

CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CEPILLO DEL CEREBELO TRATADAS POR EXPOSICIÓN PROLONGADA DE LA MUESTRA AL ALCOHOL ISOPROPÍLICO EN VARIANTE DE IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA

CHARACTERIZATION OF BRUSH CELLS OF THE CEREBELLUM TREATED BY PROLONGED EXPOSURE OF THE SAMPLE TO ISOPROPYL ALCOHOL VARIANT OF ARGENTIC IMPREGNATION

Elbert Oberto REYES GRATEROL; Sogeilys Milagro GARCÍA ODUBER; Edgar José LAGUNA CAMPOS; Mario Javier SALAS MÉNDEZ

Laboratorio de Neurohistología. Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes.

RESUMEN.

Las células cepillo son neuronas glutamatérgicas de la capa granular en la corteza cerebelosa que constan de 3 (tres) o más subtipos, caracterizados por fenotipos químicamente distintos, propiedades intrínsecas para formar sinapsis y patrones de descarga particulares. Dichas células no fueron identificadas por métodos de impregnación argéntica hasta 1994, cuando Mugnaini realiza su descripción. En este trabajo presentamos una variante de impregnación argéntica, en el cual las muestras son sumergidas en alcohol isopropílico y luego sometidas a lavados con alcohol etílico proporcionando un proceso de rápida impregnación que reduce la observación de precipitados, y donde la cristalización se realiza de manera uniforme, lo que permite observar la integridad del cuerpo celular y sus procesos, aumentando tanto la fiabilidad de la técnica como reproducibilidad de la tinción y facilita la toma de sus dimensiones. También se destaca que el medio de montaje influye en la conservación de la calidad temporal del preparado, con una mejora de la preservación utilizando Permout vs bálsamo de Canadá.

Palabras claves: células cepillo, técnica de Golgi, alcohol isopropílico, alcohol etílico, bálsamo de Canadá, Permout.

ABSTRACT.

Brush cells in the cerebellum are glutamatergic neurons of the granular layer. They are divided into three or more subtypes and were not identified by silver impregnation methods until 1994, when Mugnaini identified them using a variant of Golgi method. To make evident brush cells of the Wistar rat cerebellum, we developed a modification of the silver impregnation techniques. The improvement of method is due to the immersion of tissue sections in isopropyl alcohol following sequential washes with ethyl alcohol. It provide a quick impregnation, diminish precipitate outside cells, and the crystallization is more uniform. Morphological and morphometric studies of brush neurons stained with this technique are easy because the cell body and its processes are well observed. We also observed quality differences in the final preparation according with the mounting medium used. An improvement of the preservation was observed using Permout medium.

Keywords: brush cells, Golgi technique, isopropyl alcohol, ethyl alcohol, Canada balsam, Permout.

Recibido julio 31, 2014 - Aceptado octubre 23, 2014

INTRODUCCIÓN

Las células cepillo son pequeñas neuronas glutamatérgicas en la capa granular de la corteza cerebelosa, denominadas también células unipolares (1, 2). Se han reportado varios subtipos, que expresan distintas proteínas citoplasmáticas, propiedades intrínsecas para formar sinapsis y patrones de descarga particulares (3). Para la identificación y el estudio de las células cepillo, se han utilizado diversas técnicas, tales como la de Golgi (4), autorradiografía y técnicas de inmunohistoquímica (5, 6). El uso de técnicas inmunohistoquímicas ha permitido identificar tres tipos de neuronas en cepillo que expresan Calretinina (3), Cromogranina y Secretogranina (4, 5). En 1994 Mugnaini realizó la primera descripción morfológica de las células cepillo en la corteza cerebelosa utilizando una variante de la técnica original de Golgi (7, 8, 9). Entre los criterios morfológicos observados al microscopio óptico, se destacan aquellos reportados por Mugnaini y por Toledano, quienes describen células de tamaño intermedio en la capa granular del cerebelo de rata, con cuerpo ovalado o redondeado (diámetro entre 9-12 μm), núcleo pálido con cromatina homogéneamente distribuida, y con nucléolo débilmente teñido. Un axón suele salir del soma, y en algunas ocasiones, lo hace cerca de la dendrita. En el extremo dendrítico terminal (opuesto al soma), se observa una dilatación con finos plegamientos a manera de "cepillo". Cajal estudió extensamente la corteza cerebelosa con la técnica de impregnación argéntica, sin hacer referencia a las células cepillo (10). El principal inconveniente del método de Golgi, es la inconsistencia de impregnación, la irregularidad en los límites de las neuronas, la variación en la reproducibilidad, y la tasa de éxito de los resultados de la técnica (11, 12, 13).

