

Universidad de Guadalajara

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



« Estandarización y Modificación de la Técnica Klitzo
Para la Observación de las Células de la Neuroglia ».

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Presenta :

María Guadalupe Reyes Huante

Asesor: M.V.Z. Víctor Barragán Cano

Guadalajara, Jal. 1986.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

A MIS PADRES *

JOSEFAT REYES ESPINOZA

CARITINA HUANTE DIAZ

A MIS HERMANOS *

A MI ASESOR *

M.V.Z. VICTOR BARRAGAN CANO.

A MI H. JURADO *

M.V.Z. GUIFRE MURIA I. ROURET

M.V.Z. RICARDO GARCIA LOZANO

M.V.Z. LUIS E. ESPINOZA PAEZ

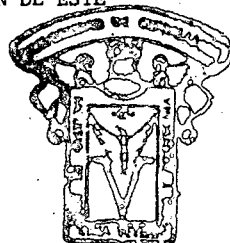
M.V.Z. LUIS RAMON ORTIZ BERRIEL

QFB. CARMEN YOLANDA PARTIDA ORTIZ

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS *

A LAS PERSONAS QUE DE UNA MANERA U OTRA
COLABORARON PARA LA REALIZACION DE ESTE
TRABAJO.

GRACIAS *

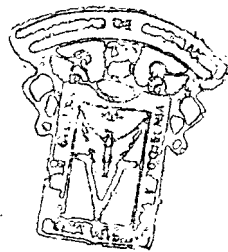


OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

I N D I C E

INTRODUCCION	PAG. 1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
HIPOTESIS	8
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODO	10
RESULTADOS	13
DISCUSION	17
CONCLUSIONES	19
SUMARIO	20
BIBLIOGRAFIA	21

" ESTANDARIZACION Y MODIFICACION DE LA TECNICA KLATZO
PARA LA OBSERVACION DE LAS CELULAS DE LA NEUROGLIA."



OFICINA DE
REVISION GIGIUM

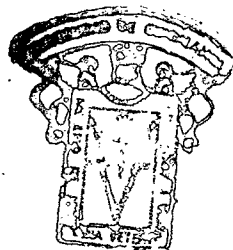
INTRODUCCION

La neuroglia o tejido glial de origen ectodérmico es un tejido puramente celular que forma el armazón de sostén de la substancia constitutiva del sistema nervioso central, tanto de substancia gris como de substancia blanca. Las células neuróglicas poseen en general un pequeño soma, que contiene fibras neuróglicas que se componen de un armazón proteico insoluble en agua y forma una tupida trama fibrosa, en la que se hallan incluidas las neuronas. (12)

En contraste con las neuronas las células neuróglicas conservan durante toda la vida su capacidad de reproducción. Cuando se produce una gran desintegración de neuronas, el espacio ocupado por éstas se rellena por proliferación rápida de la neuroglia. Las células neuróglicas pueden formar también tumuraciones (glioma). (4)

A su cargo corren importantes funciones; de nutrición, metabólicas, fagocitarias y de aislamiento recíproco de las neuronas, además de ser el tejido de sostén de las neuronas. Las células de la neuroglia se caracterizan por ser generalmente pequeñas y son de cuatro tipos: astrocitos, oligodendrocitos, microglia y células endimarias. (4,14)

El número de células neuróglicas sobrepasa hasta unas 10 veces, aproximadamente, el de las neuronas, su relación con las neuronas es de 10.:1 hasta de 50: 1. (4,14).



La importancia de la neuroglía para el metabolismo de las neuronas se deduce del hecho de que estas últimas; en cultivos de tejidos, sólo conservan (durante cierto tiempo) su funcionalismo intacto si se hallan en presencia de células gliales. Entre ambos tipos de células existen relaciones mutuas, tanto metabólicas como bioeléctricas. (4)

La neuroglía tiene características histológicas muy variables y -- son difíciles de distinguirse con los métodos histológicos rutinarios. Es preciso aplicar técnicas muy especiales y específicas para la determinación de estructuras propias de las células nerviosas, estas células se pueden identificar mejor gracias a los métodos de impregnación con metales. En 1873, Camilo Golgi recomendó por primera vez el método de impregnación argéntica para las investigaciones del sistema nervioso central. Los métodos de impregnación con sales de plata han adquirido ya tal polimorfismo que ha sido necesario describir con detalle todas las modificaciones y variante que se han hecho a fin de dar a conocer y divulgar sus aplicaciones, tan útiles en los campos de la investigación científica que ayuda al conocimiento morfológico, ya sea de tejidos biológicos normales como patológicos, pues nos permite analizar las formas celulares individuales y muchas de sus estructuras citoplásmicas granulosas y fibrilares. (3,15).

