquier cambio de este tipo, el objetivo máximo será el logro de una coloración específica óptima, acompañada de un mínimo de interferencia por la coloración de fondo (marcaje inespecífico) (Boenisch 2006c, Chemicon s.f.).

Las inmunoglobulinas, aunque se unan a la molécula o antígeno que se busca detectar, no serán visibles con el microscopio por lo que se deben conjugar con otras moléculas (marcadores) que permitan obtener una señal visible. Entre los tipos de moléculas existentes están los fluorocromos, que son moléculas que emiten luz visible cuando se les ilumina con una determinada longitud de onda (Boenisch 2006b, Overton 2006).

Aunque la inmunofluorescencia se puede usar para detectar a una sola molécula tisular, su verdadero potencial se muestra con la múltiple inmunodetección, es decir, dos o más moléculas presentes en una misma célula, sitio, o corte de tejido de forma simultánea. Esto es posible porque existe una gran variedad de fluorocromos que son capaces de emitir luz visible tras ser excitados con diferentes longitudes de onda. Tiene la ventaja del ahorro en el tiempo del proceso, y una reducción en la cantidad de reactivos y consumibles; sin embargo, debe planearse muy bien la escogencia de los anticuerpos para evitar reactividad cruzada (Christensen 2006, Overton 2006). Este tipo de marcaje tiene la desventaja de que no es permanente puesto que la luz emitida por la molécula fluorescente se desvanece con el tiempo (Boenisch 2006b, Molist et al. 2011).

La conjugación directa de un marcador con la inmunoglobulina se denomina método de detección directa (Figura 6) (Key 2006). Dado que la coloración involucra solo un anticuerpo marcado se logra una escasa amplificación de la señal, y esto resulta en muy poca sensibilidad para las exigencias actuales (Molist et al. 2011). El método de detección indirecta es más utilizado y consiste en colocar una serie de intermediarios entre la inmunoglobulina y la molécula marcadora (Key 2006, Molist et al. 2011).

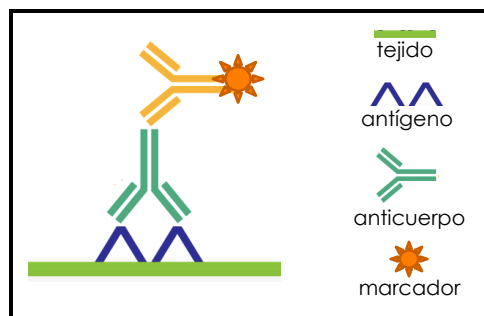
Figura 6.- Método de marcaje directo: El anticuerpo primario marcado reacciona con el antígeno del tejido.



Modificado de: Key 2006

En el método indirecto, un anticuerpo primario sin conjugar se une primero al antígeno; luego se aplica un anticuerpo secundario marcado, dirigido contra el anticuerpo primario (ahora el antígeno) (Figura 7). Si el anticuerpo primario se fabrica en conejo o ratón, el anticuerpo secundario debe dirigirse contra inmunoglobulinas del conejo o del ratón, respectivamente (Chemicon s.f.). Este método permite una mayor versatilidad de la técnica y mayor intensidad de la señal frente a una misma cantidad de antígeno (Key 2006, Molist et al. 2011).

Figura 7.- Método de marcaje indirecto: El anticuerpo secundario marcado reacciona con el anticuerpo primario unido al antígeno del tejido.



Modificado de: Key 2006

4. Microscopía de fluorescencia

Cuando se utilizan fluorocromos como marcadores de anticuerpos, la microscopía de fluorescencia es la técnica que permite visualizar los resultados de este tipo de tinciones. En el presente trabajo se utiliza la epifluorescencia para la detección de las células de interés.

La fluorescencia fue descrita por primera vez por el científico George G. Stokes tras observar que el material fluorita emitía luz roja cuando era excitado con luz ultravioleta. Stokes observó que la luz emitida tenía una mayor longitud de onda que la del haz con el que el material o sustancia era excitado, describiendo así el principio de la fluorescencia (Spring y Davidson s.f.). Las moléculas que son capaces de emitir fluorescencia se conocen como fluorocromos (Lichtman y Conchello 2005). Estas sustancias poseen un estado basal en el cual, los electrones de su capa electrónica no absorben ni emiten energía. Cuando un haz de luz incidente es lo suficientemente energético para excitar los electrones, estos absorben la energía lo cual los mueve a capas energéticas superiores. Eventualmente, el electrón excitado regresará a su estado basal liberando energía que es observada en forma de fluorescencia (Lichtman y Conchello 2005, Spring y Davidson s.f.).

Por su lado, la técnica de microscopía epifluorescente se basa en la incidencia de un haz de luz (proveniente de una lámpara de mercurio), de una determinada longitud de onda, sobre la muestra a observar. Esta muestra absorbe la energía de la luz incidente emitiendo a su vez luz a una longitud de onda mayor. Dicha luz atraviesa un filtro que dejará pasar solamente la longitud de onda de interés, mientras que otro filtro en el lente ocular, deja pasar solamente la luz emitida, la fluorescencia, sin permitir el paso de la longitud de onda de excitación (Auxilab s.f.). En un microscopio correctamente configurado, el objeto fluorescente puede ser observado sobre un fondo muy oscuro, idealmente negro (Spring y Davidson s.f.).

5. Antígenos de interés

Por el tipo de investigaciones que se llevan a cabo en el CIN, los antígenos: GFAP, NeuN, BrdU y el núcleo celular, son de gran interés.

- GFAP

Entre los distintos tipos celulares gliales, resaltan los astrocitos como reguladores de la información procesada en el sistema nervioso (Laming et al. 2000). Estas células están relacionadas con la diferenciación, proliferación, soporte trófico y supervivencia de las neuronas (Araque et al. 1999, 2014). También participan en el desarrollo de las conexiones sinápticas, y controlan su número, función y plasticidad (Araque et al. 1999). En la literatura, se han propuesto

ciertas proteínas astrocíticas como participantes en la modelación de la red neuronal: S-100 β , Glutamina Sintetasa y GFAP (Verkhratsky y Butt 2007, Wang y Bordey 2008).

GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*, por sus siglas en inglés) es una proteína de los filamentos intermedios que se ha utilizado como un marcador común de astrocitos (Verkhratsky y Butt 2007, Wang y Bordey 2008). Es un miembro de las proteínas del citoesqueleto, siendo el principal filamento intermedio de los astrocitos maduros del sistema nervioso central (Verkhratsky y Butt 2007). Se cree que es importante en la modulación de la motilidad astrocítica y además, se ha visto relacionada con procesos de astrogliosis (o proliferación de células astrogliales) (Feoli et al. 2008). Aunque la expresión de GFAP ha sido previamente considerada como secundaria a la neurodegeneración, se han encontrado aumentos de los transcritos de GFAP inclusive cuando no existe una patología aparente asociada. Dicho aumento parece también relacionarse con el envejecimiento y se sugiere estar relacionado con problemas de memoria observados en modelos animales de mediana y avanzada edad. Por esta razón, hay quienes sugieren que GFAP podría contribuir a una disminución de las funciones sinápticas durante el envejecimiento (Finch 2003, Nichols et al. 1993).

- NeuN

NeuN (*Neuronal Nuclei*, por sus siglas en inglés) es una proteína nuclear específica de neuronas, su presencia demostrada mediante el uso de anticuerpos permite distinguirlas de otros tipos celulares (Mullen et al. 1992). Se encuentra presente en la mayoría de tipos celulares, tanto del Sistema Nervioso Central como del Sistema Nervioso Periférico, de la mayoría de vertebrados, en las diferentes edades celulares (Zeta Corporation 2011). Algunas neuronas no son reconocidas a ninguna edad, a saber: células de la capa interna nuclear de la retina, células de Cajal-Retzius, células de Purkinje, núcleo de la oliva superior, células del ganglio simpático, entre otras (Mullen et al. 1992, Zeta Corporation 2011).

- BrdU

El desarrollo por Castro y Gratzner, en 1982, de anticuerpos monoclonales frente a la Bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, ofrece en la actualidad la posibilidad de identificar las células, indistintamente de su tipo celular, en fase S del ciclo celular y monitorear su proliferación celular (Carbajo et al. 1994, Leif et al. 2004). Una de las grandes ventajas que ofrece

la técnica de marcaje con BrdU y su identificación inmunocitoquímica sobre secciones de tejido es que el resultado final de la reacción sobre los núcleos marcados es claro y bien definido (Carbajo et al. 1994, Taupin 2006). Se administra intraperitonealmente en una dosis de 50-300 µg/g (Ma et al. 2008, Taupin 2006, Wojtowicz y Kee 2006).

Sin lugar a dudas, utilizando técnicas de marcaje múltiple (BrdU/marcadores citoplásmicos y/o de membrana y/o nucleares) la información acerca de la actividad proliferativa de un preparado histológico se enriquece considerablemente, dado que se puede no sólo establecer un índice de proliferación global, sino también el índice que corresponde a las distintas subpoblaciones que coexisten en un tejido (Carbajo et al. 1994).

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer protocolos de inmunotinción para el marcaje de los antígenos GFAP, NeuN y BrdU en cerebro de rata.

Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo de marcaje inmunohistológico de la proteína GFAP en cortes de tejido de cerebro de rata, para la identificación y cuantificación de células gliales.
- Implementar un protocolo de marcaje inmunohistológico de la proteína NeuN en cortes de tejido de cerebro de rata, para la identificación y cuantificación de células neuronales.
- Desarrollar un protocolo para la cuantificación de células marcadas con BrdU en cortes de tejido de cerebro de rata, como herramienta para determinar la proliferación celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Localización del estudio:

El estudio se realizó en el Laboratorio de Histología del Centro de Investigación en Neurociencias de la Universidad de Costa Rica, ubicado en el Campus Universitario Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

- Preparación de soluciones de trabajo y materiales:

Para realizar el procedimiento de perfusión intracardiaca a las ratas se prepararon cuatro litros de solución salina 0.9%, cuatro litros de solución fijadora y un litro de solución de infiltración, de acuerdo con el protocolo puntualizado en el Anexo 1.

Se prepararon 500 láminas de portaobjetos recubiertas con una solución de gelatina, sulfato de cromo y potasio según el protocolo señalado en el Anexo 2; las cuales se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

Para la implementación de los protocolos de tinción inmunohistoquímica, se prepararon cuatro litros de solución Tampón Fosfato Salino (PBS, por sus siglas en inglés) 10X, a partir de las cuales se iban preparando soluciones 1X según la necesidad. Además, se prepararon dos litros de la solución Citrato de Sodio 10 mM (Anexo 3).

- Anticuerpos y reactivos utilizados:

En el Cuadro 1 se resumen los anticuerpos y reactivos utilizados en este trabajo.

Cuadro 1.- Tipo de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la implementación del marcaje inmunohistoquímico de los antígenos GFAP, NeuN, BrdU y del núcleo celular

Células	Antígeno	Anticuerpo/Reactivo Primario	Anticuerpo Secundario
Células (general)	Núcleo celular	DAPI Marca: Life Technologies Código: P36935	-
Astrocitos	GFAP	Monoclonal (clon 2.2B10) Anti-GFAP hecho en rata Marca: Invitrogen Código: 13-0300 Concentración: 100 µg / 200 µl	Policlonal Anti-IgG (H+L) de rata hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor 555 Marca: Invitrogen Código: A-21434 Concentración: 1000 µg / 500 µl
Neuronas	NeuN	Monoclonal (clon A60) Anti-NeuN hecho en ratón Marca: Millipore Código: MAB377 Concentración: 500 µg / 500 µl	Policlonal Anti-IgG (H+L) de ratón hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor 488 Marca: Life Technologies Código: A-11029 Concentración: 1000 µg / 500 µl
Nuevas células	BrdU	Monoclonal (clon MoBU-1) Anti-BrdU hecho en ratón conjugado con Alexa Fluor 555 Marca: Invitrogen Código: B35131 Concentración: 70 µg / 350 µl	-

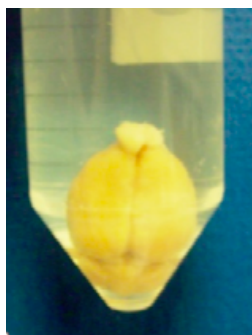
A. Estandarización de la técnica de tinción de la proteína GFAP, con inmunofluorescencia, en cortes de tejido de cerebro de rata (Tang et al. 2007, Paz 2009).

Sujetos: Cuatro ratas albinas macho de la cepa Wistar con una edad al inicio del experimento de 21 días de nacidas. Los animales se alojaron en una habitación con temperatura controlada con un horario de 12:12 h luz-oscuridad (luz se encendió a las 06:00 h), con comida y agua disponible *ad libitum*.

Fijación: Luego de dos días de haber llegado al laboratorio, se les realizó el procedimiento de perfusión intracardiaca (Anexo 1), inicialmente con solución salina 0.9% y seguido con solución fijadora, utilizando una bomba peristáltica (modelo, Marca: TAIYO). Se utilizó un volumen de 200 mL de cada solución, por animal. Finalmente, se extrajo el cerebro y se sumergió en un tubo

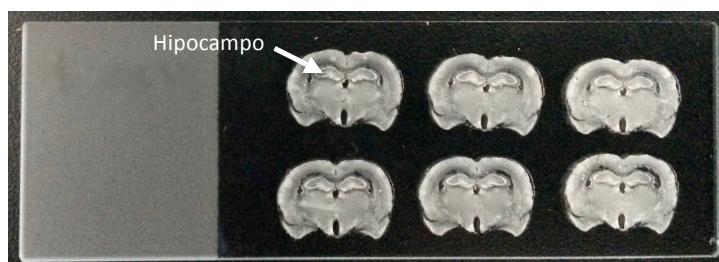
cónico con 30 mL de solución de infiltración; y estuvo listo para usarse cuando se asentó en el tubo (Fotografía 3).

Fotografía 3.- Cerebro de rata utilizado durante el trabajo experimental, sumergido en una solución de fosfatos, sacarosa 30% y formaldehído 4%.



Cortes: Se realizaron cortes coronales de cerebro de rata de 30 μm de grosor, utilizando el criostato Leica CM3050 S (Anexo 4), y se recolectaron en portaobjetos recubiertos con una solución de gelatina, sulfato de cromo y potasio (Anexo 2) (Fotografía 4). Las láminas con los cortes de tejido se almacenaron en una caja para portaobjetos, a 4 °C, hasta su marcaje.

Fotografía 4.- Cortes coronales consecutivos de cerebro de rata de 30 μm de grosor, adheridos a un portaobjetos gelatinizado con una solución de sulfato de cromo y potasio.



El día que se inició el protocolo de marcaje de los cortes, se sacaron los portaobjetos de la cámara de refrigeración, se dejaron reposar a temperatura ambiente por un periodo de diez minutos y luego se sumergieron en una jarra Coplin con 50 mL de solución de PBS para hidratarlos.

A.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno

Se realizaron dos procedimientos: con y sin citrato de sodio. Se precalentó un baño maría a 80 °C con una jarra Coplin con 50 mL de la solución citrato de sodio 10 mM a pH 6, y al alcanzar la temperatura, se sumergieron los cortes de tejido en dicha solución durante 30 minutos; posteriormente, se sacó la jarra Coplin del baño maría y se dejó enfriar el recipiente y su

contenido hasta llegar a temperatura ambiente (25 °C). Para eliminar la solución de citrato de sodio, se lavaron los cortes de tejido con solución de PBS, se dejaron reposar durante cinco minutos, y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

En el procedimiento sin citrato de sodio solamente se sumergieron los cortes de tejido en una solución de PBS, se dejaron reposar durante cinco minutos y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

A.2. Evaluación de la prueba de bloqueo inespecífico

Se realizaron dos procedimientos: con y sin bloqueo de los sitios inespecíficos de unión a antígeno. En el procedimiento con bloqueo, se sumergieron los cortes de tejido en 50 mL de una solución (preparada en el momento) de leche descremada en polvo al 3% en PBS con Triton X-100 al 0.3%, en una jarra Coplin durante 60 minutos, a temperatura ambiente (25 °C).

En el procedimiento sin bloqueo, de seguido se prosiguió con el marcaje de anticuerpo primario.

A.3. Evaluación de la titulación de anticuerpos

Se trabajó con el anticuerpo primario monoclonal (clon 2.2B10) producido en rata, reactivo para la proteína GFAP (Invitrogen: 13-0300). De acuerdo con las consideraciones del fabricante, se utilizaron tres concentraciones de anticuerpo primario: 0.005 – 0.01 – 0.02 µg/µL.

Se incubaron los cortes de tejido con el anticuerpo primario anti-GFAP, diluido en PBS con Triton X-100 al 0.3%. Se colocaron 50 µl por corte de tejido. Los anticuerpos se incubaron “overnight” (durante la noche), a 4 °C, en una cámara húmeda. Al día siguiente, se dejó la cámara húmeda a temperatura ambiente por un periodo de diez minutos. Seguidamente, se lavaron las muestras, dejándolas reposar durante cinco minutos en PBS, y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

Seguidamente, se trabajó con el anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de rata (Invitrogen: A-21434) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 555. De acuerdo con las consideraciones del fabricante, se utilizaron tres concentraciones de anticuerpo secundario: 0.001 – 0.005 – 0.01 µg/µL.

