



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco



División De Ciencias Biológicas Y De La Salud

Química Farmacéutica Biológica

Proyecto de Servicio Social

Título de proyecto: Validación del modelo 6-OHDA para inducir la Enfermedad de Parkinson en ratas Wistar macho

Proyecto genérico: Fármacos como coadyuvantes en el efecto anti-alodínico y modulador de la actividad glial en la enfermedad de Parkinson

Alumna: Karen Pamela Pérez Ruíz (2192034747)

Asesor interno: Dra. Beatriz Godínez Chaparro

Asesor externo: Dra. Estefanía González Morales

Laboratorio: Farmacodinamia de Inflamación y Dolor

Edificio N, Lab 004, UAM-Xochimilco

Introducción

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo complejo y de presentación heterogénea (Martínez-Fernández et al., 2016) descrito por primera vez por James Parkinson en 1817. Se caracteriza por afectaciones al sistema motor (Figura 1) como movimiento involuntario, rigidez muscular, bradicinesia, problemas de escritura, incoordinación y falta de equilibrio (Blair, 2004), asociado a su principal cambio histológico; una pérdida progresiva de ~80 % neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) (Mendes-Pinheiro et al., 2021; Parra et al., 2020) y la posterior pérdida de transmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado (Parra et al., 2020).

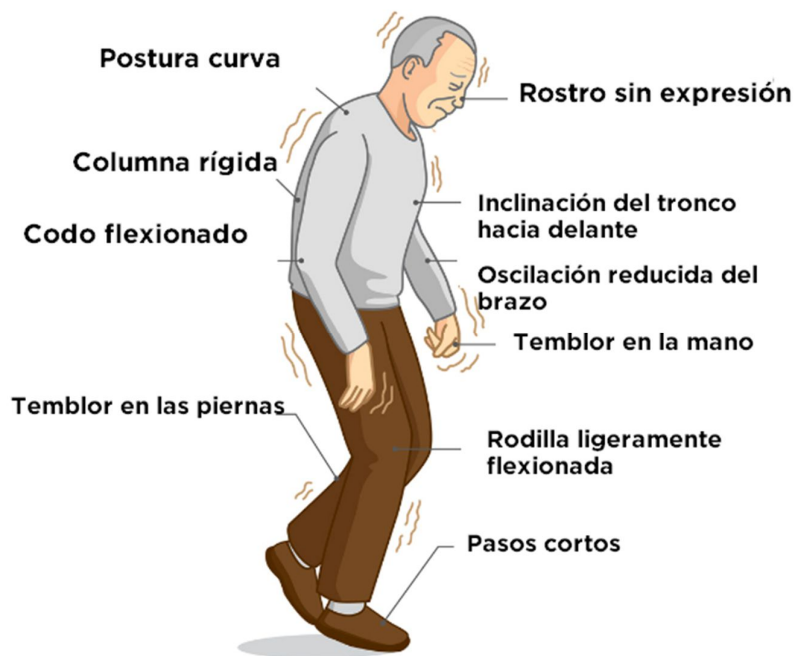


Figura 1. Síntomas provocados por las afectaciones al sistema motor en la Enfermedad de Parkinson (Traducido de Kiran, 2022).

En México, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) estima una prevalencia de 50 casos nuevos por cada 100 mil habitantes al año (Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores, 2019). Esta enfermedad deteriora la calidad de vida de los pacientes debido a los múltiples problemas que puede desencadenar, entre ellos el dolor de tipo neuropático (Truini et al., 2012), el cual es un síntoma específico de la EP y puede ser muy intenso y difícil de tratar en estos pacientes.

Los modelos animales son clave de la investigación preclínica en el descubrimiento de fármacos. Los modelos animales para inducir Parkinson incluyen modelos químicos, donde se

emplean sustancias químicas tóxicas selectivas que destruyen las neuronas dopaminérgicas y los modelos genéticos (Gamber, 2016), mediante la sobreexpresión transgénica de genes mutantes para genes autosómicos dominantes como la quinasa 2 repetida rica en α -sinucleína y leucina (LRRK2) y modelos knockout o knockdown para genes autosómicos recesivos, como Parkin; DJ-1; fosfatasa y un homólogo de tensina (PTEN) inducida por la nueva quinasa 1 (PINK1) (Dawson et al., 2010)

Los modelos químicos más comunes para mimetizar la EP en animales son: la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Burns et al., 1984 y Langston et al., 1984), que es convertida a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) por la monoaminoxidasa B (MAOB) (Przedborski & Vila, 2003); la rotenona (Heikkila et al., 1985); la 6-hidroxdopamina (6-OHDA) (Ungerstedt, 1968) cuyo mecanismo se explica más adelante, entre otros. Dichos modelos permiten caracterizar mecanismos de acción que subyacen la enfermedad, así como proponer nuevas alternativas terapéuticas que coadyuven en mitigar los síntomas motores y no motores de la enfermedad; sin embargo, estos modelos presentan limitaciones debido a la falta de una construcción fuerte y/o validez aparente, así como limitaciones de especies y cepas animales (Gamber, 2016).

Por lo anterior, es importante validar un modelo experimental para asegurar la eficacia y la reproducibilidad de la enfermedad para, posteriormente, realizar evaluaciones y proponer mecanismos de acción o nuevos agentes terapéuticos. De la misma manera, en este trabajo se plantea demostrar la validez del modelo experimental 6-OHDA para reproducir la enfermedad de Parkinson en ratas, a partir de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y el estriado.

Marco teórico

Dopamina

La dopamina, cuyo nombre químico es 3,4-dihidroxifeniletilamina (Figura 2) es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, conductas motivadas y la afectividad, así como en la comunicación neuroendócrina (Bahena-Trujillo et al., 2000).

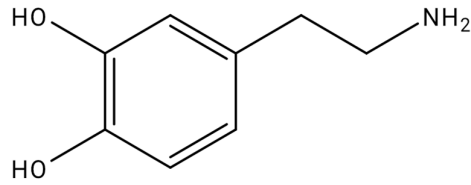


Figura 2. Estructura química de la dopamina. Elaborado con ChemDraw Professional

La síntesis de dopamina ocurre en las terminales nerviosas dopaminérgicas a partir del aminoácido L-fenilalanina, que se convierte a L-tirosina, posteriormente se obtiene L-DOPA y finalmente dopamina. Las enzimas responsables de este proceso son la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa, las cuales se encuentran en altas concentraciones en este tipo de neuronas (Figura 3). Los trabajos de Nagatsu et al. (1984) y de Levitt et al. (1965) demostraron que la hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC y que la TH es la enzima limitante de la velocidad de síntesis de la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina (Bahena-Trujillo et al., 2000).

La TH es un péptido de 498 aminoácidos (56 kDa) presente de manera predominante en la fracción citosólica de las terminales catecolaminérgicas (Weiner & Molinoff, 1989). La enzima es una oxidasa que utiliza L-tirosina y oxígeno como sustratos y tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido para formar L-DOPA (Bahena-Trujillo et al., 2000).

Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de 5 tipos de receptores dopaminérgicos, todos ellos acoplados a proteínas G y divididos en dos familias farmacológicas denominadas D₁ y D₂. Los receptores de la familia D₁ (subtipos D₁ y D₅) están acoplados a proteínas G_s y estimulan la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) como principal mecanismo de transducción de señales. Los subtipos pertenecientes a la familia D₂ (D₂, D₃ y D₄) inhiben la formación de AMPC, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a través de canales dependientes del voltaje, efectos mediados también por proteínas G (Gai y Gao) (Bahena-Trujillo et al., 2000).