Los métodos de impregnación argento-aúricas cuentan con una historia muy importante. A partir de 1888, el Investigador Español Santiago Ramón y Cajal, dedicado también al estudio del sistema nervioso, logró importantes modificaciones al método de Golgi como el doble cromado e impregnación, que constituye un perfeccionamiento de gran importancia dao a conocer en 1892 ya que mediante este sentó las bases .

morfológicas de la transmisión de los estímulos nerviosos. (3)

Al principio las técnicas argento-aúricas se utilizaron principalmente por los diferentes autores, desde hace más de cien años, en el estudio del sistema nervioso; sin embargo, en los últimos ochenta años, se han utilizado para conocer la estructura de todos los órganos y tejidos entre los que se encuentran el tejido conectivo el sistema reticulo-endotelial y otros. De esta manera los términos de impregnación serán quizás más seguros que los métodos de tinción las sales de osmio, mercurio, plomo y uranio son algunas veces utilizados, el más valioso metal para éste propósito es la plata en la forma de nitrato de plata. Se requiere el empleo de numerosos métodos especiales, unos generales y otros adaptados a la particularidad del tejido nervioso. (3,13)

Los métodos especiales son muy diversos y han dado a numerosas variantes; la elección de los mismos dependerá de la región del sistema nervioso. Indicaremos los grandes métodos básicos existentes para poner de manifiesto las células de la neuroglía. (3,5).

1.- Método Holzer (2)

a).- Fibras gliares

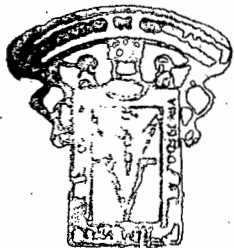
2.- Método modificación del Río-Hortega con carbonato de plata (5,9)

a).- Astrocitos

b).- Glía prevascular y la microglía

3.- Método de Ramón y Cajal con oro sublimado (2,9)

a).- Astrocitos.



4.- Método Acido Phosphotungstic y Hematoxylin (6,8)

a).- Astrocitos

b).- Colageno y mielina

5.- Método Klatzo (1,7)

a).- Astrocitos

b).- Oligodendrocitos

c).- Microglía.

6.- Método modificación de Del Río- Hortega-Golgi (5)

a).- Oligodendrogolía.

7.- Método Penfield modificación del Del Río Hortega con carbonato de plata. (9)

a).- Fibras gliares.

8.- Método Golgi con cromato de plata (9)

a).- Somas celulares y prolongaciones.

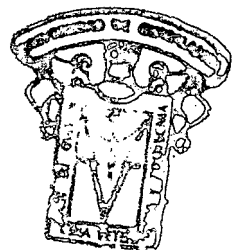
9.- Método Cox con bicloruro de mercurio (7,9)

a).- Somas celulares y prolongaciones.

10.- Método Weil y Devenpont (9)

a).- Células gliates

b).- Tumores celulares gliales

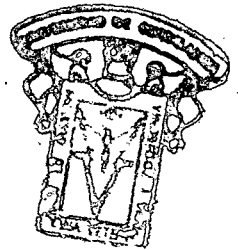


11.- Método modificación Penfield-Stern (7,10)

a).- Oligodendrocitos.

12.- Método Golgi-Hortega -Lavilla con impregnación de plata.

a).- Células gliales (1,7).



Sólo queda aclarar que las impregnaciones metálicas, han servido para evidenciar y caracterizar algunos elementos celulares y tisulares no nerviosos, que son poco destacados con otras técnicas Y que además no se limita a las investigaciones sobre sistema -- nervioso el uso de plata, sino que existe un trabajo fructífero en donde se han usado también para impregnar tejidos algunas sales de oro, ácido ósmico, de manera independiente o conjunta con las soluciones de plata. (3,5).

En el presente trabajo se utilizó el método modificado de Klatzo debido a que los procedimientos que se siguieron son rápidos y no se requirió de mucho tiempo para realizarla ni de material sofisticado. La ventaja de éste método es que permite visualizar individualmente células de la glía con sus prolongaciones, pues algunos métodos más que detalles estructurales, lo que permite observar son las formas de las neuronas. (3,9).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Para el estudio de los elementos neuronales se requiere de técnicas especiales a base de impregnaciones argentícas y en ocasiones muy sofisticadas que no están al alcance de los estudiantes.

