

NOTA TÉCNICA

Comparación de tres técnicas de trazado retrógrado para la identificación del origen espinal del nervio ciático en ratón

Myriam L. Velandia, José V. Montoya, Marlén Martínez,
Sandra Perdomo, Jaime E. Castellanos

Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

En el presente trabajo se compararon tres técnicas para la aplicación de dos tipos de trazadores retrógrados fluorescentes (Dil y Fluorogold), con el fin de identificar las neuronas motoras y sensoriales que contribuyen con fibras al nervio ciático en ratones adultos. Se ensayó la aplicación de cristales directamente en el nervio, la inyección intraneural y la impregnación del nervio seccionado usando una cámara de silicona. La localización específica de las neuronas motoras en la médula espinal y las neuronas sensoriales en los ganglios de la raíz dorsal que aportan al nervio ciático de ratón se logró aplicando el Fluorogold mediante una cámara en el cabo proximal de los nervios previamente seccionados. Al utilizar el trazador Dil, la misma técnica no permitió hacer la identificación específica de las neuronas. Se encontró que al nervio ciático de ratón podrían contribuir el ganglio de la raíz dorsal más rostrales que los informados para ratas. Estos resultados muestran que la metodología de aplicación de neurotrazadores en cápsula y la descalcificación de tejidos es útil para la localización de neuronas de ganglios de raíz dorsal y de la médula espinal que componen el nervio ciático de ratón adulto, lo que en el futuro permitirá obtener mayor información sobre la neuroanatomía básica del ratón.

Palabras clave: Fluorogold, Dil, neuronas sensoriales, neuronas motoras, ganglio de la raíz dorsal, ratón, nervio ciático, neurotrazadores.

Comparison of three neurotracing techniques for identification of the sciatic nerve spinal origin in mice

To identify sensory and motor neurons associated with the sciatic nerve in adult mice, three methods for applying fluorescent tracers (Fluorogold and Dil) were investigated: direct application, intraneural injection and impregnation of a sectioned nerve in a silicone chamber. Most accurate localization of the neurons on the dorsal root ganglia and spinal cord was accomplished by introducing the proximal stump of a transected sciatic nerve into a silicone chamber, filled with tracers and then decalcifying the tissue. Fluorogold was an effective tracing agent, in contrast to Dil, which was not. In addition to associations with cephalic ganglia L4, L5 and L6, as seen in rats, contributory neurons to the sciatic nerve were located in other ganglia in the mouse. These findings show that the silicone chamber-tissue decalcification technique is a viable tool for obtaining comparative neuroanatomical information in the mouse model.

Keywords: Fluorogold, Dil, sensory neurons, motor neurons, dorsal root ganglia, mouse, sciatic

Los trazadores neuronales son sustancias orgánicas que, captadas y transportadas retrógrada o anterógradamente por las neuronas, se acumulan en el soma o en la terminal sináptica según el

caso; su uso ha permitido determinar las proyecciones y conexiones de algunas rutas neuronales en el sistema nervioso (SN) central o periférico. Las técnicas de trazado neuronal se han desarrollado para aclarar, determinar y describir topográficamente algunas vías neuroanatómicas cuando el procedimiento convencional de disección de los tejidos no es suficiente. En el grupo de trazadores existen algunos que son fluorescentes

Correspondencia:

Jaime E. Castellanos. Avenida calle 26 No. 51-60; teléfono: (571) 220 7700, ext. 433 y 434; fax: (571) 222 3055. jcastellanos@ins.gov.co

Recibido:10/05/02; aceptado: 05/11/02

y que ofrecen ventajas en el procesamiento y observación de la muestra, pues no se requiere realizar procedimientos adicionales a la muestra. Aunque existen otras técnicas de descripción neuroanatómica, entre las cuales se hallan la técnica de degeneración anterógrada o retrógrada, hoy en día es muy frecuente usar trazadores fluorescentes para la identificación de rutas de primer orden en el SN central y periférico de ratas y otros mamíferos que, además, pueden ser aplicados a tejidos embrionarios y adultos vitales, fijados o *post mortem* (1,2).

