

Desarrollo de un protocolo de conservación del sistema nervioso central mediante la técnica de Klingler aplicado en encefalos de bovino

Manuel de Jesús Uribe Miranda¹, Tomas Armando Rivera Hernández¹, Jesús Alberto Rivera Hernández¹, Juan Pablo Ávila Madrigal²

¹Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, México. Escuela de Medicina, Departamento de Neuroanatomía

²Grupo de Investigación de Ciencias del Cerebro, Bogotá, Colombia

Autor corresponsal:

Manuel de Jesús Uribe Miranda.

Email: mdjum93@gmail.com

Citar como : Uribe Miranda MJ, Rivera Hernández TA, Rivera Hernández JA, Ávila Madrigal JP. Desarrollo de un protocolo de conservación del sistema nervioso central mediante la técnica de Klingler aplicado en encefalos de bovino, rev peruana de morfología, 2022; 3(1):45-49. doi:<https://doi.org/10.51343/revperuanamorfologia.v3i1.980>

Editor Científico: Franklin Miranda-Solis MD. MA., Lab de Anatomía, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.

Recibido: 31 de mayo 2022

Aceptado: 14 de julio 2022

Financiación: Autofinanciado por los autores.

Conflicto de Intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno

Copyright: © 2022 Manuel de Jesús Uribe Miranda, Tomas Armando Rivera Hernández, Jesús Alberto Rivera Hernández, Juan Pablo Ávila Madrigal. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia de Atribución Creative Commons, que permite el uso, distribución y reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite al autor original y la fuente.

RESUMEN

En 1935, el médico y neuroanatomista Joseph Klingler desarrollo la técnica para conservación del encéfalo humano para disección, mediante el uso de la fijación y congelamiento, técnica que actualmente lleva su nombre. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de conservación del sistema nervioso central, con fines de docencia y disección de fibras de sustancia blanca mediante la técnica de Klingler estandarizada en encefalos de bovino. Los encefalos fueron fijados y conservados con formaldehído al 10% por 4 meses. Posteriormente, fueron sometidos a inmersión en agua corriente por 24 horas, con la finalidad de evitar los efectos irritativos relacionados con la exposición continua a formaldehído. Enseguida, y con ayuda de unas pinzas de relojero de punta fina y tijeras de microdisección rectas se eliminaron los vasos sanguíneos, aracnoides y restos de sangre. Una vez disecados los elementos mencionados, cada uno de los encefalos fue colocado en una bolsa de polietileno con formaldehído al 10%, manteniéndolos durante 10 días a -18°C. en un congelador horizontal, de la marca “Whirlpool®” Una vez transcurrido el tiempo de congelamiento, se retiraron las bolsas con los encefalos, dejando descongelar a temperatura ambiente durante 24 horas. Se logró desarrollar satisfactoriamente en el Anfiteatro de la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, México, un protocolo de conservación del sistema nervioso central mediante la técnica de Klingler estandarizada, obteniendo una excelente fijación de los encefalos de bovino, y una fragmentación adecuada de la corteza cerebral.

Palabra clave: Protocolo; Neuroanatomía; Sistema nervioso central.

Development of a central nervous system preservation protocol using the Klingler technique applied to bovine brains

ABSTRACT

In 1935, the physician and neuroanatomist Joseph Klingler developed the technique for preservation of the human brains for dissection, through the use of fixation and freezing, a technique that currently bears his name. The objective of this work was to develop a protocol for the preservation of the central nervous system for teaching purposes and dissection of white matter fibers using the standardized Klingler technique in bovine brains. The brains were fixed and preserved with 10% formaldehyde for 4 months. Subsequently, they were subjected to immersion in running water for 24 hours, in order to avoid the irritative effects related to continuous exposure to formaldehyde. Then, with the help of fine-tipped watchmaker's forceps and straight microdissection scissors, the blood vessels, arachnoids and blood remains were removed. Once the aforementioned elements were dissected, each one of the brains was placed in a polyethylene bag with 10% formaldehyde, keeping them for 10 days at -18°C. in a horizontal freezer, of the “Whirlpool®” brand. Once the freezing time had elapsed, the bags with the brains were removed, leaving them to thaw at room temperature for 24 hours. At the Amphitheater of the Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, Mexico, a protocol for the preservation of the central nervous system was successfully developed using the standardized Klingler technique, obtaining excellent fixation of the bovine brains and adequate fragmentation of the cerebral cortex.

