

ISBN: 970-27-0770-6

INMUNOMARCAJE DE MICROGLIA Y ASTROCITOS EN TEJIDO CEREBRAL DE CERDO.

***Meraz Medina, T.¹, García Estrada J.³, Luquin de Anda M. S.², Feria Velasco A.¹, Gómez Pinedo U. A.⁴ y Bañuelos Pineda J.¹**

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias¹; Centro Universitario de Ciencias de la Salud² de la Universidad de Guadalajara. Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (IMSS).³ CIATEJ⁴.

El cerdo (*Sus scrofa*) es un mamífero ungulado que pertenece al orden de los artiodáctilos, pertenece a la familia de los suidos del orden ungulado, proveniente del género *Sus*. Su anatomía y fisiología orgánica es bastante similar a la del humano, de lo que resulta un animal valioso para estudios de trastornos sistémicos y celulares de importancia en salud pública. Esto motiva a identificar inmunocitoquímicamente el mejor procedimiento para evidenciar células de microglia y astrocitos del cerebro de cerdo, que servirá de fundamento para estudios posteriores sobre el sistema nervioso central.

Objetivo: Estandarización del inmunomarcaje de células de microglia y astrocitos en tejido cerebral de cerdo.

Metodología. Para este estudio se utilizaron cerebros de cerdos adultos jóvenes criados bajo condiciones de explotación semi-intensiva. Una vez sacrificados bajo condiciones de rastro, se realizó una craneotomía para obtener los cerebros e inmediatamente se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4%. Una semana después se tomaron pequeños fragmentos de tejido correspondientes a corteza prefrontal, hipocampo, hipotálamo y amígdala. De estos fragmentos se obtuvieron cortes de 40 μ m algunos de ellos fueron cortados en fresco mediante un vibratomo y otros fueron parafinados y cortados mediante un micrótomo. Como tejido control se utilizó a la par cortes de cerebro de rata.

Inmunomarcaje de microglia.

Se tomaron fragmentos de los tejidos seleccionados, ya fijados, y se lavaron en Buffer fosfato salino (PBS) con el propósito de obtener cortes de 50 μ m en un vibratomo. Se desenmascararon con microondas a 800 watts, se lavaron en PBS e inactivaron las peroxidasas endógenas. Se lavaron en PBS con 0.3% de tritón X-100, 0.1% de albúmina y 3% de suero de conejo. Se incubaron con isolectina-B₄ (dilución 1:100) durante la noche a 4° C, se lavaron con el mismo tampón e incubaron durante 24 h a 4° C con IgG (de cabra) contra lectina I de *griffonia simplicifolia* (dilución 1:100) (Ac primario), se lavaron e incubaron (4 h a temperatura ambiente) con IgG biotinizadas (H+L) (de conejo) contra IgG de cabra (Ac secundario), se lavaron, incubaron en Avidina-Biotina y se revelaron con diaminobencidina (DAB). El resultado mostró aceptable inmunomarcaje de células de microglia.

Inmunohistoquímica para astrocitos con anticuerpos monoclonales.

Para corroborar la eficacia de los anticuerpos y la técnica se procesó un cerebro de cerdo a la par de uno de rata. Los cerebros fueron cortados en fresco, lavados con PBS-triton-albúmina (PTA) al 0.1 molar, se inactivaron con peroxidasas, se sometieron a lavados, se procedió a incubar durante 12 horas a 4° C con el anticuerpo primario *mouse anti-gliial fibrillary* dilución 1:600 y se hicieron lavados con PBS. Inmediatamente se incubó con el anticuerpo secundario *Biotinylated anti-mouse IgG (H+L)* rat desarrollado en caballo durante 2 horas, dilución 1:250 seguido de lavados con PBS e incubación en oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 horas en ABC (avidin biotin). Después se lavó con PBS y se reveló con DAB. La técnica dio resultados en el tejido de rata y una marca leve en el cerebro de cerdo.

Inmunohistoquímica GFAP con Vimentina para Astrocitos.

Otros fragmentos fueron parafinados y cortados en un micrótopo rotatorio (50 µm), después fueron hidratados y bloqueadas sus peroxidasas endógenas. Se hicieron lavados con PTA, se incubaron durante 30 minutos en suero de caballo (100 µl por laminilla), se procedió a la decantación del mismo y se incubó con el Ac. primario *Antivimentin Monoclonal* concentrado, dilución 1:200 durante toda la noche a 4° C, al día siguiente se hicieron lavados con PTA y se incubó con el Ac. secundario *Anti mouse IgG* (biotinilado de hecho en caballo), dilución 1:200 por 2 horas a temperatura ambiente, siguiendo con lavados con PTA e incubación por 1 hr y media con ABC 10 µl, diluidos en 1 ml de PBS, durante 30 min., lavado con PTA y revelado con DAB. En una segunda opción se utilizó como Ac secundario *Anti rabbit* y otro grupo con *Antirabbit* acoplado con HRP, estos fueron revelados con DAB níquel o cobalto. En este intento los resultados no fueron del todo satisfactorios, aunque sí se marcaron algunos astrocitos se encontró bastante reacción de fondo.