En nuestro laboratorio, mediante la técnica de degeneración anterógrada, se determinó la distribución de las ramas espinales lumbares 6, 5 y 4 (L6, L5, L4) a lo largo del nervio ciático de rata adulta (3,4). Sin embargo, en ratones, un modelo ampliamente usado en neurobiología, esta técnica no se realiza por las dificultades técnicas que representa el procedimiento quirúrgico en animales tan pequeños. Debido a estas dificultades, se conoce muy poco respecto a la ubicación de las neuronas centrales y periféricas que emiten fibras y componen el nervio ciático en esta especie, por lo que se ha propuesto el uso de trazadores de diferente naturaleza y con diferentes modos de aplicación para los estudios neuroanatómicos en esta especie (5).

Dentro del grupo de trazadores fluorescentes de común aplicación, se encuentran el Dil (1,1'-diocetadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianinaperclorato) y el Fluorogold (FG) (hidroxistilbamtida metanosulfato) (5). El primero es un trazador lipofílico, altamente fluorescente, que difunde por la bicapa lipídica de la membrana plasmática celular en dirección anterógrada o retrógrada (8). Esta carbocianina se ha utilizado en estudios de conexiones neuronales, de cultivos organotípicos de cerebro (9,10), en estudios electrofisiológicos de neuronas disociadas, en estudios *in situ* para identificar aferencias y eferencias en diferentes tejidos y para determinar incluso el grado de toxicidad que puede generar el trazador (8,11). A su vez, el FG se aplica y se incorpora en segmentos nerviosos normales o lesionados y se acumula y transporta en vesículas usando el transporte axonal retrógrado. Una vez en el soma, la acumulación de vesículas

fluorescentes da una apariencia granular en el citoplasma de las células marcadas (1,2). Ambos trazadores se usan *in vivo* para definición de destinos de inervación durante el desarrollo (*fate mapping*) y en trasplantes de células previamente marcadas para determinar su desplazamiento o comportamiento (12,13).

Los métodos más usados son la aplicación de los trazadores en forma de cristal, la aplicación iontoforética y la inyección a presión. La aplicación en cristales es el método más empleado cuando el tejido a estudiar es de fácil acceso quirúrgico o estereotáctico, en cuyo caso se debe realizar una incisión y poner los cristales dentro o cerca al nervio. Las aplicaciones por iontoforesis o a presión requieren de la disolución de los cristales en solventes orgánicos, utilizando descargas eléctricas o mediante un sistema hidráulico o presión con gas, respectivamente. En ambos casos, se desplaza el trazador desde la micropipeta al tejido y, luego, éste se difunde en la membrana plasmática o se acumula en el citosol, dependiendo de la carga eléctrica del trazador (2,6). Otro método para la aplicación de trazadores neuronales, comúnmente usado en roedores de gran tamaño, es la implantación de una cámara o tubo en la cual se deposita el trazador solubilizado para que quede en contacto con el nervio (7).

En todos los métodos de aplicación descritos anteriormente, después de algún tiempo (minutos u horas), el tejido marcado debe ser extraído de su sitio original para ser procesado (5,7). Esta disección, en el caso de los ganglios de la raíz dorsal (GRD), no permite obtener información completa de las neuronas ubicadas en diferentes ganglios y que conforman el nervio, pues se pierde el reparo óseo. Por tal razón, en el presente estudio comparamos técnicas de aplicación de trazadores comúnmente usadas en ratas para identificar el origen espinal de las neuronas motoras y sensoriales que conforman el nervio ciático de ratones adultos, ubicadas en sus respectivos niveles vertebrales, descalcificando la columna vertebral con el tejido nervioso dentro (médula y ganglios), para determinar la aparición exacta de las neuronas marcadas en los diferentes GRD.

Materiales y métodos

Cirugía

Se utilizaron dos ratones machos jóvenes de 30-35 g, de la cepa ICR, para cada una de las técnicas ensayadas. A los animales se les aplicó atropina (0,02 mg/kg) y luego se anestesiaron con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg). La piel se incidió entre la cresta ilíaca y la parte distal del fémur; los músculos fueron cuidadosamente apartados en el borde caudal del glúteo mayor; se localizó el nervio ciático sobre el cual se realizaron los procedimientos que se describen adelante y, una vez terminada la aplicación del trazador, se suturaron los músculos con sutura reabsorbible y la piel con sutura 5,0. Los animales se mantuvieron en condiciones normales por los tiempos definidos, con agua y comida *ad libitum*.