MATERIALES Y MÉTODOS

Utilizamos 7 ratas machos de la cepa Wistar mantenidas con pellet y agua *ad libitum* con peso comprendido entre 250 y 300 grs. Los ejemplares se sacrifican según normas de bioética para manipulación de animales de experimentación (Cámara de Éter/Clo-roformo) (12). Luego se procede a la fijación con paraformaldehído (4%) por perfusión trans-cardíaca y posterior decapitación. Se extraen los encéfalos y se post-fijan por inmersión en la misma solución fijadora durante 48 horas. Se secciona el encéfalo a través de su línea media tomando como muestra la mitad derecha de cada uno y se sumerge en 26 ml de una solución cromante compuesta de: bicromato de potasio (2,5%) 22 ml, formol (35%) 1,5 ml, ácido acético (1%) 0,5 ml y gluteraldehído (25%) 2 ml. Se dejan en esta solución en frasco ámbar protegido de la luz durante 24 horas. Luego se extrae la pieza de la solución cromante y se realizan 2 lavados rápidos con agua destilada, para dejar sumergida en una solución de nitrato de plata al 1,5 % por 17 horas (14). Tras esta impregnación, la pieza se retira del envase, y se realiza un lavado con agua destilada suficiente para ser tratado con alcohol isopropílico (70%) por inmersión en envases oscuros y en cantidades suficientes (el volumen 10 veces del tamaño de la pieza) para sumergir el tejido en su totalidad. Durante 5 días el envase donde se encontraba la pieza no debe ser movilizad, ni expuesto a luz. El siguiente paso es el corte micrométrico de la pieza con orientación a una vista sagital de la corteza cerebelosa de cada hemisferio, por medio de vibrátomo (Leica VT1000S Vibratome), realizamos 120 cortes de 50 μm de espesor, dejándolos sumergidos en el mismo alcohol. Se continua luego la deshidratación con varios lavados de alcohol etílico. El primero con una concentración al 70%

durante 15 minutos, luego se trasladan los cortes a un segundo recipiente con alcohol etílico al 80% durante 15 minutos y por último a una tercera cápsula con alcohol etílico al 100% durante una hora. El traslado de los cortes para cada lavado se realiza con sumo cuidado para evitar su deterioro, utilizando para este fin un pincel especial de pelo de camello (14), pues los pinceles convencionales pueden fragmentar los cortes. Por medio de un segundo pincel, las piezas son reubicadas en una cápsula de Petri que contiene el agente aclarante para diafanizar el tejido. Posteriormente se hacen tres cambios de xilol en intervalos de 5 minutos cada uno. Como último paso se realiza el montaje del corte, retirando previamente el exceso de xilol y colocándolo sobre un porta objeto (14). Sobre esta muestra se agregó el medio de montaje bálsamo de Canadá o Permount finalizando con la colocación del cubre objeto. El almacenamiento de los preparados se hace en porta láminas debidamente cerrados para evitar exposición a la luz.

Para análisis morfométrico realizamos tomas de microfotografías con cámara digital modelo Microscope USB Digital Camera Moticam 2000, marca Motic® utilizando portaobjeto graduado con escala métrica y Motic Images Plus Versión 2.0 ML. Aumentos de 100X y 400X, tomamos en cuenta 22 células cepillo, que cumplieron con la descripción morfológica de Mugnaini (revisados por Toledano) (7), las dimensiones del mayor diámetro del soma, el eje mayor de la expansión del proceso distal de la dendrita (cepillo); y para la longitud de la dendrita (solo las células cepillo con dendrita única): la base dendrítica hasta el inicio de la expansión terminal de la misma. Todas estas medidas, en aquellas neuronas que definían la mayor integridad de su morfología en el plano observado.

RESULTADOS

En cada preparado histológico se observó toda la extensión de corteza cerebelosa. La corteza en la cual se identificó mayor proporción relativa de células cepillo correspondió con el décimo lobulillo cerebeloso nodular (Fig. 1) (15).

