



Tinción de Mulligan en Neuroanatomía: Protocolización de la técnica

Mulligan's stain in Neuroanatomy: Protocolization of the technique



Forlizzi, Valeria¹; Miranda-Solis, Franklin²; Pérez Cruz, Julio César³; Ccahuantico-Choquevilca, Luis Ángel²; Morán, Gabriel¹; Baldoncini, Matías

Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires (UBA), Buenos Aires. Argentina

E-mail de autor: Valeria Forlizzi fvforlizzi@fmed.uba.ar

¹Laboratorio de Neuroanatomía Microquirúrgica, II Cátedra de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA)

²Escuela de Medicina Humana, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú.

³Academia de Anatomía, Escuela Superior de Medicina, IPN. Lic. Neurociencias, Facultad de Medicina, (UNAM)

Resumen

En el análisis de la bibliografía sobre tinción con solución de Mulligan y obtención de coloraciones de Azul de Prusia, hemos encontrado variaciones en los protocolos y por ende en los resultados.

El objetivo del siguiente trabajo es establecer paso a paso la técnica empleada por el equipo de autores en tres universidades de América; en Argentina, México y Perú. Además, tras la obtención de fotografías comparativas se analizan los detalles neuroanatómicos que destacan estas coloraciones encefálicas, incluso de estructuras minúsculas para el uso en la docencia de la neuroanatomía.

El empleo de cortes sagitales, transversales y coronales del sistema nervioso central es fundamental para la docencia en las diferentes escuelas de medicina y laboratorios de investigación.

Palabras Clave: Tinción de Mulligan, Neuroanatomía, Docencia, Secciones encefálicas

Abstract

In the analysis of the literature on Mulligan's solution staining and Prussian Blue staining, we have found variations in the protocols and therefore in the results.

The aim of the following paper is to establish step by step the technique used by the team of authors in three universities in America, in Argentina, Mexico and Peru. Furthermore, after obtaining comparative photographs, we analyze the neuroanatomical details that highlight these encephalic colorations, even of tiny structures for use in the teaching of neuroanatomy.

The use of sagittal, transversal and coronal sections of the central nervous system is fundamental for teaching in the different medical schools and research laboratories.

Keywords: Mulligan's stain, Neuroanatomy, Teaching, Brain sections

Introducción

El estudio de secciones encefálicas o medulares sin técnicas de coloración presenta dificultades para el reconocimiento y diferenciación de los elementos de las sustancias gris y blanca.

Estructuras como las cortezas cerebral y cerebelosa, los núcleos basales, y los núcleos de los nervios craneales a nivel del tronco encefálico están conformados por cuerpos celulares neuronales.

Las cápsulas interna, externa y extrema, la corona radiada, el centro oval, y la comisura anterior están constituidos por los axones de las neuronas que se agrupan formando las fibras (blancas) de proyección, asociación o comisurales.

Existen casos particulares donde las fibras ingresan o egresan a través de la sustancia gris cerebral y cerebelosa o también a nivel del tronco encefálico.

Es en estos casos mencionados donde se torna funda-

mental el estudio de estos a través de técnicas de tinción para destacar la diferencia entre núcleos y axones neuronales. Mulligan¹ en 1931 describió una técnica que se ha utilizado ampliamente.^{2,3,4}

Sumergió las secciones del cerebro en una solución de fenol caliente previo a la tinción. Propuso que la solución de fenol disolvería los lípidos en la mielina, los extendería a través de la sustancia blanca y que esto evitaría que el tinte manchara los "cilindros del eje vecino a la neuroglia"¹ (Mulligan 1931).

Varias técnicas de tinción posteriores han incluido este paso de fenol caliente, que se describe como inmersión en la "Solución de Mulligan"^{5,6,7,8} siendo los autores más recientes Suriyapradilok y Withyachumnarnkul⁹ (1997), y un método de colorante de ftalocianina más nuevo, descrito por Wu y Kiernan¹⁰ (2001).

En el análisis de la bibliografía sobre tinción con solución de Mulligan y obtención de coloraciones de Azul de Prusia y Roberts,⁵ hemos encontrado variaciones en los protocolos y por lo tanto en los resultados.

