

## Práctica 2. Anatomía Microscópica

### Introducción

La citoarquitectura describe la organización de los somas neuronales en forma de núcleos o capas en las diferentes regiones del encéfalo y médula espinal. Los métodos más usados para los estudios citoarquitectónicos son las tinciones de tipo Nissl, con las cuales se tiñen todas las neuronas presentes en el tejido, obteniéndose información sobre el tamaño, afinidad tintorial y grado de empaquetamiento de los somas neuronales en las distintas estructuras del sistema nervioso central. A partir de los datos citoarquitectónicos se obtienen mapas de todo el encéfalo (atlas citoarquitectónicos). Cualquier estudio sobre una región determinada del encéfalo o médula espinal debe de comenzar con un análisis citoarquitectónico de la región.

La quimioarquitectura describe la organización de las células nerviosas atendiendo a la presencia de ciertos componentes químicos (neurotransmisores, enzimas, receptores, proteínas, etc.). Los métodos empleados para los estudios quimioarquitectónicos pueden ser de dos tipos: inmunotinciones y tinciones histoquímicas. Las primeras se basan en la unión de anticuerpos específicos con moléculas presentes en las neuronas. En las segundas se pone de manifiesto una determinada actividad enzimática presente en las células. La diferencia fundamental entre las técnicas inmuno-histoquímicas y las tinciones de tipo Nissl es que en las primeras solamente se tiñen aquellas células que presentan un determinado componente “químico” o una cierta actividad enzimática. Un determinado núcleo, definido citoarquitectónicamente, puede ser heterogéneo desde el punto de vista químico. Ambos tipos de estudio, citoarquitectónico y quimioarquitectónico, se complementan entre sí.

### Objetivos y Metodología

El objetivo principal de esta práctica es mostrar cómo diferentes métodos de tinción aportan distinta información sobre una determinada región del sistema nervioso.

En esta práctica se va a realizar una tinción de tipo Nissl (citoarquitectónica), junto con una técnica histoquímica (quimioarquitectónica), en encéfalo de ratón. Ambas tinciones se realizan sobre cortes histológicos de material fijado. La fijación se realiza según el procedimiento general usado para la mayoría de los órganos animales, que consiste básicamente en la fijación *in situ* del encéfalo, mediante perfusión vascular (primero con solución salina y después con el fijador- paraformaldehído al 4% en tampón), seguida por una fijación por inmersión.

El primer día de práctica se realizarán los cortes histológicos, a partir de encéfalo de ratón previamente fijado, sobre los cuales se van a realizar los dos tipos de tinciones.

### Tinción de tipo Nissl con violeta de cresilo

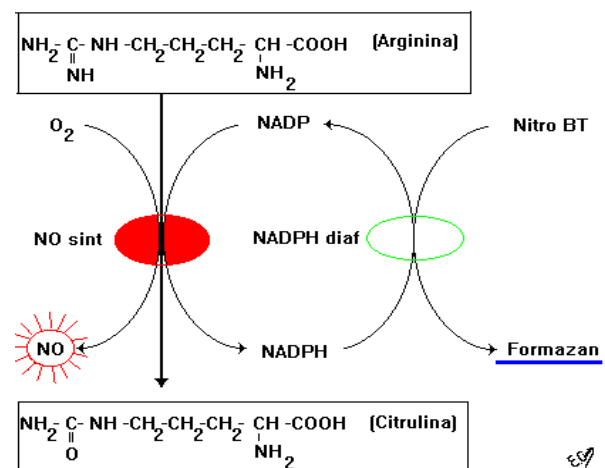
El violeta de cresilo es un colorante acidófilo, que tiñe el núcleo celular y el retículo endoplasmático rugoso (sustancia de Nissl), por lo que se emplea para las tinciones generales del sistema nervioso.

La tinción se realiza con los cortes pegados al portaobjetos y el protocolo básico es el siguiente:

1. Lavado de los cortes en agua destilada (1-3 minutos)
2. Tinción con violeta de cresilo al 1% (5-10 minutos)
3. Lavado en agua destilada (aprox. 1 minuto)
4. Diferenciación en alcohol-acético (etanol 70% con ácido acético) (aprox. 15 segundos)
5. Deshidratación (etanol 96%, etanol 100%), aclarado y montaje

### Tinción histoquímica (NADPH-diaforasa)

La diaforasa pertenece al grupo de las deshidrogenasas, enzimas capaces de eliminar hidrógeno de los sustratos y transferirlo a otra sustancia aceptora. La NADPH-diaforasa cataliza la deshidrogenación del NADPH. En la práctica, se utiliza la reacción de la diaforasa sobre el NADPH para reducir un compuesto dando un producto coloreado. El sustrato utilizado es el NADPH y la sustancia aceptora es una sal de tetrazolio (nitro blue tetrazolium, NBT).



La técnica histoquímica empleada “tiñe” las neuronas que presentan actividad diaforasa. La actividad NADPH-diaforasa es una actividad enzimática alternativa de la sintasa del óxido nítrico, por lo que la detección histoquímica de la diaforasa nos marca de manera indirecta la sintasa del óxido nítrico, o lo que es lo mismo las neuronas productoras de óxido nítrico.

La tinción se realiza sobre cortes “libres”, sin pegar a portaobjetos. El protocolo básico es el siguiente:

1. Lavado de los cortes en tampón fosfato (PB) 0.1M
2. Preincubación de los cortes en PB con un 0.25% de Triton X-100, (aprox. 10 minutos)
3. Incubación en una solución que contiene: 0,5 mg/ml de NADPH y 0,2 mg/ml de Nitro Blue Tetrazolium en PB 0.1M, con 0,25% de Triton X-100 (aprox. 10 minutos a temperatura ambiente)
4. Colocar en estufa a 37°C durante varias horas (controlar).
5. Parar la reacción con varios lavados en PB 0.1M
6. Lavado de los cortes en agua destilada y pegado sobre portaobjetos
7. Deshidratación (etanol 96%, etanol 100%), aclarado y montaje