

Estandarización de un protocolo de inmunohistoquímica para detectar microglia del cerebro de ratas de la cepa Wistar

Standardization of a Protocol of Immunohistochemistry for the Detection of Brain Microglia in Wistar Rats

Karol Ramírez Chan DDS, MSc, PhD^{1,2}; Jaime Fornaguera-Trías PhD^{2,3}

1. Facultad de Odontología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
2. Centro de Investigación en Neurociencias, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
3. Departamento de Bioquímica, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Autor para correspondencia: Dra. Karol Ramírez Chan - karol.ramirez@ucr.ac.cr

Recibido: 28-VI-2017

Aceptado: 29-VI-2017

Publicado Online First: 3-VII-2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.29698>

RESUMEN

Objetivo: Estandarizar un protocolo de inmunohistoquímica que se ha utilizado ampliamente en ratones de la cepa C57BL/6J para identificar microglia del sistema nervioso central en ratas de la cepa Wistar. **Materiales y Métodos:** La presente actividad de investigación se llevó a cabo en dos partes. En la primera parte se implementó un protocolo de inmunohistoquímica para identificar la microglia en el sistema nervioso central de 6 ratas de la cepa Wistar. Se utilizó un anticuerpo primario para rata y un anticuerpo secundario específico para el primario. Una vez establecido el protocolo en cerebro de ratas, se pasó a la segunda parte en donde se produjo un reto inmunológico con la aplicación intraperitoneal de lipopolisacárido en 2 ratas de la cepa Wistar, con el fin de evidenciar los cambios en la morfología de la microglia. **Resultados y Discusión:** Demostramos que sin realizar grandes modificaciones al protocolo original, este también puede utilizarse para la identificación de microglia en ratas adultas de la cepa Wistar. El establecimiento de este protocolo permitirá estudiar de una mejor manera la interacción bidireccional que se da entre el cerebro y el sistema inmunológico, en condiciones homeostáticas y ante diferentes estímulos fisiológicos y patológicos.

PALABRAS CLAVE

Inmunohistoquímica; Ratas cepa Wistar; Microglia.

ABSTRACT

Objective: Standardize a protocol of immunohistochemistry that has been widely used in C57BL/6J mice to identify microglia of the central nervous system in Wistar rats. **Materials and Methods:** This research activity was carried out in two parts. In the first part, a protocol of immunohistochemistry was implemented to identify microglia in the central nervous system of 6 Wistar rats. A primary antibody with reactivity to rat and a specific secondary antibody to the primary were used. Once the protocol was established in rats' brains, an immunological challenge was produced with the intraperitoneal application of lipopolysaccharide in 2 Wistar rats, in order to evidence the changes in microglia morphology. **Results and Discussion:** We demonstrate that without making major modifications to the original protocol, it can also be used to identify microglia in adult Wistar rats. In the near future, this immunostaining protocol will be applied to elucidate the bidirectional interaction between the brain and the immune system, under homeostatic conditions and different physiological and pathological stimuli.

KEYWORDS

Immunohistochemistry; Wistar rats; Microglia.

INTRODUCCIÓN

Entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune existe una comunicación bidireccional evidente frente a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos. Uno de los componentes más importantes del sistema neuroinmunológico lo constituye la microglia, que son las células primarias de defensa del SNC. La microglia se deriva de células mieloides primitivas, las cuales, durante la embriogénesis, migran del saco embrionario al SNC y permanecen en el cerebro a lo largo de toda la vida (1, 2, 3). En condiciones homeostáticas o de equilibrio dinámico, la microglia mantiene un estado proliferativo bajo, sin embargo, continuamente actúan como centinelas, "monitoreando" el ambiente a través de una activa extensión y retracción de sus procesos o ramificaciones celulares (4). La microglia responde rápidamente cuando hay algún daño extendiendo sus procesos celulares (5, 6). Estudios recientes han reportado que la microglia tiene una función significativa en el mantenimiento de la sinapsis neuronal (7), participan en la remoción de neuronas que han pasado por un proceso de apoptosis (8) y juega un papel importante en la modificación de la conectividad neuronal (9, 10).

En cuanto a su función inmunológica, la microglia está constantemente resguardando el microambiente que "vigilan", en defensa de patógenos o daños al tejido cerebral o de la médula espinal, por lo tanto, ejercen una función neuroprotectora. Al igual que otras células de origen mielopoyético, la microglia expresa una variedad de receptores para el reconocimiento de patógenos, para neurotransmisores y también para hormonas (11, 12). La activación de la microglia es desencadenada por diferentes estímulos y provoca un cambio en su morfología, haciendo que sus procesos celulares se retraigan y se vean hipertróficas (13).

El lipopolisacárido (LPS) es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y es el antígeno superficial más importante de estos microorganismos. El LPS está compuesto por una región lipídica y una glicosídica con funciones separadas y/o sinérgicas lo que hace de esta molécula uno de los factores de virulencia más complejos (14). El LPS ha sido ampliamente utilizado como una herramienta para activar la microglia y las células del sistema inmune periférico (15). Se ha demostrado consistentemente que la administración periférica de LPS induce la

activación de estas células en todo el cerebro (16). Esta activación se manifiesta en cuestión de horas, observándose un pico máximo desde las 8 hasta las 24 horas, dependiendo de la concentración de la endotoxina aplicada (16). En su estado activado, la microglia adquiere funciones similares a las del macrófago, incluyendo la proliferación celular, funciones fagocíticas y la producción de citoquinas pro inflamatorias, citoquinas anti-inflamatorias (17), quimiocinas y mensajeros secundarios tales como óxido nítrico y prostaglandinas. El LPS es un ligando específico del receptor TLR4 y se ha convertido en una sustancia muy popular para investigar las respuestas de las células gliales a estímulos neuroinflamatorias, simulando el entorno neuronal en diferentes trastornos del sistema nervioso central (18).

