



Modelo tridimensional básico y de bajo costo en cerebro de vaca mediante la Técnica de Klingler

Basic and low cost tridimensional model of the cow's brain using the Klingler technique.



MÉXICO

Uribe Miranda, Manuel de Jesús¹; Zamarripa Varela, Christian Manuel¹; Salazar García, Jesús Ricardo²

¹ Escuela de Medicina de la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, México

² Escuela de Medicina de la Universidad Autónoma de Durango Plantel Zacatecas, México

Escuela de Medicina de la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, México

E-mail de autor: Manuel de Jesús Uribe Miranda cgmj93@gmail.com

Resumen

Se describió una de las distintas técnicas neuroanatómicas para el estudio del cerebro humano y animal. Mediante la fijación con formaldehído y el congelamiento.

El objetivo de este trabajo fue generar modelos tridimensionales, fácil de manipular y de bajo costo, a través de la técnica de Klingler modificada con cerebros de vaca. En el anfiteatro de la Escuela de Medicina de la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, México.

Los criterios de exclusión fueron: cerebros de vaca con un postmortem de más de 48 horas y cuya muerte sea de origen neurológica. Posteriormente, los cerebros de vaca se sometieron al método Klingler modificado que consiste en; 1. Lavado del sistema vascular, 2. Fijación en formaldehído al 10%, 3. Inmersión del cerebro en agua corriente, 4. Retiro de meninges y sistema vascular, 5. Congelación, 6. Descongelación. El formaldehído al 10% dio el apoyo necesario para la fijación uniforme de los cerebros de vaca, el periodo de congelamiento fue lo suficientemente necesario para la fragmentación de la corteza cerebral.

El tiempo requerido para este trabajo fue de 43 días, divididos de la siguiente manera: 1 día para canulado y lavado del sistema arterial con agua corriente, 30 días para fijación por inmersión con formaldehído al 10%, 1 día para lavado con agua corriente, 1 día para retirar aracnoides, piamadre y sistema vascular y 10 días para el proceso de congelación.

Finalmente, el cerebro de vaca es una alternativa similar al cerebro humano para el estudio de diferentes estructuras de la configuración externa e interna del cerebro, principalmente para aquellos que comienzan a relacionarse estas habilidades en pregrado.

Palabras clave: cerebro, técnica de klingler, neuroanatomía, sustancia gris.

Abstract

One of the different neuroanatomical techniques for the study of the human and animal brain was described. By means of formaldehyde fixation and freezing.

The objective of this work was to generate three-dimensional models, easy to manipulate and low cost, through the modified Klingler technique with cow brains. In the amphitheater of the School of Medicine of the Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, Mexico.

The exclusion criteria were: cow brains with a postmortem of more than 48 hours, and whose death was of neurological origin. Subsequently, the cow brains were subjected to the modified Klingler method which consists of; 1. Washing of the vascular system, 2. 10% formaldehyde fixation, 3. Immersion of the brain in running water, 4. Removal of the meninges and vascular system, 5. Freezing, 6. Thawing. The 10% formaldehyde gave the necessary support for uniform fixation of the cow brains, the freezing period was sufficiently necessary for fragmentation of the cerebral cortex.

The time required for this work was 43 days, divided as follows: 1 day for cannulation and washing of the arterial system with running water, 30 days for fixation by immersion with 10% formaldehyde, 1 day for washing with running water, 1 day for removal of arachnoid, pia mater and vascular system and 10 days for the freezing process. Finally, the cow brain is an alternative similar to the human brain for the study of different structures of the external and internal configuration of the brain, mainly for those who begin to relate these skills in undergraduate.

Keywords: brain, klingler technique, neuroanatomy, gray matter.

Introducción

En 1935, el médico y neuroanatomista Joseph Klingler (1888-1963) desarrolló la técnica para conservación del cerebro humano para disección mediante la fijación y congelación.

Veintiún años después publicó su obra llamada "Atlas Cerebri Humani", técnica que actualmente lleva su nombre.¹⁻²

La técnica original de Klingler consiste en colocar el cerebro humano en formaldehído al 5% por un mes y someterlo a congelamiento entre (-20 a -22°C) durante al menos 15 días.

