

ARTICULOS DE REVISION

Nuevos trazadores neuronales y su utilización combinada

J. L. Lanciego, E. Mengual, E. Erro, J. M. Giménez-Amaya

Departamento de Anatomía. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

RESUMEN: Las técnicas de trazadores neuronales son una poderosa herramienta, cuyo uso se ha generalizado en los últimos años para el estudio de los circuitos cerebrales. Mediante su empleo, se puede conseguir describir en detalle el modo en que están conectadas dos o más zonas cerebrales, y así, obtener datos precisos acerca de cómo se procesa en un área cerebral concreta la información que se recibe simultáneamente por varias vías. El reciente desarrollo de protocolos que combinan el uso de varios trazadores ha supuesto un importante avance. A pesar de ser métodos muy exigentes a nivel técnico, estos protocolos de combinaciones múltiples de trazadores se han convertido en tecnología muy avanzada en varios laboratorios, y las posibilidades que tienen para su aplicación en Neurobiología son extraordinariamente versátiles.

SUMMARY: Neuroanatomical tract-tracing methods are powerful tools for the study of brain circuits. The use of axonal tracers has become very popular during the past few years. Tract-tracing allows us to study the way in which two or more brain areas are connected and can be used to obtain detailed data on the processing of information within a particular area. The recent development of protocols combining several tracers has resulted in an important breakthrough. Although technically very demanding, these multitracers procedures have become state of the art protocols in several laboratories, rendering a broad range of possibilities for their application in Neurobiology.

Palabras clave

Trazadores neuronales, PHA-L, BDA, Fluoro-Gold, Proteínas ligadoras de calcio, Peroxidasa, DAB, V-VIP, Inmunohistoquímica.

Key words

Axonal tracing, PHA-L, BDA, Fluoro-Gold, Calcium-binding proteins, Peroxidase, DAB, V-VIP, Immunohistochemistry.

Correspondencia

Dr. J.L. Lanciego
Departamento de Anatomía
Facultad de Medicina
Universidad de Navarra
31080 PAMPLONA.
Tel: 948-425600 ext 6235
Fax: 948-425649
email: jlanciego@unav.es