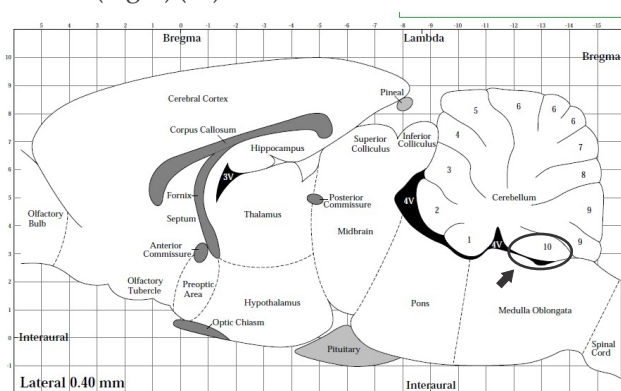


Figura 1. La mayor cantidad de células cepillo fue encontrada en el décimo (10mo.) lobulillo cerebeloso nodular. Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3rd ed. Elsevier Academic Press, Boston: pp 79.

Al final un total de 22 neuronas fueron tomadas en cuenta para estudios morfométricos. Se pudo visualizar la disposición en grupos aislados de células cepillo, ubicadas por debajo de los somas de las células de Fañanas, e inmersas en la capa granular (Fig. 2).

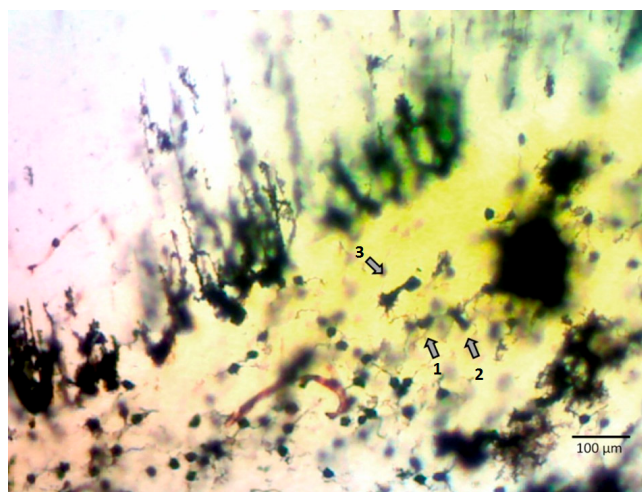


Figura 2. Muestra de corteza cerebelosa de localización décimo lobulillo nodular. Se observan células cepillo en capa de los granos, y su disposición con respecto a las células de Fañanas. Muestra la orientación de las células: 1. capa de células de Purkinje, 2. sustancia blanca, 3. Intermedia.

El fondo claro facilitó la observación de los límites celulares (Fig. 1). Observamos que la orientación de la dendrita se encuentra relacionada con las capas del cerebelo; tal que se observan tres tipos de orientación (Fig. 2):

- A la capa de células de Purkinje.
- A la sustancia blanca.
- Intermedia.

Evaluando la morfología básica individual de la célula cepillo, se observa con nitidez, el soma, axón, tronco dendrítico y dilataciones terminales (cepillo), resaltando no solo la integridad de sus partes; sino también diferenciarlas de los granos cerebelosos. Se diferencian, los cuerpos, el axón y la disposición dendrítica en ambas células, visualizada por el contraste de fondo (Figs. 3 y 4).

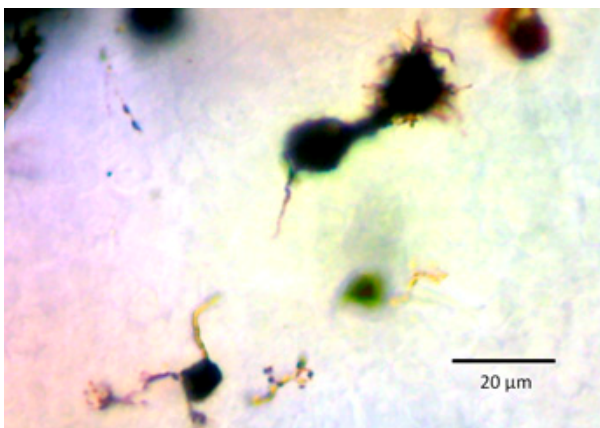


Figura 3. Capa de los granos. Compare la célula cepillo con una célula grano. Al calcular las dimensiones, el tamaño en promedio de los cuerpos celulares de la célula cepillo es de 18 μm y de las células granulosas de 7 μm .