Keywords: protocol; neuroanatomy; central nervous system

Introducción

La técnica de Klingler, es una herramienta para conservación y disección de tractos de sustancia blanca en el sistema nervioso central, creada en 1935 por el neuroanatomista Joseph Klingler, en Alemania (1). La técnica original de Klingler consiste en colocar el encéfalo humano en formaldehído concentrado al 5% en agua destilada, colgando de la arteria basilar por un año y someterlo a congelamiento entre (-8°C a -10°C) durante al menos 8 días. Para realizar la disección utilizo una pinza suiza de relojero punta fina y espátulas de madera de diferentes milímetros (2). Por otro lado, las Escuelas de Medicina, por términos ético-legales se enfrentan a un problema complejo, ya que los materiales biológicos y piezas anatómicas, cada vez son más difíciles de conseguir, aún más, las piezas de estudio neuroanatómico, que presentan difícil adquisición, sin olvidar el reto adicional que implica la difícil manipulación y estudio de las mismas fuera de los laboratorios de anatomía (3). Dicha situación hace necesario estandarizar esta técnica en encefalos de bovino. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un protocolo de conservación del sistema nervioso central, con fines de docencia y disección de fibras de sustancia blanca estandarizando su uso en encefalos de bovino, estableciendo detalles característicos y de diferenciación con la técnica original de Klingler.

Material y método

El presente trabajo se realizó en el Anfiteatro de Anatomía, de la Escuela de Medicina de la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, México, se obtuvieron 20 encefalos de bovino con un postmortem entre 24 a 48 horas, en el rastro municipal, el resto de los insumos fueron obtenidos localmente en San Luis Potosí, México.

Aspecto éticos

Los encefalos de bovino se obtuvieron secundario a un proceso de elaboración de cárnicos y derivados, y no directamente para este trabajo. Por lo tanto, al no ser un proyecto que implicara experimentación con humanos y animales de laboratorio vivos, se consideró un proyecto sin riesgo acorde a la ley general de salud. Por lo tanto, no fue necesario pedir autorización al Comité de Bioética de la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí. Sin embargo, se observaron los lineamientos para derechos conforme al sistema de residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) respectivo.

Protocolo de conservación del sistema nervioso central mediante la técnica de Klingler estandarizada:

Lavado de la configuración externa del encéfalo.

Una vez obtenidos los encefalos se lavan con agua corriente, el lavado debe realizarse manualmente mediante una manguera o directamente del grifo sin exceso de presión, con el objetivo de eliminar restos hemáticos y restos de hueso en la superficie del encéfalo.

Fijación por inmersión.

Una vez lavados los encefalos, la fijación se realiza por medio de inmersión en formaldehído al 10% por 4 meses. Se preparan 3 litros de la solución por cada encéfalo de bovino y se colocan en un recipiente de plástico con capacidad de 5 litros. Previo, a la colocación de los encefalos debe pegarse en la superficie de cada uno de los recipientes de plástico un soporte realizado con gasas de 10x10 cm, con la finalidad de formar una hamaca colgante de gasas de 60 cm de largo x 40 cm de ancho, para mantener al encéfalo lejos del fondo del recipiente con la finalidad de evitar cambios en la configuración externa del encéfalo (Fig. 1).



Fig. 1: Hamaca de gasas, en la superficie cada uno de los recipientes.

Inmersión en agua corriente.

Una vez transcurrido los 4 meses de fijación, los encefalos se someten a inmersión en agua corriente por 24 horas, en un recipiente de plástico con capacidad de 30 a 40 litros, con la finalidad de evitar los efectos tóxicos e irritativos relacionados con la exposición continua a formaldehído durante la disección de meninges y sistema vascular.

Disección de meninges y elementos vasculares.

Posterior a las 24 horas, con ayuda de pinzas de relojero de punta fina y tijeras de microdisección rectas, retiramos aracnoides, piamadre y el sistema vascular de la configuración externa del encéfalo, tratando de lesionar lo menos posible la corteza cerebral y cerebelosa.