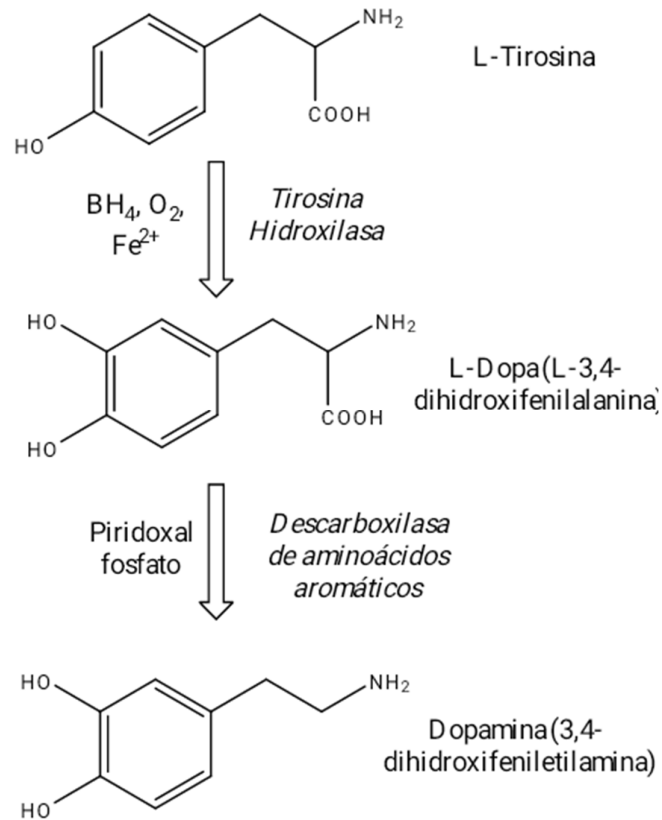


Figura 3. Mecanismo de biosíntesis de la dopamina. Modificado de Bahena-Trujillo et al., 2000 con ChemDraw Professional

Mecanismo de la 6-OHDA para inducir la Enfermedad de Parkinson

Para evaluar el proceso neurodegenerativo se han empleado modelos animales que reproducen los principales procesos celulares de la EP, tales como el estrés oxidativo; la neurodegeneración; la neuroinflamación; y la muerte celular. La 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) es uno de los neurotóxicos más empleados para inducir la Enfermedad de Parkinson en animales de laboratorio (Hernández-Baltazar et al., 2017).

Desde su primera descripción en 1959, la neurotoxina 6-OHDA ha jugado un papel fundamental en la investigación preclínica de la enfermedad de Parkinson. La 6-OHDA es un análogo estructural de las catecolaminas, como la dopamina y la noradrenalina, altamente oxidable que ejerce sus efectos tóxicos sobre las neuronas catecolaminérgicas. El primer modelo que explota la neurotoxicidad de la 6-OHDA fue desarrollado en 1968 por Ungerstedt, quien inyectó la toxina bilateralmente en la sustancia nigra de la rata, obteniendo un modelo animal de acinesia con una tasa de mortalidad muy alta. Posteriormente, se inyectó 6-OHDA

unilateralmente para obtener el "modelo de 6-OHDA Ungerstedt" de rotación (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970). Desde entonces, y dado que la 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), esta toxina se ha convertido en la más utilizada para inducir la neurodegeneración del sistema nigroestriatal, para modelar la EP en animales de experimentación. En el mismo sentido, el conocimiento de los mecanismos involucrados en la neurodegeneración y la muerte celular en este modelo es relevante para definir posibles blancos terapéuticos para la EP (Hernández-Baltazar et al., 2017).

La 6-OHDA es capturada a través del transportador de dopamina. Los efectos neurotóxicos de la 6-OHDA ocurren a través de la acumulación de la toxina en las neuronas catecolaminérgicas, seguido de la alteración de la homeostasis celular y el daño neuronal (Simola et al., 2007). Se han propuesto 3 mecanismos para explicar el efecto citotóxico de la 6-OHDA, los cuales son:

1) Auto-oxidación intra o extracelular de la 6-OHDA.

El almacenamiento intracelular de 6-OHDA está mediado por los transportadores de membrana de dopamina o noradrenalina (DAT y NAT respectivamente), que reconocen y captan 6-OHDA debido a su similitud estructural con las catecolaminas endógenas. La auto-oxidación genera H_2O_2 citotóxico, especies reactivas de oxígeno (ERO) y catecolaminas quinonas que atacan a los grupos nucleofílicos endocelulares (Simola et al., 2007).

2) Formación de peróxido de hidrógeno por efecto de la monoaminoxidasa (MAO-A).

Evento endocelular que subyace al daño neuronal inducido por 6-OHDA, varios cuerpos de evidencia sugieren un papel importante para el estrés oxidativo (EO). Cuando se infunde en el cerebro, la 6-OHDA produce especies citotóxicas a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que son amplificados por oligoelementos endocelulares como el manganeso y el hierro. Por lo tanto, la oxidación de 6-OHDA por la MAO-A genera H_2O_2 , que desencadena la producción de ERO (Simola et al., 2007).

3) Inhibición directa del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Hernández-Baltazar et al., 2017).

Estos mecanismos pueden actuar de manera independiente o de forma combinada para generar ERO. El EO generado puede ser amplificado por el aumento de calcio libre en el citoplasma (producto de la excitotoxicidad de glutamato), o bien por la pérdida de permeabilidad de membrana mitocondrial, generando un rápido agotamiento de las enzimas antioxidantes endocelulares, lo que a su vez conduce a una neurotoxicidad amplificada que causa anomalías en la estructura y el metabolismo celular y, finalmente, da como resultado daño neuronal (Figura 4) (Blum et al., 2001).

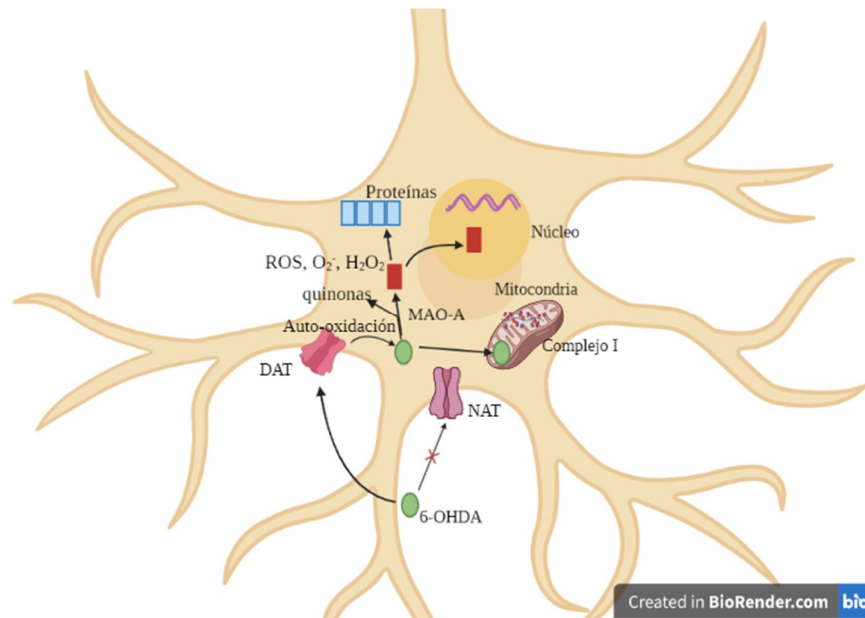


Figura 4. Mecanismos de neurotoxicidad inducida por 6-OHDA. Después de ser absorbida del espacio extracelular, la 6-OHDA se almacena en las neuronas catecolaminérgicas, donde esta sufre degradación enzimática por la MAO-A y autooxidación, generando varias especies citotóxicas que, al dañar las proteínas endocelulares y el núcleo, producen daño neuronal. Además, podría inducir neurotoxicidad al afectar la actividad del complejo mitocondrial I. Modificado de Simola et al., 2007 en BioRender.com

