



Utilización de la Inmunohistoquímica en la investigación psicológica

Wilmar Stiven Tamayo Zapata

Monografía presentada para optar al título de Psicólogo

Asesora

Marisol Lamprea Rodríguez, Doctora (PhD) en Psicobiología

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Sociales y Humanas
Psicología
Medellín, Antioquia, Colombia
2022

| | |
|----------------------------|---|
| Cita | (Tamayo Zapata, 2022) |
| Referencia | Tamayo Zapata, W. (2022). <i>Utilización de la Inmunohistoquímica en la investigación psicológica</i> [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. |
| Estilo APA 7 (2020) | |



PhD Marisol Lamprea coordinadora del Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.



CRAI María Teresa Uribe (Facultad de Ciencias Sociales y Humanas)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: Jhon Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Alba Nelly Gómez García.

Jefe departamento: Alberto Ferrer Botero.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

Este trabajo está principalmente dedicado a mi madre Mónica Zapata, la cual a pesar de las distintas vicisitudes que hemos enfrentado como familia, siempre me ha brindado su apoyo para lograr mi desarrollo personal y profesional. También a mis hermanas por ser tolerantes con todas las horas de estudio durante mis años de formación. Agrego a Estefanía Hernández y Valeria Ocampo por estar presentes en mi proceso de formación apoyando, aconsejando y motivando cuando ha sido necesario. Por último, a la PhD Marisol Lamprea y al equipo en su laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, por abrirme las puertas de este y compartirme un sinnúmero de conocimientos que me sirvieron para la construcción de este trabajo.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Resumen | 6 |
| Abstract | 7 |
| Introducción | 8 |
| 1. Contextualización: Inmunohistoquímica en la investigación psicológica | 10 |
| 2. Inmunohistoquímica..... | 16 |
| 2.1. ¿Qué es la inmunohistoquímica?..... | 16 |
| 2.2. Una breve historia | 16 |
| 2.3. ¿Qué es un anticuerpo? | 17 |
| 2.3.1. Cadena ligera | 17 |
| 2.3.2. Cadena pesada..... | 18 |
| 2.4. Clasificación de anticuerpos..... | 18 |
| 2.4.1. Anticuerpo primario..... | 18 |
| 2.4.1.1. Policlonales (PAb)..... | 18 |
| 2.4.1.2. Monoclonal (MAb). | 19 |
| 2.4.1.3. ¿A quién debo seleccionar como Ig primario?..... | 20 |
| 2.4.2. Anticuerpo secundario | 21 |
| 2.5. Interacción antígeno - Ig - anti Ig y etiquetado | 21 |
| 2.6. Algunas técnicas de tinción en inmunohistoquímica | 23 |
| 2.6.1. Método directo e indirecto | 23 |
| 2.6.2. Complejo Avidina-Biotina o Avidin-Biotin Complex (ABC)..... | 23 |
| 2.6.3. Inmunohistoquímica basada en polímeros..... | 24 |
| 2.6.4. Método de amplificación de tiramida | 24 |
| 2.6.5. Método de amplificación de fluorescencia-tiramida..... | 25 |
| 2.6.6. Amplificación de círculo rodante o Rolling Circle Amplification (RCA) | 25 |

| | |
|---|----|
| 3. Inmunofluorescencia (IF)..... | 26 |
| 3.1. Los fluoróforos..... | 26 |
| 3.2. Tipos de IF..... | 27 |
| 3.2.1. Fluorescencia directa..... | 27 |
| 3.2.2. Fluorescencia indirecta..... | 27 |
| 3.2.3. Otras desventajas al utilizar IF..... | 28 |
| 3.2.3.1. Photobleaching..... | 28 |
| 3.2.3.2. Auto fluorescencia..... | 28 |
| 3.2.3.3. Superposición de fluoróforos..... | 28 |
| 4. FOS..... | 29 |
| 4.1. Δ FosB..... | 29 |
| 5. Protocolos..... | 31 |
| 5.1. Protocolo para la realización de la técnica de IHC..... | 31 |
| 5.2. Protocolo de toma de fotografías y posterior cuantificación en ImageJ..... | 34 |
| 5.2.1. Materiales..... | 34 |
| 5.2.2. Preparación..... | 34 |
| 5.2.3. Configuración microscopio..... | 35 |
| 5.2.4. Configuración ZEN Studio..... | 36 |
| 5.2.5. Cuantificación en ImageJ..... | 37 |
| 6. Conclusión..... | 39 |
| Referencias..... | 41 |

Resumen

El presente trabajo pretende ofrecer una reflexión sobre el posible uso de las técnicas de Inmunohistoquímica y de Inmunofluorescencia en las investigaciones comportamentales. Para éste fin se mostrará un breve contexto del uso actual que se le está dando a ambas técnicas en la psicología tanto en solitario como en investigaciones interdisciplinarias. Además, se encontrará un temario que presentará breves respuestas sobre ¿qué es la inmunohistoquímica? ¿qué es la inmunofluorescencia? ¿qué tipos de técnicas inmunohistoquímica e inmunofluorescencia son utilizados? ¿qué son los anticuerpos? ¿qué tipo de anticuerpos existen?, etc., las cuales servirán como punto de partida para entender estas técnicas de inmunotinción. Adicional a lo anterior, también se habla de ciertas desventajas y ventajas que posee cada técnica al ser empleadas por el investigador para obtener información de sus tejidos de interés. Agregando que, igualmente se presenta un protocolo para la realización de la inmunohistoquímica y otro para la toma de fotografías de los tejidos y cuantificación de estos en ImageJ. Por último, culmina con la reflexión anteriormente mencionada sobre el uso de la inmunohistoquímica en la investigación científica en la psicología.

Palabras clave: inmunohistoquímica en psicología, análisis funcional en psicobiología, C-Fos y conducta, investigación animal, investigación en psicobiología, ImageJ y psicología, investigación en psicología.

Abstract

This dissertation aims to offer a reflection on the possible use of Immunohistochemistry and Immunofluorescence techniques in behavioral research. For this purpose, a brief context of the current user that is being given to both techniques in psychology, both alone and in interdisciplinary research, will be shown. In addition, you will find an agenda that will present brief answers on what is immunohistochemistry? what is immunofluorescence? What types of immunohistochemical and immunofluorescence techniques are used? what are antibodies? What kind of antibodies exists? etc., which will serve as a starting point to understanding these immunostaining techniques. In addition to the above, certain disadvantages and sales that each technique has when used by the researcher to obtain information on their tissues of interest are also discussed. Moreover, a protocol for performing immunohistochemistry and another for taking pictures of the tissues and quantifying them in ImageJ is presented. Finally, culminates with the aforementioned reflection on the use of immunohistochemistry in scientific research in psychology.

Keywords: immunohistochemistry in psychology, functional analysis in psychobiology, C-Fos and behavior, animal research, research in psychobiology, ImageJ and psychology, research in psychology.

Introducción

En los últimos 150 años, más específicamente a mediados del siglo XX inició un gran avance científico en las ciencias del comportamiento por medio del desarrollo de herramientas válidas para el estudio experimental del comportamiento y los procesos cognoscitivos. A finales de ese siglo, el conocimiento acerca del sistema nervioso evolucionó grandemente debido al desarrollo de las neurociencias gracias a las mejoras técnicas (tisulares, microscopia, neuroimagen, algorítmica, etc.), que han permitido la identificación de los mecanismos genéticos, moleculares y electrofisiológicos que participan en el desarrollo y en la plasticidad del sistema nervioso. Empero, muchos de estos desarrollos han sido utilizados para la consolidación de las neurociencias como disciplina científica y a pesar de que la psicología en cierta medida también los ha utilizado, esta ha sido desarrollada sobre la base del impulso de herramientas propias válidas para el estudio experimental del comportamiento y los procesos cognoscitivos. El objetivo de este documento es mostrar algunas aplicaciones que tiene la inmunohistoquímica en el estudio del comportamiento y cómo estas pueden ayudar a comprender de una forma más global la conducta. Además, de servir como primer acercamiento al mundo de la inmunohistoquímica a los psicólogos que estén interesados en utilizarla en sus procedimientos experimentales.

En el primer apartado de éste texto se trata de dar un contexto sobre el avance de la psicología como ciencia, mostrando someramente las dos tradiciones predominantes en la ciencia psicológica y algunas complicaciones que podría traer consigo el utilizar conceptos mediacionales para explicar la conducta de un organismo. Adicionalmente, se muestran algunas investigaciones científicas realizadas por la psicología, en donde tratan de tener una mirada mucho más amplia de la conducta entendiendo que el comportamiento y los procesos cognoscitivos son manifestaciones evidentes del funcionamiento cerebral, producto de una relación funcional que se establece entre los eventos ambientales y el comportamiento de los organismos.

El segundo apartado aborda lo que es la inmunohistoquímica y su historia, agregando que trata de explicar cada uno de los elementos básicos de este procedimiento, como lo son: Las inmunoglobulinas (anticuerpos), partes de las inmunoglobulinas y su función, tipos de inmunoglobulinas, clasificación de las inmunoglobulinas, ¿qué es un antígeno?, interacción entre inmunoglobulinas – antígenos y etiquetado y, tipos de inmunohistoquímica.

El tercer apartado trata sobre la inmunofluorescencia y sus conceptos básicos, también de sus tipos y problemas que pueden surgir mediante su uso que pueden ser grandes desventajas a la hora de usarla. Empero, también en este se incluyen algunas técnicas para disminuir la probabilidad de aparición de dichos problemas.

En el cuarto apartado se habla de la proteína FOS, qué es ésta proteína y cómo éste factor de transcripción parece estar implicado en conductas de adicción y de estrés.

El quinto apartado está dedicado al protocolo para la realización de un ensayo de inmunohistoquímica y al protocolo diseñado por el laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá para la toma de fotografías de tejidos en microscopio y la posterior cuantificación de marcas generadas por las moléculas señal de interés en ImageJ.

En el último apartado se podrá encontrar las conclusiones con una breve reflexión sobre la utilización de las técnicas de inmunohistoquímica en la investigación del comportamiento.