Primer proceso de congelamiento.

Horas después de la disección, se coloca cada uno de los encefalos por separado en una bolsa de polietileno con formaldehído al 10% (Fig. 2), por un periodo de 10 días en un congelador horizontal de la marca “Whirlpool®” a -18°C (Fig. 3). Una vez transcurrido el tiempo de congelación, se extraen las bolsas con los encefalos y se colocan en un recipiente durante 24 horas para que se descongelen a temperatura ambiente.



Fig. 2: Encefalos con formaldehído al 10%.



Fig. 3: Encefalos congelados en formaldehído al 10%.

Segundo proceso de congelamiento.

En seguida, y después de descongelarse a temperatura ambiente por un día, se vuelve a colocar cada uno de los encefalos en bolsas de polietileno, pero, ahora sin formaldehído y se someten nuevamente a congelamiento durante 10 días, en un congelador horizontal de la marca “Whirlpool®” a -18°C . Una vez transcurrido el tiempo de congelación, se extraen los encefalos y se colocan en un recipiente con agua corriente a temperatura ambiente durante 24 horas para que se descongelen. Finalmente, las piezas están listas para disección, cortes o lo que el

instructor o profesor necesite realizar (Fig. 4).

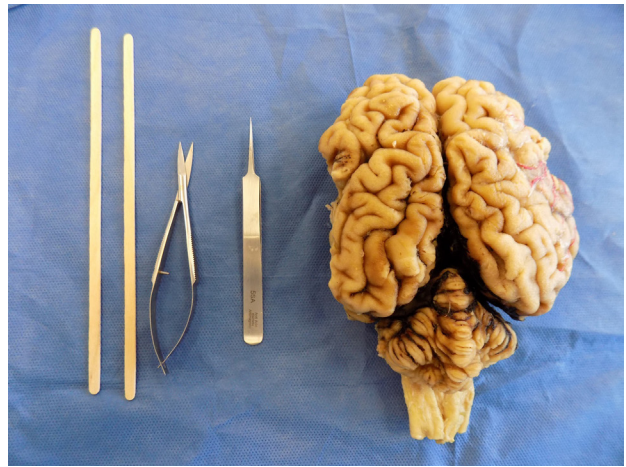


Fig. 4: Encéfalo descongelado a temperatura ambiente.

Resultados

Se logró desarrollar satisfactoriamente un protocolo de conservación del sistema nervioso central, mediante la estandarización de la técnica de Klingler en encefalos de bovino. Estableciendo diferencias en el proceso de fijación y congelamiento. Apartir de este protocolo se obtuvieron encefalos de bovino con una fijación uniforme debido a la inmersión en formaldehído al 10% por 4 meses. Adquiriendo un color blanco y una consistencia sólida como una goma. tal y como se observa en la (Fig. 5). Los grados de congelamiento a -18°C por 10 días fueron lo suficientemente necesarios para la fragmentación de la corteza cerebral (Fig. 6).

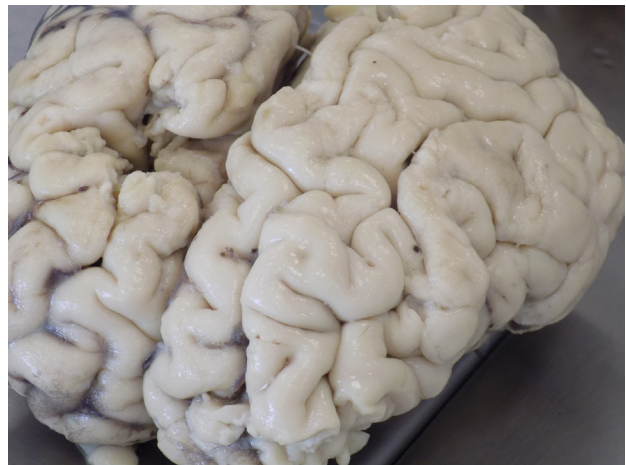


Fig. 5: Encéfalo fijado con formaldehído al 10%.