Inmunohistoquímica

La cantidad o expresión de TH se puede medir en tejido biológico a través de técnicas de biología molecular como la inmunohistoquímica (IHC), en la cual se detecta la presencia de la TH a través de anticuerpos que se unen específicamente a la enzima. La unión anticuerpo-antígeno (Figura 5) se puede visualizar usando diferentes cromógenos, por ejemplo: la peroxidasa de rábano picante (HRP) o la fosfatasa alcalina (AP), que se usan comúnmente para catalizar una reacción productora de color (Bosterbio, 2021), o empleando fluorescencia mediante la técnica de inmunofluorescencia.

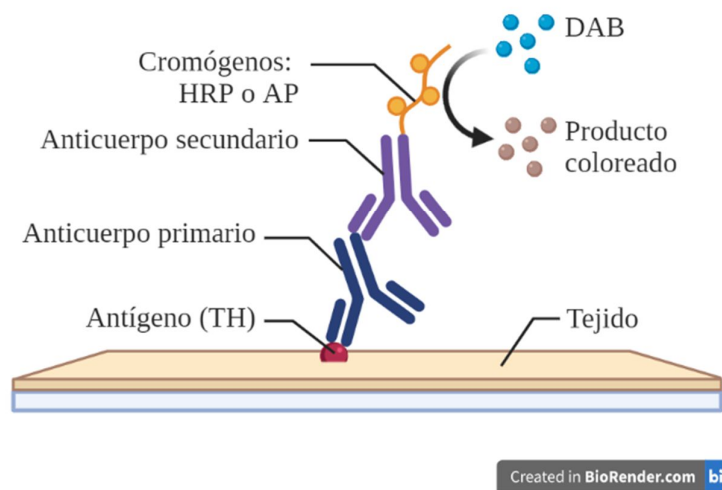


Figura 5. Complejo enzimático formado para la detección de antígenos o haptenos a partir de un tejido biológico mediante el método de inmunohistoquímica usando peroxidasa o fosfatasa alcalina. Modificado de Bosterbio, 2021 en BioRender.com

Objetivo general

Demostrar la validez del modelo experimental 6-OHDA para inducir la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y el estriado, característica de la Enfermedad de Parkinson, en ratas Wistar macho.

Objetivos particulares

1. Inducir la Enfermedad de Parkinson mediante una lesión de la SNpc a través de la administración unilateral de la toxina 6-OHDA usando cirugía estereotáxica.
2. Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para la detección de la enzima TH en la SNpc y el estriado de ratas Wistar macho.
3. Determinar la densidad óptica de neuronas dopaminérgicas positivas a TH en la SNpc de ratas con la EP usando microscopía de campo claro.

Metodología

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 280-350 g de peso, las cuales se colocaron y alojaron en grupos de 6 en cajas de acrílico, se mantuvieron a una temperatura controlada de

21-23 °C, con libre acceso a agua y alimento comercial (LabDiet, 500I Rodent Diet) a lo largo del experimento.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Protocolo No. 148) y se siguieron las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron facilitados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal (UPEAL-Bioterio) de la UAM-X.

Preparación de la 6-OHDA

La 6-OHDA y el ácido ascórbico se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Las soluciones se prepararon frescas para su uso a una concentración de 16 µg/2µL de 6-OHDA, disuelto en ácido ascórbico preparado, anteriormente, para lograr al final una concentración 0.02% y se aforó con solución salina (SS) al 0.9%.

Cirugía 6-OHDA

Se pesó individualmente a cada rata y se le administró una mezcla de los anestésicos ketamina (60 mg/kg i.p.) y xilacina (10 mg/kg i.p.), se rasuró el área donde se realizó la lesión (cabeza) y luego de comprobar la falta de reflejos en las patas traseras y cola, se colocó a la rata en el estereotáxico y ajustó adecuadamente, se añadió una gota de solución salina a cada ojo y se colocó un antifaz mojado para cubrir los ojos y protegerlos de la luz.

Antes de comenzar la cirugía, se cargó una jeringa Hamilton con la toxina 6-OHDA y se ajustó en el estereotáxico. Se procedió a hacer una pequeña incisión con un bisturí en la cabeza de la rata y se expuso el cráneo con ayuda de un sujetador y se quitaron las meninges.

Luego, se ajustó la punta de la jeringa en el punto de cruce entre bregma y la línea central del cráneo de la rata, las coordenadas se registraron y ajustaron a: AP -4.0 mm y L + 1.2 mm, lo cual fue marcado y se hizo un trépano en dicho punto, se rompieron los tejidos para asegurar la penetración de la aguja al cerebro y se introdujo a DV -8.0 mm para administrar unilateralmente del lado izquierdo 2 µL de 6-OHDA (8 µg/µL) en la SNpc. Una vez terminada la administración, se permitió un periodo de reposo de un minuto para que difunda la toxina y posteriormente se retiró la aguja lentamente. Finalmente, se limpió, se suturó y se añadió

solución violeta en la herida de la rata para evitar infección y facilitar su recuperación. Se permitió una recuperación de 15-20 días a las ratas antes de los experimentos conductuales.

Conducta motora

Para confirmar que las ratas habían desarrollado la EP, se realizaron pruebas conductuales como la prueba de giro y la del cilindro; ambas se grabaron en video y se evaluó la asimetría del uso de las extremidades anteriores para detectar alteraciones motoras.

a) Prueba de giro

Con el fin de examinar el desequilibrio inducido por la lesión dopaminérgica, se evaluó la conducta de giro, para lo cual los animales se colocaron en un cilindro de plexiglás transparente (40 cm de alto x 20 cm de diámetro) inmediatamente después de la inyección de apomorfina (0.1 mg/kg, s.c.). Se contó el número de vueltas contralaterales respecto al sitio de inyección (hacia la derecha) durante 30 minutos y se seleccionaron los animales que cumplían con al menos 150 vueltas (Truong et al., 2006).

b) Prueba de cilindro

La asimetría de las extremidades delanteras se evaluó mediante la prueba del cilindro, para lo cual, los animales se colocaron en un cilindro de plexiglás transparente (40 x 20 cm) y se registró su actividad durante 5 minutos.

Para esta prueba se contó el número de contactos con la pared realizados con las patas anteriores, ya que este representa un índice más sensible de agotamiento de dopamina que los movimientos de aterrizaje. Los contactos con la pared se clasificaron como miembros anteriores contralaterales (CL), miembros anteriores ipsilaterales (IL) o ambos miembros anteriores; bilaterales (BL).

Reactivos

Todos los reactivos utilizados para la inmunohistoquímica se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co (Toluca, Estado de México) y JT Baker (New Jersey, EEUU).