1. Contextualización: Inmunohistoquímica en la investigación psicológica

Durante el siglo XX han existido grandes avances en las ciencias del comportamiento y a finales de este, el conocimiento acerca del sistema nervioso evolucionó grandemente debido al desarrollo de las neurociencias gracias a las mejoras técnicas (tisulares, microscopia, neuroimagen, algorítmica, etc.), que han permitido la identificación de los mecanismos genéticos, moleculares y electrofisiológicos que participan en el desarrollo y en la plasticidad del sistema nervioso (Ribes, 2018; Rodríguez, Broglio, Durán, Jiménez-Moya, Gómez, Ocaña & Salas, 2005). Todos estos desarrollos fueron y son utilizados por las neurociencias, beneficiando su crecimiento y consolidación como rama científica; sí bien esos mismos métodos han sido utilizados en menor medida por la psicología, su desarrollo como ciencia ha sido en gran medida sobre la base del desarrollo de herramientas propias válidas para el estudio experimental del comportamiento y los procesos cognoscitivos; no obstante el proceso de consolidación ha sido complejo, puesto que está a los largo de su historia ha poseído distintas formas de abordar el fenómeno psicológico y estas se podrían agrupar en dos tradiciones: la mediacional, en esta se encuentran todas aquellas que tratan de explicar lo psicológico a través de las representaciones internas o mentales, las cuales son codificaciones (o procesos inconscientes, computacionales, etc.) de diversos tipos de información que recibe un organismo (sean internas o externas) y, la no mediacional, aquí se encuentran aquellas tradiciones que explican lo psicológico como producto de las relaciones funcionales que se establecen entre los eventos ambientales y el comportamiento de los organismos (Lamprea & Munera, 2007; Pérez, Gutiérrez, García & Gómez, 2018; Ribes, 2018; Rodríguez et al, 2005). Esta forma dispar de concebir el objeto de estudio en la psicología (conducta vs mente) ha generado un sistema dentro de esta y en efecto, un crecimiento aislado como “ciencias independientes” de ambas tradiciones. (Pérez et al, 2018; Ribes, 2018; Rodríguez et al, 2005).

Teniendo en cuenta lo expuesto en el párrafo anterior, se podría decir que la concepción central de la psicología mediacional puede generar serios problemas no sólo epistémicos sino también metodológicos, puesto que las representaciones internas y sus manipulaciones no pueden ser investigadas directamente a través del estudio del sistema nervioso, debido a que estos mecanismos son constructos teóricos que son inferidos de la conducta emitida por un organismo sin tener en cuenta los datos neurofisiológicos y comportamentales, sustentándose tan sólo en variables intervinientes que se les asignan distintas propiedades causales (Pérez et al, 2018; Ribes,

2018). Ej. “podemos decir que el «lazo articulatorio» es una subestructura de la memoria a corto plazo encargada de procesar la información verbal. Hasta aquí sólo utilizamos una variable interviniente, en principio como resumen y organización de unas observaciones; pero si decimos que un fallo en el lazo articulatorio es la causa de la dislexia, estamos dando un salto lógico que no está justificado y que puede sesgar la investigación” (Pérez et al, 2018, pp. 34-35). Aquí podemos observar como el interés por el procesamiento de la información verbal salta a las propiedades internas de una estructura inobservable, que traen consigo un dudoso estatus ontológico en donde a veces son traídas sólo como conceptos y otras como algo con capacidad para causar el comportamiento, dándonos una falsa sensación de conocer las causas de los fenómenos (Pérez et al 2018).

A pesar de lo anterior, la psicología mediacional ha tenido grandes avances en sus estudios a través de la unión interdisciplinar con las neurociencias, creando las neurociencias cognitivas, aunque en general recurriendo a los mismos problemas epistémicos y por ende metodológicos al seguir acudiendo a variables intervinientes que aumentan la probabilidad de culminar en falsas explicaciones causales de la conducta (Pérez et al, 2018; Rodríguez et al, 2005). Con esto no se quiere plantear que las neurociencias cognitivas no sean una rama neurocientífica rica en información y que no ha contribuido a la construcción de conocimiento de esta ciencia, pero lo que sí se pretende recalcar es que muchos de sus constructos teóricos de los fenómenos que evalúa podrían ser más parsimoniosos si se cumpliera el principio de Ockham y dejaran de lado la utilización de variables intervinientes para sus explicaciones de lo psicológico.

Es menester mencionar que uno de los más importantes psicólogos de la tradición no mediacional, B.F Skinner (1965; 1991) habla de la importancia de la fisiología y de los estudios en neurociencias, puesto que estos permiten conocer varios procesos físicos y bioquímicos, etc., que hacen parte de la conducta de un organismo, empero, su crítica se centra en que estos conocimientos de manera aislada no sirven para explicar lo que hace un organismo, dado que la conducta de este es consecuencia de distintas condiciones antecedentes específicas como su filogenia y ontogenia. Sin embargo, esto no significa que el único método de estudio de un psicólogo básico se limite al análisis funcional de la conducta en sus observaciones experimentales, ya que, el análisis tisular del sistema nervioso puede aportar información valiosa de lo que ocurre “debajo de la piel” de un organismo y así poder tener una visión más completa de las relaciones funcionales que se establecen entre los eventos ambientales y el comportamiento de los organismos. Un ejemplo de

esto sería la síntesis de nuevas proteínas en la región lateral y basal del núcleo de la amígdala que están fuertemente relacionadas con la consolidación de recuerdos, varios experimentos han emparejado un tono (estímulo neutro, EN) con una descarga eléctrica suave (estímulo incondicionado, EI), haciendo que el tono adquiriera la capacidad de provocar la respuesta incondicionada (RI) del EI, es decir que al presentar el tono (estímulo condicional, EC) este obtenga como respuesta comportamental el congelamiento de las ratas utilizadas en los experimentos (respuesta condicionada, RC); después se les inyecta anisomicina (inhibidor de proteína) en la región lateral y basal del núcleo de la amígdala, generando que las ratas no recuerdan el condicionamiento del temor, sino que muestran “amnesia”, al otro día cuando el EC (un tono) era presentado al siguiente día, las ratas que habían recibido anisomicina seguían exhibiendo amnesia (Nader, Schafe, & LeDoux, 2000; Routtenberg, 2008; Schafe & LeDoux, 2000).

Trabajos en psicología utilizando la inmunohistoquímica (IHC) se están realizando alrededor del mundo, ej. La investigación realizada por Perrotti, Hadeishi, Ulery, Barrot, Monteggia, Duman y Nestler (2004) sobre el estrés, en la cual uno de los objetivos era determinar si la forma de FosB inducida después del estrés crónico también era Δ FosB, para esto utilizaron algunas ratas macho Sprague Dawley adultas (300–350 g) que se les generó estrés de inmovilización en dispositivos de sujeción desechables para roedores (Bainbridge Scientific, Braintree, MA); para el análisis tisular se utilizó la técnica de inmunohistoquímica, emplearon un anticuerpo que reconoce a todos los miembros de la familia Fos, los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

- El estrés de restricción agudo provoca una fuerte inducción de c-Fos y FosB de longitud completa, así como una pequeña inducción de Δ FosB, en la corteza frontal (CF) y el núcleo accumbens (NAc) (esto mediante western blot).
- La inducción de c-Fos (y hasta cierto punto FosB de longitud completa) se desensibilizó después de 10 días de estrés por restricción, momento en el que los niveles de Δ FosB eran altos.
- Mediante IHC se encontró que el estrés de restricción crónica inducía la expresión de Δ FosB predominantemente en CF, NAc y la amígdala basolateral, con niveles más bajos de inducción observados en otros lugares.

Estos hallazgos hicieron que el grupo de Perrotti et al (2004) llegaran a la conclusión de que el estrés crónico induce Δ FosB en varias regiones discretas del cerebro y esta podría contribuir en los efectos a largo plazo del estrés en el cerebro.

Una investigación similar realizada por Ballesteros Cadena (2018) que tenía como objetivo determinar los efectos de la exposición a estrés agudo causado por restricción de movimientos sobre la reconsolidación de una tarea de memoria espacial, utilizando dos condiciones de entrenamiento y sobre el patrón de expresión de la proteína c-Fos. Para esto Ballesteros Cadena (2018) empleó 92 ratas macho adultas de la cepa Wistar (3-4 meses de edad) provenientes del Bioterio Central del Instituto Nacional de Salud (INS) que fueron asignadas de manera aleatoria a 8 grupos y un laberinto de Barnes, estas tuvieron un día de habituación no contingente al laberinto, 2 días de entrenamiento a este, un día de prueba de reactivación y uno de prueba de retención (Ballesteros Cadena, 2018). Después, el animal uno por uno fue colocado dentro de un cilindro de PVC de 6cm de diámetro por 17 cm de largo (que estaba sobre el laberinto de Barnes), con tapas removibles en los extremos y agujeros laterales que permitían la salida de la cola del animal y que este respirara (Ballesteros Cadena, 2018). Para el proceso de IHC se seleccionaron 5 tejidos coronales de cada sujeto, con el objetivo de observar la región prelímbica (PrL), la estriado dorsal (DMS y DLS), de la amígdala basolateral (BLA), de la capa granular del giro dentado (GrDG), del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y las cortezas somatosensorial (S1FB) y motora (M1) primarias; durante el proceso de IHC se encontró disminución de la expresión de c-Fos en las estructuras que están relacionadas con los procesos de aprendizaje y memoria y la respuesta de estrés como resultado del sobre entrenamiento (Ballesteros Cadena, 2018).

Otra investigación que empleo inmunohistoquímica, más específicamente la técnica de inmunofluorescencia se dio en la evaluación de los mecanismos subyacentes que causan la disminución de estrés en pacientes con Trastorno Obsesivo Compulsivo mediante la estimulación eléctrica del núcleo del lecho de la *stria terminalis* (BST), en resumidas cuentas esta investigación llegó a las siguientes conclusiones: Hubo reducción de ansiedad contextual en las ratas, hubo un aumento significativo de cFos en la amígdala baso lateral e igual un aumento de c Fos en todo el hemisferio izquierdo, principalmente en las secciones transversales (Luyck, Nuttin, Arckens & Luyten, 2019).

Otro ejemplo, pero en este caso de investigación interdisciplinar sería el llevado a cabo por Sabogal-Guáqueta, Carrillo-Hormaza y Cardona-Gómez (2018), en donde conjugaron

farmacología, microbiología, psicología, etc. Con el objetivo de evaluar si una fracción de biflavonoides (BF) tenía efectos neuroprotectores en un modelo de ratón transgénico triple envejecido con la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), para esto se utilizaron ratones machos y hembras homocigotos 3xTg-AD y no transgénicos con edades entre los 18 a 21 meses, que presentaran amiloidosis, tauopatía y problemas de aprendizaje dependientes de la edad, además estos tenían un peso de 27-35 g y fueron extraídos de la colonia interna en la Universidad de Antioquia mantenida en el vivero libre de patógenos específicos de la SIU (Sede de Investigación Universitaria) en Medellín, Colombia; cabe resaltar que a los ratones 3xTg AD de 21 a 24 meses de edad se administraron vía intraperitoneal (i.p) 25 mg/kg de un BF de Garcinia madruno cada 48h durante 3 meses (Sabogal-Guáqueta et al, 2018). En ésta investigación evaluaron el aprendizaje de los ratones en el laberinto en cruz elevado y en la prueba del laberinto de agua de Morris, en donde encontraron que el tratamiento con BF mejoró endeblemente el aprendizaje y, además, estos ratones pasaron más tiempo en los brazos abiertos de la prueba del laberinto en cruz elevado y adicionalmente, mostraron mayor conducta de evaluación de riesgos que el grupo control para entender más globalmente el ¿por qué de estas respuestas? Se realizaron observaciones de ciertas áreas del encéfalo con pruebas como el ELISA, Western Blot y la IHC (Sabogal-Guáqueta et al, 2018). En la prueba de IHC se buscó la inmunoreactividad de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que es un marcador de astrogliosis, cuantificándose específicamente en el hipocampo (CA1 y el subículo) debido a la importancia de esta región en el aprendizaje y la memoria, así como en la amígdala y la corteza entorrinal, debido a su importancia en las vías que regulan las conductas emocionales que están conectadas con la memoria (Sabogal-Guáqueta et al, 2018). Con todo lo anterior este grupo concluyó que el BF revierte las características histopatológicas y reduce los trastornos emocionales en el modelo de ratón 3xTg-AD, lo que sugiere que los biflavonoides de G. madruno representan una posible opción terapéutica natural para la enfermedad de Alzheimer.