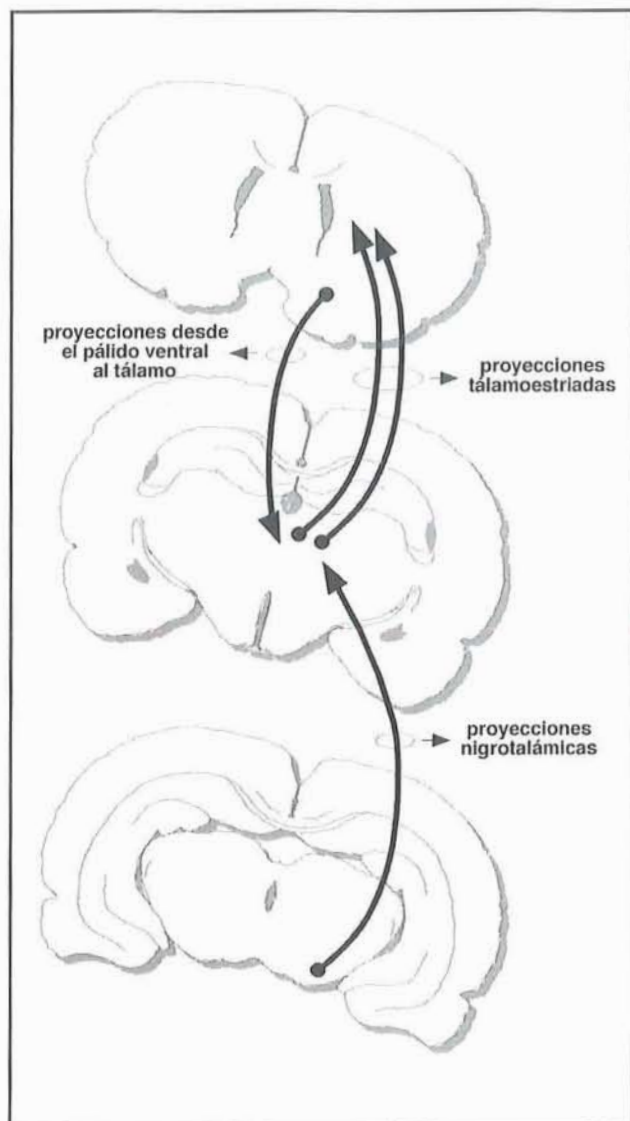
Introducción

Los métodos de trazado neuronal están basados en el transporte de unas sustancias químicas denominadas trazadores a través del axón de una neurona determinada. Cuando se deposita un trazador en el tejido cerebral, esta sustancia es captada por la neurona o por sus prolongaciones y transportada por el axón, ya sea desde el cuerpo neuronal hacia los terminales axónicos (transporte anterógrado), o bien a la inversa, esto es, desde los terminales axónicos hacia el soma celular (transporte retrógrado). En función de la dirección del transporte, los trazadores se clasifican en dos grandes grupos: trazadores anterógrados y retrógrados.

Las principales vías y circuitos nerviosos del sistema nervioso central se han venido estudiando desde finales del siglo pasado y principios del presente. Inicialmente, mediante el empleo de técnicas basadas en el método de Golgi y otras impregnaciones argénticas, así como mediante técnicas de degeneración, y más tardíamente con la aplicación de técnicas más específicas de trazadores nerviosos. Las técnicas de autorradiografía fueron los primeros métodos realmente

ARTICULOS DE REVISION

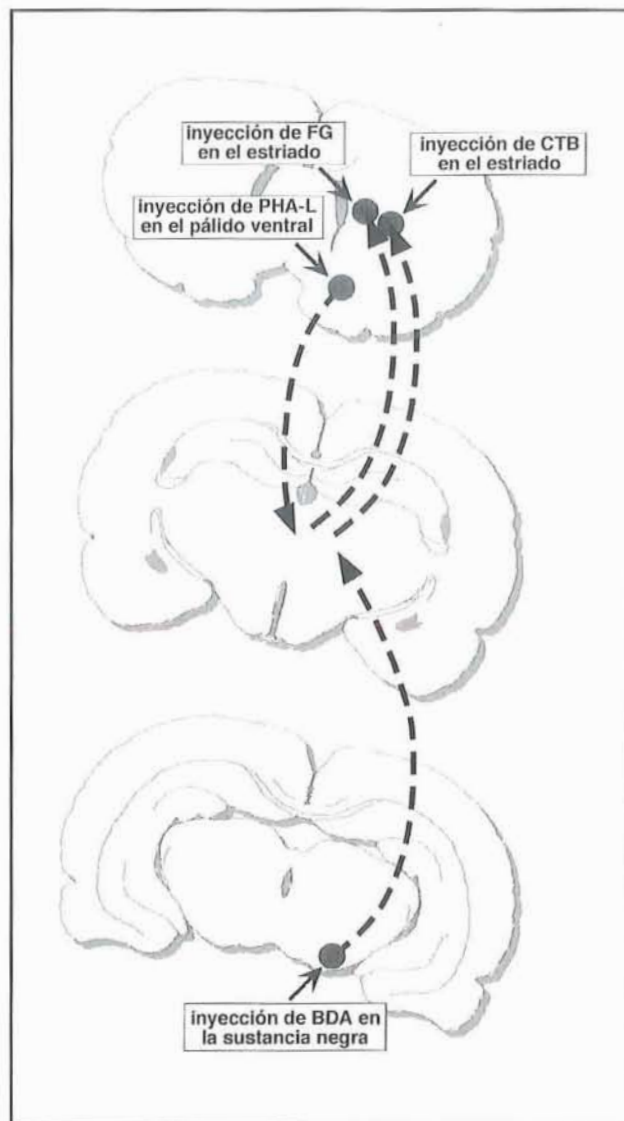
Figura 1



Esquema que muestra la convergencia existente a nivel talámico entre las proyecciones de entrada y salida de los ganglios basales en la rata.