Posteriormente se retira del congelador y se lava nuevamente con agua corriente dejándolo descongelar a temperatura ambiente. Para realizar la disección utilizo una pinza suiza de relojero punta fina y espátulas de madera de tilo de diferentes diámetros.¹⁻³⁻⁴

En los últimos años, se han publicado diferentes trabajos que presentan modificaciones al método Klingler, con cerebros de humano, vaca, gato, cerdo, conejo y caballo, tal como la reducción en la concentración de formaldehído, aumento en los días y grados de congelamiento y repleción vascular con silicón o látex de moldeo.⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸⁻⁹

Por otro lado, las escuelas públicas y privadas de medicina, por términos legales y bioéticos 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 lo complicado que es la manipulación y estudio de las mismas fuera de los laboratorios.¹⁰

Dicha situación hace necesario emplear esta técnica, estableciendo detalles característicos de los protocolos desarrollados por otros grupos de investigación.

El objetivo de este trabajo fue generar modelos tridimensionales, fácil de manipular y de bajo costo, a través de la técnica de Klingler modificada con cerebros de vaca.

Material y método

El presente trabajo se realizó en el Anfiteatro de la Escuela de Medicina de la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, México.

Los criterios de exclusión fueron cerebros de vaca con postmortem de más de 48 horas, y cuya muerte sea de origen neurológica.

Este estudio, al no ser un proyecto que implicara experimentación con pacientes y animales de laboratorio vivos, se consideró un proyecto sin riesgo acorde a la ley general de salud, ya que los cerebros de vaca se obtuvieron en el rastro municipal del estado, con un postmortem de 24 horas.

Por lo tanto, de acuerdo con las regulaciones pertinentes, el estudio está exento del requisito de aprobación por el comité de ética e Investigación de la Escuela de Medicina de la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, y se observaron los lineamientos para derechos, conforme al sistema de residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) respectivo.

Los materiales utilizados fueron: 6 cerebros de vaca con postmortem entre 24-48 horas, 12 sondas nasogástricas calibre 5Fr, 10 suturas no absorbible seda negra 3-0, 2 jeringas de 10ml, 20 gasas de 10x20 cm, tijeras de microdissección,

pinzas de relojero de punta suiza, 12 litros de formaldehído al 10%, 1 contenedor de plástico con capacidad de 20 litros, 6 bolsas de polietileno, un congelador doméstico de dos puertas marca DAEWOO® y equipo de protección personal.

Para comenzar, los cerebros de vaca se sometieron a:

- **Lavado del sistema vascular:** Se cánulan la arteria basilar y una arteria carótida interna con una sonda de alimentación nasogástrica de 5Fr. y las arterias contralaterales se ligan con seda negra 3-0 para evitar fugas. El lavado debe realizarse manualmente mediante una jeringa de 10ml. que inyecta agua corriente continuamente sin exceso de presión, con el objetivo de retirar restos hemáticos de la luz de los vasos, evitando la formación de coágulos.
- **Fijación:** Previo a la colocación del formaldehído en el recipiente de plástico, colocamos una red hecha de gasas estériles de 10x20cm. Evitando que los cerebros de vaca toquen el fondo del recipiente, para no producir cambios en la configuración externa del cerebro. La fijación se realiza por medio de inmersión en formaldehído al 10%. Se preparan 12 litros de la solución y se colocan en un recipiente de plástico con capacidad de 20 litros. Posteriormente los 6 cerebros de vaca, permanecerán por un periodo mínimo de 30 días en la solución.
- **Lavado del cerebro:** Antes de iniciar el retiro de meninges y sistema vascular, se retiran los cerebros de la solución y se lavan con agua corriente abundante durante 24 horas, con la finalidad de evitar los efectos tóxicos e irritativos relacionados con la exposición continua a formaldehído.
- **Retiro de meninges y sistema vascular:** Se retira la aracnoides, piamadre y el sistema arterial cerebral de la configuración externa de los cerebros tratando de no lesionar la corteza cerebral, cerebelosa y tallo cerebral. Para ello es necesario utilizar pinzas de relojero punta fina y tijeras de microdissección curvas o rectas, como se muestra en la imagen. **(Fig. 1)**
- **Congelación:** Posteriormente, se coloca cada uno de los cerebros en una bolsa de plástico, se realiza un nudo de manera que no se escape vapor o líquido alguno y se colocan por un periodo de 10 días en un congelador doméstico de dos puertas marca DAEWOO® a (-16°C y 24°C)
- **Descongelación:** Una vez transcurrido el tiempo en

congelación, se extraen las bolsas con los cerebros de vaca y se colocan en un recipiente de plástico 6 litros agua corriente durante 2 horas para que se descongelen a temperatura ambiente. Finalmente, el modelo está listo para realizar disección de la sustancia gris, distintos cortes o lo que el instructor o docente desee realizar.