Por último, una investigación similar a la anterior, la cual fue realizada por Sabogal-Guáqueta, Muñoz-Manco, Ramírez-Pineda, Lamprea-Rodríguez, Osorio y Cardona-Gómez (2015) en la cual tenían como objetivo evaluar los efectos neuroprotectores de la administración de quercetina en ratones envejecidos (21-24 meses, esto se hizo para tener una cantidad homogénea de Tau). Esto se realizó en ratones transgénicos triple AD (3xTg-AD) y no transgénicos envejecidos, a los cuales se les aplicó quercetina (25 mg/kg) o el 0.1% un vehículo llamado DMSO vía i.p. cada 48h durante 3 meses. En esta investigación se evaluó el aprendizaje, la memoria

espacial y conductas a través del laberinto en cruz elevado, en donde se obtuvo que la quercetina indujo un mejor rendimiento en tareas de aprendizaje y memoria espacial y un mayor comportamiento de evaluación de riesgo basado en la prueba del laberinto en cruz y en la prueba del laberinto de agua de Morris; para entender más globalmente el ¿por qué de estas respuestas? se evaluaron algunos tejidos de distintas del cerebro a través de pruebas como el ELISA, Western Blot y la IHC (Sabogal-Guáqueta et al, 2015). Empero, con la utilización de IHC se evaluaron las regiones que incluyen el CA1 y el subículo (hipocampo), la corteza entorrinal (EC) y la amígdala, en donde se observó una pérdida de densidad celular en el subículo en los ratones 3xTg-AD tratados con vehículo, y el tratamiento con quercetina aumentó la densidad celular en el subículo a un nivel similar al de los ratones no transgénicos tratados con vehículo o quercetina (Sabogal-Guáqueta et al, 2015). Como conclusión, sugirieron que, según estos hallazgos la quercetina revierte las características histológicas del Alzheimer y protege la función cognitiva y emocional en ratones 3xTg-AD de edad avanzada. (Sabogal-Guáqueta et al, 2015)

En el contexto colombiano existen varios laboratorios que emplean la técnica de inmunohistoquímica dentro de sus investigaciones comportamentales, algunos de estas están liderados por el PhD Javier Rico, la PhD Marisol Lamprea, el PhD Efraín, la PhD Elena García, el PhD Fernando Cárdenas, la PhD Patricia Cardona, la PhD Liliana Francis, entre otros.

2. Inmunohistoquímica

2.1. ¿Qué es la inmunohistoquímica?

La inmunohistoquímica (IHC) es una técnica que conjuga la unión de 3 disciplinas científicas como la histología, la química y la inmunología, siendo la más utilizada de la inmunotinción tanto en el ámbito científico como en el ámbito clínico; esta técnica consiste en la identificación y expresión de antígenos (proteína) en secciones de tejidos a través de la utilización de ciertos anticuerpos (Ig) que son marcados como reactivos específicos al conjugarse con una enzima, con un colorante fluorescente, radioisótopos, etc. (la marcación de los antígenos se hace de forma directa o indirecta). Con el fin, de que los antígenos puedan ser observados en el microscopio (abcam, s. f.; Kroemer s.f.; Kumar & Rudbeck, 2009; Ramos-Vara, 2005; Ramos-Vara & Miller, 2014).

2.2. Una breve historia

Las primeras investigaciones que utilizaron derivados de los inmunoquímicos fueron realizadas con dos objetivos, el primero para establecer la naturaleza proteica de la molécula de anticuerpo y la segunda, para dilucidar la influencia de grupos polares específicos en el mecanismo de la reacción antígeno-anticuerpo (Coons, Creech & Jones, 1941). Esto fue, hasta que Reiner realizó un preparado de atoxil-azo serológicamente activo (como marcador), mezclado con los anticuerpos I y II del antipneumococcus; demostrando así que era posible la utilización de estos para la cuantización por medio de la reacción antígeno-anticuerpo (Coons et al, 1941). Otro gran avance en esta línea, la realizó Marrack en sus experimentos al permitir que los sueros contra la fiebre tifoidea y el cólera reaccionaran con la sal de bencidina-azo-R diazotizada; demostrando que los anticuerpos modificados químicamente coloreaban de rosa a aquellos organismos que fueran homólogos (Coons et al, 1941; Marrack, 1934). A pesar de los avances en la pigmentación logrados por Marrack, en la réplica experimental que realizaron Coons et al (1941) encontraron que la coloración de los tejidos era ínfima y no era lo suficientemente intensa como ellos lo esperaban. Así que, realizaron una mezcla de preparados por la interacción entre isocianatos de hidrocarburos

aromáticos polinucleares con varias proteínas, logrando así observar con mayor fluorescencia e identificar de una manera más fácil los grupos celulares (Coons et al, 1941).

A pesar de lo anterior, esta técnica fue considerada demasiado difícil y su expansión no se logró hasta 20 años después (Javois, 2022). Desde su expansión esta se ha desarrollado y se han introducido distintas etiquetas o marcas enzimáticas como: la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, el oro coloidal, elementos radiactivos y de inmuno-reacción (estos se pueden observar por auto radiografía) (Avrameas & Uriel, 1966; Faluk & Taylor; 1971; Javois, 2022; Mason & Sammons, 1978; Nakene & Pierce, 1966).

2.3. ¿Qué es un anticuerpo?

Los anticuerpos mejor conocidos como Inmunoglobulinas (Ig), son un grupo de proteínas que se encuentran en la sangre de los animales inmunizados y, además, son una parte de la defensa de una célula huésped, es decir, de una célula infectada (Kumar & Rudbeck, 2009; National Human Genome, s. f.). La estructura de la Ig consta de cuatro cadenas polipeptídicas, incluidas dos cadenas ligeras, dos cadenas pesadas y de una zona hipervariable en la parte superior del anticuerpo, todos estos juntos forman una Y; en la parte superior de esta está la región Fab (fragmento unión-antígeno) la cual permite que la Ig produzca diferentes tipos de Ig que responderán a los antígenos que invadan el cuerpo (un virus, una bacteria, etc.) al unirse a estos; por último, el tallo de la Ig se llama Fc (fragmento cristalizado) (CUSABIO, s. f.-a; National Human Genome, s. f).

2.3.1. Cadena ligera

Es la pequeña subunidad polipeptídica de Ig, además posee dos dominios: El constante (C), el cual se da cuando es codificado por el gen IGLC y, el variable (V) está codificado por dos tipos de genes, el IGLV y el IGLJ, los cuales aparecen en muchas copias y para su formación (del dominio V) es necesario que una copia de cada uno de estos tipos de genes se una mediante un proceso de recombinación de genes (Das, Nikolaidis, Klein & Nei, 2008). Adicional, en mamíferos se han identificado dos isotipos, cadenas κ y λ , las cuales están codificadas por distintos locus (Das et al, 2008).

2.3.2. Cadena pesada

Es la gran subunidad polipeptídica de la Ig (también está presente en otro complejo proteico, las proteínas motoras) y de esta existen cinco tipos en los mamíferos, las cuales definen el isotipo de una Ig, los cuales son: γ (IgG es el tipo de Ig más abundante en el huésped inmunizado), μ (IgM es la más fácil de detectar), δ (IgD), α (IgA) y ϵ (IgE), siendo las dos primeras, las más utilizadas en IHC (abcam, 2022a; Janeway, Travers, Walport & Shlomchik, 2001; abcam, s.f.). Agregando que, esta posee dos regiones: Dominio variable o V_H , este es importante porque permite unirse al antígeno y, varios dominios constantes o C_H (abcam, 2022a; Janeway et al, 2001). Por último, es necesario agregar que en ciertos mamíferos la IgG e IgA se dividen en subclases que se denominan isotopos, esto debido al polimorfismo en las regiones conservadas de la cadena pesada (Lipman, Jackson, Trudel & Weis-Garcia, 2005).

2.4. Clasificación de anticuerpos

Los anticuerpos pueden clasificados según su capacidad de unión en dos tipos: anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios (Jaffe, Harris, Arber, Campo, Quintanilla-Fend & Quintanilla-Martínez, 2016).

2.4.1. Anticuerpo primario

Es el nombre que se le asigna a los anticuerpos que específicamente se unen a una proteína o a un antígeno, al reconocer un epítipo presente sobre el antígeno y, además, de este se derivan dos grandes categorías útiles para la IHC, los policlonales (PAb) y los monoclonales (MAb), cabe resaltar que estos también pueden ser utilizados como anticuerpos secundarios (abcam, s.f.; Jaffe et al, 2016; Keirle, Warric, Thomas & Sharrio, 2014; Pohanka, 2009).

2.4.1.1. Policlonales (PAb). Los PAb reciben su nombre gracias a que estos comprenden un espectro de moléculas de anticuerpos que tienen como origen múltiples células productoras de anticuerpos no relacionados (Anaya, Cervera, Shoenfeld, Levy & Rojas-Villarraga, 2013). Los PAb son una mezcla heterogénea de anticuerpos dirigidos contra varios epítopos del mismo

antígeno y son generados por diferentes clones de células B del animal y, como consecuencia, son inmunológicamente diferentes (abcam, s.f; Anaya et al, 2013; Jaffe et al, 2016). Los PAb se generan al inyectar en un animal la preparación antigénica de interés (este proceso dura entre 3 a 8 meses, con aplicaciones cada dos semanas), este procedimiento se realiza mucho más en conejos (a los conejos en éste procedimiento se les suele aplicar una dosis de antígeno que va desde los 10ug a los 20ug; empero, también se pueden emplear cabras, cerdos, cobayas y vacas, cada uno de estos tiene una medida específica en sus dosis) debido a que el mantenimiento de sus anticuerpos es mucho más fácil y no son tan extraños como en los humanos, además, estos precipitan las proteínas humanas en un rango más amplio de exceso de antígeno o de anticuerpo (abcam, s.f; Anaya et al, 2013; Jaffe et al, 2016). Ya pasado todo lo anterior, se extrae la sangre del animal inmunizado y de esta se extrae el suero vía centrifugado y se somete a purificación de anticuerpos (en algunas ocasiones es sometida a adsorciones diferenciales para eliminar la reactividad no deseada), con el fin de eliminar otras proteínas que se encuentren en el suero y no sean Ig (abcam, s.f; Anaya et al, 2013; Jaffe et al, 2016). Según Anaya et al (2013) estas son algunas de las ventajas de utilizar este tipo de anticuerpo: Es mejor para muestras de tejidos, es bueno para reconocer múltiples epítomos y que los PAb son robustos; algunas de las desventajas que presenta son tan sólo dos, que la producción del PAb depende de animales no humanos con vida y que aumenta la reactividad cruzada.