Aplicación de los trazadores

Para el trazado retrógrado de las neuronas del GRD y de las neuronas motoras de la médula espinal, se realizaron tres diferentes técnicas de aplicación. En la primera, bajo cirugía estereoscópica, se aplicaron directamente los cristales del Dil dentro de una ventana epineural (14). En la segunda, se hizo un procedimiento similar y se pusieron de 10 a 15 μ l de una solución de Dil (50 mM preparada en dimetilsulfóxido, DMSO), usando un capilar conectado a una jeringa de 1 ml. En la tercera técnica, se seccionó por completo el nervio ciático, el cabo proximal se sujetó y aproximó con sutura 9,0 a una cámara de silicona (7 mm) con uno de sus extremos cerrados; luego se colocaron dentro de ella 10 μ l de solución de Dil (50 mM en DMSO) (5) o FG (5% en NaCl 0,15 M) (15); el nervio se introdujo hasta que quedó en contacto con la solución y se fijó a la cámara con puntos de sutura. Al terminar, para evitar la salida de la solución y la impregnación de los tejidos vecinos, se puso silicona de uso odontológico en la zona de unión de la cámara y el nervio (15).

Procesamiento de los tejidos

Los tiempos de exposición de los trazadores fueron de 24 horas para la primera técnica, 48 para la segunda y 6 días para la tercera. Luego de estos tiempos, los ratones fueron reanestesiados y

perfundidos a través de la arteria aorta, con *buffer* fosfato salino (PBS, pH 7,4), seguido por un fijador (paraformaldehído 4% en PBS). Posteriormente se hizo disección de toda la columna vertebral, se retiró el exceso de músculo y se dejaron las columnas en posfijación en la misma solución fijadora durante una hora. Las columnas, con el tejido nervioso dentro y restos de tejido muscular alrededor, se descalcificaron en una solución de ácido fórmico al 10% más paraformaldehído al 4% en agua durante 15 días (protocolo estandarizado previamente en nuestro laboratorio). Los tejidos fueron criopreservados con una solución de sacarosa al 20% y almacenados a -20°C hasta el día en que fueron cortados. Los segmentos ubicados por debajo de la cintura pélvica se desecharon. Las vértebras desde el nivel sacro 1 hasta el nivel torácico 12 de la columna se enumeraron en dirección rostral con el fin de determinar los sitios exactos de aparición del marcaje.

De cada segmento vertebral se realizaron entre 25 a 40 cortes seriados de 16 μ m de espesor en crióstato (Tissue-tek II, Modelo No. 4551), los cuales se recogieron en láminas pretratadas con poli-L-lisina (100 μ g/ml) y se montaron en glicerol tamponado, pH 9,0. Los cortes analizados debían contener médula espinal y los respectivos ganglios de la raíz dorsal. Finalmente, se observaron con un microscopio Nikon dotado de un sistema de epifluorescencia utilizando los filtros de excitación adecuados: Dil (550 nm) y FG (480 nm). De esta manera se determinaron los niveles vertebrales en los que había marcaje de neuronas motoras o sensoriales.

Resultados

En el presente trabajo se compararon tres técnicas de aplicación de trazadores neuronales con el objeto de ubicar las neuronas sensoriales y motoras que aportan fibras al nervio ciático en ratones adultos, ubicadas en sus respectivos niveles vertebrales.

La técnica de descalcificación durante 15 días permitió hacer cortes en serie de los bloques de columna vertebral, de tal manera que la ubicación anatómica e histológica fue más fácil y de mejor calidad, logrando así la identificación de los tejidos