Se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario anti-rata Alexa Fluor 555 producido en cabra. Se diluyó el anticuerpo en PBS y se incubó a temperatura ambiente, en una cámara húmeda negra, durante 60 minutos. Se colocaron 50 µl por corte de tejido. Luego, se lavaron las muestras,

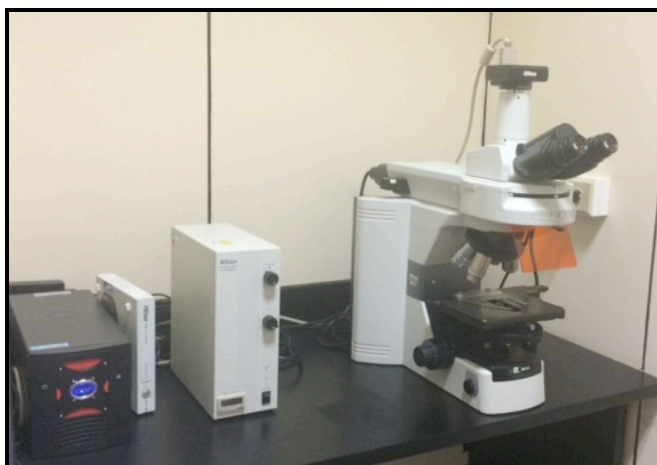
dejándolas reposar durante cinco minutos en PBS, y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

Montaje: Se dejaron secar los cortes a temperatura ambiente y se montaron los cubreobjetos con el medio “Fluoromount” (Sigma: F4680) para evitar el blanqueamiento (*bleaching*) y el decaimiento de la señal de los fluorocromos, y el medio “Prolong Gold Antifade” (Molecular Probes: P10144) con DAPI para la tinción de los núcleos.

Control negativo: Se realizó todo el protocolo descrito, con la excepción que no se incubó con el anticuerpo primario; en su reemplazo se utilizó PBS con Triton X-100 al 0.3%.

Observación: Se observaron las tinciones de los cortes de tejido con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i (Fotografía 5). Las muestras se escanearon en la zona del giro dentado del hipocampo, usando lentes objetivos de 10X, 20X, 40X y 60X. Las imágenes se fotografiaron con una cámara digital DS-Qi1Mc adaptada al microscopio y las fotografías obtenidas fueron analizadas con la ayuda del Software NIS-Elements F.

Fotografía 5.- Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i, propiedad del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Universidad de Costa Rica (UCR)



B. Estandarización de la técnica de marcaje de la proteína NeuN, con inmunofluorescencia, en cortes de tejido de cerebro de rata (Gómez-Nicola et al. 2013, Leuner et al. 2010, Tang et al. 2007).

Sujetos: Cuatro ratas albinas macho de la cepa Wistar con una edad de 21 días de nacidas al inicio del experimento. Los animales se alojaron en una habitación con temperatura controlada con un horario de 12:12 h luz-oscuridad (luz se encendió a las 06:00 h), con comida y agua disponible *ad libitum*.

Fijación: Luego de dos días de haber llegado al laboratorio, se realizó el procedimiento de perfusión intracardiaca a las ratas, al igual que para la detección de GFAP (Anexo 1), inicialmente con solución salina 0.9% y seguido con solución fijadora, utilizando una bomba peristáltica. Se utilizó un volumen de 200 mL de cada solución, por animal. Finalmente, se extrajo el cerebro y se sumergió en un tubo cónico con 30 ml de solución de infiltración; y estuvo listo para usarse cuando se asentó en el tubo.

Cortes: Se realizaron cortes coronales de cerebro de rata de 30 μ m de grosor, utilizando el criostato Leica CM3050 S (Anexo 4), y se recolectaron en portaobjetos recubiertos con una solución de gelatina, sulfato de cromo y potasio (Anexo 2). Los portaobjetos con los cortes de tejido se almacenaron en una caja especializada para tal fin, a 4 °C, hasta su utilización.

El día que se inició el protocolo de marcaje de los cortes, se sacaron los portaobjetos de la cámara de refrigeración, se dejaron reposar a temperatura ambiente por un periodo de diez minutos y luego se sumergieron en una jarra Coplin con 50 ml de solución de PBS para hidratarlos.

B.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno

Se realizaron dos procedimientos: con y sin citrato de sodio. Se precalentó un baño maría a 80 °C con una jarra Coplin con 50 ml de la solución Citrato de Sodio 10 mM a pH 6, y al alcanzar la temperatura, se sumergieron los cortes de tejido en dicha solución durante 30 minutos; posteriormente, se sacó la jarra Coplin del baño maría y se dejó enfriar el recipiente y su contenido hasta llegar a temperatura ambiente (25 °C). Para eliminar la solución de citrato de sodio, se lavaron los cortes de tejido con solución de PBS, se dejaron reposar durante cinco minutos, y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

En el procedimiento sin citrato de sodio solamente se sumergieron los cortes de tejido en una solución de PBS, se dejaron reposar durante cinco minutos y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

B.2. Evaluación de la prueba de bloqueo inespecífico

Se realizaron dos procedimientos: con y sin bloqueo de los sitios inespecíficos de unión a antígeno. En el procedimiento con bloqueo, se sumergieron los cortes de tejido en 50 ml de una solución (preparada en el momento) de leche descremada en polvo al 3% en PBS con Triton X-100 al 0.3%, en una jarra Coplin durante 60 minutos, a temperatura ambiente (25 °C). En el procedimiento sin bloqueo, de seguido se prosiguió con el marcaje de anticuerpo primario.

B.3. Evaluación de la titulación de anticuerpos

Se trabajó con un anticuerpo primario monoclonal (clon A60) producido en ratón, reactivo para la proteína NeuN (Millipore: MAB377). De acuerdo con las consideraciones del fabricante, se utilizaron tres concentraciones de anticuerpo primario: 0.001 – 0.005 – 0.01 µg/µl.

Se incubaron los cortes de tejido con el anticuerpo primario anti-NeuN, diluido en PBS con Triton X-100 al 0.3%. Se colocaron 50 µl por corte de tejido. Los anticuerpos se incubaron durante la noche (*overnight*), a 4 °C, en una cámara húmeda. Al día siguiente, se dejó la cámara húmeda a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron las muestras, dejándolas reposar durante cinco minutos en PBS, y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

Seguidamente, se trabajó con un anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de ratón (Invitrogen: A-11029) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 488. De acuerdo con las consideraciones del fabricante, se utilizaron tres concentraciones de anticuerpo secundario: 0.001 – 0.005 – 0.01 µg/µl.

Se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 488 producido en cabra. Se diluyó el anticuerpo en PBS y se incubó a temperatura ambiente, en una cámara húmeda negra, durante 60 minutos. Se colocaron 50 µl por corte de tejido. Seguidamente, se lavaron las muestras, dejándolas reposar durante cinco minutos en PBS, y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

Montaje: Se dejaron secar los cortes a temperatura ambiente y se montaron los cubreobjetos con el medio “Fluoromount” (Sigma: F4680) para evitar el blanqueamiento y el decaimiento de la señal

de los fluorocromos, y el medio “Prolong Gold Antifade” (Molecular Probes: P10144) con DAPI para la tinción de los núcleos.

Control negativo: Se realizó todo el protocolo descrito, con la excepción que no se incubó con el anticuerpo primario; solamente se utilizó PBS con Triton X-100 al 0.3%.

Observación: Se observaron las tinciones de los cortes de tejido con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i. Las muestras se escanearon en la zona del giro dentado del hipocampo, usando lentes objetivos de 10X, 20X, 40X y 60X. Las imágenes se fotografiaron con una cámara digital DS-Qi1Mc adaptada al microscopio y las fotografías obtenidas fueron analizadas con la ayuda del Software NIS-Elements F.

C. Estandarización de la técnica de inmunotinción con fluorescencia del nucleósido BrdU, en cortes de tejido de cerebro de rata (Tang et al. 2007, Wöhr et al. 2009).

Sujetos: Cuatro ratas albinas macho de la cepa Wistar con una edad de 21 días de nacidas al inicio del experimento. Los animales se alojaron en una habitación con temperatura controlada con un horario de 12:12 h luz-oscuridad (luz se encendió a las 06:00 h), con comida y agua disponible *ad libitum*.

Inyección de la solución de BrdU: Luego de tres días de haber llegado los animales al laboratorio, se preparó una solución fresca de 10 mg/mL de BrdU (Sigma: B9285) en solución salina (0.9% NaCl en H₂O_d estéril) y se llevó a pH 7. Se inyectó la solución i.p. a cada rata en dosis de 100 mg/kg de peso corporal. Los animales se sacrificaron al menos 1 hora después de la inyección.

Fijación: Se realizó el procedimiento de perfusión intracardiaca a las ratas (Anexo 1), inicialmente con solución salina 0.9% y seguido con solución fijadora, utilizando una bomba peristáltica. Se utilizó un volumen de 200 mL de cada solución, por animal. Finalmente, se extrajo el cerebro y se sumergió en un tubo cónico con 30 ml de solución de infiltración; y estuvo listo para usarse cuando se asentó en el tubo.

Cortes: Se realizaron cortes coronales de cerebro de rata de 30 μ m de grosor, utilizando el criostato Leica CM3050 S (Anexo 4), y se recolectaron en portaobjetos recubiertos con una solución de gelatina, sulfato de cromo y potasio (Anexo 2). Los portaobjetos con los cortes de tejido se almacenaron en una caja especializada para tal fin, a 4 °C, hasta su utilización.

El día que se inició el protocolo de marcaje de los cortes, se sacaron los portaobjetos de la cámara de refrigeración, se dejaron reposar a temperatura ambiente por un periodo de diez minutos y luego se sumergieron en una jarra Coplin con 50 mL de solución de PBS para hidratarlos.

C.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno

Se realizaron dos procedimientos: con y sin citrato de sodio. Se precalentó un baño maría a 80 °C con una jarra Coplin con 50 ml de la solución Citrato de Sodio 10 mM a pH 6, y al alcanzar la temperatura, se sumergieron los cortes de tejido en dicha solución durante 30 minutos; posteriormente, se sacó la jarra Coplin del baño maría y se dejó enfriar el recipiente y su contenido hasta llegar a temperatura ambiente (25 °C). Para eliminar la solución de citrato de sodio, se lavaron los cortes de tejido con solución de PBS, se dejaron reposar durante cinco minutos, y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

En el procedimiento sin citrato de sodio solamente se sumergieron los cortes de tejido en una solución de PBS, se dejaron reposar durante cinco minutos y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

C.2. Evaluación de la titulación de anticuerpo

Se trabajó con un anticuerpo monoclonal (clon MoBU-1) (Invitrogen B35131) producido en ratón, conjugado con Alexa Fluor 555, reactivo para el nucleósido BrdU. De acuerdo con las consideraciones del fabricante, se utilizaron tres concentraciones de anticuerpo: 0.001 – 0.002 – 0.004 µg/µl.

Se incubaron los cortes de tejido con el anticuerpo anti-BrdU conjugado con Alexa Fluor 555, diluido en PBS con Triton X-100 al 0.3%. Se colocaron 50 µl por corte de tejido. Los anticuerpos se incubaron durante la noche (*overnight*), a 4 °C, en una cámara húmeda. Al día siguiente, se dejó la cámara húmeda a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron las muestras, dejándolas reposar durante cinco minutos en PBS, y se repitió dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

Montaje: Se sacaron los cortes de los pozos de cultivo, se colocaron en portaobjetos, se secaron a temperatura ambiente, y se montaron los cubreobjetos con el medio “Fluoromount” (Sigma: F4680) para evitar el decaimiento de la señal, y el medio “Prolong Gold Antifade” (Molecular Probes: P10144) con DAPI para la tinción de los núcleos.

Control negativo: Se realizó todo el protocolo descrito, con la excepción que no se incubó con el anticuerpo; solamente se utilizó PBS con Triton X-100 al 0.3%.

Observación: Se observaron las tinciones de los cortes de tejido con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i. Las muestras se escanearon en la zona del giro dentado del hipocampo, usando lentes objetivos de 10X, 20X, 40X y 60X. Las imágenes se fotografiaron con una cámara digital DS-Qi1Mc adaptada al microscopio y las fotografías obtenidas fueron analizadas con la ayuda del Software NIS-Elements F.

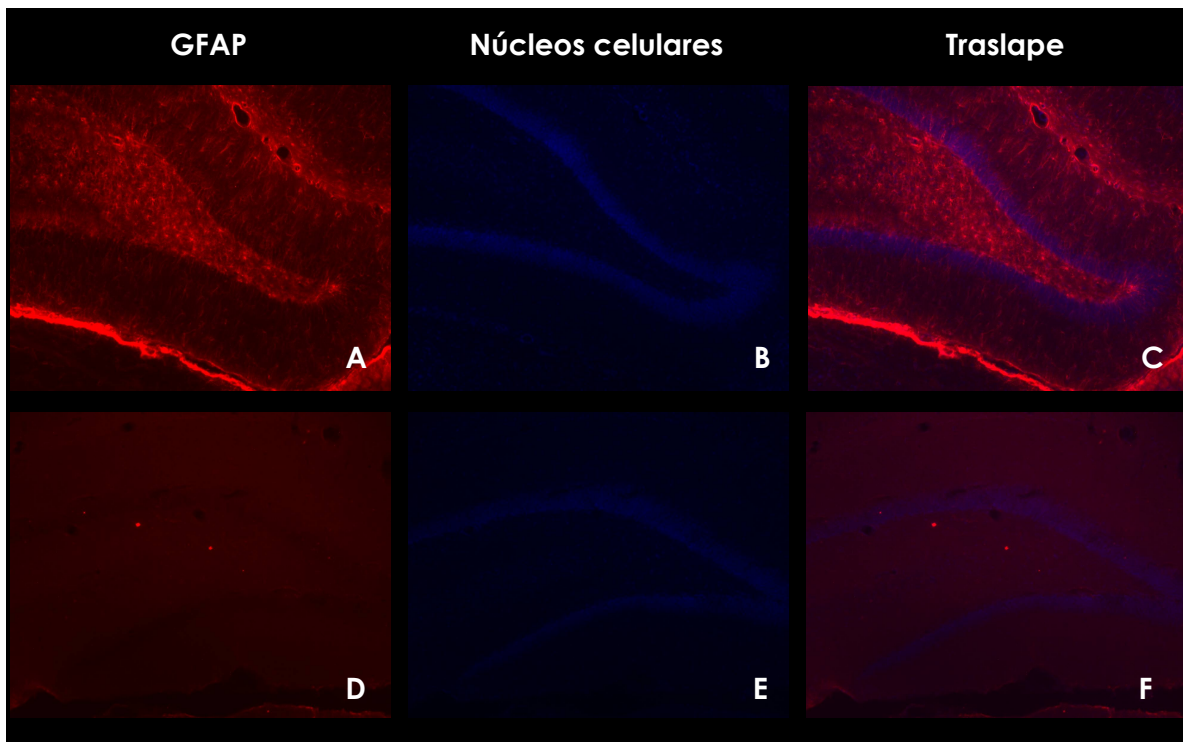
RESULTADOS

A. Estandarización de la técnica de tinción de la proteína GFAP con inmunofluorescencia en cortes de tejido de cerebros de rata.

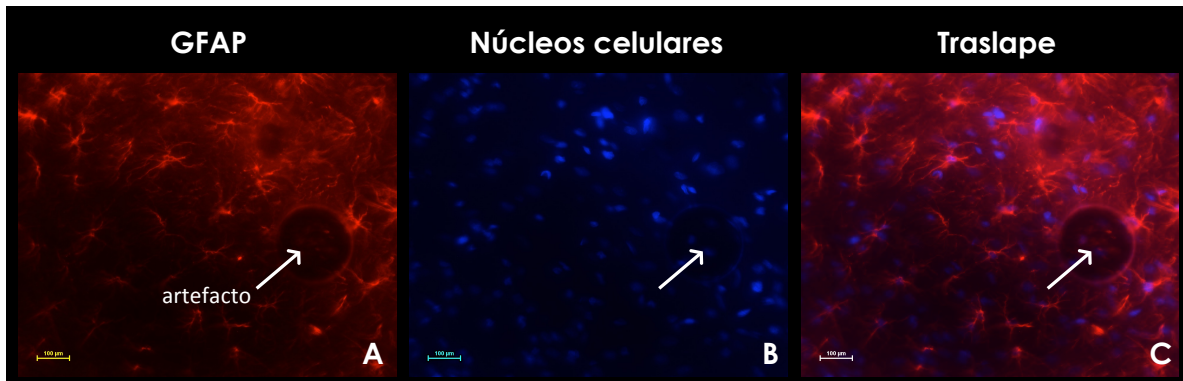
A.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno

El procedimiento con citrato de sodio 10mM a 80 °C (pH 6) permitió el marcaje del antígeno GFAP (Fotografías 6 y 7), en contraste con el procedimiento sin dicha solución.