Con el objetivo de estudiar las funciones a nivel molecular y morfológico de la microglia durante condiciones homeostáticas y neuroinflamatorias, se han establecido diversos protocolos para identificar las células gliales y macrófagos del cerebro en modelos animales experimentales (19). Una vez detectadas, estas células pueden ser analizadas utilizando diferentes técnicas de laboratorio para hacer una caracterización inmunológica, genética y protéica (19). Por ejemplo, si se quieren evidenciar los cambios morfológicos que se dan por la activación de microglia, se puede recurrir a técnicas de inmunotinción utilizando una molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba-1) (20).

Uno de los modelos animales más populares para el estudio biológico y molecular es sin lugar a duda el modelo en roedores de laboratorio. Gracias a estos modelos experimentales, se ha podido entender la respuesta inmunológica del SNC. En muchas investigaciones relacionadas con el funcionamiento de la microglia se han utilizado los ratones como sujetos experimentales, pero dado que otros experimentos utilizan la rata como sujeto para estudiar el desarrollo y la función del SNC y periférico y su relación con el comportamiento,

la cognición y desórdenes emocionales, tales como la ansiedad y la depresión (21, 22, 23) consideramos de gran relevancia, en esos mismos contextos, estudiar las características y actividad de la microglia, para entender mucho mejor el funcionamiento cooperativo del sistema nervioso y el inmunológico en las ratas.

La estandarización de esta técnica se llevó a cabo en dos partes. En la primera parte se implementó un protocolo de inmunohistoquímica para identificar la microglia del SNC. Esta técnica comúnmente se ha utilizado en ratones de diferentes cepas y el objetivo, como se mencionó anteriormente, fue validarla en ratas albinas, de la cepa Wistar. Una vez establecido el protocolo en cerebro de ratas, se pasó a la segunda parte en donde se produjo un reto inmunológico con la aplicación intraperitoneal aguda de LPS, para evidenciar los cambios morfológicos de la microglia. Para estudiar los mecanismos que interactúan en la respuesta inflamatoria en el SNC, es crucial identificar la microglia, ya que son las principales células efectoras en este sistema de la respuesta neuroinmunológica ante diferentes estímulos, mediante su activación y liberación de moléculas tales como citoquinas, quimiocinas, y factores de crecimiento (17).

METODOLOGÍA

Los procedimientos experimentales se realizaron respetando la reglamentación del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité Institucional Para El Cuido y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica.

Como se mencionara arriba, se intenta estandarizar un protocolo previamente utilizado en ratones de la cepa C57BL/6J (24), para identificar microglia de la corteza e hipocampo de ratas macho de la cepa Wistar de mediana edad (330

días). Se utilizaron en total 8 animales macho provenientes del Bioterio del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBI) de la Universidad de Costa Rica. Fueron trasladados al laboratorio del Centro de Investigación en Neurociencias (CIN) y alojados bajo condiciones control estándar (3 animales por jaula en una caja #5 transparentes, 37.5 x 22 x 18 cm) con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (6:00 am-6:00 pm); temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 1.20^{\circ}\text{C}$; humedad relativa 78-87% y aproximadamente 10 recambios de aire por hora. Los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento durante todo el periodo de alojamiento. Todas las jaulas fueron limpiadas, el material de cama (burucha de madera) reemplazado, y el alimento y comida rellenado dos veces por semana.

Primera Parte: Se utilizaron 6 animales de mediana edad (330 días post-natal) a los cuales se les realizó una perfusión intracardiaca. Brevemente se anestesiaron mediante administración intraperitoneal de Ketamina (75mg/kg) y Xilacina (10mg/kg). Se llegó al tórax, en donde se practicó una punción en el ápex cardiaco con una cánula de 27G y se realizó una incisión en la aurícula derecha del corazón para facilitar el drenaje de la sangre, que luego fue siendo sustituida por suero fisiológico. La perfusión se realizó inicialmente con solución salina (0.9%) a 4°C ; utilizada como solución de lavado. Cuando se observó un blanqueamiento de los órganos, se cambió a solución fijadora de formaldehído al 4% y fosfatos. Se utilizó un volumen de aproximadamente 200ml de cada solución, por animal. Al finalizar el protocolo, luego de pasar el fijador, se extrajo el cerebro y se almacenó en un tubo cónico con 20 mL de solución de infiltración. Posteriormente, los cerebros se transfirieron a una solución de sacarosa al 30 % y se mantuvieron en ese medio y a 4°C durante 72 horas aproximadamente.