basados en el transporte axónico y su uso se generalizó en la década de los años sesenta. En la siguiente década hizo su aparición como trazador retrógrado la peroxidasa de rabanilla (HRP), así como su variante conjugada con aglutinina de germen de trigo (HRP-

Figura 2



Esquema que muestra las zonas de inyección correspondientes a los distintos trazadores empleados en este estudio. PHA-L y BDA son transportados en sentido anterógrado, con lo que podremos visualizar en el tálamo cómo llegan los axones pertenecientes a las neuronas del pálido ventral y de la sustancia negra, respectivamente. FG y CTB son trazadores retrógrados, lo que nos permite identificar en el tálamo dos subpoblaciones neuronales que proyectan a distintas zonas del cuerpo estriado.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

WGA), la cual era transportada también anterógradamente, por lo que se le considera un trazador mixto (anterógrado y retrógrado). Tanto HRP como HRP-WGA han sido trazadores muy populares y continúan siendo perfectamente válidos hoy en día. Desde entonces y hasta la fecha, han sido numerosas las sustancias que se han incorporado al arsenal técnico disponible. Las últimas generaciones de trazadores incluyen sustancias como la lectina leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L, trazador anterógrado), sustancias fluorescentes como Fast Blue, Diamidino Yellow, Propidium Iodide y Fluoro-Gold (FB, DY, PI, FG, trazadores neuronales retrógrados), virus atenuados o sus fragmentos (herpes virus y virus de la rabia como trazadores retrógrados), toxinas bacterianas como la fracción beta de la toxina colérica (CTB, trazador retrógrado con cierto componente anterógrado), y finalmente la gran familia de los dextranos aminos, entre los que cabe destacar muy especialmente el dextrano amino biotinilado (BDA), que ha cosechado un gran éxito en la comunidad científica internacional.

Estas sustancias son inyectadas in vivo en el cerebro del animal experimental, y son detectadas posteriormente mediante técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas. Como resultado final de estas tinciones se obtiene un precipitado coloreado que sirve para identificar a cada trazador individualmente. Hoy en día es posible visualizar simultáneamente un total de tres trazadores nerviosos en una única sección histológica. En otras palabras, es posible marcar inequívocamente un total de tres vías nerviosas en tres colores diferentes (mediante el empleo de tres cromógenos distintos), para así poder proceder a su posterior estudio.

De esta manera, las posibilidades que se derivan del empleo combinado de trazadores neuronales para el estudio del sistema nervioso central son de gran envergadura. El simple conocimiento de los circuitos cerebrales así como de las interacciones que se establecen entre varias vías nerviosas no consiguen explicar por completo el funcionamiento cerebral, si bien estos estudios proporcionan datos de capital importancia para poder profundizar en dicho conocimiento.

Trazadores disponibles

Son varios los requisitos que tiene que cumplir una determinada sustancia para ser considerada como un trazador «ideal». En primer lugar, debe permitir la visualización completa de una neurona o de un grupo de neuronas, incluyendo las colaterales axónicas largas, las arborizaciones terminales y sus especializacio-

nes. Segundo, el área de inyección debe ser restringida y sin difusión. Tercero, el trazador debe ser transportado exclusivamente en una única dirección, anterógrada o retrógradamente. Cuarto, no debe haber captación por fibras de paso, ya sean éstas fibras intactas o dañadas. Quinto, el transporte debe ser restringido a una neurona o grupo de neuronas, sin dar lugar al denominado transporte transináptico. Sexto, la detección del trazador ha de ser sencilla, implicando un bajo coste en tiempo y recursos técnicos. Finalmente, es necesario que el trazador a emplear sea compatible con otros métodos, bien protocolos de más de un trazador o protocolos que combinen uno o varios trazadores con la detección inmunocitoquímica de sustancias neuroactivas. Igualmente debe ser posible realizar microscopía electrónica de las estructuras marcadas con el trazador neuronal.