2.4.1.2. Monoclonal (MAb). Los MAb son una población homogénea de Ig que va apuntalada contra un epítomo (este puede identificar distintos epítomos, incluyendo aquellos que son muy pequeños, aunque siempre van directos a un antígeno determinado) y es producida por un clon de célula B de un animal, de aquí su nombre de monoclonal (abcam, s.f.; Jaffe et al, 2016; Anaya et al, 2013; Janeway et al, 2001). La producción de esta se hace generalmente en ratones, en ratas, en conejos y en camellos, los cuales se inmunizan mediante inyecciones intraperitoneales con algún antígeno deseado y se refuerzan cada dos semanas por un período de dos meses a cuatro meses, agregando que se testea regularmente que la respuesta inmunológica ante el antígeno sea la adecuada (abcam, s.f.; Anaya et al, 2013). Cuando se logra una respuesta inmunitaria aceptable, se sacrifica al animal y los linfocitos B se aíslan del bazo (órgano que pertenece al sistema linfático), para después fusionarlos con células de mieloma con el fin de formar hibridomas (también conocidas como células inmortales) (abcam, s.f.; Anaya et al, 2013; Pham, 2018). Esta fusión

confiere a la hibridoma las capacidades de producción específica de Ig (de los linfocitos B) y el crecimiento indefinido (de los mielomas) y, su reproducción se puede realizar mediante cultivo de tejidos o inyectando el hibridoma en la cavidad peritoneal de algún animal formando un tumor, en este último la Ig se secreta dentro de dicha cavidad y se extrae el líquido de la ascitis (este líquido posee grandes concentraciones de anticuerpos, sí lo comparamos con el resultante del cultivo de tejidos) (abcam, s.f.; Anaya et al, 2013; Jaffe et al, 2016; Pham, 2018).

Anaya et al (2013) y Jaffe et al (2016) mencionan algunas de las siguientes ventajas al utilizar los MAb: Son más consistentes que los PAb, puede existir una producción constante por las hibridomas y que estos tienen menos variabilidad que los PAb. Empero, esto último también puede ser una desventaja, dado que “a polyclonal antibody preparation generally contains a mixture of antibodies reacting to multiple epitopes, it does not matter if some of the epitopes are rendered inactive by the fixation process, as long as one epitope remains in its reactive conformation” [la preparación de un PAb generalmente contiene una combinación de reacciones de anticuerpos a múltiples epítomos, no importa sí alguno de los epítomos se vuelven inactivos por el proceso de fijación, siempre que un epítomo permanezca en su conformación reactiva] (Jaffe et al, 2016, pp. 42-43). Esto podría causar problemas sí el único epítomo que es reconocido por el MAb es afectado por el proceso de fijación, ya que este no se podría utilizar para algún proceso de IHC, esto debido a que los MAb sólo reconocen un solo epítomo (Anaya, 2013; Jaffe et al, 2016). Agregando que su sensibilidad va de baja a moderada, que su tolerancia a la fijación es baja y que su costo de producción es alto (Ramos-Vara, 2005).

2.4.1.3. ¿A quién debo seleccionar como Ig primario? La selección entre un PAb y un MAb como Ig primario dependerá de varios factores como el requerimiento para su uso y sí este está disponible para su utilización (Lipman et al, 2005). Un ejemplo del requerimiento, para un experimento se requiere que haya una alta especificidad y para esto el MAb como Ig primario puede ser una buena opción y, sí se realizará un experimento de inmunoprecipitación (IP) e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), entonces el más adecuado sería el PAb dado que este puede reconocer múltiples epítomos.

2.4.2. Anticuerpo secundario

También llamados anti-Ig (Antiglobulina), son aquellos que están dirigidos contra la especie del anticuerpo primario uniéndose a las cadenas pesadas o a los fragmentos de este, para esto es necesario la creación de antiglobulinas, considerando que estas son desarrolladas para reconocer una clase de isotipo de la Ig y al emplearlas no interfieren en el proceso de fijación del anticuerpo primario con el antígeno, adicional que cuando se utiliza significa que se está realizando una marcación indirecta (CUSABIO, s. f.-b; Kerly et al, 2014; Pepper, Gerba & Gentry, 2014). Este anticuerpo puede ser PAb o MAb y se selecciona de acuerdo al anticuerpo primario, el huésped de origen y la etiqueta preferida; agregando que como se mencionó anteriormente, el anticuerpo secundario tiene que ser una antiglobulina (CUSABIO, s. f.-b ; Pepper et al, 2014). Ej., se selecciona el isotipo G de la Ig como anticuerpo primario y luego se necesitara un anti-IgG (antiglobulina G) de cadenas pesadas y ligeras, la cual va a reaccionar ante ambas cadenas de la IgG. Aquí cabe resaltar algo y es que el anti-IgG también puede reaccionar ante otras clases de Ig como la IgM y la IgA, esto debido a que estas comparten las mismas especies de cadenas ligeras con la IgG (CUSABIO, s. f.-b).

2.5. Interacción antígeno - Ig - anti Ig y etiquetado

Según Ramos-Vara (2004), abcam (2022b) y Janeway et al (2001), la unión de la Ig con el antígeno es algo inusual desde un punto de vista bioquímico, ya que, los enlaces químicos que los unen son débiles siendo principalmente hidrófobos (los enlaces que se dan aquí son con macromoléculas que su tensión superficial es menor que la del agua, estas interacciones hidrófobas se dan a través de aminoácidos de cadena lateral fenilalanina, tirosina, etc., y estos al tener menor atracción hacia las moléculas de agua tienden a unirse entre sí) y electrostáticos (a grandes rasgos, se da por las fuerzas de Van der Waals en donde las interacciones electrostáticas son débiles entre moléculas o átomos que sean dipolares, un ejemplo de esto son los puentes de hidrógeno; además, sí no existe una yuxtaposición adecuada entre iones con carga opuesta en epítomos y parátomos, los enlaces pueden ser débiles, por último las altas concentraciones de sal y el pH extremo puede interrumpir la unión), no covalentes. Aunque individualmente tales enlaces químicos son relativamente débiles, colectivamente forman interacciones muy fuertes y estrechas, por lo tanto,

las uniones más fuertes son aquellas que ocurren cuando las formas de los epítomos y de los anticuerpos son completarías, es decir, son más afines (Pepper et al, 2014).

A nivel macro lo que ocurre es que ingresa un antígeno al organismo y este induce una respuesta inmunológica, la Ig reconoce el antígeno a través del parátomo (parte de la Ig que reconoce al antígeno) basado en la estructura del antígeno y de su contenido, para después unirse al epítomo (que es una pequeña parte del antígeno); empero, esto no significa que todo anticuerpo se une a todos los epítomos, debido a que cada Ig posee parátomos específicos que se unen a un epítomo particular y así sucesivamente (CUSABIO, s. f.-a; Pepper et al, 2014; Janeway et al, 2001). Además hay que mencionar, que esto también ocurre cuando se realiza un etiquetado directo (en el etiquetado directo lo único que variaría es que la Ig primaria lleva consigo una molécula señal, la cual se activará mediante la interacción de la Ig con el antígeno, permitiendo la identificación de este) o indirecto (aquí el etiquetado ocurre gracias a la Ig secundaria, a causa de que esta lleva la molécula señal con la cual se identifica la Ig primaria que está unida al antígeno, al unirse ambas Ig secundaria y primaria, se activa la molécula señal) (Kroemer, s. f.; Pepper et al, 2014).

Según Burry (2011), existen pruebas que se pueden aplicar para poder identificar si el etiquetado es el correcto, es decir, si la Ig primaria o la secundaria han marcado de manera correcta al antígeno diana. Burry (2011) menciona que el objetivo de la prueba de control para la Ig primaria sería observar si el anticuerpo está unido al antígeno deseado y esto se hace a través de la utilización de algunos enfoques genéticos que permiten manipular la expresión de la proteína del antígeno. Algunos de estos enfoques son: El uso de tejido de un animal knockout; línea celular transfectada que expresa el antígeno para el anticuerpo primario; utilización como control de anticuerpo primario la combinación de inmunocitoquímica e hibridación fluorescente *in situ* y controles de absorción (Burry, 2011; Saper & Sawchenko 2003; Saper, 2009). Habría que decir también que la intención de la prueba con la Ig secundaria es mostrar si la marca observada se debe únicamente a la unión de la Ig secundaria a la Ig primaria y este se realiza eliminando la Ig primaria o reemplazándola con la misma cantidad de suero normal de la misma especie. (Burry, 2011).

Para concluir éste apartado, la utilización de alguno de los dos tipos de etiquetado o marcaje dependerá del tipo de tinción que requiera el experimento, ej. se tiende a asociar el marcaje directo con protocolos experimentales simples que ahorran tiempo, reactivos y que no corre el riesgo de sufrir algún tipo de reactividad cruzada con el anticuerpo secundario, aunque un marcaje directo carece de amplificación y flexibilidad de la señal y puede dar como resultado un fondo alto;

mientras que el marcaje indirecto amplifica la señal de la molécula y es más flexible, a causa de que el mismo anticuerpo secundario tiene la capacidad de reaccionar con múltiples anticuerpos primarios, empero, este posee un protocolo más complejo y su utilización aumenta el riesgo de reactividad cruzada (CUSABIO, s. f.-a).

2.6. Algunas técnicas de tinción en inmunohistoquímica

En la IHC existen diversos tipos de técnicas para la obtención de información de los tejidos utilizados para el diagnóstico, pronóstico, predicción, investigación científica, etc. La cual se logra a través de la detención y posterior conteo de antígenos diana señalizados por el anticuerpo que interactúa con este (CUSABIO, s.f.b; Kumar & Rudbeck, 2009; Pepper et al, 2014).

2.6.1. Método directo e indirecto

El método es directo cuando solo se utiliza al anticuerpo primario conjugado con una molécula señal para marcar al antígeno diana, mientras que el método es indirecto cuando el anticuerpo secundario está unido a la molécula y ésta se activa cuando el secundario se une al primario; cabe resaltar que se pueden emplear los fluorocromos, las enzimas, el oro coloidal y la biotina (para unirla a la peroxidasa u otro colorímetro) como molécula señal; por último, es menester mencionar que éste método a pesar de que es rápido carece de sensibilidad suficiente para la detección de la mayoría de los antígenos (Jaffe et al, 2016; Ramos-Vara, 2005).