Posteriormente y utilizando un criostato, se realizaron entre 5 a 10 cortes coronales de 30um de espesor en dos regiones cerebrales:

el hipocampo y la corteza parietal cerebral. Luego, los cortes se colocaron en porta objetos y se guardaron a 4°C hasta el día del análisis. El día del marcaje, los cortes que estaban en los portaobjetos fueron sacados de refrigeración y utilizando PBS fueron "soltados" e incluidos en un recipiente de 6 pozos con 1X PBS (por sus siglas en inglés Solución Salina Buferizada) (de 3 a 4 cortes por pozo) para hacer el lavado. Se lavaron los cortes con 1x PBS durante 3 minutos. Se realizó un bloqueo inespecifico con 3% leche descremada 3% /0.3% triton en 100 mls de 1X PBS y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Luego se procedió a remover la solución de bloqueo aspirando con una pipeta. Se incubaron los cortes de tejido cerebral por 24 hrs a 4°C con el anticuerpo primario Anti-Iba1 de la casa comercial abcam (cabra), 1:1000 con 1x PBS para la detección de las células de la microglia. Se utilizó como marcador la proteína Iba1, que se expresa de forma específica en macrófagos y en células de la microglia, y que es regulada positivamente ante la activación de dichas células (25). Se lavó 3 veces con 1x PBS. Cada lavado tuvo una duración de 5 minutos. Para Iba-1: se usó Donkey anti goat (green, 488), 1:500 con 1%BSA/PBS (de la casa commercial Life Technologies). Se colocó DAPI en una proporción de 1:500 para marcar los núcleos de las células. El proceso de incubación fue de 24 horas a 4°C . Se lavó 3 veces con 1XPBS. Cada lavado duró 5 minutos. Los cortes fueron colocados en portaobjetos, en donde se dejaron secar por un periodo de 1 a 2 horas. Posteriormente los cortes fueron protegidos con una lámina cubre objetos con fluoromount-G (de la casa commercial Southern Biotech). Una vez así los cortes estuvieron listos para ser analizados al microscopio de fluorescencia, (Nikon Intensilight C-HGFI) con el cual se tomaron diferentes fotos de los cortes de las dos regiones cerebrales escogidas a aumentos de 10x, 20x y 40x.

Cabe recalcar que dado que se estaba tratando de realizar una estandarización de la

técnica, no se escogieron imágenes de regiones particulares del hipocampo o de la corteza parietal en cada uno de los cortes analizados, sino que se escogieron, a manera de ejemplo, aquellas imágenes de los cortes en las que se vieran claramente las células marcadas.

Segunda Parte: se utilizaron las dos ratas restantes (aproximadamente de 330 días de edad) que se mantuvieron en las mismas condiciones que los animales de la primera parte. Se les administró intraperitonealmente LPS a diferentes dosis: a una rata se le administró una dosis de 0.5mg/kg y a la otra una dosis de 1mg/kg (en un volumen de 2.4 microgramos de LPS por microlitro de agua destilada). El propósito de utilizar estas dosis fue intentar establecer una dosis ideal para estimular la activación de microglia, basada en la literatura (16). Luego de 16 horas, los animales fueron eutanasiados y perfundidos como se describió en la Primera Parte. Posteriormente el protocolo eso de inmunomarcaje y la toma de fotografías de las imágenes también fue el mismo descrito para la primera parte.

Las imágenes en la primera y en la segunda parte fueron analizadas utilizando un programa de libre acceso para el procesamiento de imágenes (Image J), utilizando un protocolo de la Universidad de Chicago del Centro Integrado de Microscopia, creado por Christine Labno. Específicamente, para cuantificar los cambios fenotípicos en la microglia, se llevó a cabo un análisis digital de las imágenes en las que se observaban mejor las células marcadas con el anticuerpo Iba-1 (de ahora en adelante imágenes representativas) (26). Se estableció un límite para el marcaje positivo para cada imagen y se realizó un escaneo densitométrico de estos límites establecidos, utilizando el programa ImageJ del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos. El área proporcional se reportó como el área porcentaje de área en el límite positivo para cada imagen representativa, incluyendo el cuerpo celular y los procesos celulares, pero

excluyendo la tinción de fondo (27). Es decir, el área ocupada por inmunoreactividad Iba-1 se determinó midiendo el número de píxeles por encima de un valor umbral establecido y expresado como un porcentaje del total de píxeles en el campo del microscopio (28). En cada imagen representativa se reportó el área proporcional según el análisis hecho por Image J para esa imagen en específico. El área proporcional reportada para cada imagen coincidió con los rangos reportados en la literatura (24, 27, 29, 30). A la hora de valorar los resultados obtenidos es importante reiterar que en este experimento se intentó estandarizar un protocolo normalmente utilizado en ratones, para ratas de la cepa Wistar. Es un estudio de carácter puramente descriptivo y no se realizaron análisis estadísticos para comparar los diferentes cortes analizados.

RESULTADOS

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN DE IBA 1 EN CEREBRO DE RATA

Las secciones de hipocampo y corteza cerebral se prepararon de acuerdo al protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. En el parénquima del hipocampo (Figura 1) y corteza cerebral (Figura 2) se encontraron células que reaccionaron positivamente al anticuerpo Iba-1 (específico para microglia). En la Figura 1C con flecha amarilla, se observa una de estas células con un citoplasma escaso y con prolongaciones delgadas. Esta morfología es distintiva y es consistente con descripciones clásicas de microglia ramificada. El área porcentual que ocupa la microglia en la Figura 1A es de 1.74 % y en la Figura 2A es de 0.71%. En la Figura 2C se muestra con una flecha roja un ejemplo de células que también se encontraron con morfología similar a los macrófagos, con un núcleo redondo, citoplasma abundante y procesos cortos y delgados, también consistente con la morfología de la microglia. La distribución de la microglia fue generalizada en ambos tejidos,

es decir estaba distribuida por todo el corte de tejido cerebral. Además de la microglia ramificada, las células perivasculares también se marcaron positivamente para Iba1 como se observa en la Figura 3C con una flecha roja en un corte representativo de la corteza izquierda.