Por lo que éste trabajo se utilizó el método modificado de Klatzko que permite observar los elementos de la glía, debido a que no se distinguen bien apareciendo solo sus núcleos con los métodos rutinarios existentes.



H I P O T E S I S.

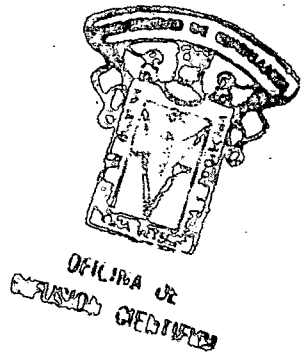
Creemos que la . con la técnica modificada de Klatzo podrá lograrse una observación más precisa de las células de la neuroglía.

OBJETIVOS

Implementación de la técnica de Klatzo modificada, para ser empleada de forma rutinaria en el Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Incrementar las técnicas histológicas empleadas en el Laboratorio de Histología, incluyendo técnicas a base de impregnaciones argénticas.

Dotar al departamento de Histología de una nueva técnica y reactivos, que auxiliará a técnicos y alumnos para el mejor estudio de estructuras celulares del S.N.C.



MATERIAL Y METODO

El presente trabajo se realizó en 50 muestras de tejido nervioso de la especie canino, caprino, rata y conejo, que se obtuvieron de cadáveres recién muertos que llegaron para Necropsia al Departamento de Patología. Haciendo cortes de tejido de un grosor de 3-4 milímetros.

TECNICA DE KLATZO MODIFICADA.

1.- Fijar en solución fresca de hidrato de cloral 3g. y 5g.- de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), en 90 ml. de agua destilada agregar 10 ml. de formalina.

Para astrocitos protoplasmáticos de 12-17 hrs., para astrocitos fibrosos fijar por 18-48 hrs., para oligodendrogolia de 18-24 hrs. y para microglía de 12-48 hrs.

2.- A las 24 hrs. enjuagar los bloques en 10 % de formalina, ponerlos a ellos en una solución fresca si un segundo día es requerido.

3.- Lavar rápidamente en 4 cambios de agua destilada. Pasar los bloques individualmente directo a 4 baños de 25 ml.- al 1 % de nitrato de plata, permaneciendo alrededor de 2 minutos en cada uno, manejar con pinzas recubiertas de parafina.

Impregnar por 18-24 hrs. en 1.5 % de Nitrato de Plata.

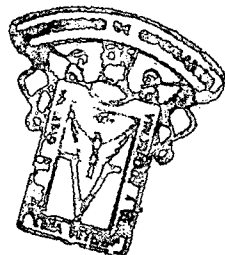
4.- Enjuagar con agua destilada y quitar con una brocha el precipitado. Meter a procesar al históquineté de manera rutinaria.

5.- Bloquear con parafina y hacer cortes de tejido en el microtomo de 60-90 micras, recolectar en baño de flotación con portaobjetos y desparafinizar en la estufa a 60 °C. y xilol, montar con resina sintética.

RESULTADOS: Células de la glía de color negro y fondo amarillo.

MODIFICACION A LA TECNICA ORIGINAL.

A).- Cortar en secciones congeladas a 60 ó 100 micras, recolectando en alcohol al 30 % (dos cambios).



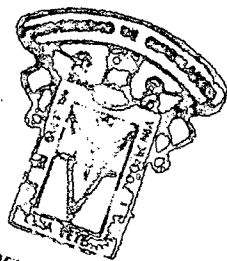
B).- Deshidratar en alcohol de 95 y 100 % y aclarar en tolueno.

C).- Sobrenadar encima de los portaobjetos, coger cubrir libremente con tolueno permount, aplicar el cubreobjetos.

RESULTADOS

La modificación hecha a la técnica de Klatzo aportó resultados positivos, ya que se logró mediante un proceso más fácil, más-rápido y relativamente económico, la observación clara de astro-citos fibrosos, astrocitos protoplasmáticos, oligodendrocitos - y células de la microglía (Figura 1 y 3). .

La técnica no fué selectiva, pues además de las células anterior-mente citadas, también se tiñeron neuronas y sus prolongaciones- (Figura 2).