Fig. 1: Elementos utilizados para disección de aracnoides y sistema vascular. 1) Pinzas de relojero punta fina; 2) Tijeras de microdisección rectas.

localizado entre las fibras de sustancia blanca y gris forman una especie de microcristales que al descongelarse a temperatura ambiente producen una hidrodisección.

Sin olvidar que el formaldehído al 10% dio el apoyo necesario para la fijación de los cerebros de vaca uniformemente, adquiriendo un color blanco y una consistencia sólida como una goma, tal y como se observa en la **Fig. 2**.

En cambio, en la **Fig. 3** se aprecia un sólo cerebro como muestra, posterior al congelamiento por 10 días cubierto de hielo.



Fig. 2: Se observa cerebro de vaca fijado en formaldehído al 10% por 30 días adquiriendo un color blanco y uniforme

Resultados

El tiempo requerido para este trabajo fue de 43 días, divididos de la siguiente manera:

- 1 día para canulado y lavado del sistema arterial con agua corriente
- 30 días para fijación por inmersión con formaldehído al 10%
- 1 día para lavado con agua corriente
- 1 día para retirar aracnoides, piamadre y sistema vascular
- 10 días para el proceso de congelación.

La técnica utilizada para producir los modelos fue satisfactoria. Se produce una compactación de la sustancia blanca y gris de los cerebros de vaca sometidos a fijación con formaldehído al 10% durante 30 días, ya que el formaldehído



Fig. 3: Se observa un sólo cerebro como muestra, posterior al congelamiento por 10 días cubierto por cristales de hielo.

El periodo de congelamiento fue lo suficientemente necesario para la fragmentación de la corteza cerebral, adquiriendo un color café claro posterior al descongelamiento a temperatura ambiente por dos horas, tal como se muestra en la **Fig. 4**.

Finalmente se muestra la disección de la sustancia gris del hemisferio izquierdo, quedando expuestas las fibras blancas de asociación corta o arciformes del mismo hemisferio. (**Fig. 5**)

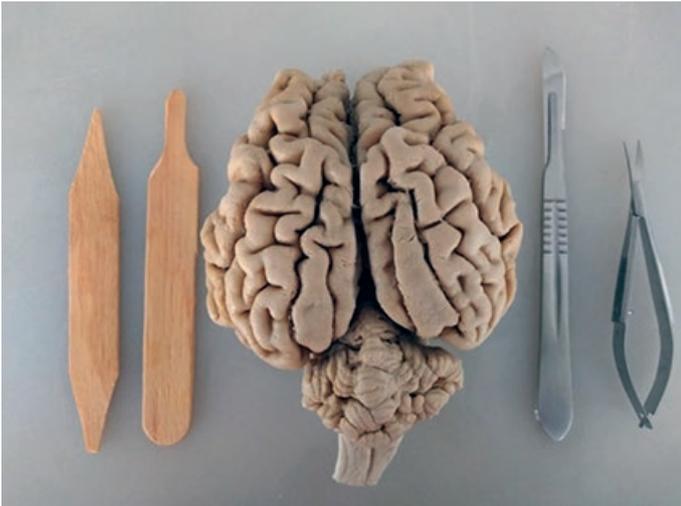


Fig. 4: Se observa un solo cerebro como muestra, descongelado a temperatura ambiente adquiriendo un color café claro.



Fig. 5: Se observa el hemisferio derecho intacto y el hemisferio izquierdo completamente diseccionado destacando en este las fibras blancas de asociación corta o arciformes

Discusión

Actualmente, los modelos neuroanatómicos hechos a través de cerebros de vaca, caballo, cerdo, no son iguales al cerebro humano real, pero son similares.

Por lo tanto, uno de los mejores métodos para aprender neuroanatomía es por medio de la observación y comparación con especímenes similares al cerebro humano.

El otro método es mediante la técnica de Klingler y consiste en la fijación con formaldehído y congelación del cerebro para disecar fibras, como sustancia blanca y gris, como lo hizo el médico y neuroanatomista alemán Joseph Klingler en 1935.