2.6.2. Complejo Avidina-Biotina o Avidin-Biotin Complex (ABC)

Este es un método indirecto, que se basa en la fuerte afinidad de la avidina o la estreptavidina por la vitamina biotina y esta se conjuga fácilmente con los anticuerpos (Kumar & Rudbeck, 2009; Ramos-Vara, 2005). En esta técnica se combinan tres capas: la primera la Ig primaria que no está marcada, la segunda sería la Ig secundaria con biotina que funciona como enlace entre la primera (que está adherida al tejido) y la tercera capa que es un complejo avidina-biotina-peroxidasa (la peroxidasa funciona como molécula señal, aunque se puede cambiar por otro sustrato u otro colorímetro) (Jaffe et al, 2016; Kumar & Rudbeck, 2009; Ramos-Vara, 2005). Según

Jaffe et al (2016) y Ramos-Vara (2005) este método tiene una sensibilidad aceptable, un fondo con ruido aceptable y un costo bajo.

2.6.3. Inmunohistoquímica basada en polímeros

Anteriormente se realizaba con el método EPOS (Enhanced Polymer One Step /Polímero mejorado en un paso, siendo este un método directo) y cuando este marcó una revolución al permitir la realización de inmunotinciones sin necesidad de utilizar biotina y/o avidina, empero uno de sus problemas fue su restricción a un grupo selecto de anticuerpos primarios proporcionados por el fabricante y no aptos para anticuerpos primarios proporcionados por el usuario (Kumar & Rudbeck, 2009). No obstante, esto sirvió para crear la necesidad y por ende posterior desarrolló de un método indirecto llamado el método de dos pasos de etiquetado polimérico (el cual consiste en un polímero compacto en el que se unen múltiples moléculas de enzimas (como molécula señal) y la Ig secundaria (Jaffe et al, 2016; Kumar & Rudbeck, 2009; Ramos-Vara, 2005). Las ventajas de esta técnica es que es más simple que el ABC, es igual o más sensible que el ABC y no tener un fondo de tinción como la biotina o la avidina; una de sus mayores desventajas es que es un procedimiento costoso (Jaffe et al, 2016; Ramos-Vara, 2005).

2.6.4. Método de amplificación de tiramida

Este es un método directo que consiste en la capacidad de los compuestos fenólicos para oxidar a intermediarios altamente reactivo e inestables, esto permite que la tiramida se adhiera químicamente a un sustrato sólido (por ejemplo, una sección de tejido) después de la oxidación/radicalización (Kumar & Rudbeck, 2009; Ramos-Vara, 2005). Esta reacción se puede aprovechar en IHC para generar productos intermedios de biotinil-tiramida altamente reactivos que se unen rápidamente a las moléculas de proteína en las inmediaciones de las enzimas peroxidasas, las cuales se asociación primero con los anticuerpos primarios asociados mediante cualquiera de los métodos IHC (Kumar & Rudbeck, 2009; Ramos-Vara, 2005). La principal ventaja es que la sensibilidad es muy alta, mientras que sus desventajas son que su fondo puede estar algo contaminado con biotina, haciendo que haya mucho ruido en este y su realización es muy costosa (Jaffe et al, 2016; Ramos-Vara, 2005).

2.6.5. Método de amplificación de fluorescil-tiramida

Este es un método indirecto que no necesita de la biotina como el método anterior, ya que, la peroxidasa se asocia con una Ig primaria que está unida al tejido mediante la aplicación de una Ig secundaria (ej. anti-ratón) al que se ha conjugado la peroxidasa y con ellas en el tejido también están la conversión y el depósito de fluorescil-tiramida, permitiendo que se pueda observar mediante microscopía de fluorescencia o la señal se puede convertir en una reacción colorimétrica mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa seguido de un sustrato de diaminobencidina-peróxido de hidrógeno. (Hatanaka, Imaoka, Torisu, Kamihara, Hashizume, Ichimura, Yoshino & Tani, 2008; Kumar & Rudbeck, 2009). En otras palabras, se podría decir que es un método de amplificador de señal que se basa en la deposición catalizada por peroxidasa de un compuesto fenólico marcado con fluoresceína, seguida de una reacción secundaria con una anti fluoresceína conjugada con peroxidasa. La ventaja de la utilización es que está libre de biotina y que es altamente sensible, tanto que permite la detección de cantidades muy pequeñas de proteína, así como el uso de anticuerpos de baja afinidad (Hatanak et al, 2009; Kumar & Rudbeck, 2009).

2.6.6. Amplificación de círculo rodante o Rolling Circle Amplification (RCA)

El objetivo de esta técnica es el aumento de la señal emitida producto de la reacción inmunológica, esto sin aumentar el ruido (no afectar el fondo); todo lo anterior se hace a través de una replicación de DNA anclada en la superficie que se puede usar para visualizar antígenos (inmuno RCA), siendo esta una reacción combinada en la que la primera parte consiste en una reacción inmunológica (unión antígeno-Ig) y la segunda parte es una amplificación isotérmica de ácidos nucleicos con una sonda de oligonucleótidos circularizadas marcadas, estas pueden incluir como marcador biotina que luego puede visualizarse mediante cualquiera de los muchos métodos de detección de avidina-biotina, entre otras (Jaffe et al, 2016; Ramos-Vara, 2005). Una de las grandes ventajas como se mencionó antes, es que no afecta el fondo a la hora de visualizar y, además, que genera un aumento 105 veces de la señal (Jaffe et al, 2016; Ramos-Vara, 2005).

3. Inmunofluorescencia (IF)

La inmunofluorescencia es una técnica de IHC que utiliza Ig unidas a fluoróforos (sustancia fluorescente) para poder visualizar varios antígenos, como también la localización de varios componentes celulares dentro de las células sean estas en suspensión y/o cultivadas, tejidos y microarrays para la detección de ciertas proteínas, entre otros (Aoki, Sousa Jr, Fukumori, Périgo, Freitas & Oliveira, 2010; Department of Biology, 2001; Im, Mareninov, Diaz & Yong, 2018; Joshi & Yu, 2017; Kaliyappan, Palanisamy, Duraiyan & Govindarajan, 2012; Kumar & Rudbeck, 2009). Esta técnica está basada en los trabajos pioneros de Albert Coons y sus colegas, además, de Mary Osborne, los informaron que el antígeno en los tejidos de los mamíferos podía ser detectado ópticamente a través de la luz ultravioleta (UV) con un anticuerpo unido químicamente al fluoróforo isocianato de fluoresceína (Aoki et al, 2010; ; Coons, Creech & Jones, 1941; Joshi & Yu, 2017; Kumar & Rudbeck, 2009). Según Joshi y Yu (2017) ha habido recientes avances que han llevado al desarrollo de fluoróforos más fotoestables y se usan ampliamente para variase aplicaciones en clínica, así como en biología celular y patología.

3.1. Los fluoróforos

Son moléculas microscópicas que pueden ser proteínas, pequeños compuestos orgánicos o polímeros sintéticos que absorben la luz con una determinada longitud de onda y que la emiten en ondas de luz más largas, siendo estos esenciales para la IF debido a que permiten detectar la expresión de proteínas o antígenos, para esto los anticuerpos se conjugan químicamente con fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o el tetrametil isotiocianato de rodamina (TRITC), estos dos son de los más usados en IF (Im et al, 2018; Joshi & Yu, 2017; Kumar & Rudbeck, 2009). Empero, la elección del fluoróforo perfecto dependerá de varios factores como el tipo de microscopio que se utilice (confocales o de fluorescencia) y el tipo marca que se adquiera, ya que cada una tiene referencias de las longitudes de onda máxima de excitación y alteración del fluoróforo adquirido (Im et al, 2018; Joshi & Yu, 2017).

3.2. Tipos de IF

Los tipos de IF son clasificados según el tipo de etiquetado y de este existen dos tipos, la directa y la indirecta.

3.2.1. Fluorescencia directa

El procedimiento es similar al de la IHC directa, la diferencia es que la Ig primaria es conjugada con una molécula señal fluorescente, la cual reaccionara cuando el parátipo identifique al epítipo (Im et al, 2018; Joshi & Yu, 2017; Kumar & Rudbeck, 2009; Odell & Cook, 2013). Según Im et al (2017), Joshi y Yu (2017) y Kumar y Rudbeck (2009) existen varias desventajas como: Sí hay pocos antígenos es muy probable que emita una señal más baja, tiene un costo muy alto, tiene menos flexibilidad y, además, dificultades con el procedimiento de marcaje cuando los conjugados directos marcados comercialmente no están disponibles; la ventaja que presenta es que los tiempos de tinción son muy cortos.

3.2.2. Fluorescencia indirecta

Este procedimiento es similar al de la IHC indirecta, la diferencia es que la Ig secundaria es la que se conjuga con una molécula señal fluorescente, la cual reaccionara cuando la Ig secundaria adhiera a las Ig primaria (Im et al, 2018; Joshi & Yu, 2017; Kumar & Rudbeck, 2009; Odell & Cook, 2013). Este procedimiento presenta algunas ventajas como que hay una probabilidad más alta de que se emita una señal robusta, a cada de más de un anticuerpo secundario puede unirse a cada primario, además, los anticuerpos secundarios producidos comercialmente son relativamente más económicos y están disponibles en una variedad de colores; sus desventajas son que puede hay probabilidad de una reactividad cruzada, que es complejo encontrar anticuerpos primarios que no se produzcan en la misma especie y que las muestras de Ig endógena pueden presentar alto ruido en el fondo (Im et al, 2018; Joshi & Yu, 2017; Kumar & Rudbeck, 2009; Odell & Cook, 2013).

3.2.3. Otras desventajas al utilizar IF

A pesar de las desventajas mencionadas anteriormente propias de cada tipo de etiquetado, existen otras que son generales como:

3.2.3.1. Photobleaching. También conocido como fotoblanqueo y se cree que sucede gracias a la fotosensibilización del oxígeno, el cual es generado por el estado de excitación del fluoróforo; este problema se puede prevenir optimizando el tiempo de exposición a la longitud de onda de excitación o con depuradores de especies reactivas de oxígeno (ROS) o con fluoróforos que hayan sido diseñados para disminuir el fotoblanqueo (Joshi & Yu, 2017; Kumar & Rudbeck, 2009).

