

### Práctica 3. Estudio de las conexiones neuronales

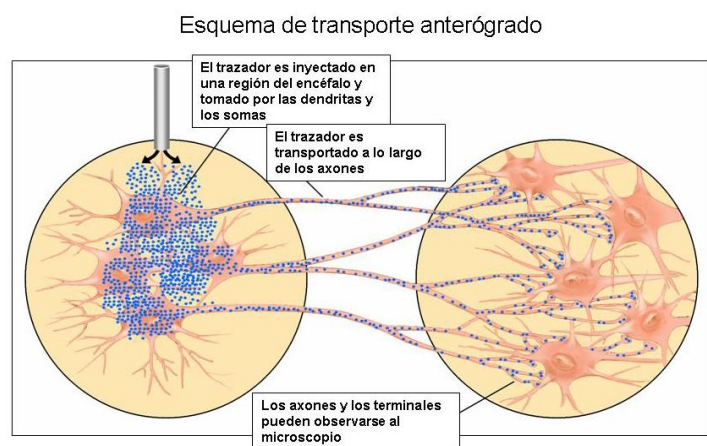
#### Introducción

A lo largo de la historia se han desarrollado distintos métodos para estudiar las conexiones dentro del sistema nervioso. Algunos de los primeros métodos consistían en analizar los cambios degenerativos o reactivos de las neuronas tras una lesión. Los axones y los terminales axónicos degeneran (degeneración "Walleriana") y estas estructuras degeneradas podían teñirse selectivamente debido a su mayor afinidad por las sales de plata.

Actualmente, la mayoría de las técnicas de trazado se basan en la utilización de sustancias, denominadas trazadores, que son incorporadas por las neuronas y transportadas a lo largo de sus prolongaciones mediante un mecanismo de transporte activo. Diferentes trazadores pueden transportarse en sentido anterógrado (desde el soma a los terminales axónicos), en sentido retrógrado (desde los terminales al soma), o en ambos sentidos.

En general, estos métodos se realizan inyectando la molécula trazadora en la región que se pretende estudiar con el animal anestesiado. Posteriormente, se deja un tiempo de supervivencia, que dependerá de la distancia a la que se tenga que transportar el trazador, para que éste sea transportado por los axones de

las neuronas. Transcurrido ese tiempo, se procede al sacrificio del animal y se procesa el encéfalo para determinar las células de origen, el recorrido de los axones marcados y las dianas de la proyección. Dependiendo del trazador empleado se pueden utilizar diferentes métodos para detectarlo. Algunos trazadores, como la HRP (peroxidasa de rábano) tienen actividad enzimática y se detectan revelando dicha actividad; otros son fluorescentes y se visualizan directamente al microscopio de fluorescencia; mientras que otros se visualizan utilizando una inmunotinción con anticuerpos dirigidos específicamente contra el trazador. Uno de los aspectos más importantes en los métodos de trazado es la localización del trazador. Es importante que el trazador sea administrado con precisión y con mínima dispersión. Además, debe determinarse el tiempo óptimo de supervivencia o incubación



tras la inyección o aplicación del trazador (puede variar desde pocos segundos a semanas o meses). Tiempos demasiado cortos pueden resultar en un marcaje incompleto de la proyección, mientras que tiempos demasiado largos pueden aumentar el marcaje inespecífico.

## **Objetivos y Metodología**

El objetivo de esta práctica es realizar una técnica que nos permita conocer las conexiones neuronales a larga distancia. La técnica elegida utiliza como sustancia “trazadora” el colorante lipofílico fluorescente Dil. Este método tiene la gran ventaja de que puede realizarse sobre tejido fijado.

El colorante lipofílico Dil (1,1',dioctadecil-3,3,3'3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato) pertenece a una familia de colorantes fluorescentes cuyo elemento común es la carbocianina. Se trata de moléculas que presentan un alto grado de hidrofobicidad y que fluorescen emitiendo luz de una determinada longitud de onda, al ser estimuladas con luz ultravioleta. El Dil presenta una absorción máxima a 549 nm y una emisión máxima a 565 nm (fluorescencia roja-amarilla).