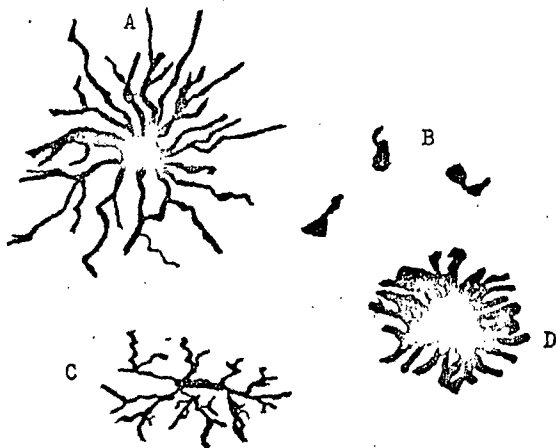


FIGURA NUM. 1. Representación de las células de la glía (A) astrocito fibroso, (B) oligodendrocitos, (C) Microglía, (D) astrocito protoplasmático.





FIGURA NUM. 2 Vista general de las células de la glía con algunas neuronas. (A) A. Fibrosos, (B) A. Protoplasmáticos, (C) Microglia, (D) Oligodendrocitos, (E) Neuronas.

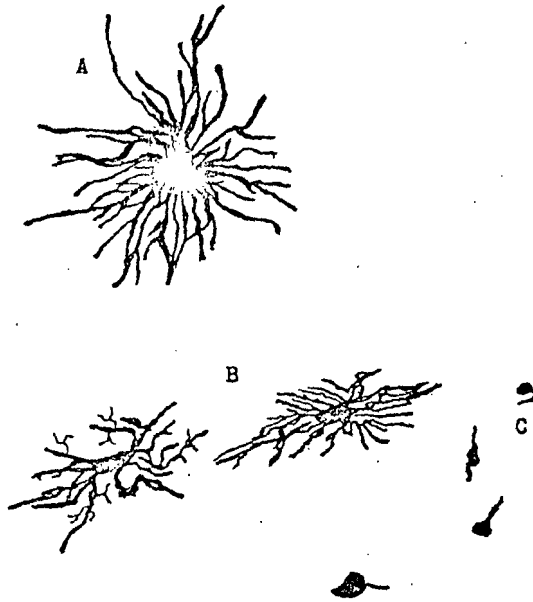
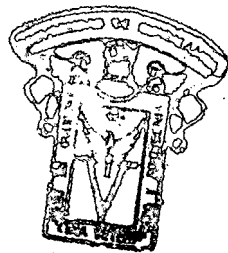


FIGURA NUM. 3

Imagen de 3 células de la glía
(A) Astrocitos fibrosos, (B) -
Microglía, (C) Oligodendrocitos.



DISCUSION

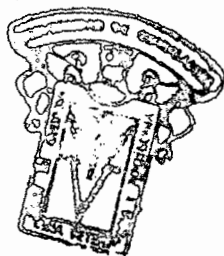
Los resultados de la modificación, a la técnica de Klatzo que se hizo por no tener el microtomo de congelación son los mismos a la técnica original, pero observamos durante el desarrollo que existen algunas diferencias en lo que se refiere al tiempo de fijación en la primera solución (dicromato de potasio), la técnica original dice que el tejido debe fijarse para astrocitos fibrosos de 18-48 hrs., para astrocitos protoplasmáticos de 12-17 hrs., oligodendrocitos por 18-24 hrs., y para microglía 12-48 hrs.

Para el método modificado se observaron células gliares fijando tejidos por 12 hasta 72 hrs., en la primera solución y 24 hrs. en nitrato de plata al 1.5 %. Nosotros observamos que entre más tiempo fijáramos el tejido en la solución de dicromato de potasio había mejor impregnación de plata y mayor tinción de células, se observó que a partir de las 36, 48 y 72 hrs. de fijación hay una mayor apreciación de las células de la glía, tiñéndose más los astrocitos fibrosos y astrocitos protoplasmáticos.

Entre las ventajas que nos presentó la utilización de la técnica de Klatzo modificada, respecto a la técnica original podemos mencionar:

Que se puede procesar tanto tejido fijado en formol como tejido fresco, además, las preparaciones pueden conservarse hasta por 30 días en solución de nitrato de plata al 1.5 %, contra 24 hrs. que es el tiempo máximo, recomendado en la técnica original.