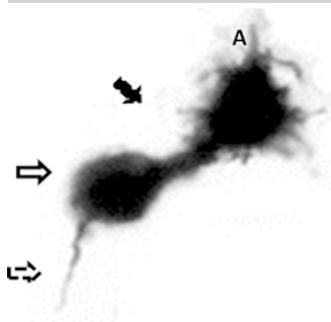


Figura 4. Morfología básica de la célula cepillo: flecha negra, dendrita; flecha sin relleno, soma; flecha con bordes punteados, axón. Se aprecia la expansión dendrítica terminal (cepillo), A.

Una observación minuciosa de los diferentes segmentos de estas células, determinó su variada tipología (Tabla 1 y Fig. 5). Aunado a esto, fueron revelados los diámetros del soma, longitudes de dendrita y los extremos distales de dendrita (cepillo), obteniéndose valores promedio de 14 μm , 18 μm y 2,5 μm respectivamente.

Forma del soma:	<ul style="list-style-type: none"> • Esferoidal • Ovoidal
Dendrita:	<ul style="list-style-type: none"> • Dendrita recta • Dendrita curva • Dendrita bifurcada
Orientación axial de la dendrita:	<ul style="list-style-type: none"> • A la capa de células de Purkinje • A la sustancia blanca • Intermedia
Según el extremo distal de la dendrita:	<ul style="list-style-type: none"> • Morfología fungoide • Con apéndices finos • Con apéndices gruesos y tupidos

Tabla 1. Células cepillo. Tipos morfológicos caracterizados.

En relación con los medios de montaje utilizados, observamos que durante las dos primeras semanas se obtienen resultados similares tanto con el bálsamo de Canadá como con Permount. A partir de la tercera semana, se observa un franco deterioro de la calidad del preparado montado con bálsamo de Canadá, consistente en aumento del precipitado pericelular con distorsión de la morfología y los límites.

DISCUSIÓN

En la conservación de muestras de corteza cerebelosa impregnado con plata antes del montaje, se ha notado la importancia de la variación en el tiempo de exposición al alcohol.

Los alcoholes relativamente ácidos como el etílico reaccionan rápidamente con el sodio y el potasio para formar metóxido y etóxido y los residuos de bicromato de potasio utilizados en la preparación de la muestra (cromación) podrían oxidar al alcohol de manera