Fotografía 6.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno GFAP en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, tomado a una magnificación de 10X. En A: Se observa el antígeno GFAP (rojo) de las células astrogiales detectado con el anticuerpo primario anti-GFAP unido a un anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 555 acoplado. En B y E: Se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En D: Sin el procedimiento de rescate de antígeno, no se observa el antígeno GFAP de las células astrogiales. En C y F: Traslape de las imágenes A + B = C; D + E = F.



Fotografía 7.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno GFAP en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, tomado a una magnificación de 40X. En A: Se observa el antígeno GFAP (rojo) de las células astrogiales detectado con el anticuerpo primario anti-GFAP unido a un anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 555 acoplado. En B: Se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En C: Traslape de las imágenes A + B = C. Escala: 100 μm .



A.2. Evaluación de la prueba de bloqueo inespecífico

No se obtuvo diferencia en la observación del antígeno GFAP en los resultados de las pruebas con y sin bloqueo de los sitios inespecíficos de unión a antígeno, utilizando leche descremada en polvo al 3% en PBS con Triton X-100 al 0.3% (Fotografía 8).

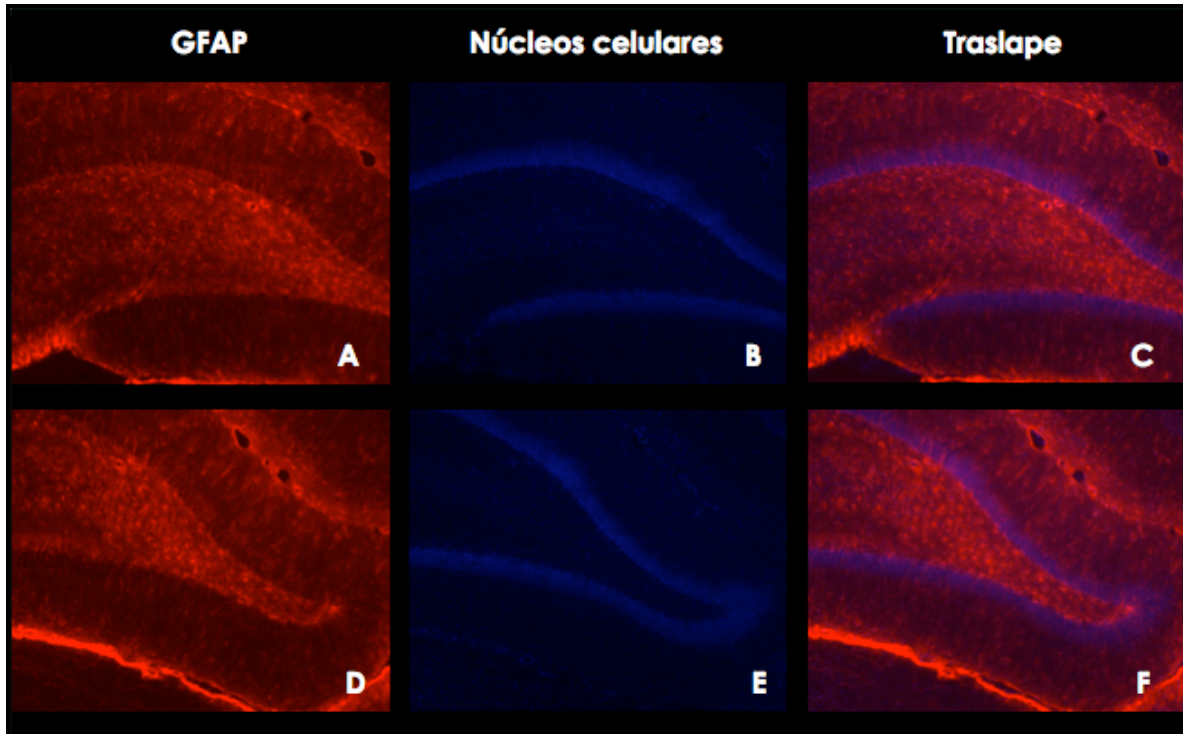
A.3. Evaluación de la titulación de anticuerpos

Las tres concentraciones de anticuerpo primario y anticuerpo secundario evaluadas mostraron amplias variaciones en el marcaje del antígeno GFAP (Fotografía 9).

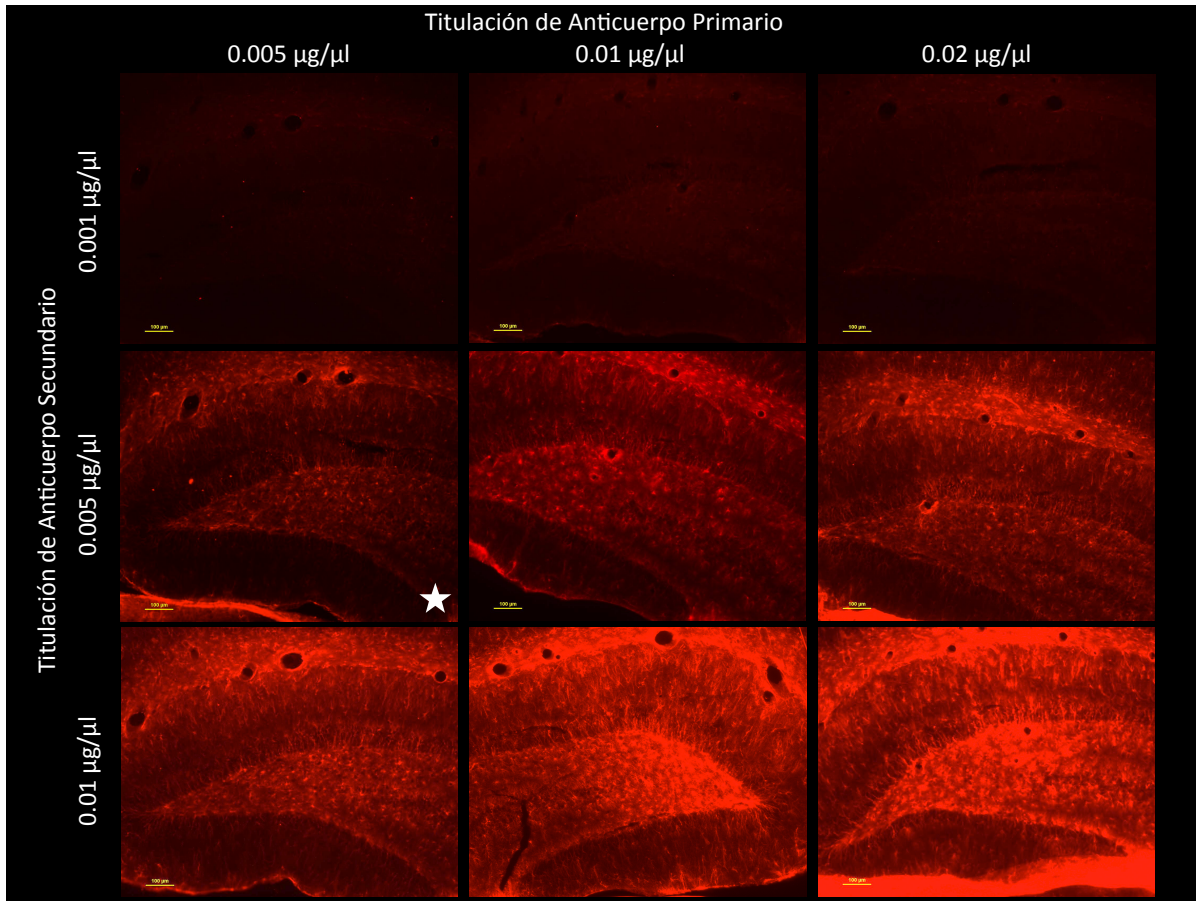
De acuerdo con los resultados observados, la concentración óptima de anticuerpo primario monoclonal (clon 2.2B10) producido en rata, reactivo para la proteína GFAP (Invitrogen: 13-0300) fue de 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Fotografía 9).

Por su parte, para el anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de rata (Invitrogen: A-21434) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 555, la concentración óptima de trabajo fue de 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Fotografía 9).

Fotografía 8.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno GFAP en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor, con y sin el procedimiento con bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno, tomado a una magnificación de 10X. En A-B-C: Utilizando leche descremada en polvo al 3% en PBS con Triton X-100 al 0.3% para el bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno. En D-E-F: Sin el procedimiento de bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno. En A y D: se observa el antígeno GFAP (rojo) de las células astrogliales detectado con el anticuerpo primario anti-GFAP unido a un anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 555 acoplado. En B y E: Se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En C y F: Traslape de las imágenes A + B = C; D + E = F.



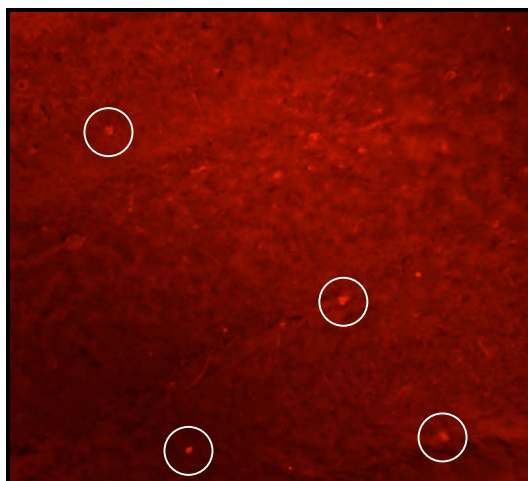
Fotografía 9.- Microscopía de epifluorescencia que muestra la titulación del anticuerpo primario monoclonal (clon 2.2B10) producido en rata, reactivo para la proteína GFAP (Invitrogen: 13-0300), y del anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de rata (Invitrogen: A-21434) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 555. Tomado a una magnificación de 10X. La estrella indica la imagen con la concentración óptima de solución de trabajo de los anticuerpos primario y secundario. Escala: 100 μ m.



Cuando se analizó el resultado del *control negativo*, se observó que resaltaban ciertos fragmentos en el tejido, que no eran correspondientes ni en forma ni en cantidad con lo observado en los resultados de los cortes con el marcaje del antígeno GFAP (Fotografía 10). De acuerdo con Billinton y Knight (2001), este tipo de resultado puede relacionarse con diferentes tipos de autofluorescencia del tejido, como resultado de la aplicación del proceso de rescate de antígeno. Por tanto, debido al posible “falso positivo” que esta señal podría generar en el momento de cuantificar el antígeno de interés, se planteó una modificación al protocolo inicial, a fin de desarrollar un protocolo que permitiera la cuantificación efectiva del antígeno GFAP. Los

resultados obtenidos en esta segunda fase de experimentación, se describen en detalle a continuación.

Fotografía 10.- Control negativo del protocolo de estandarización de la técnica de tinción de la proteína GFAP con inmunofluorescencia, en un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor; tomado a una magnificación de 20X. Los círculos encierran algunos fragmentos de autofluorescencia presente en el tejido.



A.4. Optimización del protocolo para la tinción de la proteína GFAP, con inmunofluorescencia, en cortes de tejido de cerebros de rata (Modificado de: Billinton y Knight 2001, Tang et al. 2007, Paz 2009)

Se realizaron los pasos establecidos a partir del apartado A.1 de Materiales y Métodos, eliminando el A.2, y al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario se realizó una prueba para evaluar el bloqueo de la autofluorescencia del tejido, que se describe seguidamente.

- Evaluación del bloqueo de la autofluorescencia del tejido:

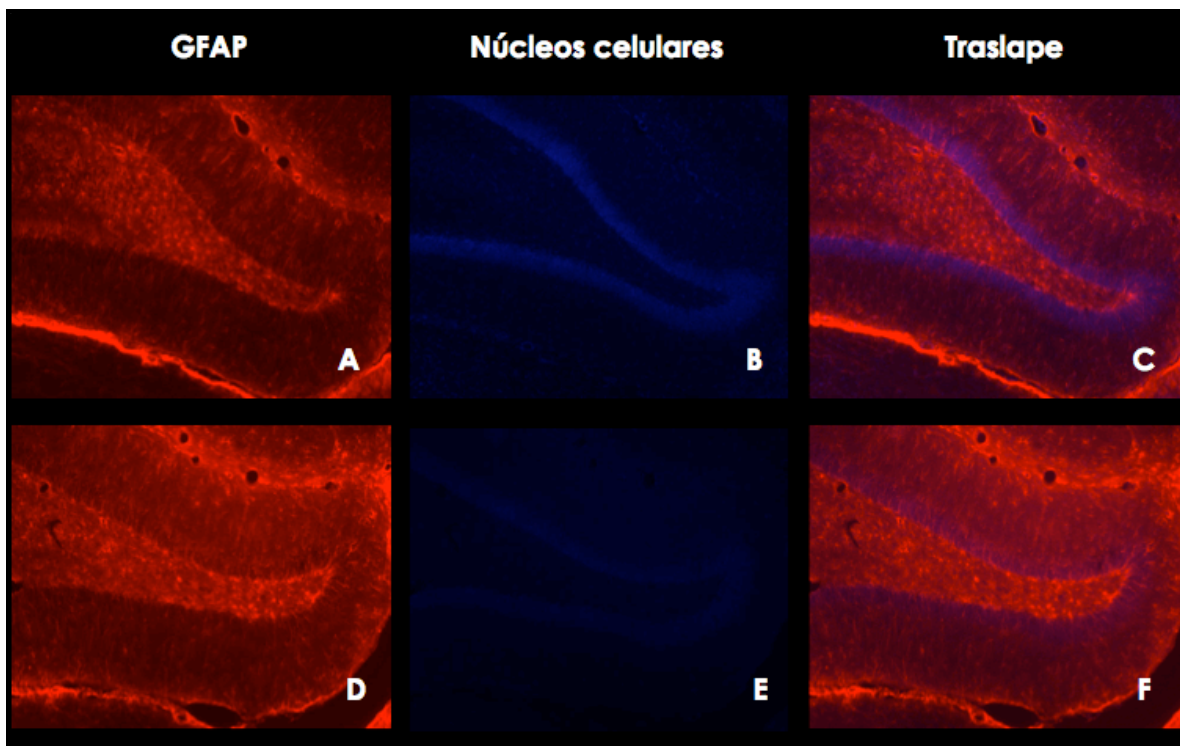
Se realizaron dos procedimientos: con y sin bloqueo de autofluorescencia, utilizando una solución de acetato de amonio 50 mM y sulfato de cobre 1 mM, a pH 5.

En el procedimiento con bloqueo, se realizó una inmersión rápida de los tejidos en agua destilada y luego se sumergieron en la solución (preparada en el momento) de acetato de amonio y sulfato de cobre por un periodo de 60 minutos. Seguidamente, se sumergieron las muestras rápidamente en agua destilada, y se lavaron durante cinco minutos en PBS, y se repitió este último paso dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

En el procedimiento sin bloqueo de autofluorescencia, de seguido se prosiguió con el montaje de los cubreobjetos.

En la Fotografía 11 se observan los resultados de las pruebas con y sin bloqueo de autofluorescencia. Con la prueba que utilizaba la solución de acetato de amonio 50 mM y sulfato de cobre 1 mM, a pH 5, se obtuvo mejor resolución de la imagen, una disminución del ruido de fondo, y se observan mejor los antígenos marcados. Además, la Fotografía 12 muestra el resultado del *control negativo*, en la cual ya no se evidencia la autofluorescencia del tejido que se veía en la fotografía 10.

Fotografía 11.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno GFAP en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor, con y sin el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido, utilizando una solución de acetato de amonio 50 mM y sulfato de cobre 1 mM, a pH 5; tomado a una magnificación de 10X. En A-B-C: Utilizando el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido. En D-E-F: Sin el procedimiento de bloqueo de autofluorescencia del tejido. En A y D: se observa el antígeno GFAP (rojo) de las células astrogiales detectado con el anticuerpo primario anti-GFAP unido al anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 555 acoplado. En B y E: Se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En C y F: Traslape de las imágenes A + B = C; D + E = F.



Fotografía 12.- Control negativo del protocolo de estandarización de la técnica de tinción de la proteína GFAP con inmunofluorescencia en cortes de tejido de cerebros de rata, utilizando el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido; tomado a una magnificación de 20X.