No existe actualmente ningún trazador que cumpla todas y cada una de las condiciones arriba señaladas, si bien existen cuatro de ellos que se acercan bastante al concepto de «trazador ideal». Estos trazadores son, por orden de aparición en la literatura, PHA-L, FG, CTB y BDA. El trazador PHA-L fue descrito como trazador anterógrado a finales de 1984 y desde entonces permanece vigente como el único trazador que se puede considerar exclusivamente anterógrado (1,7). En el capítulo de los inconvenientes relacionados con este trazador, cabe señalar principalmente la escasa calidad de los anticuerpos que se utilizan para su revelado, así como cierta debilidad en su señal para microscopía electrónica. Con respecto a FG (5), este trazador fluorescente, exclusivamente retrógrado, tuvo hace unos años una espectacular popularidad (acompañado de un no menos espectacular lanzamiento comercial y excelentes imágenes obtenidas con su aplicación) seguida de cierto declive derivado de su naturaleza fluorescente, por los problemas inherentes a dicha fluorescencia (pérdida de la señal con el tiempo, problemas de combinaciones con otras técnicas, falta de microscopía electrónica, engorroso proceso de fotoconversión...). La reciente aparición de anticuerpos comerciales frente a FG, vuelven a colocar a este trazador en primera línea, pues permiten una sencilla conversión de la señal fluorescente a una señal de microscopía óptica convencional (seguida luego de microscopía electrónica), al tiempo que facilitan enormemente su combinación con otras técnicas. Otro trazador muy competitivo es CTB (6,8,9), que puede ser considerado como trazador retrógrado de segunda elección, ya que posee cierto componente anterógrado.

ARTICULOS DE REVISION

Finalmente, el trazador «estrella» en la actualidad es sin lugar a dudas BDA (10), el cual a pesar de ser un excelente trazador anterógrado, presenta cierto componente retrógrado (que puede ser minimizado con cierta pericia en su manejo).

Empleo combinado de varios trazadores

Hoy en día, es técnicamente posible, inyectar en el cerebro del animal experimental *in vivo* tantos trazadores como deseemos a lo largo de una única sesión quirúrgica. Es igualmente posible con las tecnologías actuales, revelar simultáneamente un total de tres trazadores en una única sección histológica, de acuerdo con unos protocolos técnicos diseñados por nuestro equipo (2,3,4). Hasta la fecha, algunos laboratorios dedicados a la Neuroanatomía habían conseguido visualizar simultáneamente dos proyecciones en una sola sección. El empleo combinado de tres trazadores permite por primera vez el poner de manifiesto tres proyecciones conjuntamente, siendo por tanto numerosas las ventajas que aporta este procedimiento frente a aquéllos en los que se evidenciaban sólo una o dos proyecciones como máximo. Se obtiene así un elevado caudal de información, al tiempo que se consigue reducir sustancialmente el número de animales necesarios para completar un determinado diseño experimental, pues con un menor número de animales se obtiene una mayor cantidad de información, la cual es a su vez cualitativamente más interesante. Las principales vías del sistema nervioso central se encuentran ya descritas hoy en día, por lo que la Neuroanatomía moderna está evolucionando hacia el estudio de cómo se comportan unas vías con respecto a otras. Es por ello de radical importancia, el intentar visualizar conjuntamente el mayor número posible de proyecciones, ya que no es sólo importante estudiar cómo es una vía concreta, sino que es más necesario aún ver cómo influyen unas vías sobre otras, estudio que difícilmente se podría llevar a cabo si no se pudiesen poner de manifiesto varias proyecciones en una sola sección.