Estas células, tienen un cuerpo alargado y se adhieren cerca de los vasos sanguíneos. Basados en su morfología y localización y por la descripción que se da en estudios clásicos (31), parece ser microglia perivascular. El área porcentual que ocupa la microglia en esta imagen es de 2.11%.



Figura 1. Hipocampo Derecho. Microscopía de fluorescencia que muestra el inmunomarcaje de microglia en el parénquima de un corte coronal de cerebro de rata de mediana edad de 30 μm de grosor, tomado a una magnificación de 20X. En A se observa el antígeno Iba1 (verde) de la microglia detectado con el anticuerpo primario anti-Iba1 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. La flecha amarilla muestra microglia ramificada y en el recuadro se muestra la imagen ampliada de la misma.



Figura 2. Corteza Derecha. Microscopía de fluorescencia que muestra el inmunomarcaje de microglia en el parénquima de un corte coronal de cerebro de rata de mediana edad de 30 μm de grosor, tomado a una magnificación de 20X. En A se observa el antígeno Iba1 (verde) de la microglia detectado con el anticuerpo primario anti-Iba1 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. La flecha roja muestra microglia con una morfología parecida a los macrófagos cerebrales y en el recuadro se muestra la imagen ampliada de esta célula.



Figura 3. Corteza Izquierda. Microscopía de fluorescencia que muestra el inmunomarcaje de microglia en el parénquima de un corte coronal de cerebro de rata de mediana edad de 30 μm de grosor, tomado a una magnificación de 20X. En A se observa el antígeno Iba1 (verde) de la microglia detectado con el anticuerpo primario anti-Iba1 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. La flecha roja muestra microglia perivascular y en el recuadro la imagen ampliada de esta célula.

EXPRESIÓN DE IBA1 EN MICROGLIA ACTIVADA EN RESPUESTA A LPS

Luego de la administración intraperitoneal de LPS se observaron cambios prominentes en la morfología de la microglia en el hipocampo (Figura 4) y la corteza cerebral (Figura 5). El cambio de morfología consistió en retracción de los procesos o ramificaciones y la conversión a un fenotipo ameboide. El área porcentual de la microglia en la imagen representativa del hipocampo control (Figura 4A) es de 1.69%, en la imagen representativa del hipocampo de la rata inyectada con 0.5mg/kg de LPS (Figura 4D), el área porcentual ocupada por la microglia

es de 4.44% y en la imagen representativa de hipocampo de la rata inyectada con 1.0 mg/kg de LPS (Figura 4G), el área porcentual ocupada por la microglia es de 11.12%. Se observa un cambio de morfología más evidente con la dosis de 1mg/kg (Figura 4G, 4I, 5G y 5I), sin embargo ya se observa activación de microglia con la dosis de 0.5mg/kg (Figura 4D, 4F, 5D y 5I). Finalmente, el área porcentual ocupada por la microglia en la imagen representativa de corteza cerebral control (Figura 5A) es de 2.28%, en la imagen representativa de corteza cerebral de la rata inyectada con 0.5mg/kg de LPS (Figura 5D) es de 5.92% y de 16.77% para la imagen representativa de corteza cerebral de la rata inyectada con 1.0 mg/kg de LPS (Figura 5G).