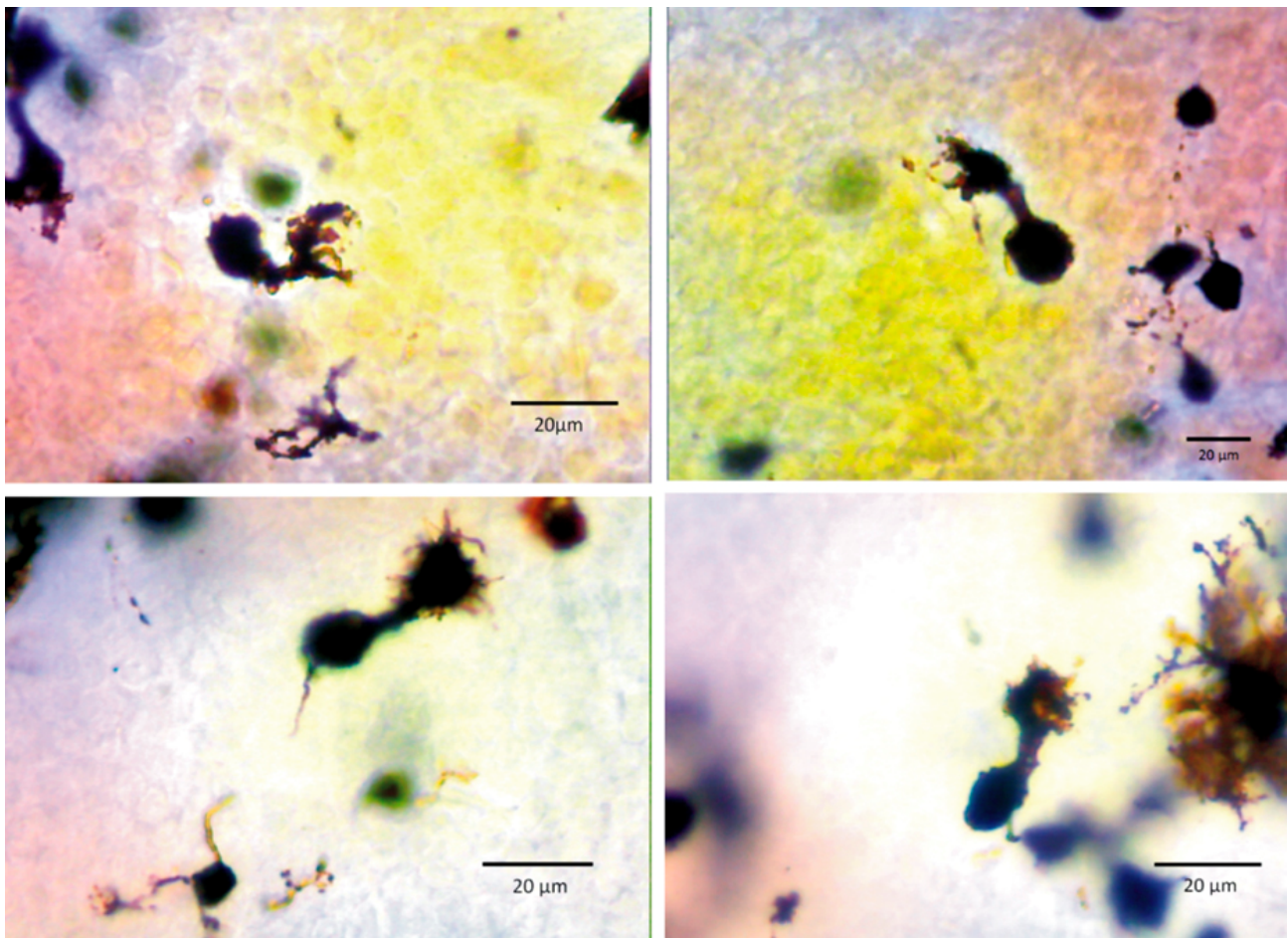


Figura 5. Variaciones morfológicas de célula cepillo.

apropiada según concentraciones y tiempo de exposición de los alcoholes. Se conoce que la oxidación suave de un alcohol primario (etílico) contribuye a la reducción de la sal metálica en el tejido, a la vez que produce aldehídos, y consecuente precipitado dentro y sobre las células, con mínimo impacto del área pericelular marcada, la cual tiende a observarse de aspecto claro (14).

Este trabajo expone una variante del método de Golgi (16), que permite la visualización con facilidad de diversos elementos celulares de la corteza cerebelosa, pero especialmente de las células cepillo, que se observan con una nitidez inusual para una técnica que aunque nacida hace más de cien años, no deja de sorprendernos aún (17, 18). Es posible que el alcohol

facilite el precipitado dentro de las neuronas, y disminuya la presencia de precipitados fuera de ésta, aumentando la tasa de neuronas marcadas en un fondo claro. La obtención de un fondo claro en los preparados histológicos ofrece una serie de beneficios para su observación: permite describir con facilidad las diferencias en la morfología a partir de la delimitación de los detalles de la estructura, también permite la diferenciación y clasificación de sus segmentos según las características reportadas por Mugnaini (1, 7, 8) y Toledano, lo que conduce a una ganancia en los estudios de morfología celular que contrastan con las técnicas rutinarias en las que el precipitado extracelular dificulta la visualización / observación.

Un valor agregado se obtiene al observar con facilidad otros tipos celulares de la corteza cerebelosa, ya bastante conocidos como son, las células de Fañanás y los granos cerebelosos. Se destacan los aspectos relacionados con la preservación en el tiempo de la muestra preparada con esta técnica, al igual de la reproducibilidad de resultados.

Comparando los resultados obtenidos con la utilización de medios de montaje (bálsamo de Canadá y Permout), nuestros estudios sugieren, la existencia de una oxidación adicional del tejido impregnado posterior al montaje, que permite mayor exposición al aire. El seguimiento de la calidad temporal del preparado muestra que con Permout se observan menores cambios en el precipitado. Esto lleva a pensar que el bálsamo de Canadá permite cambios posteriores de detalles celulares no presentes en la primera semana, a diferencia del Permout que logra un montaje más definitivo y de calidad en el tiempo.