Es por esto que el objetivo del siguiente trabajo es establecer paso a paso la técnica empleada por el equipo de autores en tres universidades de América, en Argentina, México y Perú.

Además, tras la obtención de fotografías comparativas se analizan los detalles neuroanatómicos que resaltan estas coloraciones encefálicas, inclusive de estructuras minúsculas para el uso en la docencia de la neuroanatomía.

Material y Métodos

Se trabajó con 4 (cuatro) encéfalos completos y una médula espinal humana procesados en la II Cátedra de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y en el Laboratorio de Anatomía de la Escuela de Medicina de la Universidad Nacional de San Antonio abad del Cusco, Perú.

Las piezas fueron fijadas en formaldehído al 10% durante 30 días, suspendidas sin entrar en contacto con las paredes del contenedor para evitar deformaciones.

Una vez cumplido este lapso, se procedió a retirar las cubiertas meníngeas, debido a que las mismas se convierten en barreras mecánicas en el empleo de la solución de Mulligan.

Para efectuar los cortes seriados de encéfalos se utilizó una hoja de acero afilada, realizando secciones de 10mm a nivel encefálico y de 5mm de espesor a nivel del tronco encefálico y cerebelo.

Soluciones químicas empleadas:

- **Solución de Mulligan:** 40gr de ácido fénico (C₆H₆O) en cristales; 5 g. de sulfato de cobre (SO₄Cu); 1,25 ml. de ácido clorhídrico (HCl); 1000 ml. de agua destilada.
- **Solución de Cloruro férrico:** 10 g. de cloruro férrico (ClFe₃) en 1000 ml. de agua destilada.
- **Solución de Ferrocianuro de Potasio al 1%:** 10 g. de ferrocianuro de potasio (C₆N₆FeK₄) en 1000 ml. de agua destilada

Descripción de la técnica:

- **Fijación:** Se sumerge la preparación anatómica en una solución de formaldehído al 10% y debe permanecer inmersa en ella durante 2 (dos) semanas. Luego de la fijación, se procede a lavar la pieza anatómica en abundante agua corriente para eliminar el exceso de formaldehído.

- **Limpieza y disección:** Se procede a retirar los restos de meninges y elementos vasculares, lavando el material frecuentemente para evitar su desecación.
- **Cortes:** Se realizan las secciones sobre una tabla, empleando un cuchillo de filo liso para evitar dejar huellas en el corte. Las secciones se realizaron en los planos coronal, sagital y horizontal.
Método de coloración

Consiste en una serie de pasos en los que el material anatómico será sumergido en distintas soluciones contenidas en diferentes recipientes respetando una secuencia:

1. Los cortes colocados en una rejilla de plástico se sumergen en la solución de Mulligan durante 4 (cuatro) minutos. Esta solución debe estar a 70 °C y puede ser usada varias veces mientras conserve dicha temperatura.
2. Retirar la rejilla con los cortes del recipiente, dejar escurrir la solución y sumergir en agua destilada helada (0 °C) por 2 (dos) minutos. El agua a temperatura de 0 °C corta bruscamente el proceso de desnaturalización de la proteínas ocasionada por la temperatura, esto favorece la delimitación de la impregnación de la solución de Mulligan a nivel de la sustancia gris del tejido nervioso.
3. Colocar la rejilla con los cortes en la solución de cloruro férrico durante 2 (dos) minutos.
4. Dejar escurrir la solución y lavar los cortes con agua corriente durante 2 (dos) minutos.
5. Colocar en la solución de ferrocianuro de potasio. En este paso los cortes comienzan a tomar una coloración azul que se va intensificando con el tiempo. Se retira al lograr el color deseado (generalmente 10-15 segundos).
6. Retirar la rejilla, dejar escurrir la solución de los cortes y lavarlos durante 2 (dos) minutos.
7. Conservación: Una vez finalizada la tinción de las piezas, se colocan en una bandeja con formaldehído al 4 % con 0,5 cm³ de ácido clorhídrico por cada 1 litro de formol. Esto último con el objetivo de acidificar la solución con la intención de resaltar el color azul de Prusia de las muestras.

Resultados

Con esta modificación en la técnica hemos logrado la tinción de cortes de médula, tronco encefálico, cerebelo y cerebro.