3.2.3.2. Auto fluorescencia. Las muestras pueden presentar este fenómeno cuando nucleótidos de piridina reducidos y coenzimas flavinas reducidos afectan la detección de fluorescencia en tejidos y células; esto se puede solucionar seleccionando sondas y filtros ópticos que maximicen la señal de fluorescencia en relación con la auto fluorescencia, también con el uso de un anticuerpo diferente de alta afinidad más específico o mediante la optimización del proceso de fijación (los métodos de fijación que utilizan aldehídos como el glutaraldehído pueden dar lugar a una alta auto fluorescencia que puede atenuarse lavando con borohidruro de sodio al 0,1 % en PBS antes de la incubación del anticuerpo) (Joshi & Yu, 2017; Kumar & Rudbeck, 2009).

3.2.3.3. Superposición de fluoróforos. Es un problema demasiado común que se halla en la relación de imágenes para múltiples objetivos en la misma muestra, en la cual se muestra que dos o más fluoróforos utilizados emiten luz a longitudes de onda similares, esto sucede cuando dos o más fluoróforos están tiñendo antígenos diferentes; una solución es utilizar dos tipos distintos de fluoróforos para que el espectro que se emita no se superponga y se pueda distinguir óptimamente (Joshi & Yu, 2017; Kumar & Rudbeck, 2009).

4. FOS

Es el nombre que recibe una familia de genes que consta de 4 miembros: c-FOS (el homólogo en humanos es un oncogén retroviral llamado v-FOS), FOSB, FOSL1 y FOSL2; los cuales codifican proteínas de cremallera de leucina pueden dimerizarse (esta es una reacción química en la que dos moléculas de subunidades idénticas, más conocidas como monómeros, forman una estructura química única, denominada dímero) con proteínas de la familia JUN (la familia FOS exclusivamente lo pueden hacer con la familia JUN), formando así el complejo del factor de transcripción AP-1 que cuando se une al ADN participa en la proliferación, transformación y apoptosis celular al modular la transcripción de una amplia variedad de genes, controlando así la invasión celular en diversos sistemas biológicos; adicional, es necesario recalcar que la acumulación de todos los factores transcripcionales de la familia FOS dependen de la actividad del EPK (Ding, Gan, Xiang, Zhu, Jin, Ning, Guo, Zhao, Xie & Yuan, 2022; Milde-Langosch, 2005; National Library of Medicine, s. f.; Renaud Kubota, Rumi & Soares, 2014; O'Shea, Rutkowski & Kim, 1992). Como tal, las proteínas FOS se han implicado como reguladores de la proliferación, diferenciación y transformación celular y en ciertos casos, la expresión del gen FOS también se ha asociado con la muerte celular apoptótica, la invasión de los trofoblastos, participante de la respuesta inflamatoria de PAT, (National Library of Medicine, s. f.; Ding et al, 2022; O'Shea et al, 1992; Prrotti, Hadeishi, Ulery, Barrot, Monteggia, Duman & Nestler, 2004; Renaud et al, 2014). La estructura de este es muy simple (igual a la del JUN) y un sector muy pequeño de su secuencia primaria, posee los determinantes para la formación de heterodímeros específicos (O'Shea et al, 1992).

4.1. Δ FosB

El Δ FosB es una variante de empalme trucado de la transcripción del gen FOSB (Nakabeppu & Nathans, 1991). Este está implicado en el desarrollo de cualquier adicción sea psicológica u orgánica, ya que influye en las regiones de recompensa del cerebro por la exposición a cualquier estímulo (E) que genere placer y además media en las respuestas sensibilizadas tras la exposición a estos, funcionando más específicamente en el núcleo accumbens como una especie de interruptor molecular ininterrumpido (sobre expresado) que desencadena series de transcripciones (que pueden producir cambios duraderos en la expresión génica) que tienen como

finalidad la búsqueda compulsiva de recompensa y pudiendo mantenerse por meses después del cese del E, gracias a la vida media anormal y excepcional de las isoformas Δ FosB, además también parece estar implicado en el estrés y el estrés crónico (Pitchers, Frohmader, Vialou, Mouzon, Nestle, Lehman & Coolen, 2010; Olsen, 2011; de Perrotti et al, 2004; Ballesteros Cadena, 2018). Debido a lo anterior se considera que el Δ FosB tiene un valor muy importante como biomarcador, ya que este es perfecto al ser un factor de transcripción esencial implicado en las vías moleculares y conductuales de la adicción tras la exposición repetida a las drogas, sirviendo como bioindicador no sólo de adicción sino también quizá para identificar si un tratamiento contra este flagelo puede funcionar (Wallace, Vialou, Ríos, Carle-Florence, Chakravarty, Kumar, Graham, Green, Kirk, Iniguez, Perrotti, Barrot, DiLeone, Nestler & Bolanos-Guzman, 2008; Nestler, 2008; Olsen, 2011).

El Δ FosB puede ser detectado a través de procesos del método Western, al utilizar un anticuerpo policlonal anti-FosB para la caracterización de anticuerpos y un anticuerpo monoclonal contra el gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o con procedimientos de IHC. (Allace et al, 2008).

5. Protocolos

5.1. Protocolo para la realización de la técnica de IHC

Para lograr todo lo anterior es necesario seguir los siguientes pasos:

- I. Preparación de la muestra: “many include processes such as fixation, dehydration, embedding and sectioning (...) [,] the two main methods of preserving tissues for IHC are paraffin embedding and freezing of the tissue” [Esta puede incluir procesos de fijación, deshidratación, inclusión y corte (...), los dos métodos más importantes para preservar el tejido para IHC es la inclusión de parafina y el congelamiento de los tejidos] (abcam, s. f., p. 6). La fijación previene la autólisis y la necrosis de los tejidos, además preserva la antigenicidad y las células de este, como también mejora el índice de refracción de los constituyentes del tejido; después la muestra se incluye en parafina (preservando la morfología del tejido y dando soporte) o se congela (abcam, s. f.).
 - a. abcam (s.f.) menciona que antes del proceso de parafina, el tejido debe fijarse (el fijador depende del antígeno) por medio de perfusión o inmersión inmediatamente después de la disección y este proceso puede durar entre 4 y 24 horas (después de aquí puede existir una fijación excesiva, enmascarando el antígeno); el paso siguiente es la deshidratación del tejido sumergiéndolo suavemente en concentraciones crecientes de Alcohol (ej. 50%, 70%, etc.), buscando un cambio gradual en la hidrofobicidad en efecto minimizando el daño celular, luego se debe limpiar con xileno, enseguida se incluye en parafina y esta se calienta en un microondas de laboratorio a 60°C para luego dejarla endurecer toda la noche y, finalmente el tejido se secciona con un micrótopo (las secciones de tejido se pueden secar en un portaobjetos) y almacenar durante largos períodos a temperatura ambiente (abcam, s. f.; Pohanka, 2009; Ramos-Vara & Miller, 2014).
 - b. abcam (s.f.) menciona que, los tejidos congelados con frecuencia se utilizan cuando se detectan modificaciones posteriores a la traducción, como la

fosforilación y congelarlos estos deben sumergirse en nitrógeno líquido o isopentano, o enterrando la muestra en hielo seco, este se corta con un criostato y pueden almacenar a -80 °C durante máximo 1 año.

- II. **Recuperar antígenos:** Es un método de recuperación (desenmascaramiento) de epítomos que pudieron perderse durante el proceso de fijación, ya que este puede ocasionar entrecruzamientos de proteínas, lo que enmascararía los epítomos, pudiendo restringir la unión antígeno-anticuerpo (abcam, s. f.; Ramos-Vara & Miller, 2014). Existen dos métodos de recuperación, uno que es el de epítomos inducidos por proteolíticos (PIER), en este se utilizan enzimas (proteínasa K, tripsina o pepsina) o reactivos PIER; mientras en el método de recuperación de epítomos inducidos por calor (HIER) se utiliza calor de una variedad de fuentes (microondas, vapor, etc.) para desenmascarar epítomos (abcam, s. f.; Javois, 1999; Pohanka, 2009; Ramos-Vara & Miller, 2014). Según abcam (s. f.) existen algunos antígenos (ej. cadenas ligeras de inmunoglobulina) que se pueden recuperar de forma más fácil mediante una combinación de calentamiento y digestión enzimática. Aunque, hay que tener en cuenta que el uso del método de digestión enzimática puede destruir algunos epítomos y la morfología del tejido (Javois, 1999). Después de todo esto se debe realizar la permeabilización (esta se realiza con disolventes), dado que permite que el anticuerpo acceda a los antígenos intracelulares (abcam, s. f.).
- III. **Reducción de la inmunotinción no específica:** Este punto va a depender del tipo de tejido y el método de detección de antígeno que fue utilizado, ya que hay métodos en los que sea necesario bloquear enzimas y/o biotinas antes de la tinción con los anticuerpos para evitar la unión no específica de anticuerpos al tejido o a los receptores Fc (abcam, s.f.; Ramos-Vara & Miller, 2014). Para esto se puede utilizar suero (preferentemente suero que contenga la misma especie de anticuerpos), puesto que este contiene anticuerpos que se unen a sitios no específicos (abcam, s.f.).
- IV. **Inmunotinción:** Se basa en la especificidad del anticuerpo primario para el antígeno diana, en donde el anticuerpo es detectado directamente a través de un marcador (sea una enzima como HRP o AP, etc.) y este se conjuga directamente (Ig primaria) o de manera indirecta (Ig secundaria) (ej. Sí se usa un anticuerpo primario generado en un

perro, se debe usar un anticuerpo secundario anti-perro generado en una especie que no sea un perro) (abcam, s. f.). El anticuerpo se visualiza mediante:

- a. Enzima que convierten un sustrato soluble en un producto cromogénico insoluble, esto lo hacen uniéndose generalmente a anticuerpos secundarios, pero también con anticuerpos primarios para la detección directa; las enzimas más utilizadas son HRP, que convierte DAB y, AP que convierte el 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (abcam, s.f.). La ventaja de este tipo de detección es que es más sensible que la fluorescente, adicional que los precipitados coloreados son más fotoestables (se puede almacenar en el portaobjetos por años); empero, la preparación de este es mucho más largo (abcam, s.f.). Actualmente se utilizan cuatro métodos cromogénicos indirectos: ABC, el cual está basado en anticuerpos secundarios biotinilados que actúan como enlaces entre un anticuerpo primario unido al tejido y un complejo de enzima informadora-avidina-biotina; LSAB,) es similar al método ABC porque utiliza un anticuerpo secundario biotinilado que une un anticuerpo primario a un conjugado de estreptavidina-enzima; Polímero, utiliza un esqueleto de dextrano al que se unen múltiples moléculas enzimáticas y anticuerpos secundarios, la unión de anticuerpo secundario-esqueleto de dextrano luego se une al anticuerpo primario; Micropolímero, los micropolímeros no tienden a agregarse ya que no contienen un esqueleto de dextrano y brindan mayor sensibilidad a través de una mejor penetración en el tejido que los métodos con polímeros (abcam, s.f.).
- b. Fluorescente, utilizan etiquetas de fluorocromo que emiten luz de una longitud de onda más larga cuando se excitan con luz de una longitud de onda específica y se usa comúnmente para visualizar múltiples antígenos simultáneamente. (abcam, s.f.).