Las especificaciones de los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de anticuerpos utilizados para los procedimientos de inmunohistoquímica						
	Anticuerpos primarios			Anticuerpos secundarios		
Proteína	Fuente	Dilución	#Catálogo	Fuente	Dilución	#Catálogo
	Ratón monoclonal	1:500	Sigma ZMS1033	Biotinilado, cabra anti ratón	1:500	Vector BA-9200
			Santa Cruz SC25269	Estreptavidi na acoplado a HRP	1:5000	Invitrogen 43-4323

Inmunohistoquímica

a) Obtención de cerebros

Treinta días después de la lesión unilateral de la SNpc en ratas macho Wistar, estas se anestesiaron con pentobarbital sódico (200 mg/kg vía i.p.) y se perfundieron por vía intracardiaca, con 250 mL de solución salina al 0.9 % y posteriormente con 300 mL de paraformaldehído (PFA) al 4 %, en una solución amortiguadora de fosfatos (buffer de fosfatos de sodio 0.1 M), suplementada con 0.9 % de SS, a un pH de 7.3. Al final de este procedimiento se extrajeron los cerebros de los animales y se colocaron en sacarosa al 30% en buffer de fosfatos de sodio (PBS 1X) para almacenarlos a 4 °C hasta su uso posterior.

b) Tinción con violeta de cresilo

El violeta de cresilo (acetato) es un compuesto perteneciente al grupo de los colorantes de oxazina que se usa especialmente para la tinción nuclear y visualización de los cuerpos de Nissl y tinción estándar para identificación de Helicobacter y de cromatina, por lo que resulta útil en

el diagnóstico celular en la medicina humana y examen histológico de muestras de origen biológico y detección de daño tisular (Sigma-Aldrich, cat. C5042).

El procedimiento se realizó de la siguiente manera: Se seleccionaron 2 cortes de tejido de cada uno de los cerebros, se colocaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante 24 horas. Posteriormente, se aclararon y rehidrataron durante 3 segundos con las siguientes soluciones: Xilol 100 %, Xilol 50%, Etanol 100 %, Etanol 96 %, Etanol 80% y Etanol 70 %. A continuación, se lavó con agua destilada por 3 segundos y se tiñó en solución de violeta de cresilo al 0.1% durante 30 minutos, pasado este tiempo y cuando se observó un cambio en la coloración del tejido (violeta), se lavó con agua destilada por 3 segundos. Posteriormente, se deshidrataron y aclararon los cortes, en las siguientes soluciones durante 3 segundos cada una: Etanol 70 %, Etanol 80 %, Etanol 96 %, Etanol 100 %, Xilol 50% y Xilol 100 %; inmediatamente se agregaron 100 μ L de medio de montaje Entellan, se colocó un cubreobjetos de 24 x 60 mm y se permitió secar por 24 horas. Finalmente, se observaron las preparaciones en un microscopio de campo claro con un objetivo 4X y se obtuvieron imágenes con ayuda de un escáner EPSON para determinar la presencia o ausencia de daño en el tejido. Solo aquellos cerebros que mostraron ausencia de daño, se utilizaron para la técnica de inmunohistoquímica posteriormente.

c) Procedimiento inmunohistoquímico

El procedimiento de inmunohistoquímica fue modificado del protocolo de Mendieta *et al.* (2016) para su estandarización, el cual se estableció de la siguiente manera:

Se realizaron cortes coronales (60 μ m) de los cerebros de ratas de los grupos 6-OHDA y SHAM, en la región que comprende la SNpc (Bregma -4.00 mm a -6.60 mm) y el estriado (Bregma 2.40 mm a -3.80 mm) (Paxinos & Watson, 2009) por medio de un criostato (Leica CM1100), a -22 °C y se guardaron en placas de 24 pozos con PBS, identificados adecuadamente por zona y grupo experimental.

Se seleccionaron 5-6 cortes de cada zona (SNpc y estriado) por cerebro, los cuales se colocaron en placas de 24 pozos con PBS, después se realizaron 3 lavados con PBS-Tritón (PBS-T) 0.4% durante 10 minutos cada lavado a temperatura ambiente. Después, se incubaron con H₂O₂ al 3% en PBS-T durante 10 minutos para eliminar la peroxidasa endógena y se realizaron 3 lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno. Luego, se bloqueó con suero de cabra al 5% durante 10 minutos y ahí mismo, se incubaron los tejidos con el anticuerpo

primario Anti-TH rabbit (dilución 1:500 en solución de bloqueo) durante 24 horas a 4°C en agitación constante, pasado este tiempo; se realizaron 3 lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno, se incubaron los tejidos con el anticuerpo secundario biotinilado goat anti-mouse (Vector, dilución 1:500) por 90 minutos en agitación constante y se realizaron 3 lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron los tejidos con estreptavidina acoplada a HRP (Invitrogen, dilución 1:5000) durante 90 minutos en agitación constante y se realizaron 3 lavados con PBS-T durante 10 minutos cada uno. A continuación, se reveló con 1 mL de DAB (Sigma, 50 mg/100 mL) y 10 µL de H₂O₂ al 30 % (concentración final 0.3%) por cada pozo, durante 30 minutos, se retiró la solución y se añadió PBS para detener la reacción colorimétrica, se colocaron los tejidos en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante 24 horas. Finalmente, se deshidrataron con soluciones de etanol 80, 90 y 100 %, xilol:etanol 50:50 y xilol 100 %, inmediatamente después se añadieron 200 µL del medio de montaje Entellan (Merck, Cat. 1.07960), se cubrieron con cubreobjetos de 24 x 60 mm y se dejaron secar por 24 horas.

d) Cuantificación

La cuantificación se realizó por dos métodos; densidad óptica y conteo manual. Para la densidad óptica, se observaron las muestras en un estereoscopio (Leica EZ4) y se tomaron fotografías para su posterior análisis y cuantificación en objetivos 0.8-1.25x para obtener imágenes del tejido completo y 2.0x para cuantificar cada lado. La cuantificación por densidad óptica se realizó de la siguiente manera:

Se seleccionaron imágenes de 5-7 cortes por cada cerebro de rata, las cuales se convirtieron a escala de grises y se guardaron en formato TIFF con el programa Corel Photo Paint 5, en estas imágenes se identificó la SNpc con ayuda del Atlas de Paxinos & Watson (2009). Posteriormente, se analizaron con el programa Image Studio lite Versión 5.2 con ayuda de la herramienta de “draw ellipse” a diferentes tamaños según la anterioridad identificada. Se recopilaron los datos de “Signal”, “Area” y “Background” de cada uno de los lados de los cortes.

Para el método de conteo manual, se tomaron fotografías con un microscopio Motic BA310E acoplado a una cámara digital Motic 285A, con el objetivo 10X, se guardaron en formato TIFF y se nombraron adecuadamente para una fácil identificación. La cuantificación se llevó a cabo de la siguiente manera: Se seleccionaron imágenes de 5-7 cortes por cada

cerebro de rata, las cuales se unieron en Microsoft Publisher para armar la rebanada completa. Se identificó la SNpc con ayuda del Atlas de Paxinos & Watson (2009) y con la herramienta de dibujo libre se marcó y contó cada una de las neuronas por cuadrantes, las cuales fueron registradas y sumadas para tener el número de neuronas por lado (IL o CL) de cada rebanada. La cuantificación por ambos métodos fue realizada por dos investigadores independientes.

e) Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm S.E.M. para 3-6 animales; las diferencias se consideraron significativas con una $P < 0.05$ en comparación con el grupo Sham (ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey). El análisis para la prueba de apomorfina se realizó con ANOVA de dos vías seguido de Holm Sidak.