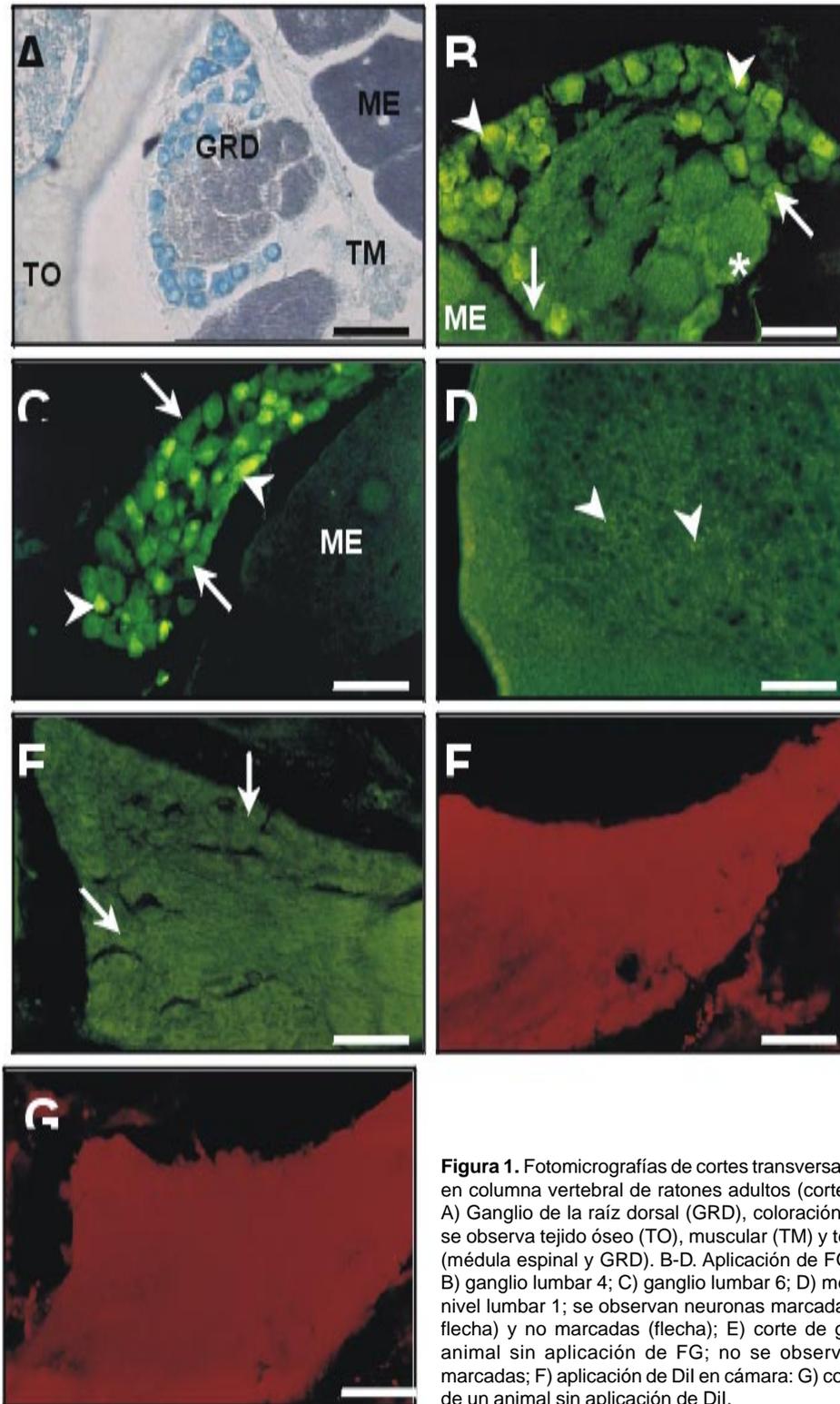


Figura 1. Fotomicrografías de cortes transversales de ganglio en columna vertebral de ratones adultos (cortes de 16 μ m). A) Ganglio de la raíz dorsal (GRD), coloración con Giemsa; se observa tejido óseo (TO), muscular (TM) y tejido nervioso (médula espinal y GRD). B-D. Aplicación de FG en cápsula. B) ganglio lumbar 4; C) ganglio lumbar 6; D) médula espinal, nivel lumbar 1; se observan neuronas marcadas (cabeza de flecha) y no marcadas (flecha); E) corte de ganglio de un animal sin aplicación de FG; no se observan neuronas marcadas; F) aplicación de Dil en cámara; G) corte de ganglio de un animal sin aplicación de Dil.

nervioso, óseo y muscular. El método de aplicación usando una cámara de silicona con la solución de FG permitió obtener mejores resultados. Al introducir el cabo proximal del nervio dentro de la cámara llena con la sustancia fluorescente, se logró impregnar todas las fibras que provienen de la médula espinal y de los ganglios, por lo que la marcación en los somas respectivos fue evidente, observándose los citoplasmas con el color amarillo intenso y el aspecto punteado característico del FG (figura 1B-E).