A modo de ejemplo ilustrativo de lo anteriormente expuesto, nuestro grupo de investigación está interesado en estudiar cuál es el papel del tálamo en la organización morfofuncional de los ganglios basales y en

las posibles implicaciones fisiopatológicas de estas estructuras en enfermedades neurodegenerativas, muy particularmente en la enfermedad de Parkinson. Es sabido que determinados núcleos talámicos poseen neuronas que proyectan al estriado (núcleo de entrada de los ganglios basales), al tiempo que son zonas talámicas concretas las que reciben la información procedente de núcleos de salida de los ganglios basales. Está por ver cómo se relacionan entre sí en el tálamo unas y otras proyecciones, esto es, es necesario saber si las neuronas talámicas que proyectan al estriado son o no las que al mismo tiempo reciben la información procedente de los núcleos de salida de los ganglios basales. Además, en caso de que exista solapamiento entre las distintas proyecciones, sería de gran importancia el conocer si dicho solapamiento afecta o no por igual a todos los núcleos talámicos que poseen neuronas de proyectan al estriado. Adicionalmente, caso de existir solapamiento en ciertos núcleos talámicos, interesaría conocer si dicha convergencia de proyecciones es total o parcial. Finalmente, es de una importancia crucial el estudiar si los posibles contactos que se establezcan a nivel talámico entra las proyecciones de entrada y salida de los ganglios basales, se realizan directamente entre un axón que llega al tálamo sobre una neurona talámica que a su vez proyecta al estriado o si se realiza de manera indirecta a través de una interneurona.

En definitiva, la elevada complejidad de determinados circuitos como los someramente señalados con anterioridad, requiere del empleo combinado de varios trazadores neuronales, los cuales al ser puestos de manifiesto simultáneamente, nos permite estudiar el grado con el que dichas proyecciones interactúan entre sí. El reciente diseño de revelados triples con tres cromógenos diferentes (en tres colores) puede posibilitar un mejor conocimiento de la estructura y el funcionamiento de complicados circuitos cerebrales, para así comprender mejor la anatomía fina que subyace a determinadas patologías del sistema nervioso central.

Agradecimientos

Subvencionado por el proyecto FIS 96/0488, la Fundación «Marcelino Botín» y la Universidad de Navarra.

ARTICULOS DE REVISION

BIBLIOGRAFÍA

1. Gerfen CR, Sawchenko PE: An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res* 1984; 209: 219-238.

2. Lanciego JL, Goede PH, Witter MP, Wouterlood FG: Use of peroxidase substrate Vector® VIP for multiple staining in light microscopy. *J Neurosci Meth* 1997; 74: 1-7.

3. Lanciego JL, Wouterlood FG, Erro E, Giménez-Amaya JM: Multiple axonal tracing: simultaneous detection of three tracers in the same section. *Histochemistry and Cell Biology* 1998; 110: 509-515.

4. Lanciego JL, Luquin MR, Guillén

J, Giménez-Amaya JM: Multiple neuroanatomical tracing in primates. *Brain Research Protocols* 1998; 2: 323-332.

5. Schmued LC, Fallon JH: Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 1986; 377: 147-154.

6. Stoeckel K, Schwab ME, Thoenen H: Role of gangliosides in the uptake and retrograde axonal transport of cholera and tetanus toxin as compared to nerve growth factor and wheat germ agglutinin. *Brain Res* 1977; 132: 273-285.

7. Ter Horst GJ, Tønder N, Zimmer J: *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin immunohistochemistry. A comparison between autoradiographic and lectin tracing of neuronal elements. *Brain Res* 1984; 307: 379-383.

8. Trojanowski JQ, Gonatas JO, Gonatas NK: Conjugated of horseradish peroxidase (HRP) with cholera toxin and wheat germ agglutinin are superior to free HRP as orthograde transported markers. *Brain Res* 1981; 223: 381-385.

9. Trojanowski JQ, Gonatas JO, Steiber A, Gonatas NK: Horseradish peroxidase (HRP) conjugates of cholera toxin and lectins are more sensitive retrograde transported markers than free HRP. *Brain Res* 1982; 231: 33-50.

10. Veenman CL, Reiner A, Honig MG: Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-label studies. *J Neurosci Meth* 1992; 41: 239-254.