

FINANCIAMIENTO DE ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN (TERCERA CONVOCATORIA)

Capacitación en técnicas de inmunohistoquímica en neurociencia

Laboratorio de Neurociencias comportamental e Evolutivas (LaNCE) – Universidade Federal de Sergipe (UFS)

Universidad Nacional de Asunción – Facultad de Ciencias Químicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biomoleculares

Analía Rojas Caballero – amnrojas@gmail.com

RESUMEN

La técnica de inmuno-histoquímica es una herramienta que permite evidenciar *in situ* presencia, ausencia o alteraciones en la expresión de componentes tisulares. Los estudios de elementos tisulares propios de las células neuronales son esenciales para entender los procesos fisiopatológicos en una condición patológica como la enfermedad de Parkinson (EP) que aún no poseen explicación. **Metodología:** Todos los trabajos fueron de diseño experimental. Se utilizaron encéfalos de ratones tratados con reserpina (un inductor farmacológico del modelo de EP), se realizó la disección del cerebro y la separación de las áreas de interés del cerebro del animal. Con ayuda de un criostato se realizó el corte de las áreas para someterlas a una conservación en free-floating. Posteriormente, se realizó la técnica de inmunohistoquímica para revelar moléculas de interés que permitan entender mejor la patología neurodegenerativa del Parkinson. Se logró analizar reactividad de la marcación de GLUR1 al inicio de tratamiento (4ta dosis), luego del inicio de las manifestaciones motoras (10ma dosis) y al término del tratamiento (15va dosis). Además, se logró participar de otras actividades como análisis de test de comportamiento para evaluar estados de alteración motora en un modelo *in-vivo*. **Resultados:** Se logró comprender y aplicar la técnica de inmunohistoquímica, así como los procesos de fijación, disección y reconocimiento de las áreas del cerebro de interés. La evaluación final de la marcación realizada permitió determinar la afectación de los receptores GLUR1 durante el tratamiento de RES. Evidenciándose alteraciones a partir de la décima dosis en adelante. **Conclusión:** Esta beca de investigación es una forma eficiente y efectiva de adquisición de conocimientos y habilidades en el campo de la neurociencia. Las mismas podrán ser implementadas localmente para fortalecer las actividades académicas, proyectos de investigación y servicio en la FCQ-UNA. Además, cabe destacar que concretó la formación de una colaboración con profesionales internacionales de gran renombre en el área y permitirá fortalecer el desarrollo del área de estudios neurodegenerativos en Paraguay.

OBJETIVOS

El objetivo fue realizar la capacitación en técnica de inmunohistoquímica cerebral de modelos murinos. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Comprender el fundamento de los métodos de inmunohistoquímica y sus aplicaciones
- Realizar la fijación y la conservación por el método free floating de cerebros de animales que fueron sometidos a un tratamiento farmacológico de RES.
- Diseccionar las áreas y regiones de interés del cerebro para realizar las láminas que serán estudiadas
- Evaluar la afectación general de las células dopaminérgicas en el tejido estudiado, el estrés oxidativo y el estado inmunológico de las zonas afectadas por la neurodegeneración.

APORTES DE LA INVESTIGACIÓN

La capacitación consistió principalmente en realizar, aprender y aplicar la inmuno-histoquímica. Esta técnica es una herramienta que permite evidenciar *in situ* presencia, ausencia o alteraciones en la expresión de componentes tisulares. Sin embargo, pude hacer aún más actividades durante la estancia como aprender técnicas de evaluación de comportamiento del animal, preparar los tejidos para análisis bioquímicos o biomoleculares, aprender la perfusión de tejidos para lograr una mejor obtención de muestras, entre otras. La Estancia de investigación es sumamente importante porque empleare la técnica de inmunohistoquímica en el proyecto de Doctorado en neurodegeneración que realizo actualmente en el Dpto. de Farmacología de la FCQ-UNA. Además, la posibilidad que me brindaron de participar en la inmuno-tinción de distintos marcadores servirá para aplicar a otros trabajos de mis colegas en la FCQ-UNA. Los lazos generados a través de contactos son muy valiosos ya pudimos planear colaboraciones futuras entre ambos laboratorios para seguir desarrollando esta línea en Paraguay. Cabe mencionar que fui incluida en el análisis de resultados con la idea de contar con una publicación en conjunto y afianzar así la colaboración entre ambos grupos.