La fijación con formaldehído es el método más utilizado. Consiste en la inmersión en soluciones a base de formaldehído a diferentes porcentajes. No obstante, es poco agradable debido al penetrante olor y la irritación de mucosas generada por los químicos utilizados.¹¹

Por otro lado, Guerrero, Del Sol y Ottone recomiendan la concentración de formaldehído al 10% para conservar los tejidos del sistema nervioso central, siendo la más utilizada, la cual no presenta alteraciones de los tractos y estructuras, en relación a la concentración de formaldehído utilizado por Klingler para este trabajo.¹²

Con respecto a la fijación Ocampo y Gomes afirman que el formaldehído es un magnífico avance en la fijación de tejidos por su poder antimicrobiano, bajo costo y fácil acceso, pero es tóxico si se expone durante mucho tiempo. En respuesta a esto se ha buscado utilizar fijadores alternos como; alcohol, fenol, entre otros.¹³

La técnica de Klingler es un excelente método de disección de la configuración interna del encéfalo, que nos permite apreciar la dirección, angulación, y trayecto de las fibras de asociación, comisurales y de proyección.⁵

Los futuros trabajos con estos modelos deberán de tomar en cuenta tres condiciones para obtener una buena pieza.

Según Klingler, la primera es poseer buenos conocimientos de neuroanatomía, el segundo es poseer unas manos muy adiestradas y la tercera es tener paciencia y constancia.¹⁻³

Conclusiones

El cerebro de vaca es una gran alternativa similar al cerebro humano contiene estructuras muy peculiares que podrían servir como reforzamiento de las clases prácticas de neuroanatomía de pregrado como; cuerpo calloso, tallo cerebral, cerebelo y meninges.

Los autores recomiendan la fijación con formaldehído al

10% por 30 días y someter a congelación los cerebros a (-16°C y 24°C) durante 10 días y la utilización de instrumentos de microdissección como; pinzas de relojero de punta fina y tijeras de microdissección rectas o curvas para lesionar lo menos posible la corteza cerebral.

Agradecimientos

Un especial agradecimiento, a la Universidad Cuauhtémoc Plantel San Luis Potosí, por facilitarnos el anfiteatro y el material de laboratorio.

También en especial, al Dr. Julio Cesar Pérez Cruz, por compartir sus conocimientos sobre la técnica de Klingler.

Referencias

1. Cuneatos. Neuroanatomía 2.0: *Dissección de Encéfalo: Método Klingler* (1) [Video en línea]. 8 de octubre del 2010. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=I-IGo6jdNzkQ>
2. Pérez, J. C.; Baldoncini, M.; Ledesma L. A. *Método Klingler, Atlas-manual de dissección de encéfalo y sustancia blanca encefálica método Klingler*. 1ª edición, Ciudad de México, 2014, pp. 23-29.
3. Klingler, J. & Ludwig, E. *Atlas Cerebri Humani*. Karger, Basel: NY, 1953.
4. Klingler, J. & Gloor, P. *The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in human brain*. J Comp Neurol, 1960, 115: 333-69.
5. Pérez, J. C.; Gallegos, P.; Garduño, P.; Reyes, G.; Valderrama, M. R.; Herrera, I.; Arteaga, S. M.; Herrera, P. & Delgado, L. *Estandarización del método Klingler y su visualización tridimensional*. Rev. Hosp. Jua Mex., 2008, 75(2):99-108.
6. Yaman, M. E.; Izdes, M.; Sentürk, S.; Ozturk, Y. & Kazanci, A. *Fiber dissection training model for neurosurgical practice: white matter fiber dissection with Klingler's technique in bovine brain*. J. Neurol. Sci., 2014, 31(4):783-9.
7. Pascalau, R.; Aldea, C.; Padurean, A.; Szabo, B. *Comparative Study of the Major White Matter Tracts Anatomy in Equine, Feline and Canine Brains by Use of the Fibre Dissection Technique*. Anat. Histol. Embryol., 2015, 45(5):373-85.
8. Nunes, C.; Rassier, G.; Han, Y.; Mota, P.; Zimelewicz, D.; Nunes, N.; Gadelha, E. *Microsurgical anatomy of language*. *Clinical Anatomy*, 2020, 1-15.
9. Andrzej, T.; Balasa, A.; Jeżewski, P.; Michalowski, Ł.; Marchel A. *White matter dissection with the Klingler technique: a literature review*. Brain Struct Funct., 2021, 226(1):13-47.
10. 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.
11. Peralta, E.; Beltrán, A.; Luque, M.; Quijano, Y. *La plastinación como técnica de preservación de material biológico para docencia e investigación en anatomía*. Morfolia., 2017, 9(1):55-62.
12. Guerrero, M.; Del Sol M.; Ottone, N. E. *Preparación de hemisferios cerebrales para dissección de tractos*. Int. J. Morphol., 2019, 37(2):533-540.
13. Ocampo, M. I. & Gómez, J. C.; *Técnicas para el estudio anatómico del cerebro: una revisión*. Univ. Méd., 2021, 62(1).