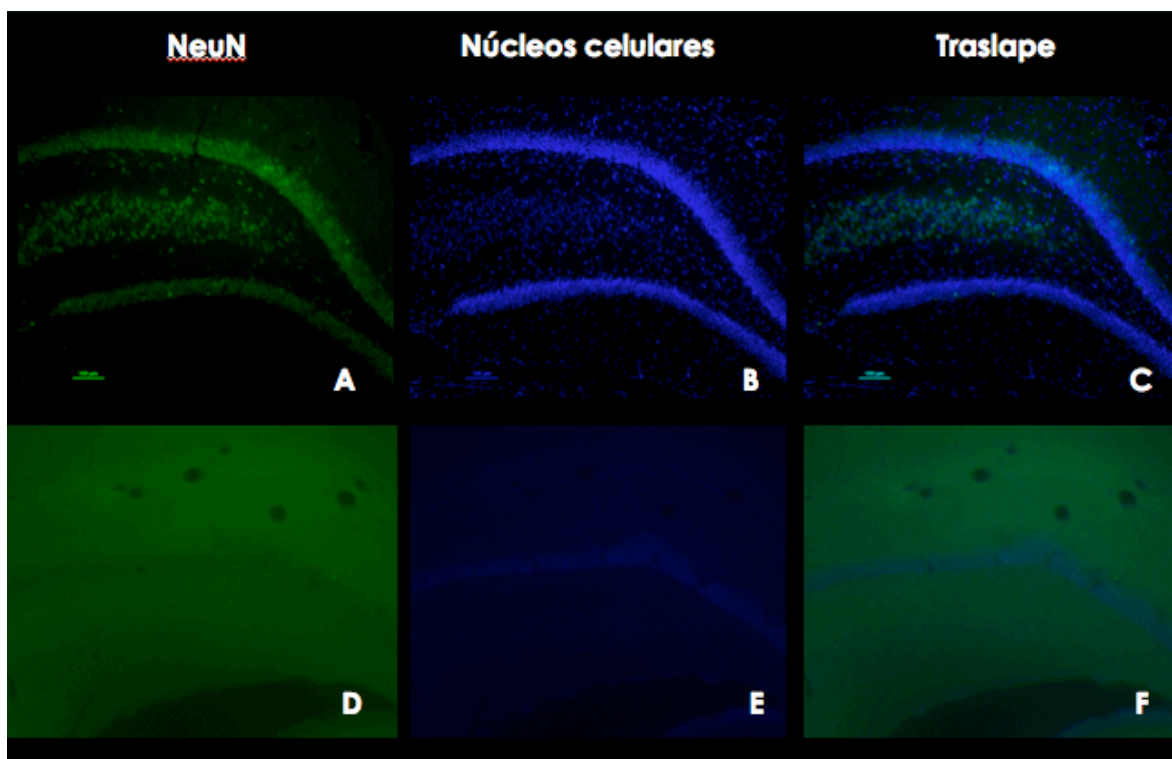
Con los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas, se estableció un protocolo para la detección inmunohistoquímica de la proteína GFAP en cortes de tejido de cerebro de rata (Apéndice 1).

B. Estandarización de la técnica de marcaje de la proteína NeuN con inmunofluorescencia en cortes de tejido de cerebro de rata.

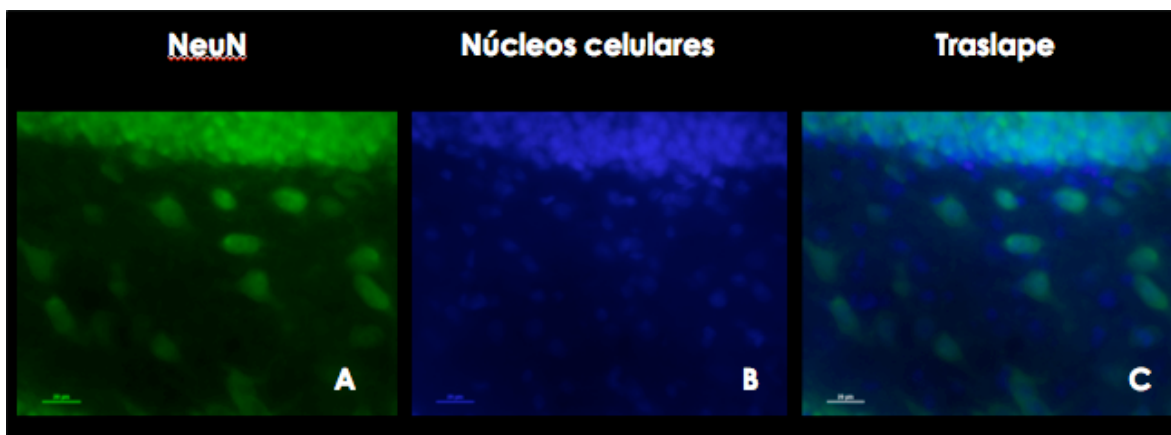
B.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno

Al igual que con el protocolo anterior, el procedimiento con citrato de sodio 10 mM a 80 °C (pH 6) permitió el marcaje y la observación del antígeno NeuN (Fotografías 13 y 14), en contraste con el procedimiento sin dicha solución.

Fotografía 13.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno NeuN en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, tomado a una magnificación de 10X. En A: Se observa el antígeno NeuN (verde) de las células neuronales detectado con el anticuerpo primario anti-NeuN unido a un anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 488 acoplado. En B y E: Se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En D: Sin el procedimiento de rescate de antígeno, no se observa el antígeno NeuN de las células neuronales. En C y F: Traslape de las imágenes A + B = C; D + E = F. Escala: 100 μm .



Fotografía 14.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno NeuN en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, tomado a una magnificación de 60X. En A: Se observa el antígeno NeuN (verde) de las células neuronales detectado con el anticuerpo primario anti-NeuN unido a un anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 488 acoplado. En B: Se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En C: Traslape de las imágenes A + B = C. Escala: 100 μm .



B.2. Evaluación de la prueba de bloqueo inespecífico

No se obtuvo diferencia con la observación del antígeno NeuN en los resultados de las pruebas con y sin bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno, utilizando leche descremada en polvo al 3% en PBS con Triton X-100 al 0.3% (Fotografía 15).

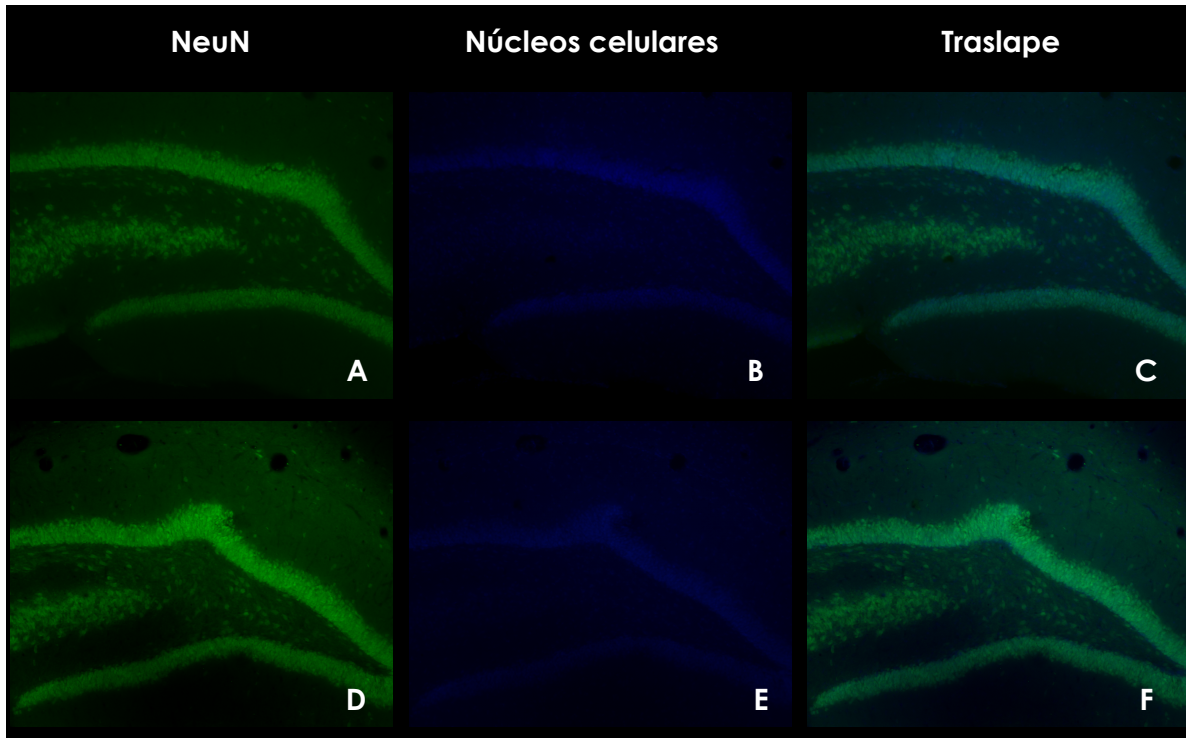
B.3. Evaluación de la titulación de anticuerpos

Las tres concentraciones de anticuerpo primario y anticuerpo secundario evaluadas mostraron marcadas diferencias en el marcaje del antígeno NeuN (Fotografía 16).

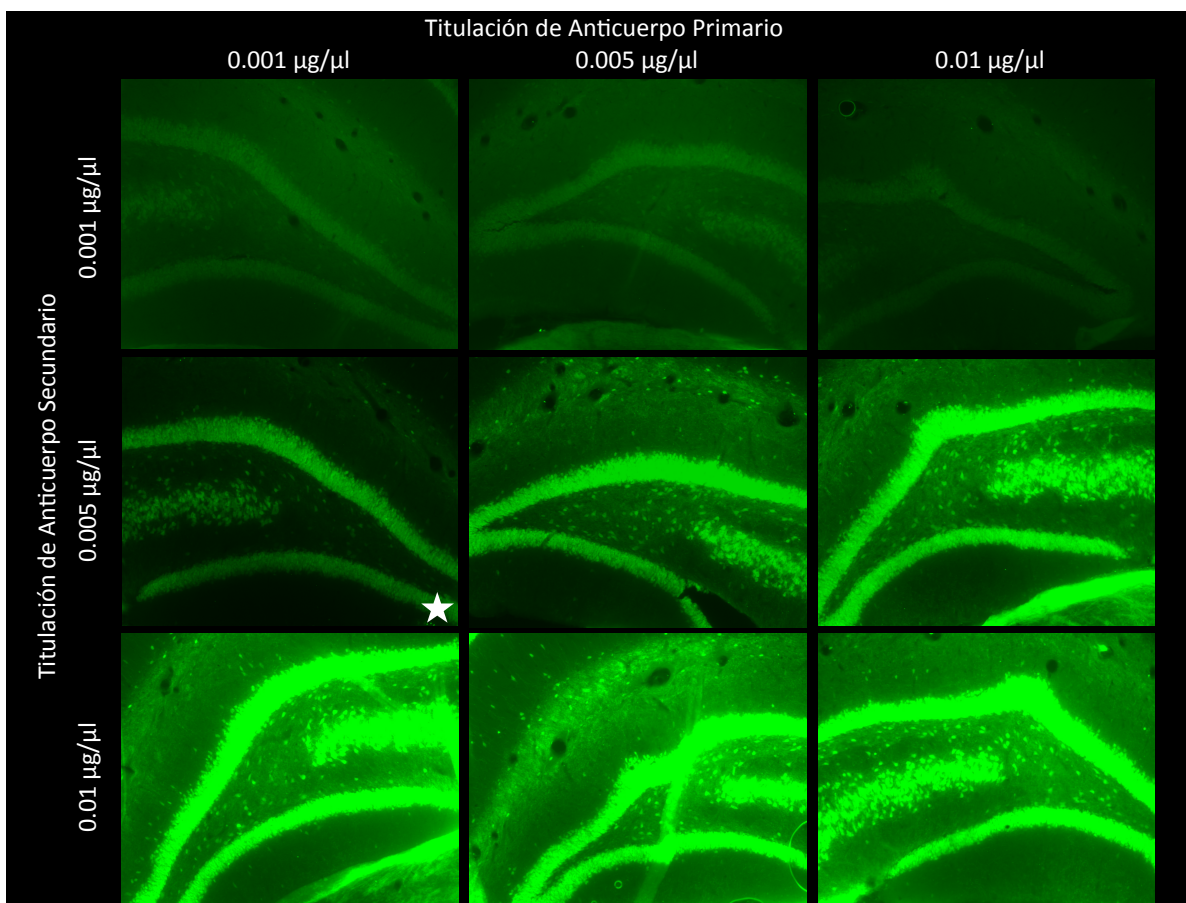
De acuerdo con los resultados observados, la concentración más apta de anticuerpo primario monoclonal (clon A60) producido en ratón, reactivo para la proteína NeuN (Millipore: MAB377) fue de 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Fotografía 16).

Por su parte, para el anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de ratón (Invitrogen: A-11029) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 488, la concentración más óptima de trabajo fue de 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Fotografía 16).

Fotografía 15.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno NeuN en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor, con y sin el procedimiento con bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno, tomado a una magnificación de 10X. En A-B-C: Utilizando leche descremada en polvo al 3% en PBS con Triton X-100 al 0.3% para el bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno. En D-E-F: Sin el procedimiento de bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno. En A y D: se observa el antígeno NeuN (verde) de las células neuronales detectado con el anticuerpo primario anti-NeuN unido a un anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 488 acoplado. En B y E: Se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En C y F: Traslape de las imágenes A + B = C; D + E = F.



Fotografía 16.- Microscopía de epifluorescencia que muestra la titulación del anticuerpo primario monoclonal (clon A60) producido en ratón, reactivo para la proteína NeuN (Millipore: MAB377) y el anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de ratón (Invitrogen: A-11029) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 488. Tomado a una magnificación de 10X. La estrella indica la imagen con la concentración óptima de solución de trabajo de los anticuerpos primario y secundario.



Cuando se analizó el resultado del *control negativo*, se observaron fragmentos en el tejido que eran correspondientes con la autofluorescencia del tejido del *control negativo* del protocolo anterior, producto del proceso de rescate de antígeno (Fotografía 17). Por tanto, se aplicó la misma modificación metodológica que en el protocolo de inmunomarcaje del antígeno GFAP.

B.4. Optimización del protocolo para el marcaje de la proteína NeuN, con inmunofluorescencia, en cortes de tejido de cerebro de rata (Modificado de: Billinton y Knight 2001, Gómez-Nicola et al. 2013, Leuner et al. 2010, Tang et al. 2007).

Se realizaron todos los pasos establecidos a partir del apartado B.1 de Materiales y Métodos, eliminando el B.2, y al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario se realizó una prueba para el bloqueo de la autofluorescencia del tejido, la cual se describe seguidamente.

- Evaluación del bloqueo de la autofluorescencia del tejido:

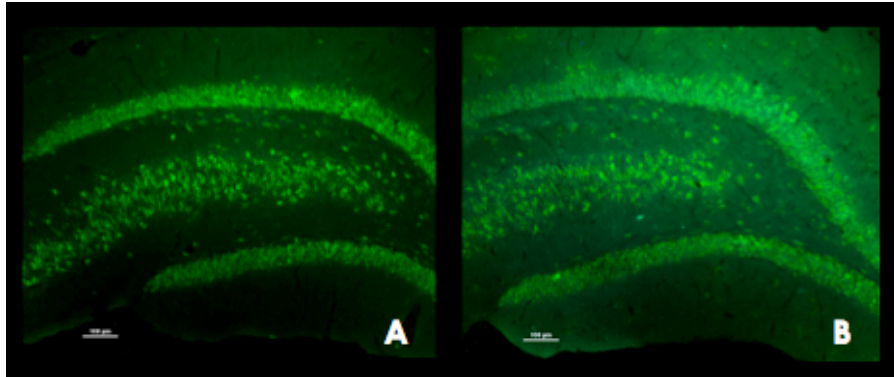
Se realizaron dos procedimientos: con y sin bloqueo de autofluorescencia, utilizando una solución de acetato de amonio 50 mM y sulfato de cobre 1 mM, a pH 5.

En el procedimiento con bloqueo, se realizó una inmersión rápida de los tejidos en agua destilada y luego se sumergieron en la solución (preparada en el momento) de acetato de amonio y sulfato de cobre por un periodo de 60 minutos. Seguidamente, se sumergieron las muestras rápidamente en agua destilada, y se lavaron durante cinco minutos en PBS, y se repitió este último paso dos veces más, con PBS nuevo cada vez.

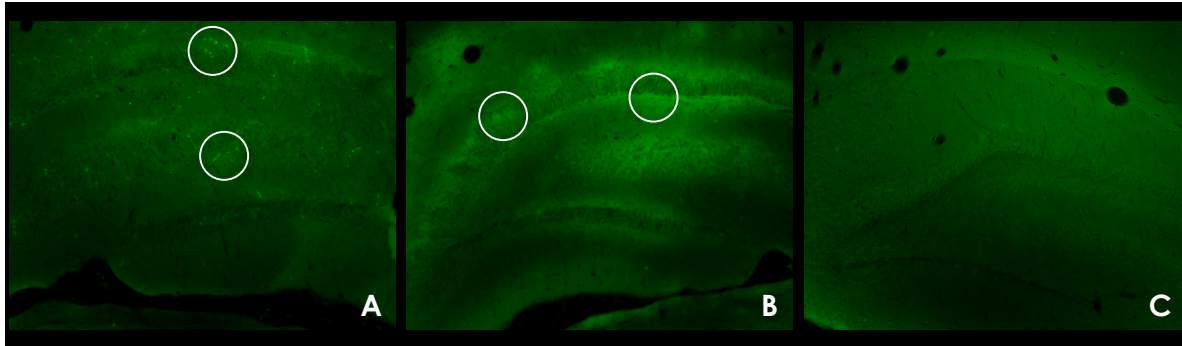
En el procedimiento sin bloqueo de autofluorescencia, de seguido se prosiguió con el montaje de los cubreobjetos.