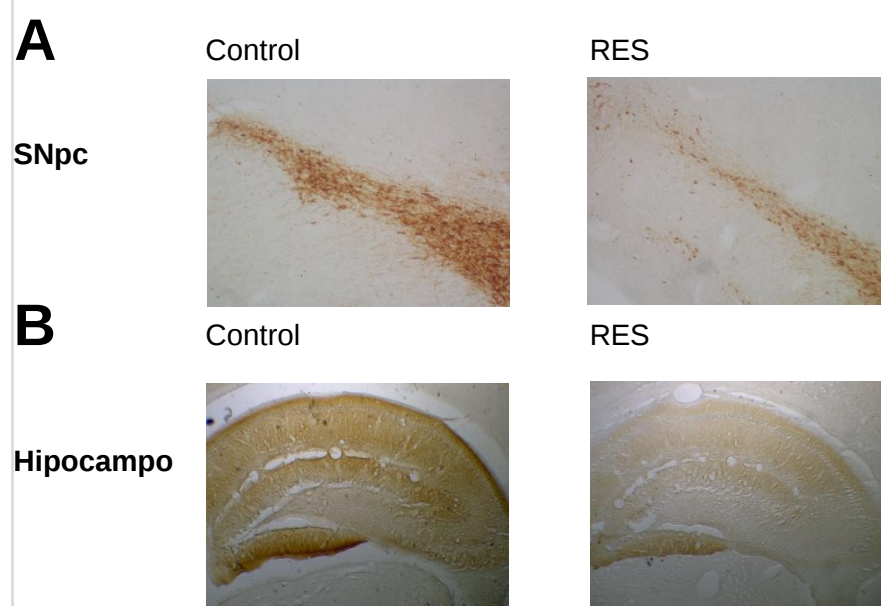
ACTIVIDADES REALIZADAS

- 1) En ratones se realizó la obtención del cerebro por medio de eutanasia empleando el proceso de perfusión del animal. Entrenamiento en la identificación de las áreas de cerebro: prefrontal, estriado, hipocampo, sustancia negra y VTA, y cerebelo.
- 2) Disección del encéfalo y conservación de las áreas de interés. Utilización del criostato para realizar cortes de 40 μ M del encéfalo de animales.
- 3) Se realizó el proceso de inmunohistoquímica a partir de la conservación free-floating. Incluyendo los siguientes pasos: Lavados de los cortes con PB (Buffer fosfato) Proceso de inhibición de per oxidasa endógena. Proceso de bloqueo de epítomos inespecíficos con proteínas de leche. Proceso de incubación con anticuerpos primarios específicos del antígeno de interés*. Proceso de incubación con anticuerpos secundarios. Proceso de amplificación de señal por medio de avidina – biotina. Proceso de revelación de la marcación con DAB (Diaminobenceno).
- 4) Para luego realizar el proceso de montaje en láminas. Proceso de intensificación de la señal con técnica de osmio. Proceso de armado de lámina-laminilla.
- 5) Entrenamiento en la visualización de las láminas tenidas y captura de áreas de interés. Entrenamiento en la evaluación de la densidad óptica de las regiones inmuno-teñidas.

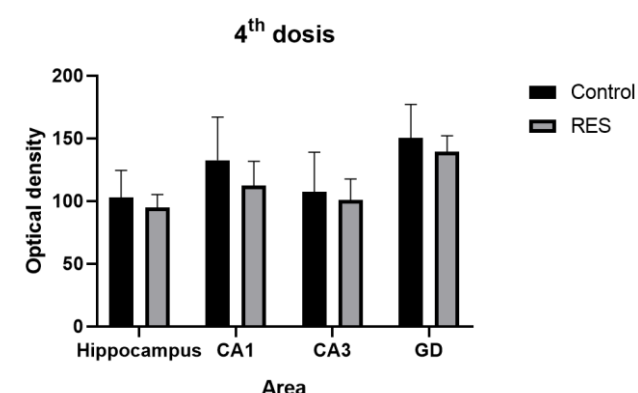
*Se utilizaron diversos marcadores: marcador de tiroxina hidroxilasa, en neuronas dopaminérgicas, GLU1R: marcador de receptores de glutamato, presente en neuronas y células gliales, GFAP: marcador específico de activación de astrocitos, CD11b y CD68: marcador de macrófagos y microglia, IBA-1: marcador de activación de microglia, Ox-40: marcador de células T-activadas y estrés oxidativo.



RESULTADOS OBTENIDOS



C



- A. Marcación con inmunotinción específica de tiroxina hidroxilasa en región de la *sustancia negra pars compacta* (SNpc) del encéfalo de ratas sometidas a tratamiento con reserpina (RES) y ratas sin tratamiento con Reserpina (control).
- B. Marcación con inmunotinción específica de receptor glutamérgico 1 (GLU1R) en región del hipocampo del encéfalo de ratas sometidas a tratamiento con reserpina (RES) y ratas sin tratamiento con Reserpina (control).
- C. El análisis de expresión de GLU1R en hipocampo y sus distintas sub-áreas (CA1, CA3 y Giro dentado) que revela que a la 4ta dosis de reserpina, hay una tendencia a disminuir la expresión de GLU1R en hipocampo (n=6).

CONCLUSIÓN

Esta beca de investigación brinda la posibilidad de adquirir de forma eficiente y efectiva conocimientos y habilidades innovadoras en el campo de la neurociencia que no están aun disponibles en el país. Además, cabe destacar que concretó la formación de una colaboración con profesionales internacionales de gran renombre en el área y permitirá fortalecer el desarrollo del área de estudios neurodegenerativos en Paraguay.

VISIÓN Y PLANES FUTUROS

Las técnicas aprendidas en esta capacitación podrán ser implementadas localmente para fortalecer las actividades académicas, proyectos de investigación y servicio en la FCQ-UNA. Además, cabe destacar que concretó la formación de una colaboración con profesionales internacionales de gran renombre en el área y permitirá fortalecer el desarrollo del área de investigaciones en neurodegeneración en nuestro país. No obstante, esta técnica permitirá mejorar los productos de la investigación con plantas medicinales nativas del país generando publicaciones científicas en revistas arbitradas e indexadas de impacto, potencial protección de la propiedad intelectual de los resultados (patente u otros) y desarrollo de procesos o productos innovadores en asociación con empresas de investigación nacional e internacional.

“Esta Estancia de Investigación fue cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con recursos del FEEI”