CONCLUSIONES

Ésta modificación de la técnica para la preparación y conservación de muestras de corteza cerebelosa, proporciona un proceso de contrastación rápido. Durante la observación microscópica, se evidenció una

reducción en la formación de precipitados y una cristalización uniforme, por lo que se observa integridad del cuerpo celular y sus procesos, aumentando tanto la fiabilidad como reproducibilidad del marcaje de las células cepillo de la corteza cerebelosa de rata cepa Wistar. Es posible que el alcohol facilite el precipitado dentro de las neuronas, y disminuya la presencia de precipitados fuera de ésta, aumentando la tasa de neuronas marcadas en un fondo claro.

El montaje de los preparados histológicos con Permout, tiene una clara ventaja sobre el bálsamo de Canadá para preservar la calidad del preparado en el tiempo.

Al comparar los medios de montaje se puede concluir que el Permout demostró mantener una menor cantidad de sedimento, en comparación con el bálsamo de Canadá que es en emulsión y de consistencia espesa. Por otra parte a las 2 semanas, las láminas con Permout permanecen estables y secas por completo asegurando la calidad del preparado, a diferencia de aquellas con el montaje en bálsamo de Canadá, las cuales al transcurrir un mes, aún permanecen inestables y con mayor cantidad de precipitado extracelular, esto posiblemente causa entrada de aire al preparado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mugnaini E, Floris A (1994) The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339: 174-180.
2. Diño MR, Willard FH, Mugnaini E (1999) Distribution of unipolar brush cells and other calretinin immunoreactive components in the mammalian cerebellar cortex. *J Neurocytol* 28: 99-123.
3. Braak E, Braak H (1993) The new monodendritic neuronal type within the adult human cerebellar granule cell layer shows calretinin-immunoreactivity. *Neurosci Lett* 154: 199-202.
4. Floris A, Diño M, Jacobowitz D, Mugnaini E (1994) The unipolar brush cells of the rat cerebellar cortex and cochlear nucleus are calretinin positive: a study by light and electron immunocytochemistry. *Anat Embryol* 189: 495-520.
5. Nunzi MG, Mugnaini E (2009) Aspects of the neuroendocrine cerebellum: expression of secretogranin II, chromogranin A and chromogranin B in mouse cerebellar unipolar brush cells. *Neuroscience* 162(3): 673-687.
6. Consalez G, Hawkes R (2013) The compartmental restriction of cerebellar interneurons. *Frontiers in Neural Circuits* (6)123: 1-14.
7. Álvarez M, Lloréns-Martín M, Lacruz-Peña C, Toledano-Gasca A (2004) Nueva célula 'en cepillo' (brush cell) o célula monopolar del cerebelo. Características y posible función. *Rev Neurol* 38(4): 339-346.

8. Mugnaini E, Sekerkova G, Martina M (2011) The unipolar brush cell: a remarkable neuron finally receiving the deserved attention. *Brain Res Rev* 66(1-2): 220-245.
9. Altman J, Bayer S (1977) Time of origin and distribution of a new cell type in the rat cerebellar cortex. *Exp Brain Res* 29: 265-274.
10. Mugnaini E, Floris A, Wright-Gross M (1994) The extraordinary synapses of the unipolar brush cell: an electron microscopic study in the rat cerebellum. *Synapse* 16: 284-311.
11. Smitha JSM, Roopa R (2012) Rapid Golgi Technique for staining pyramidal neurons in rat hippocampus. *IJBAMS* 2(3): 98-102.
12. Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia (1990) Anestesia en el animal de laboratorio Parte 2. *Res Surgery Suppl* 5: 36-44.
13. Christian Bruck H (1966) Métodos de coloración físicos y físico-químicos. *Técnica Histológica. Manual para realizar preparaciones microscópicas en el laboratorio* Primera edición, Editorial Paz Montalvo. Madrid, pp 127-128.
14. García del Moral R (1993) Coloraciones para estudios neurohistológicos. *Laboratorio de Anatomía Patológica. Primera edición.* McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, pp 222-224.
15. Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 3rd ed. Elsevier Academic Press, Boston, pp 79.
16. Pannese E (1999) The Golgi stain: invention, diffusion and impact on neurosciences. *J Hist Neurosci* 8(2): 132-140.
17. Marquez M (2004) Santiago Ramón y Cajal: algo más que un fotógrafo. *Ámbitos* 11-12: 139-153.
18. Torres-Fernandez O (2006) La técnica de impregnación argéntica de Golgi. *Commemoración del centenario del premio Nobel de Medicina* (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Biomédica* 26: 498-508.