Como se puede apreciar en las **Figs. 1 y 2** donde se muestran algunas imágenes con los resultados, la diferencia entre zonas azules con cuerpos neuronales y zonas blancas con predominancia axonal es muy clara.

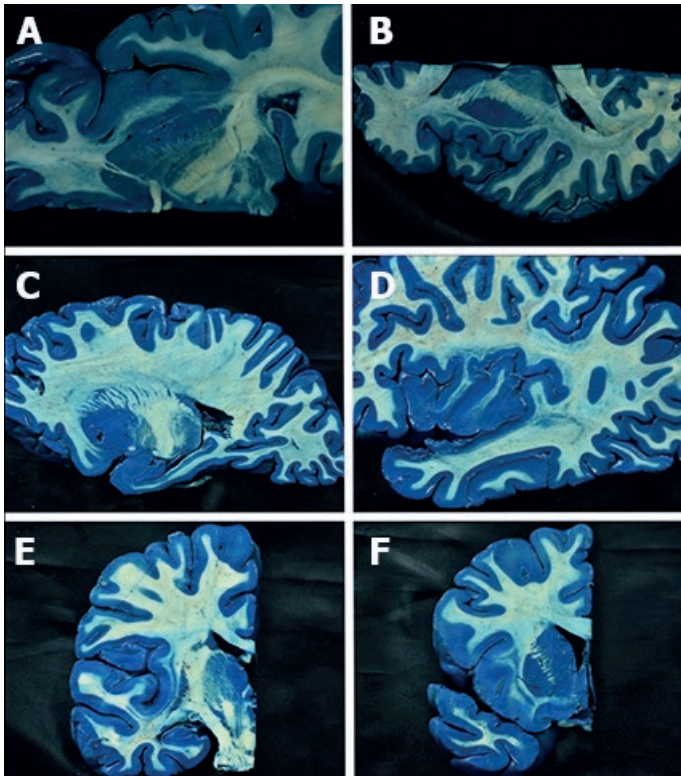


Fig. 1: A) Corte axial de hemisferio cerebral derecho donde se observa cabeza de núcleo caudado, por detrás la comisura anterior y lateralmente el núcleo lenticular. Posteriormente se destaca de color blanco el brazo posterior de la cápsula interna con las fibras genículo calcarinas naciendo del cuerpo geniculado lateral del tálamo.
 B) Sección axial de hemisferio cerebral izquierdo, con diferenciación precisa de corteza cerebral y sustancia blanca de lóbulos frontal, temporal, insular, parietal y occipital. Por debajo de la corteza de la ínsula observamos secuencialmente: cápsula extrema, claustró, cápsula externa, núcleo lenticular, brazo anterior y posterior de cápsula interna, cabeza de núcleo caudado hacia adelante y hacia atrás el tálamo.
 C) Corte sagital a nivel de la rodilla de la capsula interna, hacia adelante observamos la cabeza del núcleo caudado fusionado por debajo con el núcleo acumbens y hacia arriba se diferencian los cuerpos neuronales del cuerpo estriado. El globo pálido interno y externo se encuentran por detrás y en el centro la comisura anterior.
 D) Sección sagital a nivel del lóbulo de la ínsula, diferenciándose sus giros cortos y largos, además del surco limitante que la separa de los lóbulos frontal, parietal y temporal.
 E) Corte coronal a nivel del tálamo, hacia arriba se encuentra la cola del núcleo caudado, lateralmente el brazo posterior de la cápsula interna, putamen, cápsula externa, claustró, cápsula extrema y corteza de la ínsula en la profundidad de la cisura lateral.
 F) Sección coronal a nivel del asta frontal del ventrículo lateral derecho, en relación a la cavidad ventricular se encuentra la cabeza del núcleo caudado, lateralmente la porción más anterior del putamen y entre ambos las fibras que atraviesan el brazo anterior de la cápsula interna para formar el cuerpo estriado.

Esto está estrechamente vinculado a la técnica del proceso, dado que, comenzando con un corte prolijo con lavado adecuado de la sección, se eliminan aquellos somas neuronales que son deslizados por la acción del corte sobre la sustancia blanca.