5.2. Protocolo de toma de fotografías y posterior cuantificación en ImageJ

Después de la realización del ensayo de IHC es necesaria la toma de fotografías de los tejidos que pasaron por esta o por la IF, debido a que estas nos permiten realizar la cuantificación de lo hallado con las técnicas mencionadas anteriormente. En el laboratorio de neurociencias del departamento de Psicología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, se emplea el siguiente protocolo:

5.2.1. Materiales

Según el Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia (2021) estos son los materiales que deben utilizar para llevar a cabo este protocolo:

- Microscopio óptico Axiostar Plus Zeiss
- Cámara AxioCam ERc 5s
- Computador con ZEN Studio e ImageJ (o FIJI)
- Láminas para cuantificación
- Alcohol 70%
- Una cuchilla Paramount de 10
- Una hoja de papel de arroz
- Bitácora

5.2.2. Preparación

- i. Organizar las láminas en su respectiva caja con los controles y luego el tejido de los sujetos experimentales (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- ii. Revisar una a una las láminas para evaluar si existen excesos de citorresina para posteriormente eliminarlas, de ser así tomar la cuchilla Paramount y raspar suavemente el exceso hasta que lo haya retirado, por último, limpiar la lámina con alcohol y papel de arroz (si no se tiene papel de arroz, puede utilizar una toalla Zeiss para realizar la limpieza final

- de la lámina) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- iii. Calcular la cantidad de fotos a tomar, teniendo en cuenta la cantidad de láminas, cortes y estructuras que rastreará (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
 - iv. De ser necesario, dibujar en un acetato o imprimir mapas con los indicadores que facilitarán la ubicación de sus estructuras de interés (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).

5.2.3. Configuración microscopio

- 1) Encender el computador que está conectado al microscopio, verificar que el programa ZEN Studio esté funcionando de forma correcta (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- 2) Encender el microscopio con el botón verde que se encuentra en el costado derecho. La luz del foco deberá encenderse y ser visible a través de los oculares, de lo contrario, revisar si la perilla ubicada a la derecha de los oculares está en modo “Cámara” (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- 3) Poner la primera lámina (generalmente, el control positivo de su IHC) con la parte superior o dorsal de los tejidos mirando hacia usted, ajustar el zum con los tornillos macro y micrométricos hasta que pueda notar el background del tejido, así como la marca de su anticuerpo en el objetivo de 5x (debe ajustar las condiciones de luz con la perilla ubicada en el costado derecho, con tejidos de 40um funciona bien la intensidad de 3. Tenga en cuenta que esta medida deberá ajustarse de acuerdo con el objetivo que utilice) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- 4) Una vez ubique su estructura de interés con el objetivo de 5x aumente progresivamente de objetivos hasta que la imagen capte únicamente su estructura (generalmente, 20x con estructuras grandes y 40x con las más pequeñas) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- 5) Cuando haya determinado el objetivo adecuado, active la cámara girando el interruptor ubicado en la parte superior derecha. En el programa ZEN Studio, en el botón “Live” deberá

verse la imagen que había identificado en los oculares (generalmente pierde un poco de enfoque, así que deberá ajustarlo con el tornillo micrométrico nuevamente) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).

5.2.4. Configuración ZEN Studio

Ahora con la imagen en vivo (“Live”) es necesario ajustar los parámetros del procesamiento de la imagen, así que se deben seguir los siguientes pasos:

- A. Debe asegurarse que el programa tome las fotografías en blanco y negro para facilitar la cuantificación en ImageJ, esto puede configurarlo en la sección “Mode”, seleccionando la opción B/W (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- B. Debe ajustar el tiempo de exposición para controlar el contraste entre la marca y el background, esto se puede configurar en la sección “Exposure time”, modificando la cantidad de milisegundos (ms) que mejor funcionen con su tejido (Recuerde que depende del grosor de este; con tejidos de 40um, 80ms han mostrado buenos resultados) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- C. Finalmente, antes de tomar la fotografía, es necesario que ajuste el histograma que controlará los valores de la señal (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022). El rango original es de 0 a 255 unidades, pero puede ajustarlo de 50 a 200 para reducir la cantidad de ruido de la imagen en vivo sin perder señal. Esto puede realizarlo en la parte inferior izquierda (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- D. Una vez ajustados todos los parámetros, seleccione el botón “Snap” y la foto se tomará automáticamente. Se creará una nueva pestaña con la imagen capturada (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- E. En el histograma, modifique el rango para eliminar el ruido; debe seleccionar la opción “Min/Máx”; luego, de clic derecho sobre el nombre de la imagen en la pestaña superior y seleccione la opción “Save” (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).

- F. Seleccione la carpeta en la cual guardará las fotos, nombre la imagen teniendo en cuenta que debe ser fácilmente identificable y seleccione la opción “jpeg” (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022). Una sugerencia para el nombre sería “Estructura_Sujeto_Objeto_Hemisferio” pero realmente depende del tipo de ensayo que vaya a cuantificar (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).

5.2.5. Cuantificación en ImageJ

- A. Una vez tenga todas las fotografías de la misma estructura. Abra el programa ImageJ o FIJI en su computador (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- B. Seleccione la opción “File”, luego “Open” y en la ventana emergente, seleccione la fotografía del control positivo de su estructura de interés (todas las fotografías deben estar separadas por estructuras en diferentes carpetas. Esto facilitará el proceso de cuantificación) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- C. Seleccione la opción “Image”, luego “Type” y de clic en “8-bit” (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- D. Seleccione la opción “Process”, luego “Subtract Background”. En la ventana emergente, establezca el “Rolling ball radius” en 50 píxeles y seleccione las opciones “Light Background” para eliminar parte del ruido de la fotografía y “Preview” para evaluar el cambio (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
- E. Seleccione la opción “Image”, luego “Adjust” y “Threshold”. En la ventana emergente aparecerá un histograma. El rango de cambio está entre las 0-255 unidades, debe ajustar el rango para tomar la señal de su marca. Generalmente, para las imágenes de 20 y 40x el rango debería ser 0-240 (recuerde que estas condiciones pueden variar dependiendo de su tejido y demás modificaciones al protocolo) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).

-
- F. Seleccione la opción “Process”, luego “Binary” y en el menú seleccione “Make Binary” (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
 - G. Luego, siguiendo la ruta inicial para llegar al menú anterior. Seleccione las opciones “Erode”, “Fill holes” y “Watershed” para eliminar el resto del ruido, mejorar el contraste con el fondo y dar mejor forma a la marca (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
 - H. Para establecer los parámetros que el programa utilizará para hacer la cuantificación, es necesario tener las medidas del mayor y menor objeto; utilice la herramienta de dibujo de círculos para realizar una circunferencia alrededor del objeto de mayor tamaño. Una vez el dibujo coincida con el borde del objeto, seleccione la opción “Analyze”, luego “Measure” y anote el valor del área; realice el mismo procedimiento con el objeto de interés de menor tamaño y registre el rango en su bitácora con valores cerrados por debajo y encima (el rango que fue creado con el valor mínimo y máximo del área de estos objetos será utilizado para cuantificar todas las imágenes de esta estructura) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
 - I. Seleccione la opción “Analyze Particles”; en la ventana emergente, modifique los valores de “Size” con los valores mínimo y máximo registrados previamente. Se sugiere que utilice un rango de circularidad entre los 0,50 y 1,00; en la opción “Show”, seleccione “Outline”; adicionalmente, seleccione las casillas de “Display results”, “Summarize” e “In situ show” para poder evaluar si la cuantificación resultó exitosa (el éxito de la cuantificación se evalúa dependiendo de la cantidad de marca que se pierda o la cantidad de mugre que se cuenta como marca, sí se presenta un alto nivel de falso positivo o negativo, debe ajustar parámetros como el rango del threshold, del área o la circularidad) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).
 - J. Al finalizar el conteo de todas las imágenes de la estructura de interés, seleccione la opción “Save as” en la ventana “Summary” y guarde el archivo como un .CSV (CommaSeparatedValues) (Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, 2022).

6. Conclusión

Las técnicas de inmunohistoquímica desde su advenimiento hasta el día de hoy han contribuido enormemente al ámbito clínico y al científico. En este último las disciplinas que más la utilizan y por ende se han beneficiado de ella han sido la bioquímica, las neurociencias, la farmacología, la biología molecular, la genética y la fisiología; utilizándola con el fin de obtener información de las funciones que las proteínas están realizando (mejor dicho, estuvieron realizando antes de la fijación y que esta ayudó a conservar como una fotografía del momento) dentro del grupo celular (tejido) de interés como las enzimáticas, las estructurales, entre otras. A pesar de todo, muchas de estas investigaciones son realizadas en sujetos, comúnmente ratas o ratones, y no tienen en cuenta como variable lo que estos hacen, es decir, las relaciones funcionales que se establecen entre los eventos ambientales y el comportamiento, siendo esto un groso error debido a que esta relación puede influir en algún grado en los procesos bioquímicos que pueden ocurrir en la expresión, síntesis o transcripción de las proteínas y por ende en sus funciones. Aunque, es de entender que quizá para la gran mayoría de las disciplinas que utilizan IHC es de poco interés esta relación funcional y sus posibles implicaciones en los procesos proteicos, a lo mejor porque su objeto de estudio no es la conducta, al contrario de la psicología y más específicamente aquella de tradición no mediacional. La psicología como ciencia básica puede aportar su método de estudio, el análisis funcional (AF) y así establecer las relaciones funcionales que pudieron ser causales de dichos procesos proteicos y/o de aquellas conductas que pudieron ser causadas por estos, generando así un rico complemento explicativo de todos esos procesos bioquímicos que ocurren antes o después de que se genere una conducta.

Empero, la psicología no sólo aporta su método en la investigación interdisciplinar, esto debido a que científicos de la disciplina psicológica en distintos lugares del mundo han utilizado la IHC en los fenómenos netamente psicológicos como los procesos psicológicos básicos a través de los aspectos estructurales y funcionales del encéfalo por medio de las distintas funciones proteicas en relación directa con comportamientos y procesos cognoscitivos específicos, permitiendo así no sólo conocer las bases neurobiológicas de la conducta sino también complementar toda aquella información que es adquirida por medio del análisis funcional de la conducta, resultando en una explicación más completa que podría no solo aportar al corpus científico sino también aumentar la probabilidad de predicción y de control de la conducta “normal” como patológica. En efecto, todo esto podría ser encauzado en el desarrollo de tecnologías que contribuyan la mejora en el

diagnóstico y pronóstico de las enfermedades psiquiátricas, así como en los procesos de aprendizaje, entre otros. Una línea prometedora de investigación que se podría continuar en psicología sería con las proteínas de la familia FOS, las cuales están implicadas en distintos procesos como las adicciones, el estrés, etc. Y podrían ser candidatos de biomarcadores para predecir la aparición de ciertas conductas, patologías y sí un tratamiento contra la adicción o el estrés está funcionando.