Para todo el análisis se usó el programa estadístico Sigma Plot 12.0.

Resultados y análisis

Los resultados de la prueba de cilindro se muestran en la figura 6, donde se aprecia que hubo un mayor porcentaje de uso de los miembros anteriores IL que CL en las ratas del grupo 6-OHDA, lo cual significa un déficit motor provocado por la lesión con la toxina; a diferencia del grupo Sham, donde el porcentaje de uso de la pata es constante y similar en los miembros IL, CL y BL, ya que no hay daño neuronal.

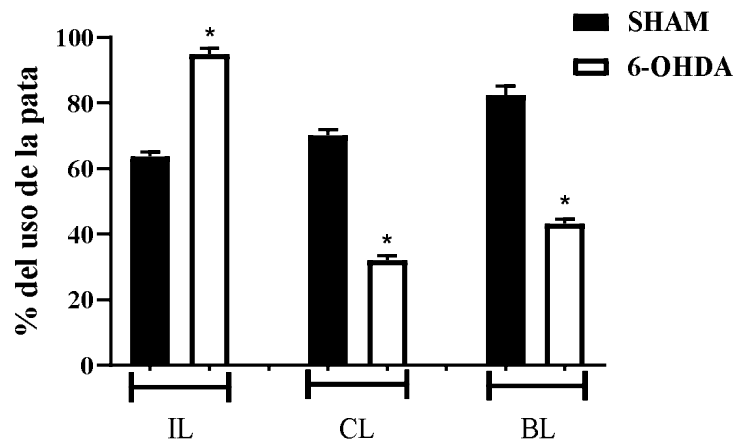


Figura 6. Prueba de cilindro. Porcentaje del uso de la pata con los miembros anteriores ipsilaterales (IL), contralaterales (CL) y bilaterales (BL) del grupo Sham y 6-OHDA. Los datos se presentan como

la media \pm SEM de 6 animales por grupo. Sham $*P < 0.05$ vs 6-OHDA, determinado por una ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey.

Los giros inducidos por apomorfina se muestran en la figura 7. Expresa los giros CL por cada 10 minutos de los grupos Sham y 6-OHDA. Se registraron valores de 0 en animales del grupo Sham y las ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA mostraron una rotación significativa CL (202 ± 22 giros en 30 minutos) inducida por apomorfina.

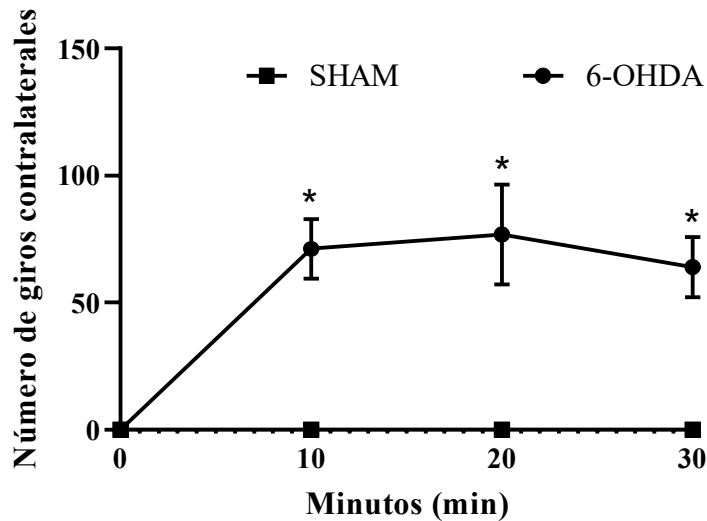


Figura 7. Prueba de apomorfina para el grupo Sham y 6-OHDA. Los datos se expresan como el número de giros contralaterales en un periodo de 30 minutos de 6 animales por grupo. Sham $*P < 0.001$ vs 6-OHDA, determinado por prueba de ANOVA de dos vías, seguido de prueba Holm Sidak.

Las fotografías de la tinción con violeta de cresilo, la cual se realizó para verificar la integridad de los cortes de cerebros de los diferentes grupos experimentales usados para la técnica de inmunohistoquímica se muestran a continuación (figura 8).

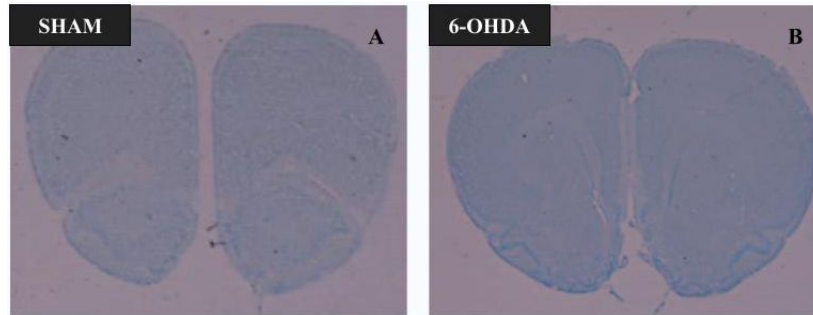


Figura 8. Imágenes representativas de la tinción con violeta de cresilo del grupo Sham y 6-OHDA, objetivo 2X.

En la figura 9 se muestran imágenes representativas de los cerebros de los grupos Sham y 6-OHDA, donde se observan las neuronas positivas a TH en color café. Se observa que las ratas que tienen la lesión con la 6-OHDA presentan una disminución de la cantidad de TH en el sitio de la lesión (IL; izquierdo) a diferencia del sitio donde no se realizó la lesión o con las ratas Sham donde se observa TH en ambos lados de la rebanada.

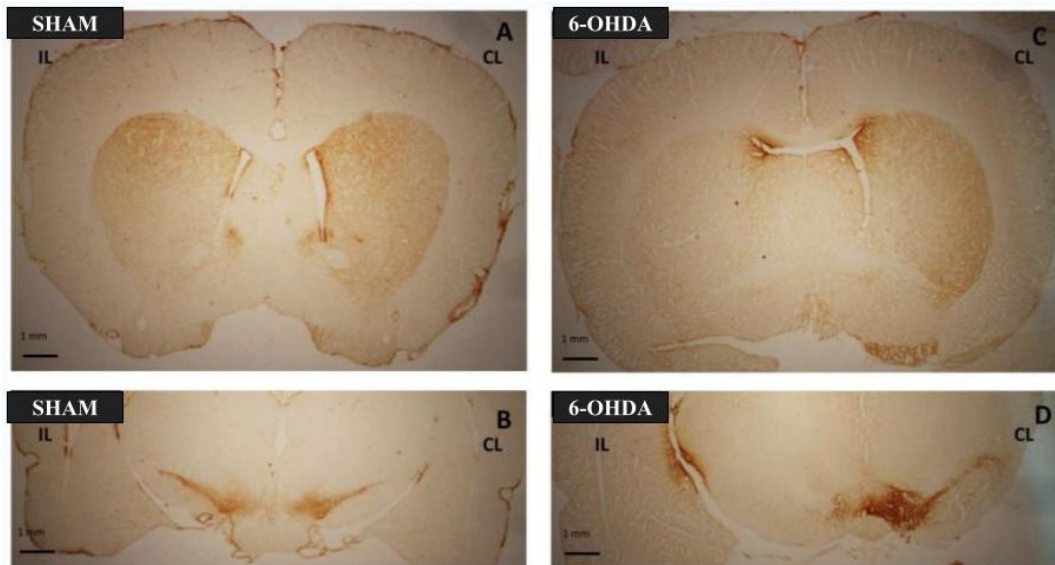


Figura 9. Inmunotinción con tirosina hidroxilasa (TH) de estriado del grupo Sham (A, n=3) y 6-OHDA (C, n=3), SNpc de Sham (B, n=3) y 6-OHDA (16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (D, n=3) unilateral. Barra de escala = 1 mm.