Para el logro de estos resultados es muy importante emplear siempre elementos de plástico o de madera para la preparación de las tres soluciones (Mulligan, cloruro férrico y ferrocianuro de potasio) y para manipular el material anatómico.

La precisión en la coloración azul intensa se ha logrado no solamente a nivel de la corteza cerebral y cerebelosa; sino

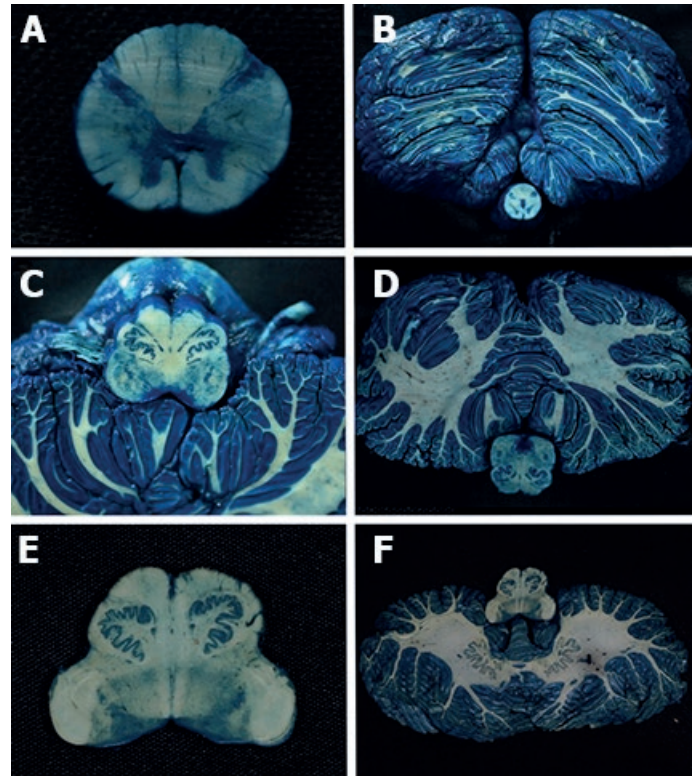


Fig. 2: A) Sección axial de médula a nivel cervical, la tinción de Mulligan logra destacar las astas anteriores, laterales y posteriores.
 B) Corte cerebelo-bulbar en el segmento inferior del bulbo, se aprecia la diferenciación de la sustancia blanca y gris a nivel de la folias cerebelosas.
 C) Vista inferior de sección axial en la mitad superior del bulbo raquídeo, realizado a nivel de las olivas bulbares. La tinción destaca forma serpiginosa la disposición del núcleo olivar, además los núcleos ubicados en el piso del cuarto ventrículo.
 D) Sección axial donde se observan ambos hemisferios y vermis cerebeloso.
 E) En este corte a nivel del bulbo superficialmente observamos el surco mediano anterior, surcos pre y retro-olivario, núcleo olivar y piso del cuarto ventrículo.
 F) Corte axial de tronco encefálico y cerebelo a nivel del surco bulbo-protuberantial, en la profundidad de la sustancia blanca de los hemisferios cerebelosos se logró adecuada tinción de los núcleos dentado, globoso y emboliforme.

también en los núcleos caudado, accumbens, subtalámico, tálamo, globo pálido, putamen, etc.

Se ha logrado con detalle diferenciar las seis capas que componen el cuerpo geniculado lateral del tálamo y diferenciar los elementos de sustancia gris y blanca del hipocampo.

Discusión

El método de coloración está basado en una serie de reacciones químicas que producen los elementos que constituyen la solución de Mulligan.

El primer paso consiste en sumergir la preparación en una solución de Mulligan calentada a 70°. En esta solución el ácido fénico, actuando como mordiente en un medio ácido (por el HCl) reducirá el cobre de cúprico a cuproso, permitiendo la unión del cobre cuproso a los grupos aminos de las proteínas.

La especificidad de la tinción por la sustancia gris estaría dada por la mayor concentración proteica de la sustancia gris con respecto de la blanca. Esta reacción requiere para producirse de condiciones precisas de temperatura y pH del medio. Es en este paso donde se produce la tinción en sí, permitiendo en los pasos sucesivos hacerla visible.