En los ganglios se observaron las neuronas sensoriales de diferentes tamaños, con una morfología aceptable (1,2,6). Se encontraron neuronas sensoriales marcadas en ganglios espinales más caudales y cefálicos que los informados en los estudios en ratas, pues adicionalmente a los encontrados en los niveles lumbares 6, 5 y 4, también se hallaron neuronas sensoriales positivas en los ganglios correspondientes a los niveles sacro 1, lumbar 3, 2, 1 y torácico 13 y 12.

La aplicación de otro trazador neuronal fluorescente (Dil), depositándolo en cristales o inyectando una solución a través de una ventana epineural no permitió observar marcación específica en los somas neuronales, debido posiblemente al corto tiempo de exposición al trazador o a que éste pudo haberse difundido hacia el tejido circundante. Al realizar la aplicación del Dil con el mismo método de la cámara de silicona descrito antes, se produjo un marcaje intenso no específico, tanto en el ganglio como en los tejidos adyacentes, que no permitió visualizar específicamente las neuronas aportantes al nervio ciático (figura 1F-G).

Discusión

Las técnicas con trazadores fluorescentes retrógrados en neuroanatomía son de uso común debido a su fácil manejo y baja toxicidad, incluso cuando se usan en células vitales, pues se sabe que las células marcadas *in vitro* no presentan ningún cambio en su actividad fisiológica y bioquímica (8,16). Según la necesidad y el tipo de tejido a estudiar, se pueden aplicar en cristal o solubilizarse en diferentes medios que mejoran en muchos casos su actividad. Tanto el Dil como

el FG poseen una vida media de emisión de fluorescencia de varios días o hasta semanas, según el modo de almacenar las muestras. Para su detección solamente se requiere de un montaje húmedo, sin procedimientos adicionales que puedan comprometer la morfología y la fluorescencia del trazador y, además, un microscopio corriente con el equipo necesario para detectar la fluorescencia (1).

Las diferencias de los resultados observados en este trabajo entre Dil y FG, se podrían explicar en parte porque el FG tiene la capacidad de introducirse por endocitosis y ascender a través del transporte axonal retrógrado rápido, en cambio el Dil, por su naturaleza altamente lipofílica, produce el marcaje difundiendo por las membranas de los axones hasta los somas, marcando incluso células gliales y tejidos anexos (17). Con la aplicación de Dil en forma de cristales dentro de la ventana epineural no se produjo marcaje visible en GRD o en médula, lo que se explica, probablemente, por su lenta difusión en el tejido nervioso o por el corto tiempo de exposición. Además, es posible que por su alta liposolubilidad los tejidos circundantes se hayan impregnado con el Dil y no haya difundido hasta los respectivos somas (18). Cuando se aplicó dentro de la cámara de silicona, se logró marcación en los somas neuronales, pero fue inespecífico probablemente debido al daño membranal generado durante el proceso de descalcificación o por el seccionamiento en criostato como se ha propuesto previamente (18).

Tanto el FG como el Dil son trazadores que no traspasan las sinapsis, por esto sólo pueden describir rutas de primer orden en el SN. Los marcadores fluorescentes se pueden combinar con otras técnicas, como inmunohistoquímica con tejido previamente marcado *in vivo*, (8-10) o con cultivos celulares donde las células no pierden el marcaje, resisten procedimientos de disociación enzimática y conservan la reactividad para la realización de la inmunocitoquímica (14,17). En el presente estudio se observó, mediante el método de transporte retrógrado de FG, que en los ratones de la cepa ICR las fibras nerviosas sensoriales y motoras que conforman el nervio ciático son aportadas por los GRD L6, L5 y L4 al

igual que en rata (19), pero también recibe aportes de otros ganglios de niveles más caudales y cefálicos como S1, L3, L2, L1, T13, T12, lo que se diferecia de lo informado en estudios realizados en ratas.