En la Fotografía 17 se observan los resultados de las pruebas con y sin bloqueo de autofluorescencia. Con la prueba que utilizaba la solución de acetato de amonio 50 mM y sulfato de cobre 1 mM, a pH 5, se obtuvo una disminución del ruido de fondo correspondiente a la autofluorescencia del tejido. Además, la Fotografía 18 muestra el resultado del *control negativo*, en la cual ya no se evidencia la autofluorescencia del tejido.

Fotografía 17.- Microscopía de epifluorescencia que muestra el inmunomarcaje del antígeno NeuN en la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor, con y sin el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido, utilizando una solución de acetato de amonio 50 mM y sulfato de cobre 1 mM, a pH 5; tomado a una magnificación de 10X. En A: Utilizando el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido. En B: Sin el procedimiento de autofluorescencia del tejido. Escala: 100 μm .



Fotografía 18.- Controles negativos del protocolo de estandarización de la técnica de tinción de la proteína NeuN con inmunofluorescencia, en un corte coronal de cerebro de rata de 30 μm de grosor; tomado a una magnificación de 10X. En A-B: Sin el procedimiento de bloqueo de autofluorescencia del tejido. En C: Utilizando el procedimiento con bloqueo de autofluorescencia del tejido. Los círculos encierran algunos fragmentos y zonas de autofluorescencia presente en el tejido.



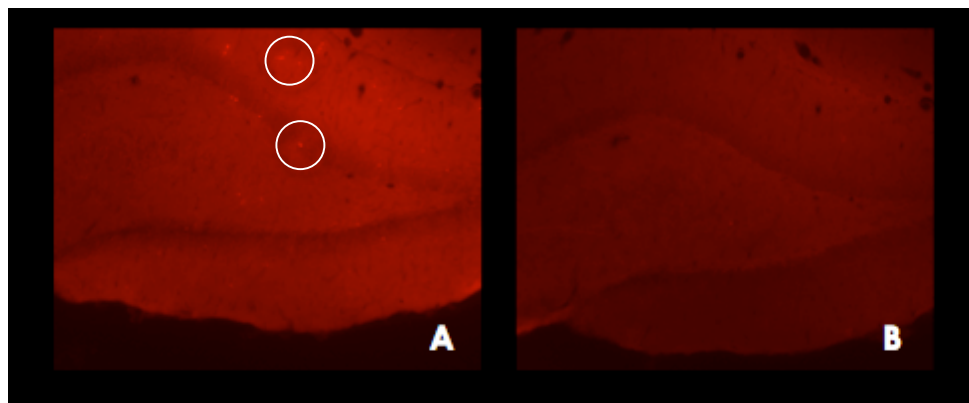
Con los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas, se estableció un protocolo de marcaje inmunohistológico de la proteína NeuN en cortes de tejido de cerebro de rata (Apéndice 2).

C. Estandarización de la técnica de inmunotinción con fluorescencia del nucleósido BrdU, en cortes de tejido de cerebro de rata (Tang et al. 2007, Wöhr et al. 2009).

C.1. Evaluación de la prueba de rescate de antígeno

Los ensayos con y sin citrato de sodio 10 mM a 80 °C no permitieron el marcaje del nucleósido BrdU (Fotografía 19). Pero sí evidenciaron la necesidad de tener que incluir el paso de bloqueo de autofluorescencia del tejido, utilizando una solución de sulfato de cobre 1 mM y acetato de amonio 50 mM, a pH 5 (Billinton y Knight 2001).

Fotografía 19.- Microscopía de epifluorescencia de la zona del giro dentado del hipocampo de un corte coronal de cerebro de rata de 30 µm de grosor, utilizando el procedimiento de rescate de antígeno con una solución de citrato de sodio a 80 °C, probando el protocolo de inmunomarcaje del nucleósido BrdU. Tomado a una magnificación de 10X. En A: Utilizando el procedimiento de rescate de antígeno. En B: Sin el procedimiento de rescate de antígeno. Los círculos encierran algunos fragmentos de autofluorescencia presente en el tejido.



C.2. Evaluación de la titulación de anticuerpo

No se logró la detección del nucleósido BrdU a ninguna concentración del anticuerpo monoclonal (clon MoBU-1) (Invitrogen: B35131) producido en ratón, conjugado con Alexa Fluor 555 (Fotografía 20).

Fotografía 20. Microscopía de epifluorescencia que muestra diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal (clon MoBU-1) conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 555. Tomado a una magnificación de 10X



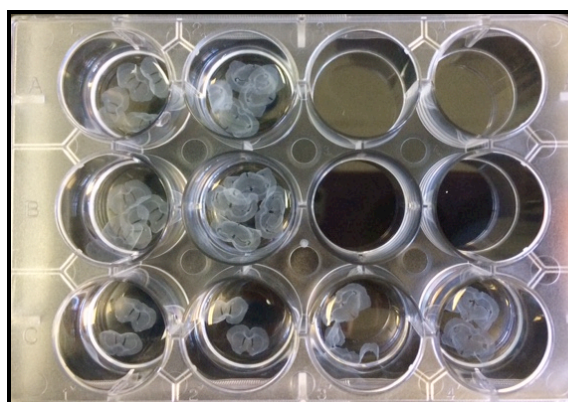
Debido al resultado negativo en la detección del nucleósido BrdU, se plantearon modificaciones al protocolo inicial y nuevas estrategias metodológicas, a fin de desarrollar un protocolo que permitiera la cuantificación efectiva del nucleósido de interés. Las metodologías desarrolladas en esta segunda fase de experimentación y sus resultados, se describen en detalle en el Cuadro 2, a continuación.

Cuadro 2.- Optimización de la técnica de inmunotinción con fluorescencia del nucleósido BrdU, en cortes de tejido de cerebro de rata y sus resultados experimentales

Nueva metodología	Resultado	Referencia
Se realizaron cortes coronales del tejido de 20 µm de grosor, en vez de 30 µm.	Negativo	-
Los cortes de tejido se trabajaron con la técnica <i>free floating</i> , en vez de fijarlos a un portaobjetos recubierto con gelatina (Fotografía 21).	Negativo	Brenes et al. 2016, Leuner et al. 2010
Se utilizó un equipo agitador de orbital a una velocidad de 90 rpm, en vez de dejar los cortes reposando en cada etapa del protocolo.	Negativo	-
Se utilizó la solución HCl 2N, durante 30 minutos, a 37 °C para realizar el procedimiento de desnaturalización del ADN.	Negativo	Cameron y McKay 2001, Leuner et al. 2010, Ramírez 2016
Se incubó en la solución 50% formamida 2X en citrato de sodio (0.3 M NaCl, 0.03 M citrato de sodio) a 65 °C durante 120 minutos. Luego, se lavó en la solución de citrato de sodio durante cinco minutos, y se incubó en HCl 2N a 37 °C durante 30 minutos, para realizar el procedimiento de desnaturalización del ADN. Por último, se lavó en 0.1 M de ácido bórico, pH 8.5, durante 10 minutos.	Negativo	Kuhn et al. 1996, Leuner et al. 2010
Se utilizó la solución HCl 2N en agua destilada, durante 20 minutos, a 40 °C, con un doble lavado posterior con tetraborato de sodio (40	Negativo	Tang et al. 2007

mM, pH 8.5), para realizar el procedimiento de desnaturalización del ADN.		
Se utilizó la solución HCl 2N en PBS con 0.5% de Triton X-100, durante 30 minutos, a 37 °C, con un lavado posterior con tetraborato de sodio (0.1 M, pH 8.5), para realizar el procedimiento de desnaturalización del ADN.	Negativo	Nieoullon et al. 2005
Se realizó un proceso combinado de rescate de antígeno y desnaturalización del ADN, utilizando citrato de sodio 10 mM a pH 6 y luego, HCl 2N a 37 °C, con 30 minutos de duración cada uno.	Negativo	Gómez-Nicola et al. 2013
Se realizó un proceso combinado de desnaturalización del ADN y rescate de antígeno, incubando primero en HCl 1N durante quince minutos y luego en citrato de sodio 10 mM a pH 6, durante 30 minutos.	Negativo	Wojtowicz y Kee 2006
Se aumentó el tiempo de exposición e incubación del anticuerpo a 72 horas, en vez de solamente 24 horas.	Negativo	-
Se inyectó una solución i.p. de 10 mg/mL de BrdU a cuatro ratas, en dosis de 100 mg/kg de peso corporal por día, durante 3 días, para una dosis total de 300 mg/kg de BrdU, según su peso corporal.	Negativo	Wojtowicz y Kee 2006
Se inyectó una solución i.p. de 10 mg/ml de BrdU a cuatro ratas, en tres dosis de 100 mg/kg de peso corporal, en un mismo día, para una dosis total de 300 mg/kg de BrdU, según su peso corporal.	Negativo	Wojtowicz y Kee 2006
Se inyectó una solución i.p. de 10 mg/ml de BrdU a cuatro ratas, en dosis de 100 mg/kg de peso corporal por día, durante 5 días, para una dosis total de 500 mg/kg de BrdU, según su peso corporal.	Negativo	Brenes et al. 2016
Junto con la última dosis de solución BrdU, se inyectó i.p. a cada rata una solución de 1 mg/mL de AMPH, preparada en solución salina (0.9% NaCl en H ₂ O _d estéril), en dosis de 2.5 mg/kg de peso corporal.	Negativo	Brenes et al. 2016

Fotografía 21.- Cortes coronales de cerebro de rata de 30 µm de grosor, recolectados en una placa de cultivo multipozos, con solución de PBS, para el trabajo *free floating*.



Con los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas, no se logró el establecimiento de un protocolo de marcaje inmunohistológico del nucleósido BrdU en cortes de tejido de cerebro de rata.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para garantizar el proceso histotecnológico de inmunotinción de proteínas con fluorescencia en cortes de tejido de cerebros de rata fue necesario definir los parámetros óptimos de: rescate de antígenos, bloqueo de los sitios inespecíficos de unión a antígeno, titulación de los anticuerpos primarios y secundarios, y bloqueo de la autofluorescencia del tejido. Los resultados obtenidos permitieron la estandarización de estos parámetros y el desarrollo de los protocolos para la detección inmunohistoquímica de las proteínas GFAP y NeuN en cortes de tejido de cerebro de rata (Apéndice 1 y 2).

De acuerdo con lo observado, se puede establecer que el uso del formaldehído como fijador del tejido cumplió su objetivo, ya que actuó con rapidez evitando la autólisis y degradación de los tejidos y sus componentes, además tuvo un alto poder de penetración en el tejido y por tanto la morfología en general de las muestras y los detalles estructurales estaban conservados. No existe una sola posibilidad de preparar los tejidos para el procesamiento en inmunohistoquímica, y la conveniencia de la técnica depende de cada laboratorio y de los intereses particulares, o sea, de la pregunta que se desea contestar; no obstante, en la mayoría de laboratorios de histopatología, la gran mayoría de las muestras se fijan utilizando el formaldehído como componente principal, por sus múltiples ventajas sobre otros fijadores (Howat y Wilson 2014, Kiernan 2005, Montero 2003). El mecanismo de acción del formaldehído ocurre a través de la formación de enlaces covalentes con los grupos amino libres presentes en las proteínas, que forman puentes metilo entre las proteínas del tejido, creando cambios conformacionales en las mismas y formando compuestos cálcicos que afectan las zonas antigénicas (Howat y Wilson 2014, Shi et al. 1997, Vaquero 2007). De esta forma, el acceso de los anticuerpos a los antígenos puede imposibilitarse por la fijación. Por tanto, el formaldehído debe ser eliminado y la estructura de las proteínas debe ser revertida, por un proceso de hidrólisis, para obtener un resultado positivo en el proceso del marcaje inmunohistoquímico (Howat y Wilson 2014, Shi et al. 2011).

Aunque existen varias formas de mejorar el acceso de los anticuerpos a los antígenos del tejido, el calentamiento a alta temperatura se considera el procedimiento más importante. Además, el pH de la solución, el componente químico y la permeabilización juegan un papel como co-factores en el proceso de calentamiento. En la literatura se menciona la importancia de mantener un pH entre 6 y 7 en la solución porque el proceso de hidrólisis de la proteína es dependiente del pH y la modificación inducida por la formalina en las estructuras de los ácidos nucleicos y proteínas

también es dependiente del pH; el citrato de sodio funciona como agente quelante de los compuestos de calcio; y los detergentes se utilizan para aumentar la permeabilidad de las membranas y así favorecer el acceso de los anticuerpos al interior del tejido (Montero 2003, Shi et al. 1997, 2001, 2011). De acuerdo con los resultados obtenidos, se determinó que es fundamental para el desarrollo del proceso de marcaje inmunohistoquímico realizar el paso de rescate o recuperación de antígenos para desenmascarar los sitios de unión a los antígenos cubiertos por el proceso de fijación (Fotografías 6 y 13).

Varios autores indican la importancia de bloquear o saturar sitios de unión en la membrana celular, para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos en el ensayo. Una solución de bloqueo ideal debe unirse a todos los potenciales sitios de unión inespecíficos de la membrana, eliminando todo el ruido de fondo (*background*) sin alterar o bloquear los epítomos para la unión del anticuerpo primario (Dako 2006, Gibbs s.f.). Sin embargo, esto puede conllevar al bloqueo de los sitios de unión de interés (epítomos) y por tanto afectar con un falso negativo el resultado del marcaje del anticuerpo. Es por eso que la elección de la solución de bloqueo ideal, o la decisión de su utilización o no, debe basarse más en el trabajo empírico que en la literatura. No existe una solución de bloqueo universal y/o ideal, pero entre las más utilizadas se encuentran: albúmina de suero de bovino (BSA, por sus siglas en inglés), leche descremada deshidratada o caseína, suero normal entero y gelatina de pescado. Las ventajas de la leche descremada, frente a sus semejantes, son: su bajo costo, diversidad molecular y características anfipáticas (Gibbs s.f., Paz 2009). Aunque los resultados de las pruebas de marcaje de los antígeno GFAP y NeuN, con y sin bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al antígeno no mostraron diferencias (Fotografías 8 y 15), se tomó la decisión de eliminar este paso en los protocolos, para disminuir el tiempo de la realización de los mismos.

Los anticuerpos primarios utilizados (Cuadro 1) se escogieron de tipo monoclonal por sus múltiples ventajas: alta homogeneidad, ausencia de anticuerpos inespecíficos, ausencia de variabilidad de lote a lote, alta especificidad de unión al antígeno, afinidad uniforme y el clon idéntico vendido por diferentes empresas será el mismo anticuerpo (Boenisch 2006a). De esta forma, siempre será detectado el mismo antígeno por el mismo parátipo.

Por otra parte, los anticuerpos secundarios utilizados (Cuadro 1) se escogieron de tipo policlonal. Múltiples clones teóricamente dan altos niveles de etiquetado para un solo antígeno, ya que contienen muchos anticuerpos contra diferentes epítomos en la misma proteína (Boenisch 2006a,

Chemicon s.f.). De esta forma, se buscó que la señal de los fluorocromos se viera amplificada al tener más de un anticuerpo secundario unido a un único anticuerpo primario.

Para la localización de las proteínas GFAP y NeuN se utilizó el método de detección indirecta, que consistió en colocar un intermediario entre la inmunoglobulina primaria y la molécula marcadora (Key 2006). Este método presenta ciertas ventajas sobre su contraparte directa, a saber: es mucho más flexible ya que es posible que un anticuerpo primario se una a más de un anticuerpo secundario, y es más sensible ya que se obtiene mayor intensidad de la señal del fluorocromo frente a una misma cantidad de antígeno. Entre las desventajas están: mayor tiempo de trabajo en el desarrollo del protocolo al aumentar el número de etapas necesarias y es menos sensible a interferencias debidas a reactividad cruzada de los anticuerpos o a reacciones no específicas, las cuales tienden a aumentar el ruido de fondo de la técnica (Key 2006, Molist et al. 2011).

Además, para la localización del nucleósido BrdU, se utilizó el método de detección directa, en el que se hace uso de un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluorocromo (Key 2006). Tiene la desventaja que se logra una escasa amplificación de la señal dado que la coloración involucra solo un anticuerpo marcado y esto resulta en muy poca sensibilidad, y entre sus ventajas está la reducción del número de etapas necesarias, por lo tanto es más rápida (Key 2006, Molist et al. 2011).

La titulación de anticuerpos es un procedimiento empírico diseñado para determinar la concentración de anticuerpos apropiada para el trabajo en el laboratorio. Para la escogencia de la dilución correcta de los anticuerpos utilizados se tomó como referencia la información que brindaba el fabricante en la ficha técnica de cada anticuerpo. Se estableció como referencia lo mencionado por Stewart y Stewart (2001) que una dilución óptima o la mejor concentración de anticuerpo es aquella que permita evitar falsos negativos (insaturación) y evitar una excesiva tinción de fondo (sobresaturación). En ese sentido, la interpretación de los resultados obtenidos a partir de la Fotografía 9 se resume en el Cuadro 3.