Su estructura química y su carácter altamente lipofílico facilita su inserción en la fracción lipídica de la membrana plasmática, donde difunde libremente. Este carácter ha permitido que su empleo se extienda a las técnicas de marcaje de las vías nerviosas, es decir, se emplea como trazador neuronal tanto anterógrado como retrógrado, ya que las moléculas de Dil una vez incorporadas a la bicapa lipídica de la membrana celular (a nivel de soma, dendritas o axón) difunden a lo largo de la neurona trazando su recorrido. La principal ventaja de estos colorantes es que pueden usarse para marcar neuronas y sus prolongaciones en tejido que ha sido fijado previamente con fijadores aldehídicos. Las prolongaciones neuronales y los somas se marcan a considerables distancias tanto en sentido anterógrado como retrógrado. En tejidos fijados, la tinción ocurre por un proceso de difusión del colorante a lo largo de la membrana plasmática de las células. La velocidad de difusión varía según la temperatura.

## **Protocolo básico**

El método de trazado que vamos a emplear se realiza sobre material fijado, por lo que los pasos iniciales consisten en la fijación del tejido. 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.

Una vez que tenemos el encéfalo fijado se procederá a realizar la técnica de trazado propiamente dicha, cuyos pasos principales se comentan a continuación:

### 1. Colocación de los cristales

Este paso es crítico, ya que la precisión en la aplicación es determinante para poder interpretar los resultados. Un factor importante es el tamaño de los cristales de Dil, que deben ser pequeños para minimizar el área de difusión del colorante. Para preparar cristales suficientemente pequeños, se toman cantidades mínimas del producto y se disuelven en alcohol absoluto. Se extiende una gota sobre un portaobjetos y se deja evaporar en la oscuridad. De esta forma, el Dil recristaliza en cristales más pequeños que los originales. La colocación de los cristales en la región del encéfalo que queremos estudiar se realiza con ayuda de una lupa. Para ello, adherimos los cristales de Dil a la punta de una micropipeta de vidrio u otro objeto que posea una punta fina. Antes de colocar el cristal, se seca ligeramente la superficie para permitir que el colorante entre en contacto directo con el tejido y no quede flotando sobre la superficie de éste (recordemos que el Dil es hidrofóbico). Una vez colocado el cristal en la zona deseada, se cubre ésta con una gota de agar (al 4%) para evitar que el cristal de Dil pueda moverse durante el periodo de incubación

### 2. Incubación

La incubación se realiza colocando el tejido en paraformaldehído al 4% en PB 0.1M, en oscuridad y a 40°C de temperatura, durante un tiempo variable (desde algunos días hasta semanas) dependiendo de la longitud de la vía que se pretenda estudiar. Durante este tiempo, el colorante difunde pasivamente por las prolongaciones neuronales, desde el lugar de aplicación.

### 3. Corte y tinción

Transcurrido el período de incubación, se procede a la obtención de los cortes (entre 50 y 100 micras de espesor), mediante el vibratomo. Estos cortes pueden observarse directamente en el microscopio de fluorescencia, aunque para ayudarnos en la identificación de las regiones, los cortes pueden teñirse con un colorante fluorescente como el DAPI, que tiñe los núcleos celulares (fluorescencia azul). La tinción se realiza

colocando los cortes en una solución de DAPI (1  $\mu\text{g/ml}$  en agua destilada) durante 60 segundos. Una vez lavados con tampón PB 0.1M, se colocan los cortes sobre portaobjetos y se montan con glicerina al 50% en tampón PB 0.1 M.

#### 4. Observación

La observación se realiza en el microscopio de fluorescencia, usando los filtros adecuados.