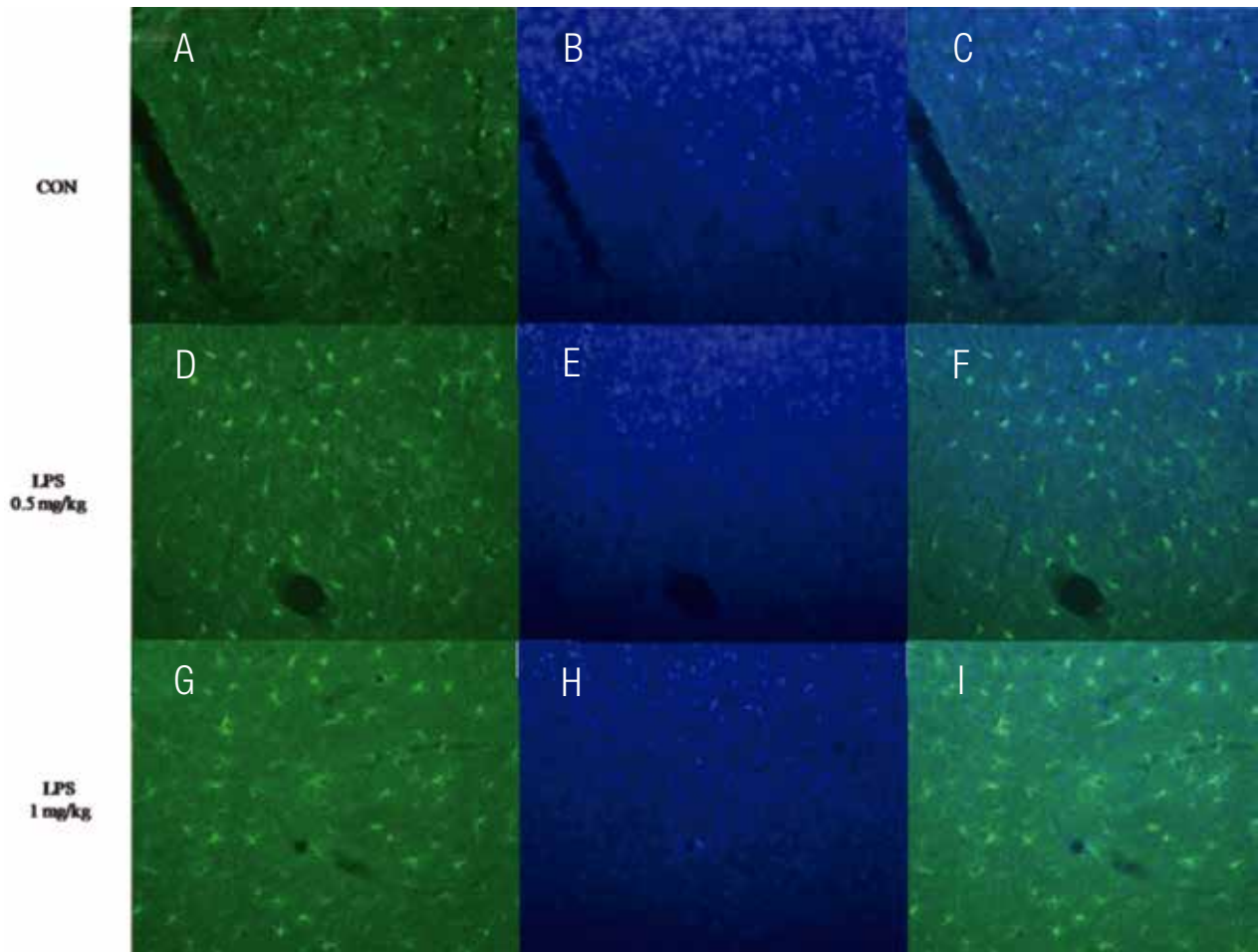


Figura 4. Hipocampo Izquierdo. Microscopía de fluorescencia que muestra el inmunomarcado de microglia en el parénquima de un corte coronal de cerebro de rata de mediana edad de 30 μ m de grosor, tomado a una magnificación de 20X. En A, D y G, se observa el antígeno Iba1 (verde) de la microglia detectado con el anticuerpo primario anti-Iba1 unido a un anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 488 acoplado. En B, E y H se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En C, F e I Traslape de las imágenes. CON=Control; LPS= lipopolisacárido.