En cuanto a la cuantificación por densidad óptica (figura 10), para el grupo Sham se obtuvieron valores de ~ 20 , sin encontrar diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.98$) entre los lados (IL y CL), en cambio, para el grupo 6-OHDA se obtuvieron valores de ~ 1.5 para el lado CL y

de ~0.5 para IL. La comparación entre lado IL de grupo Sham y 6-OHDA concluyó en una diferencia significativa en la densidad de ambos grupos ($P = 0.001$).

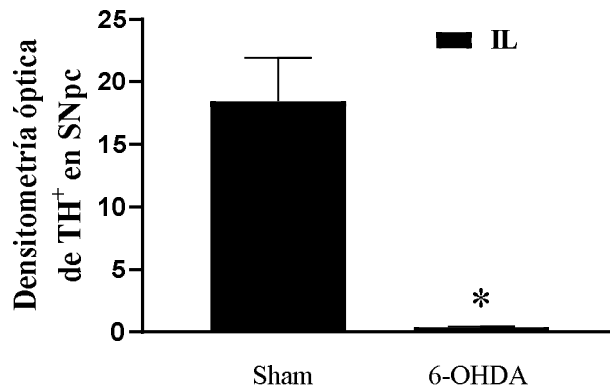


Figura 10. Análisis de densitometría de la inmunoreactividad a tirosina hidroxilasa (TH) en la SNpc del grupo Sham y 6-OHDA. Los datos se expresan como la densitometría de 3 animales por grupo del lado ipsilateral. Sham IL * $P < 0.001$ vs 6-OHDA IL, determinado con ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey.

Por otro lado, para la cuantificación por conteo neuronal (Figura 11), se encontraron valores de (~490) para el grupo Sham, sin encontrar diferencia significativa ($P = 0.98$) entre los lados (IL y CL), en cambio, para el grupo 6-OHDA se obtuvieron valores de ~355 para el lado CL y de ~178 para IL, encontrando diferencia significativa ($P = 0.01$) entre ambos lados. También se realizó la comparación entre grupos encontrando diferencia significativa ($P = 0.0003$).

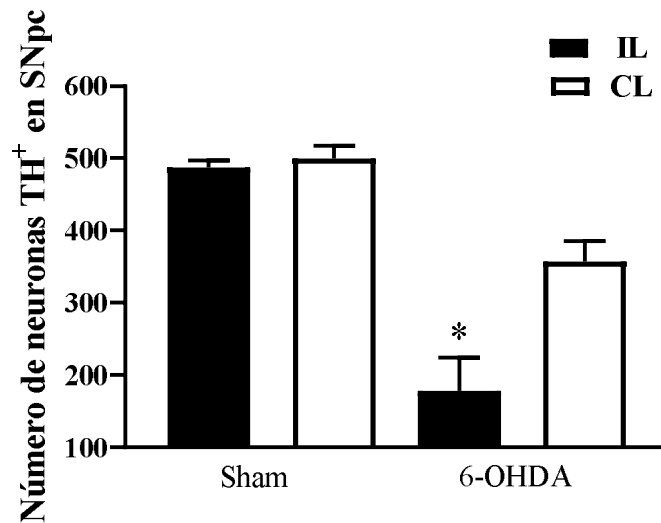


Figura 11. Análisis de la inmunoreactividad a tirosina hidroxilasa (TH) por conteo neuronal en la SNpc del grupo Sham y 6-OHDA. Los datos se expresan como el número de neuronas TH⁺ de 3 animales por grupo. Sham IL *P<0.001 vs 6-OHDA IL, determinado con ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Tukey.

En general, las ratas que recibieron inyección unilateral de 6-OHDA, mostraron una pérdida significativa de células positivas a TH en la SNpc del lado donde se realizó la lesión, a diferencia de aquellas ratas que habían recibido inyección del vehículo ($p < 0.01$), con un promedio de pérdida del ~80% de neuronas.

Discusión

Con base en los resultados obtenidos, podemos decir que es importante evaluar las condiciones de los cerebros antes de realizar la IHC, ya de que eso depende tener éxito en la observación de la marca de TH en la técnica y se puede evitar obtener falsos positivos o falsos negativos debido al mal estado del tejido, por ello en este trabajo se realizó la tinción con violeta de cresilo para asegurar la viabilidad nuestros tejidos antes de realizar la técnica. A partir de esa tinción, se pudo analizar el daño en los tejidos. Aquellos cerebros que se encontraban en buen estado se utilizaron para el proceso inmunohistoquímico.

El grupo 6-OHDA desarrolló la enfermedad de Parkinson, lo cual se sustenta con diversos hechos; el primero de ellos por los resultados de las pruebas de cilindro y apomorfina, donde se comprobó la alteración de su comportamiento motor y con los resultados de la IHC; donde en este grupo de ratas se observó una menor inmunoreactividad o marcaje de TH en el

lado IL a la lesión con la toxina, el conteo de neuronas positivas a TH por densidad óptica y por conteo neuronal nos muestran una disminución de alrededor del 80% de neuronas positivas a TH en las ratas que sufrieron la lesión con la 6-OHDA.

A diferencia de otros modelos, el modelo 6-OHDA induce la muerte de neuronas dopaminérgicas en zonas específicas (Hernández-Baltazar, 2017), por ello es de los más utilizados y es adecuado para reproducir la enfermedad (Mendieta et al., 2016, Kin et al., 2019). Además, este modelo resulta de utilidad para evaluar efectos de fármacos antiparkinsonianos como la levodopa, el pramipexol, etc.

El modelo de neurotoxina 6-OHDA se utilizó por primera vez para inducir la degeneración de las neuronas monoamina de la vía nigrostriatal en 1968. El modelo 6-OHDA se usa comúnmente para causar neurodegeneración en la vía nigrostriatal, ya que es un análogo de la dopamina y tóxico para las células que contienen catecolaminas. Después de que la toxina ingresa al cerebro, puede ser absorbido por el transportador de dopamina (DAT) en las neuronas dopaminérgicas, lo que lleva a la degeneración de la vía nigrostriatal, ya que la 6-OHDA se acumula en el citosol de las neuronas, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) y llevando a la muerte celular. Específicamente, las lesiones causadas en la SNpc dan lugar a una degeneración rápida de las neuronas (Poletti et al., 2021).

La ausencia de dopamina en el cuerpo estriado provoca un desequilibrio en las actividades de las vías de control motor directo e indirecto (Poletti et al., 2021), para ello, las pruebas conductuales para evaluar la lesión dopaminérgica mostraron una clara diferencia entre las ratas lesionadas con la 6-OHDA y ratas Sham.