Los cortes impregnados con la solución de Mulligan se retiran y colocan en agua destilada helada para cortar bruscamente el proceso químico de la solución de Mulligan.

El siguiente paso es llevarlos a una solución de cloruro férrico la cual oxida el cobre cuproso depositado, a cobre cúprico a la vez que reduce el hierro de férrico a ferroso.

El cobre y el hierro se intercambian entre sí, quedando depositado el hierro en lugar del cobre (reacción de sustitución).

El siguiente paso es llevar los cortes a una solución de ferrocianuro de potasio, que es una sal del ácido cianhídrico donde el cianuro ha sido parcialmente saturado por el hierro.

El ferrocianuro de potasio se transforma entonces en ferrocianuro férrico al reaccionar con el hierro depositado en la preparación y queda fijado en la misma. Esta sustancia da un color azul intenso en los sitios en que se ha depositado (sustancia gris).

La importancia de esta técnica para el estudio del sistema nervioso central radica en la posibilidad de diferenciar las estructuras encefálicas a simple vista, de manera que se permita apreciar la anatomía en toda su dimensión.

La afinidad de la solución de Mulligan por las proteínas de la sustancia gris permite, junto con la de otras soluciones, teñir de azul intenso (Prussian Blue) dicha sustancia y así diferenciarla de la sustancia blanca.

Las dificultades en la obtención de encéfalos humanos para la enseñanza de neuroanatomía incrementan la necesidad de realizar especímenes que puedan utilizarse durante años⁸ con las diferentes generaciones de estudiantes de medicina en las cátedras de anatomía.

Con la técnica de Mulligan se obtiene una tinción superficial, por lo que el preparado al ser manipulado pierde con el tiempo el color azul característico. Es por este motivo, que luego del proceso de tinción, los cortes de cerebro, troncoencefálico y cerebelo son colocados en recipientes de vidrio hechos a medida y conservados allí con formol al 10% y ácido clorhídrico.

Si bien otros autores^{7,8,9,10} han descrito la posibilidad de plastinar los cortes, este último es un método costoso y en el proceso de plastinación puede perderse la intensidad del color.

En nuestra experiencia, se ha logrado conservar secciones de encéfalo con técnica de Mulligan y Roberts durante más de 20 años en buenas condiciones con fines pedagógicos.

Referencias

1. Mulligan J (1931): *A method of staining the brain for macroscopic study*. Journal of Anatomy (London) 65: 468-472.
2. Alston R. L: *A batch staining method for brain slices allowing volumen measurements of grey and white matter using an image analyzing computer* (Quantimet 720). Stain Technology 56(4):207-213, 1981
3. Barnard, J.W., Roberts, J. O. and Brown, J. G: *A simple macroscopic staining and mounting procedure for wet sections from cadaver brains*. Anat. Rec. 105: 11-17, 1949
4. LeMasurier, H. E: *Simple method of staining macroscopic brain sections*. Arch. Neurol. Psychiatr. 34:1065-1067, 1935
5. Roberts, M. and Hanaway, J: *Preparation of brainslicesformacroscopicstudybythecoppersulphate-phenol-ferrocyanidetechnique*. StainTechnol. 44:143-146, 1969
6. Blair, D. M., Davies, F. and McClelland, E. W: *On the nature of certain macroscopic staining reactions of the brain*. J. Anat. 66:478-485, 1932
7. Loftspring M.C, Smanik J, et al: *Selective gray matter staining of human brain slices: optimized use of cadaver materials*. Biotechnic & Histochemistry 83(3_4): 173_177, 2008
8. Baeres F. M. M. and Möller M: *Plastination of Dissected Brain Specimens and Mulligan-Stained Sections of the Human Brain* European Journal of Morphology 39(5): 307-311, 2001
9. Suriyaprapadilok L, Withyachumnarnkul B: *Plastination of stained sections of the human brain: comparison between different staining methods*. J. Internat. Soc. Plastination 12: 27-32, 1997
10. Wu M. And Kiernan J. A: *A new method for surface staining large slices of fixed brain using a copper phthalocyanine dye*. Biotechnic & Histochemistry 76(5&6):253-255, 2001