Otra prueba con *Vimentina policlonal* (biotinilado anti-goat IgG hecho en conejo) dilución 1:200 como Ac secundario. Antes de la incubación con el Ac. primario se preincubó con suero de conejo, 100 µl por laminilla a una dilución de 3 a 5%, como Ac primario se utilizó *Anti-Vimentin* desarrollado en cabra, dilución 1:200 una parte de los tejidos fueron incubados sin biotina PAP y otro con biotina ABC los dos se revelaron con DAB. En estas técnicas no se obtuvieron resultados positivos.

En otro procedimiento se utilizaron tejidos de cerebro de rata y de cerdo incubados con tripsina en cámara húmeda durante 24 horas a 4° C. Una parte fue tratado con tripsina y otra sin tripsina el primer grupo fue incubado con anticuerpo *monoclonal anti mouse* (hecho en caballo) y el otro con Ac *policlonal anti-goat IgG* biotinilado (hecho en conejo) con la misma distribución, con una dilución 1:100. Esta técnica tampoco evidenció un marcaje suficiente.

En otros cortes de cerebro de cerdo de 30 µm no parafinados, se utilizó el mismo protocolo, con la adición de tripsina. El Ac primario fue *vimentina monoclonal* y en otro grupo se utilizó Ac policlonal, dilución 1:100. Después de lavados con PBS, se adicionó, para el Ac. Monoclonal, suero de caballo al 3% y para el policlonal suero de conejo al 10%. Junto con el suero se adicionó el Ac. secundario. Para el grupo monoclonal se utilizó *Biotinilated Antimouse* (hecho en caballo) y para el grupo policlonal se utilizó *Antigoat IgG biotinilated* (hecho en conejo), después se adicionó ABC. Se reveló con DAB mas TRIS.

En este caso las marcas fueron muy aisladas y no en todos los cortes se encontraron ramificaciones, las marcas fueron muy superficiales y se marcaron muchos capilares.

En otro intento solo se pasaron los tejidos a diferentes tiempos en tripsina, 10, 15 y 20 min. Los filamentos marcados no fueron específicos.

Después se separaron en grupos para probar distintas formas de la técnica. A algunos cortes se les aplico ciclos de 3 minutos en microondas con tampón citrato. Los cortes fueron divididos en cuatro grupos:

1. Grupo con Avidin-Biotin y otro sin este, con ciclos de microondas.
2. Grupo con Avidin-Biotin y otro sin Avidin-Biotin sin ciclos de microondas.

Siguiendo el protocolo, se bloqueo con Avidin-Biotin Blockin Kit mezclado con suero de conejo (Ac. primario, policlonal biotinilado), se incubó por separado el Avidin con 10% de suero diluido en PBS 0.1M y después se incubo con biotina en las mismas condiciones. A los grupos con Avidin-Biotin les fue retiradas las soluciones y se agregó el Ac primario vimentina policlonal dilución 1:100, y al grupo sin Avidin- Biotin se le agregó directamente el Ac. primario, incubando por 24horas a 4° C. Al día siguiente se agregó el Ac secundario policlonal anti-cabra, hecho en conejo, durante 30 min a 37° C, en dilución 1:100 y se reveló con DAB. El resultado mostro que el grupo no expuesto a microondas y con Avidin-Biotin obtuvo una marca muy suave, poca especificidad y la inmunorreaccion fue muy débil, mientras que en el grupo con microondas y Avidin-Biotin la marca mejoró, hubo mayor marcaje de los filamentos, aunque un algo inespecífico.

Después de estos resultados se realizó otro procedimiento con vimentina policlonal con bloqueo de AB y ciclos de microondas. En este se utilizaron 6 ciclos de 3 min en microondas con tampón citrato, utilizando tres grupos, dos de los cuales utilizaron la misma técnica y otro grupo fue procesado con glicina-lisina al 0.2 M, al grupo 1 se agregó bloqueo de AB, diluido con suero de conejo al 10% en PBS al 0.1M agregando 4 gotas de Avidin (A) incubado por 15 min y con Biotina durante otros 15 min. Al grupo 2 se agregó lisina-glicina y se dejó incubar durante 45 min; después se bloqueo con AB de la misma forma que el primer grupo. El Ac primario utilizado fue *vimentina policlonal*, dilución 1:100, el Ac. secundario *Anti-goat biotinylated*, hecho en conejo, con la misma dilución, finalmente se reveló con DAB mas TRIS. Obteniendo de esta forma los mejores resultados.