La prueba de apomorfina es una prueba de comportamiento comúnmente utilizada para predecir la pérdida celular en la vía nigrostriatal. Se define como un proceso en el que la administración repetida de apomorfina, un agonista dopaminérgico, conduce a una intensificación del comportamiento rotacional en animales lesionados por 6-OHDA (Poletti et al., 2021). Para esta prueba, los animales con Parkinson presentaron un aumento en el número de giros con un patrón constante. Lo mismo parece suceder con otros investigadores, como con Medina-Salazar et al., 2021, donde demostraron que este comportamiento es igual hasta 6 meses después de la cirugía. La inmunohistoquímica es una técnica que utiliza la unión específica entre un anticuerpo y un antígeno para detectar y localizar antígenos específicos en

células y tejidos, que se detectan y examinan más comúnmente con el microscopio óptico (Magaki et al., 2020).

La IHC es una herramienta estándar en muchos campos en el entorno de la investigación (Magaki et al., 2020). Consistente con estudios previos en animales lesionados por 6-OHDA (Padovan-Neto et al., 2020), el análisis histológico mediante IHC que compara la TH del cerebro de ambos hemisferios permite una evaluación fiable del déficit de DA (Poletti et al., 2021). La técnica de IHC resultó adecuada para evaluar la pérdida neuronal de células TH⁺ en las rebanadas de cerebro de ratas. Ambas cuantificaciones muestran diferencia entre ambos grupos de ratas, esto debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas únicamente en el lado donde se administró la 6-OHDA, tendencia reportada en otros trabajos como el de Medina-Salazar et al., 2021. Sin embargo, la pérdida de neuronas no fue total, por lo que la lesión inducida con la 6-OHDA es de tipo moderada, según se describe en estudios previos (Allbutt & Henderson, 2007; Moreno-Fitz et al., 2015), resultando en una lesión dopaminérgica de ~60 % de las neuronas (Jayasinghe et al., 2017).

A pesar de ser el modelo más utilizado, el modelo 6-OHDA tiene sus limitaciones, una de ellas es que no representa completamente los mecanismos moleculares involucrados en la patología de la enfermedad, como la acumulación de proteínas alfa-sinucleína y la formación de cuerpos de Lewy. El modelo simula la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigrostriatal, correspondiente a una etapa tardía de la enfermedad y que conduce a la aparición de síntomas motores y no motores. Esto lo hace inadecuado para estudiar su desarrollo natural (Kin et al., 2019). Además, es crucial verificar cuidadosamente las coordenadas durante este delicado procedimiento quirúrgico, ya que una causa común de muerte es la inserción de la aguja en la coordenada incorrecta en el cerebro, ya que se provoca un daño en otras estructuras cerebrales (por ejemplo, el hipotálamo) por la aguja (Poletti et al., 2021).

Conclusión

En el presente trabajo se comprobó la eficacia del modelo 6-OHDA para mimetizar la pérdida de neuronas dopaminérgicas que ocurre en la enfermedad de Parkinson. Así mismo, se determinó que la técnica de IHC es útil para identificar la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducidas por la lesión en la SNpc con 6-OHDA en ratas.

Bibliografía

Allbutt, H. & Henderson, J. (2007). Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J. Neurosc. Meth.*, 159, 195-202. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.07.006.

Bahena-Trujillo, R., Flores, G. & Arias-Montaña, J. (2000). Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), México, D.F., México., Flores, G., Arias-Montaña, J. A., & Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, México. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista biomédica*, 11(1), 39–60. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v11i1.218>

Blair Ford, M. D. (2004). El Dolor en la Enfermedad de Parkinson (Pain). Parkinson's Disease Foundation. Recuperado de <https://www.parkinson.org/library/fact-sheets/dolor>

Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R., & Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 65(2), 135–172. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(01\)00003-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(01)00003-x)

Bosterbio (2021) Immunohistochemistry Principle. How IHC staining Works. Recuperado de <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/immunohistochemistry-ihc-principle>

Burns RS, Markey SP, Phillips JM y Chiueh CC (1984) La neurotoxicidad de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina en el mono y el hombre. *Can J Neurol Sci*, 11, 166-168.

Dawson, T. M., Ko, H. S., & Dawson, V. L. (2010). Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron*, 66(5), 646–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.034>

Gamber, K. M. (2016). Animal Models of Parkinson's Disease: New models provide greater translational and predictive value. *BioTechniques*, 61(4), 210–211. <https://doi.org/10.2144/000114463>

Heikkila, R. E., Nicklas, W. J., Vyas, I., & Duvoisin, R. C. (1985). Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats:

implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neuroscience letters*, 62(3), 389–394. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90580-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90580-4)

Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 32(8), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.06.011>

Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores (INAPAM) (2019). Parkinson, segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 50 años. Recuperado de <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/parkinson-segunda-enfermedad-neurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50-anos?idiom=es>

Jayasinghe, V. R., Flores-Barrera, E., West, A. R., Tseng, K. Y. (2017). Frequency-dependent corticostriatal disinhibition resulting from chronic dopamine depletion: role of local striatal cGMP and GABA-AR signaling. *Cerebral Cortex*. 27 (1), 625-634.

Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., Date, I. (2019) Animal models for Parkinson's disease research: trends in the 2000s. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (21), 5402.

Kiran, R. (2022). Parkinson's disease: Symptoms, dos and don'ts, treatment, causes. Medicover Hospitals. Recuperado de <https://www.medicoverhospitals.in/diseases/parkinsons-disease/>

Langston J.W., Langston E.B. e Irwin I. (1984). Parkinsonismo inducido por MPTP en primates humanos y no humanos: aspectos clínicos y experimentales. *Acta Neurol Scand Suppl*, 100, 49–54.

Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2020). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology*, 1897, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

Martínez-Fernández., R., Gasca-Salas C., C., Sánchez-Ferro, Á., & Ángel Obeso, J. (2016). Actualización en la Enfermedad de Parkinson. *Revista médica Clínica Las Condes*, 27(3), 363–379. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2016.06.010>

Medina-Salazar I., Moreno-Fitz J., Jiménez G., Morales N., Pizarro M., Elías-Viñas D., & Verdugo-Díaz L. (2021). Tratamiento a largo plazo con campos electromagnéticos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24, e302. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.302>

Mendes-Pinheiro, B., Soares-Cunha, C., Marote, A., Loureiro-Campos, E., Campos, J., Barata-Antunes, S., Monteiro-Fernandes, D., Santos, D., Duarte-Silva, S., Pinto, L., & Salgado, A. J. (2021). Unilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion in mice: a closer look into non-motor phenotype and glial response. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111530>

Mendieta L., Granado N., Aguilera J., Tizabi Y., & Moratalla R. (2006). Fragment C Domain of Tetanus Toxin Mitigates Methamphetamine Neurotoxicity and Its Motor Consequences in Mice. *Int J Neuropsychopharmacology*. 19(8). pyw021. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw021>

Moreno-Fitz, J., Medina-Salazar, I., Chávez-Hernández, V., Elías-Viñas, D. & Verdugo-Díaz, L. (2015). Efecto de la exposición a campos magnéticos de extrema baja frecuencia en un modelo de hemiparkinson en ratas. *Enneurobiología*, 7(12), 290615.

Padovan-Neto F., Patterson S., Voelkner N., Altwal F., Beverley J., West A., & Steiner H. (2020) Selective regulation of 5-HT1B serotonin receptor expression in the striatum by dopamine depletion and repeated L-DOPA treatment: relationship to L-DOPA-induced dyskinesias. *Molecular Neurobiology*. 57 (2), 736-751.