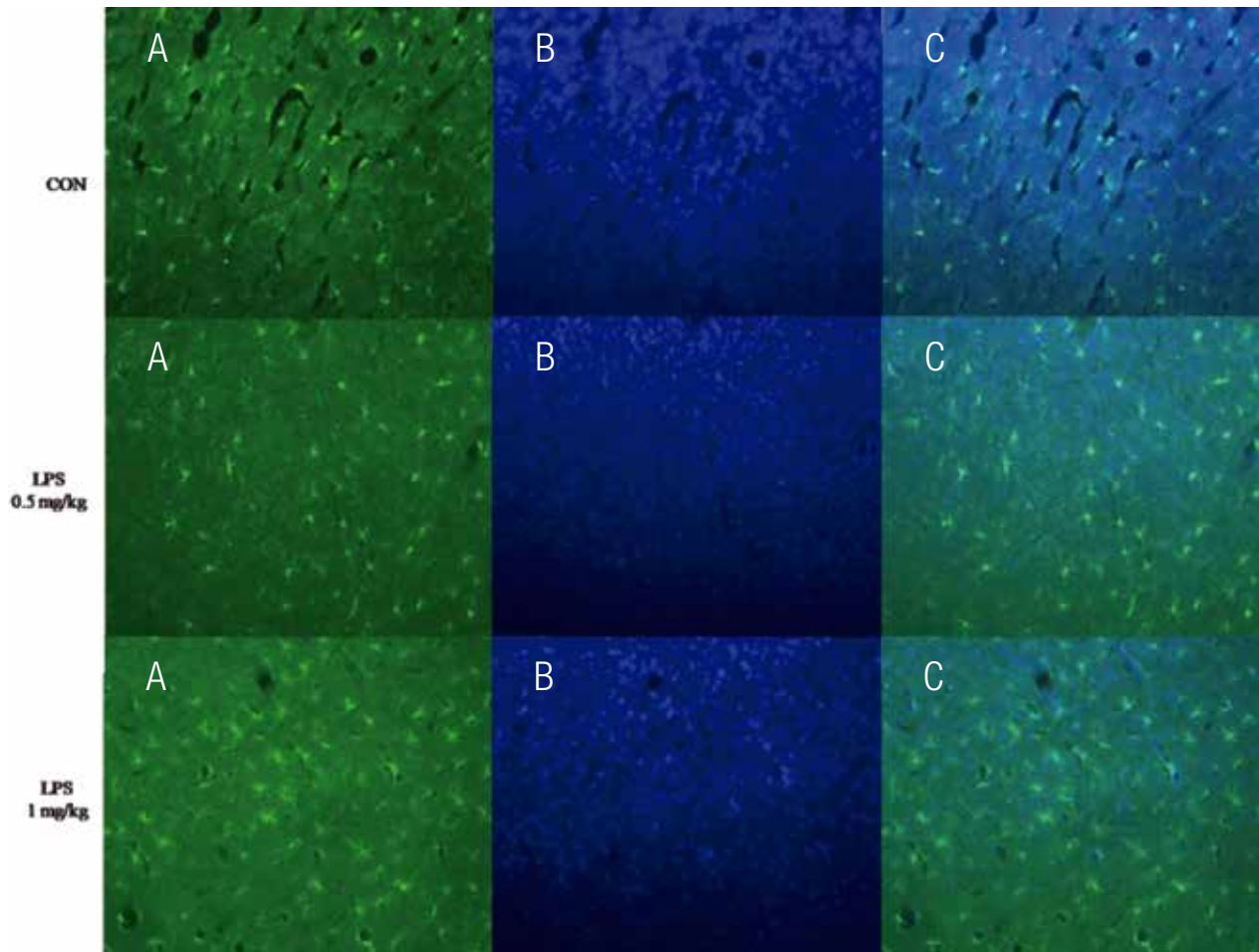


Figura 5. Corteza Izquierda. Microscopía de fluorescencia que muestra el inmunomarcaje de microglia en el parénquima de un corte coronal de cerebro de rata de mediana edad de 30 μm de grosor, tomado a una magnificación de 20X. En A, D y G, se observa el antígeno Iba1 (verde) de la microglia detectado con el anticuerpo primario anti-Iba1 unido a un anticuerpo secundario con el marcador Alexa Fluor 488 acoplado. En B, E y H se observan los núcleos de las células que fueron marcados con DAPI (azul). En C, F e I Traslape de las imágenes. CON=Control; LPS= lipopolisacárido.

DISCUSIÓN

La microglia son las células principales de defensa del cerebro y juegan un papel crítico en la mediación de las respuestas inmunes celulares del SNC. Consecuentemente, una parte fundamental de cualquier intento por entender cómo funciona el cerebro como un todo, es la investigación de estas células y de su relación con las otras células nerviosas. Con este propósito, los marcadores inmunohistoquímicos han emergido como una de las herramientas más valiosas de los neurocientíficos. Utilizando anticuerpos contra diferentes componentes celulares, se pueden identificar células que expresan un fenotipo y, más aún, se puede obtener información acerca de sus características morfológicas y expresión de proteínas específicas. Por ejemplo, el inmunomarcaje permite demostrar antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos. Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos y esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración (32). La técnica de inmunohistoquímica evidencia una molécula o familia de moléculas presentes en una sección histológica y muestra su distribución tisular "in situ" (32). Así mismo, la conjugación o combinación de los anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades de moléculas presentes en los tejidos (33,32).

En estudio se estandarizó un protocolo para el reconocimiento de las células de la microglia utilizando inmunohistoquímica. Este protocolo normalmente se ha utilizado en ratones para los mismos fines y no le hicimos modificaciones sustanciales para poder detectar estas células en otros roedores. Estos resultados entonces amplían el rango de acción de un mismo protocolo e incluso podrían permitir proyectar resultados a especies diferentes. Por supuesto para poder

asegararlo debería validarse este protocolo en diferentes condiciones, en diferentes regiones cerebrales, entre otras. Actualmente, la técnica de inmunohistoquímica es una de las más utilizadas para identificar las células de microglia. Para ello, existen anticuerpos contra proteínas específicas de estas células. La molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1) es una proteína específica de células de microglia y macrófagos cerebrales, que no se expresa ni en neuronas, ni tampoco en astrocitos (31) y es muy utilizada como marcador de microglia (34). Es una proteína pequeña de 17 kDa formada por 147 aminoácidos, que marca el cuerpo celular y las dendritas de las células.

El gen Iba1 se encuentra dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase III (35). Los CMH también son utilizados para detectar microglia. Hay tres tipos de CMH: de clase I, II y III y específicamente el de clase II es un marcador de células activas presentadoras de antígenos, involucradas en la respuesta inmune. La microglia se comporta como una célula presentadora de antígeno en el cerebro, por lo que la utilización de CMH también es útil para estudiar la actividad de estas células (36). La desventaja de utilizar el marcador CMH es que éste se expresa únicamente en una subpoblación de estas células (37,38). A pesar de esto, el marcador más utilizado para detectar la microglia activada en cortes post-mortem de cerebro humano, particularmente en cerebros con alguna patología asociada, es el antígeno leucocitario humano HLA-DR (un tipo de receptor del CMH clase II). La microglia que da positivo al HLA-DR adquieren una variedad de morfologías cuando son activadas por diferentes estímulos, no solo patológicos, sino también por los diferentes estados de diferenciación y por la localización que tienen en el cerebro (13). El marcador Iba1 junto con CD68 se utilizan ampliamente para identificar la microglia en cerebros de humanos post-mortem, sin embargo, con estos dos marcadores no se pueden evidenciar los cambios específicos en el fenotipo (13).

Otras proteínas que se han utilizado para el marcaje de microglia son proteínas específicas de macrófagos: ED-1, ED-2 y ED-3 (39). Sin embargo, la desventaja de utilizar estas proteínas es que estudios previos han documentado que la señal de ED-1 coincide con la de Iba1, pero no reacciona contra la microglia ramificada (37). También se han utilizado las proteínas OX41, OX42 (40, 41, 37), OX3, OX6, OX18, ED1, Mac-1, F4/80 y 5D4, todas estas se expresan en microglia, monocitos y macrófagos (42).