Debido a que el marcaje es de tipo indirecto, el anticuerpo primario, no visible, solo puede ser valorado en función del resultado obtenido luego del acople con el anticuerpo secundario, visible. Existen dos opciones ideales (saturadas) para el trabajo en el laboratorio con el anticuerpo primario: las concentraciones 0.005 µg/µl y 0.01 µg/µl. Se escogió la concentración 0.005 µg/µl para favorecer el ahorro del reactivo. En el caso del anticuerpo secundario, se estableció la concentración 0.005 µg/µl como la idónea.

Cuadro 3.- Resultados obtenidos en la prueba de titulación de anticuerpos para el marcaje inmunohistoquímico de la proteína GFAP (Fotografía 9)

Titulación de Anticuerpos		Anticuerpo Primario, producido en rata, anti GFAP		
		0.005 µg/µl	0.01 µg/µl	0.02 µg/µl
Anticuerpo Secundario, anti rata	0.001 µg/µl	Insaturado	Insaturado	Insaturado
	0.005 µg/µl	Saturado	Saturado	Sobresaturado
	0.01 µg/µl	Sobresaturado	Sobresaturado	Sobresaturado

De la misma forma, la interpretación de los resultados obtenidos a partir de la Fotografía 16 se resume en el Cuadro 4, a continuación.

Cuadro 4.- Resultados obtenidos en la prueba de titulación de anticuerpos para el marcaje inmunohistoquímico de la proteína NeuN (Fotografía 16)

Titulación de Anticuerpos		Anticuerpo Primario, producido en ratón, anti NeuN		
		0.001 µg/µl	0.005 µg/µl	0.01 µg/µl
Anticuerpo Secundario, anti ratón	0.001 µg/µl	Insaturado	Insaturado	Insaturado
	0.005 µg/µl	Saturado	Sobresaturado	Sobresaturado
	0.01 µg/µl	Sobresaturado	Sobresaturado	Sobresaturado

La opción ideal (saturadas) para el trabajo en el laboratorio con el anticuerpo primario es la concentración 0.001 µg/µl; y en el caso del anticuerpo secundario, se estableció la concentración 0.005 µg/µl como la idónea.

Por otra parte, en el desarrollo del protocolo se buscaba evitar que el anticuerpo no se secase durante el proceso de incubación, por lo que se incubó el tejido en un ambiente húmedo (cámara de incubación), independientemente de la temperatura de incubación. Además, era deseable que los anticuerpos no unidos al antígeno se eliminaran por completo antes del paso siguiente, por eso se lavaron las secciones de tejido tres veces, cinco minutos cada vez, en una solución tamponada a pH 7.4 (PBS) (Paz 2009).

Como se ha mencionado en este trabajo, las moléculas fluorescentes (fluorocromos) absorben luz de una longitud de onda dada y emiten luz de otra longitud de onda, sin embargo, la intensidad y el color de la luz emitida es una propiedad característica del fluorocromo utilizado (Spring y Davidson s.f.). Los espectros de emisión y excitación son bien definidos para cada fluorocromo, y

por tanto cuando se desean observar dos o más antígenos en una misma muestra, se busca que los fluorocromos involucrados tengan diferentes espectros de excitación y emisión, para lograr diferenciar a los antígenos observados. Los fluorocromos utilizados en este trabajo y sus respectivos espectros de excitación y emisión cumplen con este criterio (Cuadro 5).

Cuadro 5.- Características de los fluorocromos utilizados en el desarrollo de este proyecto

Fluorocromo	Longitud de onda de Excitación máxima (nm)	Longitud de onda de Emisión máxima (nm)	Color de emisión de la fluorescencia
DAPI	358	461	Azul
Alexa Fluor 488	496	519	Verde
Alexa Fluor 555	555	570	Rojo

El blanqueamiento de un fluorocromo (“photobleaching” o “fading”) es la destrucción, usualmente irreversible, del fluorocromo en el estado excitado. Se pueden producir modificaciones químicas (de uniones covalentes, por ejemplo) y ocurren, generalmente, en condiciones de alta intensidad de iluminación (Schnell et al. 1999). Recientemente se han desarrollado fluoróforos de nueva generación, que son más brillantes y más fotoestables ante la estimulación lumínica, tal es el caso de los fluorocromos DyLight y Alexa Fluor; y también se han desarrollado sustancias anti-blanqueamiento (“antifade”), como Slow Fade, Vecta Shield, ProLong Gold, Fluoromount, etc (Diez-Fraile et al. 2012, Life Technologies Corporation 2013).

Para confirmar el buen desarrollo de la técnica inmunohistoquímica fue necesario realizar controles negativos, ya que una tinción inmunohistoquímica específica se define con el parámetro de que no hay tinción si se excluye el anticuerpo primario, asegurándose así que no hay falsos positivos. Entre las causas de los falsos positivos para los ensayos de inmunofluorescencia en tejido cerebral está la autofluorescencia del tejido (Fotografías 10, 18 y 19) (Diez-Fraile et al. 2012). Varios autores mencionan ciertos componentes celulares presentes en cortes de tejido cerebral que producen autofluorescencia, a saber: flavinas, lipofuscinas, serotonina y NADPH. Las flavinas tienen un espectro de emisión entre 520 nm y 560 nm (color de emisión de la fluorescencia: verde - rojo), las lipofuscinas varían entre 420 nm y 560 nm (color de emisión de la fluorescencia: azul - rojo), la serotonina en 440 nm (color de emisión de la fluorescencia: azul) y NADPH en 460 nm (color de emisión de la fluorescencia: azul) (Billinton y Knight 2001, Diez-Fraile et al. 2012, Schnell et al. 1999, Spitzer et al. 2011). No obstante, este efecto puede evitarse bloqueando la autofluorescencia mediante el uso de tratamientos químicos que no afecten los

marcajes fluorescentes (Fotografías 11 y 17). Varios autores han reportado que el sulfato de cobre en concentración de 1-10 mM en 50 mM de acetato de amonio (pH 5) reduce o elimina la autofluorescencia en secciones de tejido de cerebro de rata; siendo el ión Cu^{2+} el responsable de su acción ya que el cobre es un excelente "eliminador de electrones" por lo que hay electrones de las moléculas que se transfieren al Cu^{2+} cuando están en contacto (Kikugawa et al. 1997; Brehmer et al. 2004; Schnell et al. 1999, Zhang et al. 2010). Basado en los resultados obtenidos con el uso de la solución de sulfato de cobre 1 mM y acetato de amonio 50 mM (pH 5) (Fotografías 11 y 17) se considera fundamental, para el desarrollo del proceso de marcaje inmunohistoquímico, realizar el paso de bloqueo de autofluorescencia con dicha solución para evitar falsos positivos en el material histológico.

5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU) ha sido reconocido desde 1982 como un marcador principal de células mitóticas en estudios de neurogénesis adulta (Gratzner 1982, Leif et al. 2004, Taupin 2006). La sustitución de timidina, una base endógena de ADN, con su análogo, BrdU, asegura el etiquetado específico de solamente las células en división. Esta especificidad del BrdU combinado con la alta sensibilidad de la microscopía de fluorescencia condujo a la gran popularidad del método, y en la actualidad se considera que fue un elemento central para que se aceptara en la comunidad científica internacional la neurogénesis en el adulto como un proceso natural en el cerebro de los mamíferos (Kee et al. 2002, Taupin 2007).

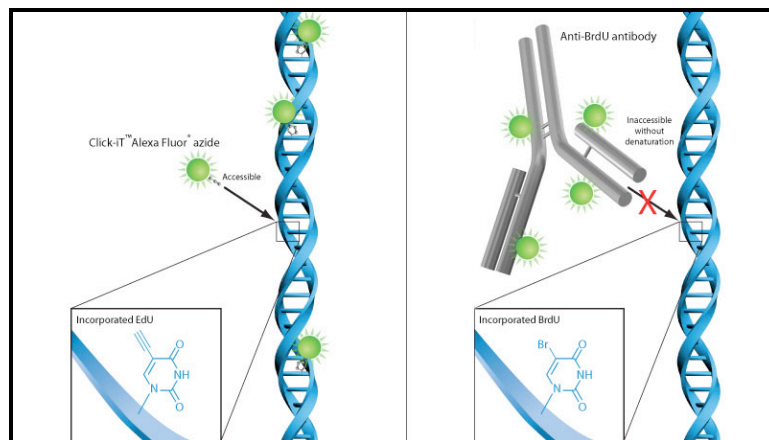
Sin embargo, la innegable utilidad del método va de la mano con sus limitaciones e inconvenientes. Para la detección del BrdU incorporado en el ADN, es necesaria la desnaturalización de la doble hélice por métodos agresivos (ácidos, calor, enzimas, etc.) para exponer las moléculas de BrdU y permitir el acceso del anticuerpo anti-BrdU a los residuos de BrdU incorporados. Estos tratamientos pueden afectar negativamente la integridad y la calidad de la muestra y destruir epítomos de interés en el tejido, lo que hace desafiante, no solo la co-tinción con otros anticuerpos, sino además el marcaje efectivo del nucleósido (Buck et al. 2008). Por otra parte, Cameron y McKay (2001) reportaron la incertidumbre de la difusión de esta sustancia entre los diversos tejidos del cuerpo después de la inyección intraperitoneal en animales de laboratorio, ya que la barrera hematoencefálica puede impedir que el BrdU penetre libremente el tejido cerebral, lo que podría resultar en una incorporación inefectiva del nucleósido sintético (Kee et al. 2002, Taupin 2006). Ahunado a esto, se reporta que el estrés puede inhibir el proceso de neurogénesis (Cameron y Gould 1994, Gould et al. 1998) y por lo tanto la manipulación y el procedimiento de inyección de BrdU en las ratas es probable que tenga un efecto no deseado

sobre la tasa de neurogénesis a nivel cerebral y favorecer, además, la no incorporación del nucleósido en el ADN. Si a estas teorías se le suma el uso de un anticuerpo con tipo de marcaje directo, podría suponerse una escasa amplificación de la señal y en muy poca sensibilidad para la detección de unas escasas células en el tejido (Molist et al. 2011).

Para hacer frente a estas limitaciones, varios intentos se han hecho, buscando un nuevo método o forma para marcar las células nuevas en el proceso de neurogénesis. Salic y Mitchison (2008) y Cappella et al. (2008) desarrollaron un método más fácil y altamente sensible utilizando etinildesoxiuridina (EdU), otro análogo a la timidina, para etiquetar el ADN recién sintetizado (Figura 8). Se inyecta a los animales de la misma forma que el BrdU, y para su detección, se aplica una reacción química "click" para detectar el nucleósido incorporado en el ADN. La reacción es una cicloadición catalizada por cobre, en la que se forma un anillo de triazol estable por el acoplamiento covalente del grupo alquino presente en EdU a un Alexa Fluor conjugado con un grupo azida (Buck et al. 2008, Chehrehasa et al. 2009, Invitrogen 2010, Mead y Lefebvre 2014).

Se ha demostrado que el número de células positivas para EdU en el giro dentado del hipocampo de ratas aumenta ligeramente en una forma dependiente de la dosis EdU incorporada. Además, se ha visto que EdU y BrdU co-localizan en las mismas células dentro del hipocampo. No hay tratamientos fuertes de los tejidos, por lo que el ensayo es rápido y fiable. Es muy sensible, y como se preserva la integridad física de las muestras, pueden realizarse dobles marcajes con BrdU y/o con muchos otros anticuerpos en ensayos inmunofluorescentes (Buck et al. 2008, Invitrogen 2010, Mead y Lefebvre 2014, Zeng et al. 2010).

Figura 8.- Comparación de la reacción "click", entre el grupo etinil del EdU incorporado en el ADN de doble cadena y Alexa Fluor 488 azida, y el marcaje inmunofluorescente de BrdU, inaccesible sin el proceso de desnaturalización del ADN de doble cadena.



Fuente: Buck et al. 2008

La dificultad más clara en el desarrollo de este proyecto fue el resultado negativo en el inmunomarcaje del nucleósido BrdU, a pesar de las diferentes estrategias utilizadas (Cuadro 2). No obstante, de acuerdo con lo investigado, se puede evidenciar que no existe un solo protocolo de detección inmunohistoquímica del BrdU, y más bien, hay múltiples tácticas utilizadas por los investigadores para lograr este objetivo.

Finalmente, hay que mencionar que la presente investigación permitió, de una forma exitosa, la implementación y estandarización de dos protocolos de inmunotinción para la identificación y cuantificación de células gliales y neuronales, para así poder utilizarse en diferentes proyectos involucrados con el estudio del sistema nervioso. Queda pendiente el desarrollo de una nueva estrategia para determinar la proliferación celular en cortes de tejido de cerebro de rata y acoplarla con los protocolos ya mencionados utilizando la técnica de marcaje múltiple, para determinar el fenotipo de las nuevas células marcadas.

CONCLUSIONES

De la presente investigación se concluye que:

- El formaldehído resulta ser un fijador apropiado para ser utilizado en las técnicas de inmunotinción.
- Es fundamental el paso de rescate o recuperación de antígenos, con citrato de sodio (pH 6) a 80 °C para desenmascarar los sitios de unión a los antígenos cubiertos por el proceso de fijación de los cortes cerebrales de rata.
- El bloqueo de sitios de unión en el preparado histológico puede reducir la unión inespecífica de los anticuerpos, pero también puede bloquear los sitios de unión de interés (epítomos) y por tanto afectar con un falso negativo el resultado del marcaje del anticuerpo.
- El uso del anticuerpo primario monoclonal (clon 2.2B10) producido en rata, reactivo para la proteína GFAP (Invitrogen: 13-0300) y del anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de rata (Invitrogen: A-21434) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 555, permitieron la identificación y cuantificación de células gliales en cortes de tejido de cerebro de rata.
- El uso del anticuerpo primario monoclonal (clon A60) producido en ratón, reactivo para la proteína NeuN (Millipore: MAB377) y del anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, reactivo para inmunoglobulinas de ratón (Invitrogen: A-11029) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 488, permitieron la identificación y cuantificación de células neuronales en cortes de tejido de cerebro de rata.
- El método de detección indirecta es flexible ya que es posible que un anticuerpo primario se una a más de un anticuerpo secundario, y es sensible ya que se obtiene mayor intensidad de la señal del fluorocromo frente a una misma cantidad de antígeno.
- El método de detección directa tiene la desventaja que se logra una escasa amplificación de la señal dado que la coloración involucra solo un anticuerpo marcado y esto resulta en muy poca sensibilidad.
- Una dilución óptima o la mejor concentración de anticuerpo es aquella que permita evitar falsos negativos (insaturación) y evitar una excesiva tinción de fondo (sobresaturación).

- Los controles negativos permiten evidenciar la presencia de falsos positivos en el procesamiento inmunohistológico.
- Ciertos componentes celulares presentes en los cortes de tejido cerebral producen autofluorescencia, a saber: flavinas, lipofuscinas, serotonina y NADPH; y esta autofluorescencia puede reducirse o eliminarse con el uso de una solución de sulfato de cobre 1 mM y acetato de amonio 50 mM (pH 5).
- No se logró el establecimiento de un protocolo de marcaje inmunohistológico del nucleósido BrdU en cortes de tejido de cerebro de rata, utilizando el anticuerpo monoclonal (clon MoBU-1) anti-BrdU producido en ratón y conjugado con Alexa Fluor 555.
- Uno de los productos de este trabajo es la elaboración de dos protocolos detallados para el marcaje inmunohistológico de las proteínas GFAP y NeuN en cortes de tejido de cerebro de rata, para que sean utilizados en los diferentes proyectos de investigación del área de Neurobiología del CIN-UCR.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer uso de mascarilla (tapa boca) durante el trabajo en el criostato y mantener cerrada la ventana deslizante del mismo cuando no se esté trabajando dentro de la cámara, esto con el fin de evitar la formación de escarcha en las paredes de la cámara y en el micrótomos, y la contaminación de los cortes cerebrales.
- Se recomienda utilizar guantes en todo momento y especialmente durante el desarrollo del protocolo de revestimiento de los portaobjetos con gelatina con sulfato de cromo y potasio, con el fin de evitar contaminar y manchar la superficie de estos. Se recomienda el uso de guantes de nitrilo para trabajar con sustancias químico-tóxicas, como el sulfato de cobre, Triton X-100, etc. Además, utilizar el equipo de protección adecuado al manipular sustancias irritantes, como la formalina.
- Luego de estudiar las ventajas de las tecnologías emergentes, se recomienda cambiar el nucleósido sintético BrdU por el nucleósido EdU, con un marcaje que involucre a Alexa Fluor 555 para alcanzar la realización del protocolo que permita determinar la proliferación celular en cortes de tejido de cerebro de rata.

BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN N.; BARRES B. 2009. Glia - more than just brain glue. *Nature Neuroscience* 457: 675-677.
- AIMONE J.; WILES J.; GAGE FH. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience* 9(6): 723-727.
- AMARAL D.; SCHARFMAN H.; LAVENEX P. 2007. The Dentate Gyrus: Fundamental Neuroanatomical Organization. *Progress in Brain Research* 163: 3-22.
- ANDERSEN P.; MORRIS R.; AMARAL D.; BLISS T.; O'KEEFE J. 2007. *The Hippocampus Book*. New York, EU, Oxford. 832 p.
- ARAQUE A.; CARMIGNOTO G.; HAYDON P.; OLIET S.; ROBITAILLE R.; VOLTERRA R. 2014. Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81(4):728-39.
- ARAQUE A.; PARPURA V.; SANZGIRI R.; HAYDON P. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences* 22: 208-215.
- AUXILAB. s.f. Epi-fluorescence microscope (en línea). Consultado 19 ene. 2015. Disponible en: <http://www.auxilab.es/documentos/info/ingles/50158358.pdf>
- BAKKER R.; TIESINGA P.; KÖTTER R. 2015. The Scalable Brain Atlas: instant web-based access to public brain atlases and related content. *Neuroinformatics*. Consultado 28 abril 2016. Disponible en: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12021-014-9258-x>
- BERESFORD W. 2000. Histology Full-Text (en línea). Virignia, EU. Consultado 27 set. 2014. Disponible en [http://wberesford.hsc.wvu.edu/histol.htm#HISTOLOGY:METHOD AND MICROSCOPY](http://wberesford.hsc.wvu.edu/histol.htm#HISTOLOGY:METHOD_AND_MICROSCOPY).
- BILLINTON N.; NIGHT A. 2001. Seeing the Wood through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence. *Analytical Biochemistry* 291, 175–197.
- BIRD C.; BURGESS N. 2008. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature Reviews Neuroscience* 9(3): 182-94.
- BOENISCH T. 2006a. Antibodies. *Dako Educational Guide to Immunohistochemical Staining Methods*. 4 ed. p. 1-14.
- _____. 2006b. Basic enzymology. *Dako Educational Guide to Immunohistochemical Staining Methods*: 4 ed. p. 19-26.
- _____. 2006c. Basic immunochemistry. *Dako Educational Guide to Immunohistochemical Staining Methods*. 4 ed. p. 15-18.
- BREHMER A.; BLASER B.; SEITZ G.; SCHRÖDL F.; NEUHUBER W. 2004. Pattern of lipofuscin pigmentation in nitrergic and non-nitrergic, neurofilament immunoreactive myenteric neuron types of human small intestine. *Histochemistry and Cell Biology* 121(1): 13-20.
- BRENES J.C.; LACKINGER M.; HÖGLINGER G.; SCHRATT G.; SCHWARTING R.; WÖHR M. 2016. Differential Effects of Social and Physical Environmental Enrichment on Brain Plasticity, Cognition, and Ultrasonic Communication in Rats. *The Journal of Comparative Neurology* 524(8):1586-607.

- BUCK S., BRADFORD J., GEE K., AGNEW B., CLARKE S., SALIC A. 2008. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques* 44:927-929.
- BUTT A.; HAMILTON N.; HUBBARD P.; PUGH M.; IBRAHIM M. 2005. Synantocytes: the fifth element. *Journal of Anatomy* 207(6): 695-706.
- CAMERON H., GOULD E. 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 61:203-209.
- CAMERON H., MCKAY R. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435:406-417.
- CAPPELLA P.; GASPARRI F.; PULICI M.; MOLL J. 2008. A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining. *Cytometry A*. 73(7):626-36.
- CARBAJO E.; CARBAJO S.; TRIVIÑO A.; HERNÁNDEZ L.; LÓPEZ A. 1994. Análisis del ciclo celular mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica (en línea). Coruña, ES. Consultado 25 nov. 2014. Disponible en: http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/2183/9306/1/CC-011_art_8.pdf.
- CHEHREHASA F.; MEEDENIYA A.; DWYER P.; ABRAHAMSEN G.; MACKAY-SIM A. 2009. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods* 177:122-130.
- CHEMICON. s.f. Introduction to Antibodies. Consultado 20 oct. 2014. Disponible en: https://biochem.wisc.edu/sites/default/files/labs/weibel/methods/Introduction_to_Antibodies.pdf.
- CHRISTENSEN NK. 2006. Multi-Staining Immunohistochemistry. *Dako Educational Guide to Immunohistochemical Staining Methods*. 4 ed. p. 61-69.
- DAKO. 2006. *Immunohistochemical Staining Methods*. California, EU. 4 ed. 183 p.
- DAS G.; REUHL K.; ZHOU R. 2013. The Golgi-cox Method. *Natural Development: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1018, 313-321.
- DIEZ-FRAILE A.; VAN HECKE N.; GUÉRIN C.; D'HERDE K. 2012. Optimizing Multiple Immunostaining of Neural Tissue, *Applications of Immunocytochemistry*. Consultado 25 abril 2016. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/applications-ofimmunocytochemistry/optimizing-multiple-immunostaining-of-neural-tissue>.
- ESCOBAR A. 2007. Epilepsia. Anomalías del desarrollo cerebral y esclerosis del asta de Amón asociadas a epileptogénesis. ¿Cuál es su relevancia? Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. *Revista Mexicana de Neurociencias* 8(2): 163-169.
- FARIÑA J.; ESCALONA J. 2005. La obra de Pio del Rio Horteaga y sus consecuencias en la neuropatología. *Arbor* 181(714): 221-232.
- FARMILO A.; STEAD R. 2006. Fixation and Processing. *Dako Educational Guide to Immunohistochemical Staining Methods*. 4 ed. p. 27-33.
- FELIPE D.; JONES E. 1992. Santiago Ramon y Cajal and methods in neurohistology. *Trends in Neurosciences* 15(7): 237-245.

- FEOLI A.; LEITE M.; TRAMONTINA A.; TRAMONTINA F.; POSSER T.; RODRIGUES L.; SWAROWSKY A.; QUINCOZES-SANTOS A.; LEAL R.; GOTTFRIED C.; PERRY M.; GONÇALVES C. 2008. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. *Brain Research* 1187: 33–41.
- FINCH C. 2003. Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Neurobiology of Aging* 24 (Suppl. 1), S123–S127.
- FLORIAN C.; ROULLET P. 2004. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural Brain Research* 154: 365-74.
- FORNAGUERA J. 1995. Protocolo para el revestimiento de portaobjetos con gelatina (entrevista). Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica.
- GARTNER L.; HIATT J. 2002. Texto y atlas de histología. 2 ed. CL, McGraw Hill. 511 p.
- GENESER F. 2000. Histología sobre bases biomoleculares. Editorial Médica Panamericana. 3 ed. Buenos Aires. 813p.
- GERFEN Ch. R. 1997. Basic Neuroanatomical Methods. *Current Protocols in Neuroscience* 1.1.1-1.1.11, by John Wiley & Sons, Inc.
- GIBBS J. s.f. Effective Blocking Procedures (en línea). Consultado 19 abril 2016. Disponible en: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA_bloqueo.pdf
- GÓMEZ-NICOLA D.; FRANSEN N.; SUZZI S.; PERRY V. 2013. Regulation of Microglial Proliferation during Chronic Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience* 33(6):2481–2493.
- GOULD E.; TANAPAT P.; MCEWEN B.; FLUGGGE G.; FUCHS E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3168-3171.
- GRATZNER HG. 1982. Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474-475.
- HERNÁNDEZ S. 2006. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina* 2(3): 252-256pp.
- HOWAT W.; WILSON B. 2014. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 70: 12–19.
- INVITROGEN. 2010. Do you still BrdU? Replace cumbersome BrdU assays with simplicity— Click-iT® EdU. 4p.
- JUNQUEIRA L.; CARNEIRO J. 2005. Histología Básica. Editorial Masson. 6 ed. España. 499p.
- KANDEL E.; SCHWARTZ J.; JESSELL T. 2001. Principios de Neurociencia. McGraw Hill Interamericana. Madrid.
- KEE N.; SIVALINGAM S.; BOONSTRA R.; WOJTOWICZ J.M. 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Methods* 115: 97-105.
- KEMPERMANN G.; JESSBERGER S.; STEINER B.; KRONENBERG G. 2004. Milestones of Neuronal Development in the Adult Hippocampus. *Trends in Neuroscience* 27(8): 447-452pp.

- KEY M. 2006. Immunohistochemistry Staining Methods. Dako Educational Guide to Immunohistochemical Staining Methods. Chapter 7. 4 ed. p. 47-54.
- KEY M.; BOENISCH T. 2006. Antigen Retrieval. Dako Educational Guide to Immunohistochemical Staining Methods. Chapter 6. 4 ed. p. 41-45.
- KIERNAN J. 2005. Preservation and retrieval of antigens for immunohistochemistry – methods and mechanisms. The Cutting Edge (National Society for Histotechnology, Region IX newsletter) April: 5-11.
- KIKUGAWA K.; BEPPU M.; SATO A.; KASAI H. 1997. Separation of multiple yellow fluorescent lipofuscin components in rat kidney and their characterization. Mechanisms of Ageing and Development. 97(2): 93-107.
- KUHN H.; DICKINSON-ANSON H.; GAGE F. 1996. Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Rat: Age-Related Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation. The Journal of Neuroscience 16(6): 2027-2033.
- LAMING P.; KIMELBERG H.; ROBINSON S.; SALM A.; HAWRYLAK N.; MÜLLER C.; ROOTS B.; NG K. 2000. Neuronal-glial interactions and behavior. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 24: 295–340.
- LEICA. 2000. Leica CM3050 S - Criostato. Manual de instrucciones V1.1. Leica Microsystems Nussloch GmbH. 66 p.
- LEIF R.; STEIN J.; ZUCKER R. 2004. A Short History of the Initial Application of Anti–5-BrdU to the Detection and Measurement of S Phase. Cytometry Part A 58A: 45–52.
- LEUNER B.; GLASPER E.; GOULD E. 2010. Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive. Journal of Comparative Neurology 517(2): 123–133.
- LICHTMAN J.; CONCHELLO J. 2005. Fluorescence Microscopy. Nature Methods 2 (12): 910-919.
- LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION. 2013. ProLong Gold Antifade Reagents, ProLong Antifade Kits, and SlowFade GoldAntifade Reagents (en línea). Consultado 24 abril 2016. Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/ProLong_Antifade_SlowFade_GreenFactSheet_d2.pdf
- MA M.; MA Y.; YI X.; GUO R.; ZHU W.; FAN X.; XU G.; FREY II W.; LIU X. 2008. Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone. BMC Neuroscience 9: 117.
- MEAD T.; LEFEBVRE V. 2014. Proliferation Assays (BrdU and EdU) on Skeletal Tissue Sections. Methods Mol Biol. 1130: 233–243.
- MOLIST P.; POMBAL M.; MEGÍAS M. 2011. Técnicas histológicas. Atlas de histología vegetal y animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. España. 35p.
- MONTERO C. 2003. The Antigen–Antibody Reaction in Immunohistochemistry. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 51: 1–4.
- MULLEN R.; BUCK C.; SMITH A. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development 116: 201-211.

- NICHOLS N.; DAY J.; LAPING N.; JOHNSON S.; FINCH C. 1993. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of Aging* 14: 421-429.
- NIEOULLON V.; BELVINDRAH R.; ROUGON G.; CHAZAL G. 2005. mCD24 regulates proliferation of neuronal committed precursors in the subventricular zone. *Mol. Cell. Neurosci.* 28: 462–474.
- OJA S.; SARANSAARI P.; SCHOUSBOE A. 2007. Glutamine, Glutamate, and GABA: Metabolic Aspects. En: *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: amino acids and peptides in the nervous system*. Springer, New York . 1-21pp.
- VERTON W. 2006. Immunofluorescence. *Dako Educational Guide to Immunohistochemical Staining Methods*. Chapter 8. 4 ed. p. 55-60.
- PAXINOS G.; WATSON C. 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4 ed. Academic Press. 474 p.
- PAZ D. 2009. Protocolo de inmunotinción (entrevista). Buenos Aires, Argentina, Universidad de Buenos Aires.
- PURVES D.; AUGUSTINE G.; FITZPATRICK D.; HALL W.; LAMANTIA A.; MCNAMARA J.; WILLIAMS S. 2007. *Neurociencia*. 3 ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- RAMÍREZ K. 2016. Protocolo de inmunotinción de BrdU (entrevista). Universidad de Ohio, Estados Unidos de América.
- REDISH A. 1999. *Beyond the Cognitive Map. From place cells to episodic memories*. Massachussets, EU. MIT Press. 420 p.
- RODRÍGUEZ E. 2007. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethica* 13 (1): 25-40.
- SALIC A.; MITCHISON T. 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:2415–2420.
- SHI S.; COTE R.; TAYLOR C. 1997. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45(3): 327–343.
- _____. 2001. Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49(8): 931–937.
- SHI S.; SHI Y.; TAYLOR C. 2011. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Review and Future Prospects in Research and Diagnosis over Two Decades. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 59:13–32.
- SCHNELL S.; STAINES W.; WESSENDORF M. 1999. Reduction of Lipofuscin-like Autofluorescence in Fluorescently Labeled Tissue. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 47(6): 719–730.
- SPITZER N; SAMMONS G.; PRICE E. 2011. Autofluorescent cells in rat brain can be convincing impostors in green fluorescent reporter studies. *J Neurosci Methods*. 197(1): 48–55
- SPRING K.; DAVIDSON M. s.f. *Introduction to Fluorescence Microscopy*. Consultado: 28 set. 2014. Disponible en: http://www.microscopyu.com/print/articles/fluorescence/fluorescence_intro-print.html.

- STEWART C.; STEWART S. 2001. Titering Antibodies. *Current Protocols in Cytometry*. 00:4.1:4.1.1–4.1.13.
- TANG X.; FALLS D.; LI X.; LANE T.; LUSKIN M. 2007. Antigen-Retrieval Procedure for Bromodeoxyuridine Immunolabeling with Concurrent Labeling of Nuclear DNA and Antigens Damaged by HCl Pretreatment. *The Journal of Neuroscience* 27(22):5837–5844.
- TAUPIN P. 2006. Neurogenesis in the adult central nervous system. *Comptes rendus Biologies* 329: 465-475.
- _____. 2007. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews* 53: 198–214.
- VAQUERO M. 2007. Manual de Calidad de Inmunohistoquímica en Anatomía Patológica. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Donostia. Consultado: 20 oct. 2014. Disponible en: http://www.osakidetza.euskadi.net/r85-sida01/es/contenidos/informacion/hd_publicaciones/es_hdon/adjuntos/ManualInmunohistoquimica.pdf.
- VERKHRATSKY A.; BUTT A. 2007. *Glial Neurobiology: A textbook*. John Wiley & Sons. 215 p.
- WANG B.; BORDEY A. 2008. The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology* 86:342–367.
- WOJTOWICZ J. M.; KEE N. 2006. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nature Protocols* 1(3): 1399-1405.
- WÖHR M.; KEHL M.; BORTA A.; SCHÄNZER A.; SCHWARTING R.; HÖGLINGER G. 2009. New insights into the relationship of neurogenesis and affect: tickling induces hippocampal cell proliferation in rats emitting appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neuroscience* 163(4):1024-30.
- ZENG CH.; PAN F.; JONES L.; LIM M.; GRIFFIN E.; SHELINE Y.; MINTUN M.; HOLTZMAN D.; MACH R. 2010. Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system. *Brain Research* 1319:21-32.
- ZETA CORPORATION. 2011. Neuronal-Nuclei (NeuN) (Clone A60). Mouse Monoclonal Antibody. Consultado: 27 set. 2014. Disponible en: <http://www.zeta-corp.com/Files/UploadFile/21f8555b3fc14fd9a017806c8f5dac56.pdf>.
- ZHANG Y., ZHANG W., JOHNSTON A.H., NEWMAN T.A., PYYKKÖ I., ZOU J. 2010. Improving the visualization of fluorescently tagged nanoparticles and fluorophore-labeled molecular probes by treatment with CuSO₄ to quench autofluorescence in the rat inner ear. *Hearing Research* 269(1-2): 1-11.

ANEXO 1.- Protocolo para realizar perfusión intracardiaca en rata (Modificado de: Gerfen 1997)

Procedimiento:

Se anestesia el animal mediante administración intraperitoneal (Ketamina (95mg/kg) y Xilacina (10mg/kg)).

Se fija al animal a una superficie, prensando sus cuatro patas, exponiendo la parte ventral. A continuación se accede a la cavidad abdominal mediante una incisión en la línea alba hasta el diafragma, con cuidado de no dañar el hígado. Seguido se llega al tórax, en donde se practica una punción en el ápex cardiaco con una cánula de 27G (o similar) y se realiza una incisión en la aurícula derecha del corazón para facilitar el drenaje de la sangre, que va siendo sustituida por el suero fisiológico.