Parra, I., Martínez, I., Ramírez-García, G., Tizabi, Y., & Mendieta, L. (2020). Differential Effects of LPS and 6-OHDA on Microglia's Morphology in Rats: Implications for Inflammatory Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research*, 37(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00104-z>

Paxinos, G., & Watson, C. (2009). *Chemoarchitectonic atlas of the Mouse Brain*. Academic Press.

Poletti R., Ribeiro D., Dos Santos K., Godoy L., Corrêa M., & Padovan-Neto F. (2021). The 6-hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (176), 10.3791/62923. <https://doi.org/10.3791/62923>

Przedborski, S., & Vila, M. (2003). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 189–198.

Romero-Sánchez, H. A., Mendieta, L., Austrich-Olivares, A. M., Garza-Mouriño, G., Benitez-Diaz Mirón, M., Coen, A., & Godínez-Chaparro, B. (2020). Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway with 6-OHDA induced allodynia and hyperalgesia reverted by pramipexol in rats. *European Journal of Pharmacology*, 869. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172814>

Sigma-Aldrich (s/f). Microscopía Violeta de cresilo (acetato). Merckmillipore.com. Recuperado de [https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-PE-Site/es_ES/-/PEN/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-105235&DocumentId=200703.260.ProNet&DocumentType=PI&Language=ES&Country=N F&Origin=PDP#:~:text=El%20violeta%20de%20cresilo%20\(acetato,sexo%20\(X%2D%20cromatina\).](https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-PE-Site/es_ES/-/PEN/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-105235&DocumentId=200703.260.ProNet&DocumentType=PI&Language=ES&Country=N F&Origin=PDP#:~:text=El%20violeta%20de%20cresilo%20(acetato,sexo%20(X%2D%20cromatina).)

Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 11(3-4), 151–167. <https://doi.org/10.1007/BF03033565>

Truini, A., Frontoni, M., & Cruccu, G. (2012). Parkinson's disease related pain: a review of recent findings. *Journal of Neurology* 2012 260:1, 260(1), 330–334. <https://doi.org/10.1007/S00415-012-6754-5>

Truong, L., Allbutt, H., Kassiou, M., & Henderson, J. M. (2006). Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behavioural brain research*, 169(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.11.026>

Ungerstedt, U., (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5: 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)

Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G. W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain research*, 24(3), 485–493. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90187-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90187-3)

Weiner, N., Molinoff, P.B. Catecholamines. En: Siegel, G.J., Agranoff, B., Albers, R.W., Molinoff, P.B. eds. *Basic Neurochemistry*. 4th Ed. New York: Raven Press; 1989. p. 233-251

ANEXOS

Anexo A. Preparación de soluciones para perfusión

A-1. Paraformaldehído (PFA) 4%.

Se requiere la preparación de dos soluciones: Solución A (PBS, ver anexo B-1) y solución B.

Para 1 L de PFA 4%:

Preparar 400 mL aproximadamente de PBS 0.1 M (1X)

Solución B: Realizar bajo campana de extracción.

Preparar 400 mL aproximadamente de paraformaldehído, para ello pesar 40 g de paraformaldehído y colocarlo en un vaso de precipitados de 1000 mL con agua destilada a 55 °C (muy importante mantener la temperatura para evitar degradación del PFA) en agitación con agitador magnética. Agregar lentejas de NaOH puro (Merck, Cat. 1.06498), esperar a que se disuelva el NaOH y dejar de adicionar NaOH cuando la solución se vea clara o transparente.

Posteriormente, mezclar ambas soluciones (A y B), ajustar a un pH de 7.35 a 7.42 con HCl concentrado y aforar a 1 L.

Finalmente filtrar la solución final y guardar en refrigeración a 4°C.

A-2. Solución de sacarosa 30 %

Para 100 mL de sacarosa 30%:

Pesar 30 g de sacarosa (Fermont, Cat. 07642) y disolver en PBS.

Anexo B. Preparación de soluciones para el procedimiento inmunohistoquímico.

B-1. Solución buffer de fosfatos de sodio 0.1M (PBS).

Para 1 litro de PBS, siga las siguientes instrucciones:

Primero, pesar individualmente con exactitud en una balanza analítica 7.75 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, J. T. Baker, cat. 3818-01), 27.25 g de

fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4 , J. T. Baker, cat. 3828-01) y 22.5 g de cloruro de sodio (NaCl , J. T. Baker, cat. 3624-05).

Añadir 500 mL aproximadamente de agua destilada en un vaso de precipitados de 1000 mL y colocar sobre una parrilla eléctrica. Después, colocar un agitador magnético dentro del vaso de precipitados y añadir con calma los reactivos pesados anteriormente en el siguiente orden: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl y finalmente Na_2HPO_4 .

Una vez disuelto, aforar la solución a 1 L con agua destilada y filtrar.

B-2. PBS-T 0.4%

Para 100 mL de PBS-T 0.4%:

Añadir 400 μL de Tritón X-100 (Merck Cat. 1.12298.0101) y 99.6 mL de solución de PBS preparada anteriormente. Agitar manualmente.

B-3. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 3 %

Para 100 mL de H_2O_2 3 %:

Añadir 10 mL de H_2O_2 30 % (Fermont Cat. 56002) y 90 mL de PBS.

B-4. Solución de bloqueo

Para 100 mL de solución de bloqueo:

Añadir 5 mL de suero de cabra 100% y 95 mL de PBS-T 0.4%

B-5. Dianimobencidina (DAB) para revelado

Para 100 mL de DAB (50 mg/100 mL):

Pesar 50 mg de DAB (Sigma, Cat. D5637) y diluir en 100 mL de PBS.

Para el revelado: Añadir 1 mL DAB + 10 μL H_2O_2 30 % (concentración final 0.3%).

B-6. Preparación de portaobjetos gelatinizados

Solución para gelatinizar

Se requiere la preparación de dos soluciones: Solución A y solución B.

Para la solución A:

En un vaso de precipitados de 250 mL, agregar 100 mL de agua MilliQ e hidratar 2 g de gelatina con agitación constante (Sigma Aldrich. Cat. G8150).

Para la solución B:

En un vaso de 500 mL con 140 mL de agua, agregar 0.2 g de sulfato cúprico (Sigma Aldrich. Cat. 243361), calentar entre 40-60°C y mantener en agitación constante.

Añadir la solución A a la solución B. Mantener en agitación constante y calentamiento (40-60 °C), hasta disolverse.

Enfriar la solución a temperatura ambiente.

Agregar a la solución resultante 160 mL de etanol absoluto.

Gelatinización

Sumergir y retirar lentamente los portaobjetos (perfectamente limpios) en la solución de gelatina-sulfato cúprico final 2 veces o las veces que sean necesario de acuerdo a las necesidades de la preparación (se puede dejar sumergido hasta 20 minutos en cada ocasión). Finalmente dejar escurrir para eliminar el exceso de solución y secar a temperatura ambiente libre de polvo.

B-7. Soluciones para deshidratación:

Etanol 80 %

Para 100 mL de etanol 80 %:

Añadir 83.3 mL de etanol 96 % y aforar con 16.7 mL de agua destilada.

Etanol 90 %

Para 100 mL de etanol 90 %:

Añadir 93.8 mL de etanol 96 % y aforar con 6.2 mL de agua destilada.

Xilol: etanol 50:50

Para 100 mL de Xilol: etanol 50:50:

Añadir 47.9 mL de xilol 100 % (J.T.Baker, catalogo. 949002) y 52.1 mL de etanol 96 %.