Discusión

Según Joseph Klingler, el método original para la conservación de encefalos humanos consiste en; la extracción del encéfalo de un cadáver con postmortem entre 24 y 48 horas, debe estar sumergido en 5 litros de

formaldehído, concentrado al 5% en agua destilada y colgando desde la arteria basilar, por un periodo de 12 meses. Antes de someterse a congelamiento, el encéfalo debe someterse a inmersión en agua corriente por varias horas. El proceso de congelamiento debe ser entre (-8 y -10 °C) durante 8 días, finalmente se recomienda someter a inmersión el encéfalo en agua corriente para iniciar la disección (2).

Por otro lado, nosotros reemplazamos el agua destilada de la fórmula original por agua corriente, ya que esta es de más fácil obtención en nuestro medio y sin costo alguno. Además, se ha disminuido el número de días en formaldehído debido a que el parénquima del encéfalo de bovino es menor, lo que permite una fijación uniforme en menos tiempo.

En cuanto a la fijación del sistema nervioso central se recomienda la concentración de formaldehído al 10%, la cual no presenta alteraciones de los tractos y estructuras, en relación a la utilizada por Klingler para este trabajo (4).

Del mismo modo, algunos autores piensan que el uso de formaldehído es un magnífico avance en la conservación de tejidos por su poder antimicrobiano, bajo costo y fácil acceso. Nosotros, al igual que otros autores (5), estamos de acuerdo con esta afirmación, sin olvidar que es un carcinógeno potencial en humanos.

Por otro lado, para evitar cambios en la configuración externa del encéfalo, se realizó una especie de cama o hamaca colgante con varias gasas de tal manera que el encéfalo quede suspendido, y no entre en contacto con el fondo del recipiente (6)(7).

Con respecto al proceso de congelamiento, sometimos los encefalos en dos fases diferentes, la primera con formaldehído al 10% y la segunda sin formaldehído durante el mismo periodo de tiempo y temperatura. Logrando una consistencia más adecuada de la pieza anatómica y fragmentación de la sustancia gris (8).

Conclusión

Recomendamos, utilizar un soporte realizado con gasas, con la finalidad de formar una hamaca para mantener al encéfalo lejos del fondo del recipiente para evitar cambios en la configuración externa del encéfalo.

Del mismo modo, es importante utilizar instrumentos de microdisección como; pinzas de relojero de punta fina y tijeras de microdisección rectas para lesionar lo menos posible la corteza cerebral.



REFERENCIAS

1. Pérez JC, Baldoncini M, Ledesma L. Atlas-manual de disección de encéfalo y sustancia blanca encefálica método Klingler. [internet]. Ciudad de México: INAV 2.0; 2014 [consultado 22 Nov 2021]. Disponible en: https://matiasbaldoncini.com/images/Publicaciones/17_ATLAS_compressed_1.pdf
2. Klingler J, Ludwig E. Atlas Cerebri Humani, Karger, Basel: NY, 1953.
3. Peralta E, Quijano Y. Generación de réplicas anatómicas del sistema ventricular encefálico humano mediante técnica de inyección corrosión, Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 2015; 18(1):51-57.
4. Guerrero M, Del sol M, Ottone, N. Preparación de hemisferios cerebrales para disección de tractos, Int. J. Morphol. 2019; 37(2):533-540.
5. Ocampo M, Gómez, J. Técnicas para el estudio anatómico del cerebro: una revisión, Univ. Méd. 2021; 62(1).
6. Pérez JC, Gallegos P, Garduño P, Reyes G, Valderrama M, Herrera I, Arteaga S, Herrera P, Delgado L. Estandarización del método Klingler y su visualización tridimensional, Rev. Hosp. Jua Mex. 2008; 75(2):99-108.
7. Uribe M, Zamarripa C, Salazar J. Modelo tridimensional básico y de bajo costo en cerebro de vaca mediante la técnica de Klingler. Arg. De Anat. Online. [internet]. 2022 [consultado 27 May 2022]; 13(1):19-23. Disponible en: <https://www.revista-anatomia.com.ar/archivos-parciales/2022-1-revista-argentina-de-anatomia-online-b.pdf>
8. Oxley A, Pereira H, Sassoli V. Disección de fibras del sistema nervioso central. En: SBA, editor. Técnicas anatómicas. 1ª. ed., Sao Paulo, 2021. p. 159-167.