Es menester recordar que estas observaciones que se obtienen en el laboratorio y que no tienen en cuenta las relaciones causales de la interacción entre la conducta y las características del medio ambiente, no dicen nada por sí mismas de lo que hace un organismo; como tampoco un AF puede explicar qué es lo que ocurre en el sistema nervioso de un sujeto y cómo el funcionamiento de este puede, por ejemplo, a través de la transcripción, la traducción y síntesis de ciertas proteínas aumentar o disminuir la probabilidad de emisión de ciertas conductas. Por consiguiente, es necesario afirmar que, para acrecentar el nivel de conocimiento en el estudio de los procesos psicológicos y las bases neurobiológicas de la conducta, no es suficiente con la utilización de la IHC y el AF, sino que también se debe recurrir a los métodos electrofisiológicos, imagenológicos, etc. para así tener una comprensión mayor de los fenómenos psicológicos de interés.

Referencias

- abcam. (2022a). *Guide to Antibody structure and isotypes*. <https://bit.ly/3uwBdsE>
- abcam. (2022b). *Antigens*. <https://bit.ly/3IwAMEj>
- abcam. (s. f.). *Immunohistochemistry Application Guide*. <https://bit.ly/3PcOzSv>
- Anaya, J. M., Cervera, R., Shoenfeld, Y., Levy, R. A., & Rojas-Villarraga, A. (2013). *Autoimmunity*. El Rosario University Press.
- Aoki, V., Sousa Jr, J. X., Fukumori, L. M. I., Pérego, A. M., Freitas, E. L., & Oliveira, Z. N. P. (2010). Imunofluorescência direta e indireta. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(4), 490–500. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962010000400010>
- Avrameas, S., & Uriel, J. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion [Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]. *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles*, 262(24), 2543-2545.
- Ballesteros Cadena, D. (2018). *Efectos del estrés agudo sobre la reconsolidación de la memoria espacial y el patrón de expresión de la proteína c-Fos* [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia.
- Burry, R. W. (2011). Controls for Immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(1), 6–12. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956920>
- Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*, 47(2), 200–202. <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084p>
- Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 47(2), 200-202.
- CUSABIO. (s. f.-a). *What Is an Antibody?* <https://bit.ly/3nQTqNy>
- CUSABIO. (s. f.-b). *The difference between primary antibody and secondary antibody*. <https://bit.ly/3P4IN5w>
- Das, S., Nikolaidis, N., Klein, J., & Nei, M. (2008). Evolutionary redefinition of immunoglobulin light chain isotypes in tetrapods using molecular markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16647–16652. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808800105>

- Department of Biology. (2001). *Immunofluorescence Method*. Davidson College. <https://bit.ly/3c3u1Oh>
- Ding, S., Gan, T., Xiang, Y., Zhu, X., Jin, Y., Ning, H., Guo, T., Zhao, S., Xie, J., & Yuan, Z. (2022). FOS gene associated immune infiltration signature in perivascular adipose tissues of abdominal aortic aneurysm. *Gene*, *831*, 146576. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146576>
- Hatanaka, Y., Imaoka, Y., Torisu, K., Kamihara, Y., Hashizume, K., Ichimura, K., Yoshino, T., & Tani, Y. (2008). A Simplified, Sensitive Immunohistochemical Detection System Employing Signal Amplification Based on Fluorescyl-Tyramide/Antifluorescein Antibody Reaction: Its Application to Pathologic Testing and Research. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *16*(1), 87–93. <https://doi.org/10.1097/pai.0b013e31802ca9ea>
- Hernández, P. J., & Abel, T. (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiology of learning and memory*, *89*(3), 293–311. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.09.010>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2018). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in Molecular Biology*, 299–311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Jaffe, E. S., Harris, N. L., Arber, D. A., Campo, E., Quintanilla-Fend, L., & Quintanilla-Martínez, L. (2016). *Hematopathology* (2nd ed.). Elsevier Gezondheidszorg.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology* (5th ed.). Garland Science.
- Javois, C. L. (2022). *Immunocytochemical Methods and Protocols (English Edition)*. Humana Press.
- Javois, L. C. (1999). *Immunocytochemical Methods and Protocols* (2nd ed., Vol. 115). Humana Press.
- Joshi, S., & Yu, D. (2017). Immunofluorescence. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 135–150. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803077-6.00008-4>
- Kaliyappan, K., Palanisamy, M., Duraiyan, J., & Govindarajan, R. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, *4*(6), 307. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100281>
- Keirle, M., Warric, E., Thomas, M., & Sharrio, C. (2014). *Biological Macromolecules*. Saint Francis College. <https://bit.ly/3ADHmHm>
- Kroemer, T. (s. f.). *An Introduction to Primary Antibodies and Secondary Antibodies*. GOLBIO. <https://bit.ly/3ys106f>

- Kumar, G. L., & Rudbeck, L. (2009). *Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition* (5.^a ed.). Dako.
- Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia. (2021). *Protocolo de toma de fotografías y cuantificación*. Laboratorio de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia.
- Lamprea, M., & Munera, A. (2007). Presentación. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 39(1), 9–11.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- Luyck, K., Nuttin, B., Arckens, L., & Luyten, L. (2019). Behavioral and neural assessment of high-frequency stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis in a rat model of anxiety. *Brain Stimulation*, 12(2), 562. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.12.862>
- Marrack, J. (1934). Nature of Antibodies. *Nature*, 133(3356), 292–293. <https://doi.org/10.1038/133292b0>
- Mason, D. Y., & Sammons, R. (1978). Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *Journal of Clinical Pathology*, 31(5), 454–460. <https://doi.org/10.1136/jcp.31.5.454>
- Milde-Langosch, K. (2005). The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *European Journal of Cancer*, 41(16), 2449–2461. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.008>
- Nader, K., Schafe, G. E., & le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Nakabeppu, Y., & Nathans, D. (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell*, 64(4), 751–759. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90504-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90504-r)
- Nakane, P. K., & Pierce, G. B. (1966). Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 14(12), 929–931. <https://doi.org/10.1177/14.12.929>
- National Human Genome. (s. f.). *Antibody*. Genome.Gov. <https://bit.ly/3O7PxPj>
- National Library of Medicine. (s. f.). *FOS Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit [Homo sapiens (human)]*. NIH. <https://bit.ly/3yvmUp4>

- Nestler, E. J. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3245–3255. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0067>
- O'Shea, E. K., Rutkowski, R., & Kim, P. S. (1992). Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell*, 68(4), 699–708. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90145-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90145-3)
- Odell, I. D., & Cook, D. (2013). Immunofluorescence Techniques. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.455>
- Olsen, C. M. (2011). Natural rewards, neuroplasticity, and non-drug addictions. *Neuropharmacology*, 61(7), 1109–1122. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.03.010>
- Page Faulk, W., & Malcolm Taylor, G. (1971). Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*, 8(11), 1081–1083. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90496-4](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90496-4)
- Pepper, I. L., Gerba, C. P., & Gentry, T. J. (Eds.). (2014). Environmental Microbiology. *Chapter 12. Immunological Methods* (3.^a ed., pp. 245–269). Amsterdam University Press.
- Pérez, V., Gutiérrez, M., García, A., & Gómez, J. (2018). *Procesos Psicológicos Básicos. Un Análisis Funcional*. UNED.
- Perrotti, L. I., Hadeishi, Y., Ulery, P. G., Barrot, M., Monteggia, L., Duman, R., & Nestler, E. (2004). Induction of FosB in Reward-Related Brain Structures after Chronic Stress. *Journal of Neuroscience*, 24(47), 10594–10602. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2542-04.2004>
- Pham, P. V. (2018). Medical Biotechnology. *Omics Technologies and Bio-Engineering*, 449–469. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804659-3.00019-1>
- Pitchers, K. K., Frohmader, K. S., Vialou, V., Mouzon, E., Nestler, E. J., Lehman, M. N., & Coolen, L. M. (2010). Δ FosB in the nucleus accumbens is critical for reinforcing effects of sexual reward. *Genes, Brain and Behavior*, 9(7), 831–840. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2010.00621.x>
- Pohanka, M. (2009). Monoclonal and polyclonal antibodies production - preparation of potent biorecognition element. *Journal of Applied Biomedicine*, 7(3), 115–121. <https://doi.org/10.32725/jab.2009.012>
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along. *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87. <https://doi.org/10.1177/0300985813505879>

- Renaud, S. J., Kubota, K., Rumi, M. A., & Soares, M. J. (2014). The FOS transcription factor family differentially controls trophoblast migration and invasion. *The Journal of biological chemistry*, 289(8), 5025–5039. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523746>
- Ribes, E. (2018). *El Estudio Científico De La Conducta Individual: Una Introducción A La Teoría De La Psicología* (1.^a ed.). Manual Moderno.
- Rodríguez, F., Cristina, B., Emilio, D., Jiménez-Moya, F., Gómez, A., Francisco, O., & Salas, C. (2005). *Fundamentos de neurociencia*. McGraw-Hill Education.
- Routtenberg, A. (2008). The substrate for long-lasting memory: If not protein synthesis, then what? *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.012>
- Sabogal-Guáqueta, A. M., Carrillo-Hormaza, L., Osorio, E., & Cardona-Gómez, G. P. (2018). Effects of biflavonoids from *Garcinia madruno* on a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 129, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.002>
- Sabogal-Guáqueta, A. M., Muñoz-Manco, J. I., Ramírez-Pineda, J. R., Lamprea-Rodríguez, M., Osorio, E., & Cardona-Gómez, G. P. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, 93, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.027>
- Saper, C. B. (2009). A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57,1-5.
- Saper, C. B., & Sawchenko, P. E. (2003). Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *Journal of Comparative Neurology*, 465,161-163.
- Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). Memory Consolidation of Auditory Pavlovian Fear Conditioning Requires Protein Synthesis and Protein Kinase A in the Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), RC96. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-18-j0003.2000>
- Skinner, B. F. (1965). *Science and Human Behavior* (New Impression ed.). Free Press.
- Skinner, B. F. (1991). ¿Qué sucedió con la psicología como ciencia de la conducta? En *El análisis de la conducta: Una visión retrospectiva*.
- Wallace, D. L., Vialou, V., Rios, L., Carle-Florence, T. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Graham, D. L., Green, T. A., Kirk, A., Iniguez, S. D., Perrotti, L. I., Barrot, M., DiLeone, R. J., Nestler, E. J., & Bolanos-Guzman, C. A. (2008). The Influence of FosB in the Nucleus Accumbens on Natural Reward-Related Behavior. *Journal of Neuroscience*, 28(41), 10272–10277. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1531-08.2008>