Cuando hay señales de activación, como con LPS, la microglia cambia su morfología de "ramificadas" a "desramificadas", se encojen sus prolongaciones, y el soma o cuerpo celular se hipertrofia (13). Estos cambios morfológicos son evidentes con la técnica de inmunohistoquímica, y la manera más evidente de detectar este cambio de morfología es utilizando Iba1 (43). Además, cuando la microglia se activa se transforma a un fenotipo ameboide, adquiriendo así funciones similares a los macrófagos (44,45). Se ha descrito que diferentes estímulos y/o señales inhibitorias regulan la activación de la microglia y si no hay una estimulación crónica, la microglia vuelve a su fenotipo de "monitoreo", el cuerpo celular se vuelve de nuevo ovalado y los procesos se tornan largos y ramificados (46).

El LPS es una endotoxina bacteriana que activa la microglia y puede llegar a causar neurodegeneración (47). Una sola inyección sistémica de LPS puede inducir la activación crónica de la microglia y dependiendo de la dosis, esta activación puede acompañarse por pérdida de neuronas (48). Inclusive se ha reportado que el LPS aumenta la activación de la microglia y concomitantemente acelera la progresión de enfermedades neurodegenerativas (49). Entre las enfermedades neurodegenerativas que se han implicado con microglia activada están: la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de

Parkinson (50,51). De hecho, ya hay estudios clínicos piloto que han estudiado el impacto que tiene la inhibición de la microglia (por ejemplo, con Minociclina) en la progresión de enfermedades neurodegenerativas (52,51,54,55). De tal forma el LPS, como estimulante del sistema inmunológico, resulta útil y válido para estudiar los mecanismos relacionados con la activación de la microglia.

CONCLUSIONES

El protocolo que se usó en este trabajo normalmente se ha implementado para estudiar la microglia en ratones y específicamente de la cepa C57BL/6J. Lo único que se modificó del protocolo original fue el tipo de anticuerpo primario con reactividad específica a la rata y por lo tanto también el anticuerpo secundario contra la especie del anticuerpo primario, en este caso cabra. Logramos demostrar que sin realizar grandes modificaciones al protocolo original (24), este puede también utilizarse para la determinación de la microglia en ratas adultas macho de la cepa Wistar.

El protocolo permite analizar la densidad microglial y la morfología de esa microglia. Se podrían hacer entonces estudios comparativos entre los tipos de microglia ramificada y ameboide en diferentes regiones cerebrales y la relación de estos parámetros con por ejemplo patologías, cambios en el ambiente de los individuos e incluso en sus interacciones sociales. El estudio simultáneo de cambios en la microglia y en otras células nerviosas, como neuronas y astrocitos, de seguro permitirá establecer hipótesis sobre la interacción entre células diversas en el sistema nervioso central, y su importancia funcional tanto en salud como en enfermedad. Eventualmente conocer mejor las interacciones y los cambios celulares que se dan podría ayudarnos a encontrar y desarrollar terapéuticas para la prevención o el tratamiento de enfermedades del SNC.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Ing. Adriana Saborío y la Lic. Andrea Mora por la ayuda técnica en el desarrollo de esta actividad de investigación. También agradecemos el préstamo del microscopio por parte del Laboratorio de Investigación y Capacitación en Ciencias de la Facultad de Odontología, Universidad de Costa Rica. El LPS fue donado por el Dr. Edgardo Moreno del Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

CONFLICTO DE INTERÉS

Nada por aclarar.

REFERENCIAS

- Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330 (6005): 841-5.
- Ransohoff R. M., Cardona A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 2010; 468 (7321) : 253-62.
- Kierdorf K., Erny D., Goldmann T. et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 2013;16 (3): 273-80.
- Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)* 2005; 308 (5726): 1314-8.
- Grossmann R., Stence N., Carr J. et al. Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia* 2002; 37 (3): 229-240.
- McGavern D. B., Kang S. S. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature Reviews. Immunology* 2011;11 (5): 318-29.
- Wake H., Moorhouse A. J., Jinno S. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 2009; 29 (13): 3974-80.
- Sierra A., Encinas J. M., Deudero J. J. et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell* 2010; 7 (4): 483-95.
- Tremblay M., Lowery R. L., Majewska A. K. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biology* 2010; 8 (11).
- Delpech J. C., Madore C., Nadjar A. et al. Microglia in neuronal plasticity: Influence of stress. *Neuropharmacology* 2015; 96:19-28.
- Pocock J. M., Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 2007; 30 (10): 527-35.
- Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nature reviews. Immunology* 2009; 9 (6): 429-39.
- Walker D. G., Lue L. F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther* 2015 Aug 19;7 (1): 56-015-0139-9.
- Carson C. F., Hammer K. A., Riley T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006 Jan; 19 (1): 50-62.
- Chen Z., Jalabi W., Shpargel K. B., et al. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci.* 2012 Aug 22; 32 (34): 11706-15.
- Buttini M., Limonta S., Boddeke H. W. Peripheral administration of lipopolysaccharide

- induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem Int.* 1996 Jul; 29 (1): 25-35.
17. Ransohoff R. M., Perry V. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 119-45.
 18. Tarassishin L., Suh H. S., Lee S. C. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. *Glia* 2014 Jun; 62 (6): 999-1013.
 19. Cardona A. E., Huang D., Sasse M. E. et al. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nature Protocols* 2006; 1 (4): 1947-51.
 20. Imai Y., Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia* 2002 Nov; 40 (2): 164-174.
 21. Brenes J. C., Fornaguera J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav Brain Res.* 2009 Mar 2; 198 (1): 199-205.
 22. Sequeira-Cordero A., Mora-Gallegos A., Cuenca-Berger P. et al. Individual differences in the forced swimming test and neurochemical kinetics in the rat brain. *Physiol Behav.* 2014 Apr 10; 128: 60-9.
 23. Mora-Gallegos A., Rojas-Carvajal M., Salas S. et al. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem.* 2015 Feb; 118: 96-104.
 24. Wohleb E. S., Hanke M. L., Corona A. W. et al. β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci* 2011 Apr 27; 31 (17): 6277-88.
 25. Cerón J., Troncoso J. Alteraciones de las células de la microglia del sistema nervioso central provocadas por lesiones del nervio facial. *Biomédica* 2016; 36:619-31.
 26. Donnelly D. J., Gensel J. C., Ankeny D. P. et al. An efficient and reproducible method for quantifying macrophages in different experimental models of central nervous system pathology. *J Neurosci Methods* 2009 181:36-44.
 27. Norden D. M., Trojanowski P. J., Villanueva E., Navarro E., Godbout J. P. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia.* 2016 Feb; 64 (2): 300-16.
 28. Trapp B. D., Wujek J. R., Criste G. A. et al. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia.* 2007 Mar ; 55 (4): 360-8.
 29. Wohleb E. S., Fenn A. M., Pacenta A. M. et al. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2012 Sep; 37 (9): 1491-505.
 30. Corona A. W., Norden D. M., Skendelas J. P. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition attenuates lipopolysaccharide induced persistent microglial activation and depressive-like complications in fractalkine receptor (CX(3)CR1)-deficient mice. *Brain Behav Immun.* 2013 Jul; 31:134-42.
 31. Ito D., Imai Y., Ohsawa K., Nakajima K. et al. Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 1998 Jun 1; 57 (1):1-9.
 32. Saborío-Arce A. Tesis de Licenciatura en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica: Establecimiento de protocolos de inmunotinción para los antígenos GFAP, NeuN y BrdU en cerebro de rata. <https://es.scribd.com/document/318291917/Tesis-Lic-Biotecnologia-Saborio-Arce-2016>
 33. Boenisch T. Heat-induced antigen retrieval: what are we retrieving? *J Histochem Cytochem* 2006; 54:961-964.

34. Naskar R., Wissing M., Thanos S. Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002 Sep; 43(9): 2962-2968.
35. Imai Y., Ibata I., Ito D. et al. A novel gene *Iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Jul 25; 224 (3): 855-862.
36. Thomas W. E. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* 1992 Jan-Apr; 17 (1): 61-74.
37. Zhang G. X., Li J., Ventura E. et al. Parenchymal microglia of naive adult C57BL/6J mice express high levels of B7.1, B7.2, and MHC class II. *Exp Mol Pathol* 2002 Aug; 73(1): 35-45.
38. Gallego B. I., Salazar J. J., de Hoz R. et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation* 2012 May 14; 9: 92-2094-9-92.
39. Dijkstra C. D., Dopp E. A., Joling P. et al. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 1985 Mar; 54 (3): 589-599.
40. Robinson A. P., White T. M., Mason D. W. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 1986 Feb; 57 (2): 239-247.
41. Castellano B., Gonzalez B., Jensen M. B. et al. A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. *J Histochem Cytochem* 1991 May; 39 (5): 561-568.
42. Chen L., Yang P., Kijlstra A. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 2002 Mar; 10 (1): 27-39.
43. Imai Y., Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: Role of *Iba1*. *Glia* 2002; 40 (2): 164-174.
44. Davis E. J., Foster T. D., Thomas W. E. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 1994; 34:73-78.
45. Streit W. J. Microglial response to brain injury: a brief synopsis. *Toxicol Pathol* 2000; 28: 28-30.
46. Ayoub A. E., Salm A. K. Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. *J Neurosci* 2003; 27; 23 (21): 7759-7766.
47. Dutta G., Zhang P., Liu B. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22, 453-464.
48. Qin L., Wu X., Block M. L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 2007; 55, 453-462.
49. Cunningham C., Champion S., Lunnon K. et al. Systemic inflammation induces acute

- behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry* 2009; 65, 304-312.
50. Maccioni R. B., Rojo L. E., Fernandez J. A. et al. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1153, 240-246.
51. Masocha W. Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain. *Journal of Neuroimmunology* 2009; 214: 78-82.
52. McGeer P. L., Itagaki S., Boyes B. E. et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1988; 38, 1285-1291.
53. Gordon P.H., Moore D.H., Miller R. G. et al. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomized trial. *Lancet Neurol* 2007; 6, 1045-1053.
54. NINDS-NET-PD-Investigators. A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clin. Neuropharmacol* 2008; 31, 141-150.
55. Zhang Y., Metz L. M., Yong V. W. et al. Pilot study of minocycline in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 2008; 35, 185-191.



Attribution (BY-NC) - (BY) You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggest the licensor endorses you or your use. (NC) You may not use the material for commercial purposes.