Las desventajas que observamos en la aplicación de ésta técnica son: Que no es muy selectiva, pues además de las células de glía se tiñeron neuronas y sus prolongaciones, además los vasos sanguíneos y depósitos de plata formados interfieren la impregnación -- de células nerviosas y la solución de nitrato de plata no debe usarse más de 2 veces porque no tiñe de una manera óptima las células de la glía.



CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se cumple con los objetivos del presente trabajo.

La modificación a la técnica de Klatzo resultó más fácil de realizar, más rápida y más económica que la técnica original.

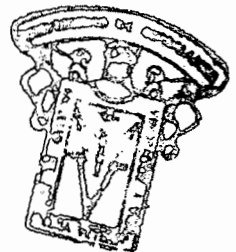
Puede ser aplicada a tejidos fijados en formol y a tejidos frescos.

Los tejidos pueden conservarse más tiempo en sol. de nitrato de plata, que en la técnica original.

La técnica no fué selectiva, porque se tiñeron también neuronas.

Los vasos sanguíneos y depósitos de plata formados, interfieren la impregnación.

Cuando la solución de nitrato de plata se utilizó más de dos veces, no se logró tinción adecuada de las células del glía.

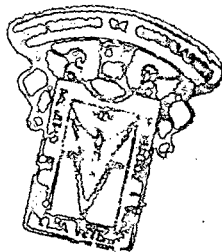


S U M A R I O

Se utilizaron 50 muestras de corteza cerebral y cerebelo de canino, caprino ratas y conejo, se hicieron cortes histológicos - con un grosor de 3 a 4 milímetros y se procesaron por medio de la técnica argéntica de Klatzo modificada.

Se logró la observación de astrocitos fibrosos, astrocitos protoplasmáticos, oligodendrocitos y microglía.

La técnica de Klatzo modificada resultó un procedimiento fácil, rápido y relativamente económico para la tinción e identificación de células de la neuroglía, aunque no selectiva, pues se tiñeron también neuronas y sus prolongaciones.



B I B L I O G R A F I A

- 1.- D' Amlio F.E., " The Golgi-Hortega Lavilla Tecnique, with a useful additional step for aplicati3n to brain tisgve after prolonged fixation" , Stain Tech; 58 (2) P3g. 79,84 (1983).
- 2.- Desbiley D.B. Rack G.A., Histological Laboratory Methods " Endinburgh and London, E.S. Livingstone, (1970 p3g. 205,-- 262.
- 3.- Estrada F.E., Peralta Z.L., Rivas M.P., " Manual de T3cnicas Histol3gicas," primera edici3n, M3xico, A.G.T., Edit. S.A. - (1982) P3f. 13, 15, 22, 24.
- 4.- Guntler H., y col. " Fisiolog3a Veterinaria," (II), Edit.- Acribia (1974) P3g. 833, 834.
- 5.- Humason G.L., "Animals Tissue Thechnique" , fourth editi3n, Sn. Francisco, W.H., Frecman and Company, (1979) P3g. 162, 165, 175, 203.
- 6.- Kemali M., " A modificati3n of the rapid Golgi metrod" , Stain Techonl., 53 (3) P3g. 169, 172 (1976).
- 7.- Lillie R.D., and Fullmer H.M., " Histpathologic Technic and -- Practical Histochemistry " fourth editi3n, Mc Graw-Hill, Book company, P3g. 769, 770. .

- 8.- Luna L.G. " Manual of Histologic Staining Methods of the Armedforces Institute fo Pathology," third edición, New York, Mc. Graw- Hill, (1968).
- 9.- Martoja R. y Martoja M.P., " Técnicas de Histología Animal," primera edición, junio (1970) Edit. Totog Masson, S.A. - Barcelona. Pág. 133, 152.
- 10.- Preece A., H.T. " Manual for Histologic Thechnicians" , third edición (1972) Edit. Little, Brow y Company Boston, Pág.200 214.
- 11.- Schumcher S.V., " Comprendió de Histología Humana" ,Edit. Labor, S.A. (1974) Pág. 97,98.
- 12.- Hammersen, S. " Atlas en colo de Citología, Histología y Anatomía Microscópica" , 2da. Edición, Edit. Salvat, (1982) Pág.- 80, 81,82.
- 13.- Weiss K., Greep, R.O. " Histology," forth edición, Edit. Mc. -- Gran-Hill, Book company (1977 Pág. 317,323.
- 14.- Whearter P.R., Burk TT. GH. Daniels G. Victor " Histología Funcional, " Edit. Jims. Barcelona (1980) Pág. 98-101.