La perfusión se realiza inicialmente con solución salina a 4°C; utilizada como solución de lavado. Cuando se observa un blanqueamiento de los órganos (y sobretodo del hígado), se cambia a solución fijadora de formaldehído al 4% y fosfatos. Se utiliza un volumen de aproximadamente 200ml-300ml de cada solución, por animal.

Al finalizar el protocolo, luego de pasar el fijador, se procede a retirar el cerebro y se almacena en un tubo cónico con 30ml de solución de infiltración.

Reactivos, soluciones, consumibles, equipo e instrumentos necesarios:

Cálculos para determinar la dosis de anestesia:

-Ketamina: (___ kg masa corp.) * (95 mg Ketamina/kg masa corp.) * (1 mL dln/100 mg Ketamina) = ___ ml

-Xilacina: (___ kg masa corp.) * (10 mg Xilacina/kg masa corp.) * (256.8/220.3) * (100/99) = ___ mg

Disolver el total de Xilacina en el total de Ketamina

Solución salina 0.9%:

Para 1 L, tomar 9 g NaCl + 1000 ml H₂O_d. Disolver y almacenar a 4°C

Solución fijadora (4% formaldehído y fosfatos):

Para 1 L, tomar 900 ml H₂O destilada + 100 ml formalina (35-40% formaldehído) + 3.2 g NaH₂PO₄ + 10.9 g Na₂HPO₄ + 9 g NaCl + 100 g sacarosa. Disolver y almacenar a 4°C.

*Si se utiliza la solución comercial de formalina de Sigma (HT501320) añadir 9 g NaCl + 100 g de sacarosa.

Solución de infiltración:

Para 1 L, tomar 900 ml H₂O destilada + 100 ml formalina (35-40% formaldehído) + 3.2 g NaH₂PO₄ + 10.9 g Na₂HPO₄ + 9 g NaCl + 300 g sacarosa. Disolver y almacenar a 4°C.

*Si se utiliza la solución comercial de formalina de Sigma (HT501320) añadir 9 g NaCl + 300 g sacarosa.

Equipo e instrumentos:

Bomba Peristáltica, tijeras quirúrgicas, cánula de 27G (o similar) o equipo de infusión pericraneal con aletas, jeringas y agujas adecuadas para la anestesia del animal, recipiente colector de líquidos, superficie para colocar al animal, herramientas para la extracción del cerebro (pinzas quiebra huesos y micro espátulas).

ANEXO 2.- Protocolo para el revestimiento de portaobjetos con gelatina, Sulfato de Cromo y Potasio (Fornaguera 1995; Das et al. 2013)

Procedimiento:

Previo al revestimiento, se realiza un proceso de lavado de los portaobjetos (jabón + agua), con el fin de eliminar sustancias oleicas y otras que pudieran interferir en el proceso de tinción posterior; luego se embeben las láminas en HCl 2N durante cinco minutos, seguidamente se le dan dos baños en alcohol 95%, de cinco minutos cada uno, y se dejan secando por diez minutos a 40°C en un horno.

Posteriormente, se sumergen tres veces en una solución de gelatina al 0.5% (Food Grade-Merck, #1.04078.0500) con sulfato de cromo y potasio, previamente filtrada, y se dejan secando a temperatura ambiente en un lugar limpio o a 37°C en el horno.

Al finalizar el protocolo, se almacenan los portaobjetos gelatinizados en cajas, a temperatura a 4°C, hasta su utilización.

Reactivos, soluciones, consumibles e instrumentos necesarios:

Solución de lavado:

200 mL de H₂O + jabón

Solución de HCl 2N:

Se toman 33.33 mL de HCl concentrado (aproximadamente 12N) y se diluyen en 200 mL de H₂O_d. *(Importante: Los ácidos fuertes, como el clorhídrico, tienen “alto calor de disolución”, es decir, al diluirlos, liberan mucho calor; si al ácido concentrado se le añade agua puede ocurrir que salpique y eso trae consecuencias como quemaduras y demás. Para evitar ésto, hay que agregar primero el agua en el recipiente, y luego, se agrega el ácido con precaución).*

Solución alcohol 95%:

Para 200 mL, tomar 190 mL alcohol absoluto (100%) + 10 mL H₂O_d.

Solución de gelatina al 0.5% con sulfato de potasio cromo

Para 200 mL, tomar 1000 mg gelatina (0.5%) (Food Grade-Merck, #1.04078.0500) + 100 mg de sulfato de cromo y potasio + 200 mL H₂O_d filtrada. Inicialmente agitar por un periodo de 30 minutos, en la campana de extracción de gases, la mitad de la cantidad de agua a utilizar con los 1000 mg de gelatina, hasta que la gelatina esté disuelta completamente (utilizar un poco de temperatura si fuera necesario). Posterior a esto agregar 100 mg de sulfato de cromo y potasio y disolver antes de agregar el total del líquido final. Seguidamente se debe filtrar la solución para evitar grumos adheridos a los portaobjetos. Dejar enfriar.

Equipo e instrumentos:

- Batería o cubeta de vidrio con cestillo (utilizar una diferente para cada solución).
- Horno a 40°C
- Cajas para guardar los portaobjetos
- Campana de extracción de gases

Notas importantes:

Utilizar guantes durante el desarrollo del protocolo y para la manipulación de los portaobjetos, y sobre todo no tocar con los dedos la superficie de estos. Se puede repetir el protocolo con las mismas soluciones para otros portaobjetos. Realizar el procedimiento en la campana de extracción de gases.

ANEXO 3.- Preparación de Solución PBS y Solución de citrato de sodio 10 mM (Modificado de: Gerfen 1997)

PBS:

Se añade la cantidad de sales a un balón aforado, adecuado para el volumen de la solución por preparar y según como se indica a continuación:

Cuadro 6.- Preparación de solución tampón fosfato salino 1X.				
1X	Concentración final	250mL	500mL	1000mL
NaCl	138 mM	2.00g	4.00g	8.00g
KCl	3 mM	0.05g	0.10g	0.20g
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	0.36	0.72g	1.44g
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	0.06g	0.12g	0.24g
H ₂ O _d	-	250mL	500mL	1 L

Cuadro 7.- Preparación de solución tampón fosfato salino 10X.				
10X	Concentración final	250mL	500mL	1000mL
NaCl	1380 mM	20.15g	40.3g	80.6g
KCl	30 mM	0.55g	1.10g	2.20g
Na ₂ HPO ₄	81 mM	2.875	5.75g	11.5g
KH ₂ PO ₄	15 mM	0.50g	1.0g	2.0g
H ₂ O _d	-	250mL	500mL	1 L

Se añade el 80% del volumen final de H₂O_d requerido (200, 400 u 800 mL según se trate de 250, 500 ó 1000 mL de volumen final).

Se utiliza una barra magnética y un agitador magnético para diluir las sales y en el proceso se ajusta el pH a 7.4 con HCl o NaOH (Las soluciones 10X de PBS poseen un pH ~6.8, por ello en el caso de estas soluciones, no es necesario ajustar el pH sino hasta que son llevadas a 1X. Las soluciones 1X no presentan variaciones de pH dependientes de temperatura).

Se afora la solución con H₂O_d al volumen final requerido y se filtra para eliminar partículas suspendidas.

Se almacena a temperatura ambiente (uso rutinario), no más de una semana, o bajo refrigeración entre +4°C y +8 °C (soluciones de respaldo).

Citrato de sodio: (10mM):

Con el objetivo de mejorar la exposición de los antígenos, los cortes se someten a un tratamiento con citrato de sodio 10mM (pH 6.0).

Se disuelve 2.94 g de citrato de sodio en 1 L de agua destilada. Se ajusta el pH a 6 con HCl.

Se almacena a temperatura ambiente (uso rutinario) por 3 meses, o bajo refrigeración entre +4 y +8 °C si es un tiempo mayor.

ANEXO 4.- Protocolo para el corte de cerebros de rata utilizando el criostato Leica CM3050 S (Leica 2000)

Procedimiento:

1. Ajustar la temperatura del criostato a -26°C , y esperar a que el equipo se estabilice a dicha temperatura antes de iniciar el trabajo.
2. Aplicar una cantidad suficiente de “medio de montaje” (Leica Cryocompound) sobre una “platina porta-muestras”, a temperatura ambiente.
3. Montar la muestra de cerebro, sobre la “platina porta-muestras” y orientar el tejido teniendo el cuidado de posicionar la parte superior del cerebro en donde se señala en la platina.
4. Recubrir el tejido superficialmente con el “medio de montaje” (Leica Cryocompound) e inmediatamente colocar la platina con la muestra en uno de los diez orificios del “bloque de congelación rápida” del criostato. Dejar reposando 30 minutos con el fin de que disminuya la temperatura de la muestra y alcance la temperatura de la cámara.
5. Montar la platina con la muestra en el “termobloque” del criostato, acercar la muestra a la cuchilla y ajustar la “ventana de corte” de la muestra.
6. Desbastar la muestra hasta obtener secciones completas de la superficie total del tejido.
7. Ajustar el ángulo de corte de la muestra, orientándola en sus ejes x-, y-, z-.
8. Ajustar el grosor del corte a $25\text{ }\mu\text{m}$ y utilizar una velocidad de corte del 20% (42mm/s) en modo automático.
9. Tomar el corte de cerebro con un portaobjeto recubierto con gelatina. Recogerlo de la base metálica, dejando caer encima el portaobjeto (que se encuentra a temperatura ambiente).

Reactivos, soluciones, consumibles e instrumentos necesarios:

Equipo e instrumentos:

Criostato Leica CM3050 S - Medio de montaje “Leica Cryocompound” - Tejido (cerebro de rata)

Portaobjetos gelatinizados (ver protocolo respectivo – Anexo 2)

Notas importantes:

El presente protocolo es replicable para realizar el corte de un tejido animal, como el cerebro de rata. Dado caso que se deseen realizar cortes con otro tipo de tejido, hay que evaluar nuevamente los parámetros de temperatura de congelación, velocidad y grosor del corte en el criostato.

APÉNDICE 1.- Protocolo para la detección inmunohistoquímica de la proteína GFAP en cortes de tejido de cerebro de rata (Modificado de: Billinton y Knight 2001, Tang et al. 2007, Paz 2009)

Fijación: Se realiza el procedimiento de perfusión intracardiaca a las ratas (ver protocolo aparte), inicialmente con solución salina 0.9% y seguido con una solución de fosfatos, sacarosa 10% y formaldehído 4%, utilizando una bomba peristáltica. El cerebro se extrae manualmente y se sumerge en una solución de fosfatos, sacarosa 30% y formaldehído 4%. Estará listo para su uso cuando se asiente en el tubo.

Corte: Se realizan cortes coronales de cerebro de rata de 30 μm de grosor con criostato (ver protocolo aparte) y se recolectan en portaobjetos gelatinizados con una solución de sulfato de cromo y potasio (ver protocolo aparte). Se dejan reposar 10' a temperatura ambiente y luego se sumergen en solución de PBS 3 x 5' para hidratar.

Rescate de antígeno: Se precalienta el baño maría a 80 °C con el recipiente que contiene una solución de citrato de sodio 10mM a pH 6, y al alcanzar la temperatura se sumergen los portaobjetos en la solución durante 30', se saca del baño maría y se deja enfriar a temperatura ambiente por 20'.

Lavado: Para eliminar el exceso de citrato, se realiza un triple lavado de las muestras, de 5' cada uno, a temperatura ambiente, en un Coplin, con PBS nuevo cada vez.

Anticuerpo primario: Se incuban los cortes de tejido con el anticuerpo primario monoclonal (clon 2.2B10) producido en rata, reactivo para la proteína GFAP, con Triton X-100 0.3%; a una concentración de 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se colocan, aproximadamente, 50 μl por corte de tejido. Los anticuerpos se incuban "overnight", a 4 °C, en cámara húmeda. Puede utilizarse plástico sobre cada muestra para evitar la desecación de los cortes.

Lavado: Al día siguiente, se deja la cámara húmeda a temperatura ambiente durante 10' para ambientar los tejidos. Seguidamente, se lavan las muestras con PBS durante 15' en un Coplin. Cambiar el PBS cada 5'.

Anticuerpo secundario: Se incuban los cortes con el anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, diluido en PBS reactivo para inmunoglobulinas de rata (Invitrogen: A-21434) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 555 (longitud de onda para observación: 555nm). Se diluye el anticuerpo en PBS a una concentración de 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y se incuban a temperatura ambiente, en una cámara húmeda negra, durante 60'. Se colocan, aproximadamente, 50 μl por corte de tejido.

Lavado: Se lavan las muestras con PBS durante 15' en un Coplin. Cambiar el PBS cada 5'.

Autofluorescencia: Se enjuagan los cortes en agua destilada filtrada y se incuban, durante 60', en una solución de Sulfato de Cobre 1mM y Acetato de Amonio 50mM, pH 5. Finalmente se realiza un enjuague con agua destilada filtrada y tres lavados de las muestras, de 5' cada uno, con PBS nuevo.

Montaje: Se secan los cortes 15' a temperatura ambiente y se montan los cubreobjetos con el medio "Fluoromount" (Sigma: F4680) para evitar el decaimiento de la señal, o el medio "Prolong Gold Antifade" (Molecular Probes: P10144) con DAPI para la tinción de los núcleos.

NOTAS:

Control negativo: Se realiza todo el protocolo, con la excepción que no se incuba con anticuerpo primario; solamente se utiliza PBS con Triton X-100 0.3%.

APÉNDICE 2.- Protocolo de marcaje inmunohistológico de la proteína NeuN en cortes de tejido de cerebro de rata (Modificado de: Billinton y Knight 2001, Gómez-Nicola et al. 2013, Leuner et al. 2010, Tang et al. 2007).

Fijación: Se realiza el procedimiento de perfusión intracardiaca a las ratas (ver protocolo aparte), inicialmente con solución salina 0.9% y seguido con una solución de fosfatos, sacarosa 10% y formaldehído 4%, utilizando una bomba peristáltica. El cerebro se extrae manualmente y se sumerge en una solución de fosfatos, sacarosa 30% y formaldehído 4%. Estará listo para su uso cuando se asiente en el tubo.

Corte: Se realizan cortes coronales de cerebro de rata de 30 μm de grosor con criostato (ver protocolo aparte) y se recolectan en portaobjetos gelatinizados con una solución de sulfato de cromo y potasio (ver protocolo aparte). Se dejan reposar 10' a temperatura ambiente y luego se sumergen en solución de PBS 3 x 5' para hidratar.

Rescate de antígeno: Se precalienta el baño maría a 80 °C con el recipiente que contiene una solución de citrato de sodio 10mM a pH 6, y al alcanzar la temperatura se sumergen los portaobjetos en la solución durante 30', se saca del baño maría y se deja enfriar a temperatura ambiente por 20'.

Lavado: Para eliminar el exceso de citrato, se realiza un triple lavado de las muestras, de 5' cada uno, a temperatura ambiente, en un Coplin, con PBS nuevo cada vez.

Anticuerpo primario: Se incuban los cortes de tejido con el anticuerpo primario monoclonal (clon A60) producido en ratón, reactivo para la proteína NeuN (Millipore: MAB377), con Triton X-100 0.3%; a una concentración de 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se colocan, aproximadamente, 50 μl por corte de tejido. Los anticuerpos se incuban "overnight", a 4 °C, en cámara húmeda. Puede utilizarse plástico sobre cada muestra para evitar la desecación de los cortes.

Lavado: Al día siguiente, se deja la cámara húmeda a temperatura ambiente durante 10' para ambientar los tejidos. Seguidamente, se lavan las muestras con PBS durante 15' en un Coplin. Cambiar el PBS cada 5'.

Anticuerpo secundario: Se incuban los cortes con el anticuerpo secundario policlonal producido en cabra, diluido en PBS reactivo para inmunoglobulinas de ratón (Invitrogen: A-11029) y acoplado con el fluorocromo Alexa Fluor 488 (longitud de onda para observación: 488nm). Se diluye el anticuerpo en PBS a una concentración de 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y se incuban a temperatura ambiente, en una cámara húmeda negra, durante 60'. Se colocan, aproximadamente, 50 μl por corte de tejido.

Lavado: Se lavan las muestras con PBS durante 15' en un Coplin. Cambiar el PBS cada 5'.

Autofluorescencia: Se enjuagan los cortes en agua destilada filtrada y se incuban, durante 60', en una solución de Sulfato de Cobre 1mM y Acetato de Amonio 50mM, pH 5. Finalmente se realiza un enjuague con agua destilada filtrada y tres lavados de las muestras, de 5' cada uno, con PBS nuevo.

Montaje: Se secan los cortes 15' a temperatura ambiente y se montan los cubreobjetos con el medio "Fluoromount" (Sigma: F4680) para evitar el decaimiento de la señal, o el medio "Prolong Gold Antifade" (Molecular Probes: P10144) con DAPI para la tinción de los núcleos.

NOTAS:

Control negativo: Se realiza todo el protocolo, con la excepción que no se incuban con anticuerpo primario; solamente se utiliza PBS con Triton X-100 0.3%.