Con la aplicación en cámara de FG y el procesamiento de los tejidos utilizados en este informe, se logró ubicar específicamente las neuronas motoras y sensoriales que aportan fibras al nervio ciático de ratón. En un futuro, con estudios más detallados, se podría determinar si existen diferencias entre cepas de esta especie o entre otras especies animales respecto al origen y aportes de fibras procedentes de diferentes GRD. Además, esta técnica podría ser aplicada para definir propiedades bioquímicas y fisiológicas de las neuronas sensoriales y motoras que conforman el nervio ciático u otros troncos nerviosos en ratón.

Referencias

1. **Vercelli A, Repici M, Garbossa D, Grimaldi A.** Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull* 2000;51:11-28.
2. **Kobbert C, Apps R, Lanciego JL, Mey J, Thanos S.** Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 2000;62:327-51.
3. **Montoya JV, Ariza J, Sutachán JJ, Hurtado H.** Relationship between functional deficiencies and the contribution of myelin nerve fibers derived from L4-L5 and L6 spinolumbar branches in adult rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 2002;173:266-74.
4. **Sutachán JJ, Montoya JV, Ariza J, Baldovino M, Robles JD, Hurtado H.** Contribución de fibras mielínicas provenientes de los nervios espinales lumbares L4, L5 y L6 al nervio ciático de rata adulta y sus ramas principales. *Iatreia* 2000;13:215-20.
5. **Schmued LC.** Anterograde and retrograde neuroanatomical tract tracing with fluorescent compounds. *Neurosci Protocols* 1994;50:1-15.
6. **Altun M, Bergman E, Ulfhake B.** Retrograde labeling of primary sensory neurons with fluorescent latex microspheres: a useful tool for long term tagging of neurons. *J Neurosci Meth* 2001;108:19-24.
7. **Puigdellivol-Sánchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C.** Sciatic and femoral nerve sensory neurons occupy different regions of the L4 dorsal root ganglion in adult rat. *Neurosci Lett* 1998;251:169-72.
8. **Honig MG, Hume RI.** Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 1986;103:171-87.
9. **Holmqvist BI, Ostholm T, Ekstrom P.** Dil tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in a teleost, the Atlantic salmon. *J Neurosci Meth* 1992;42:45-53.
10. **Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ.** Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye Dil. *Exp Neurol* 1988;102:92-101.
11. **Wang G, Scott S.** Muscle sensory innervation patterns in embryonic chick hindlimbs following dorsal root ganglion reversal. *Develop Biol* 1997;189:27-35.
12. **Hernit-Grand CS, MacKlis JD.** Embryonic neurons transplanted to regions of targeted photolytic cell death in adult mouse somatosensory cortex reform specific callosal projections. *Exp Neurol* 1996;139:131-42.
13. **Onifet SM, White LA, Whittemore SR, Holets VR.** *In vitro* labeling strategies for identifying primary neural tissue and a neuronal cell line after transplantation in the central nervous system cell. *Transplant* 1993;2:131-49.
14. **Eckert S, Taddese A, MacCleskey E.** Isolation and cultured of rat sensory neurons having distinct sensory modalities. *J Neurosci Meth* 1998;86:183-90.
15. **Perry MJ, Lawson CN.** Differences in expression of oligosaccharides, neuropeptides, carbonic anhydrase and neurofilament in rat primary afferent neurons retrogradely labelled via skin, muscle or visceral nerves. *Neuroscience* 1998;85:193-210.
16. **Yoshimura N, White G, Weight F, Groat W.** Patch clamp recording from subpopulation of autonomic and afferent neurons identified by axonal tracing techniques. *J Auton Nerv Syst* 1994;49:85-92.
17. **Sawchenko PE, Swanson LW.** A method for tracing biochemically defined pathways in the central nervous system using combined fluorescence retrograde transport and immunohistochemical technique. *Brain Res* 1981;210:31-51.
18. **von Bartheld C, Cunningham D, Rubel E.** Neuronal tracing with dil: decalcification, cryosectioning, and photoconversion for light and electron microscopic analysis. *J Histochem Cytochem* 1990;38:725-33.
19. **Gelder J, Chopin S.** The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *Anat Record* 1977;188:45-7.