


PROYECTO DE MÁSTER DE BIOMEDICINA



"Optimización de la técnica de
Plastinación S-10 a baja
temperatura aplicada en
corazones de cerdo"

LAURA CUBERO LÓPEZ
CURSO 2011/2012

JOSÉ ARTURO PRADA OLIVEIRA, Profesor Titular de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Cádiz.

INFORMA que **Dña Laura Cubero López**, Alumna del Máster en Biomedicina ha realizado bajo mi supervisión y en las dependencias del Departamento de Anatomía y Embriología Humanas, los trabajos conducentes a la superación de la prueba de desarrollo de un proyecto de investigación del mencionado Máster.

Sin otro particular, y a petición de la interesada, firmo la presente en Cádiz, a 25 de septiembre de 2012.

Prof. J Arturo Prada Oliveira



INTRODUCCIÓN

En el antiguo Egipto enterraban, inicialmente, a sus muertos en la caliente arena del desierto, en recipientes con hierbas, lo que provocaba que los restos se desecaran rápidamente, previniéndolos así de la descomposición; posteriormente eran sepultados. Más tarde, comenzaron a construir mastabas de adobe, e idear el complejo proceso de la momificación y los rituales asociados con el entierro que dieron origen a los ritos funerarios.

La práctica se originó debido a la creencia en la inmortalidad del espíritu humano, según la mitología egipcia, dando lugar al desarrollo del embalsamamiento y la momificación, para poder preservar la identidad del individuo en el más allá, de acuerdo con sus costumbres. También creían que para pasar con éxito el Juicio de Osiris, el cuerpo debía conservarse intacto. Descubren que el cuerpo simplemente enterrado no tarda en estropearse y buscando una razón con el tiempo dan con la solución: el cuerpo tiene mucha agua lo que hace que se descomponga con facilidad.

Aprendieron a extraer del cuerpo los órganos, la sangre y todo aquello que facilitase su descomposición, al final los enterraban en la arena del desierto y después de un tiempo empezaron a tratarlo con natrón, lo que era mucho más costoso e hizo que hubiera dos tipos de enterramientos: los de aquellos que tenían pocos bienes y los de aquellos que tenían mucho, o lo suficiente como para permitirse una especia tan "rara" como el natrón.

Con el tiempo se ha ido perfeccionando la técnica y dejando a un lado la parte mística para darle una prioridad a la parte científica. La conservación del cuerpo humano se hace imprescindible para su utilización en el estudio profundo de la Anatomía humana, lo que ha llevado a formar a los profesionales de la Medicina y otras Ciencias de la Salud.

Una de las técnicas, hoy día, más innovadoras en la conservación cadavérica es la Plastinación, inventada por el anatomista alemán, Gunther von Hagens.

Esta técnica se basa en el reemplazamiento de los fluidos de nuestros tejidos por reactivos plásticos como silicona, resina epóxida o poliéster, en un proceso de vacío. Las piezas quedan secas y sin olor. Gracias a estas

propiedades, la Plastinación de especímenes tiene una alta importancia en el terreno educativo, sobretodo, para los estudiantes de medicina.

Gracias a la calidad que presentan las piezas, la Plastinación representa la forma más atractiva de exhibir un cadáver humano.

Además, la posibilidad de hacer cortes transparentes de las piezas lo hace particularmente interesante ya que pueden llegar a observarse a simple vista estructuras indispensables, que sólo se podrían verse con gran dificultad.

La Plastinación es una técnica aparentemente sencilla. Los pasos a seguir son:

- 1.- Disección y Fijación
- 2.- Deshidratación
- 3.- Impregnación
- 4.- Polimerización o curado



Fig 1. Cadáveres de hombre y caballo plastinados por Gunther von Hagens

FIJACIÓN

La fijación es un procedimiento para conservar los tejidos en el estado más parecido posible a los procesos orgánicos, evitando la descomposición y transformación de las sustancias celulares.

Hay que distinguir, primeramente, entre la fijación microscópica y la macroscópica. La microscópica se usa para el proceso histológico. La fijación macroscópica es previa a la disección de las muestras y en ocasiones, las piezas (a veces órganos enteros) quedan sumergidas.

NORMAS GENERALES DURANTE LA FIJACIÓN

1. Preparar los fijadores con la suficiente antelación. Si se preparan mezclas que no sean estables, se pesarán y medirán bien todos sus componentes.
2. Usar frascos de boca ancha, transparentes y escrupulosamente lavados antes de su utilización. Luego se etiquetarán debidamente.
3. El volumen del fijador debe ser 20 veces mayor que el de las muestras introducidas en él, pues muchos fijadores se van consumiendo durante la fijación y disminuyen su eficacia al irse diluyendo (el tejido tiene agua).
4. Cada fijador debe utilizarse una sola vez.
5. Toda la pieza debe estar sumergida. Se evita que flote poniendo un papel de filtro encima (pulmón). Si por el contrario, se hunde, se pone una gasa o un algodón debajo.
6. El tejido se echa sobre el fijador, y no al revés.
7. Los frascos se deben mover de vez en cuando para favorecer la penetración del fijador.
8. Cada fijador tiene un tiempo óptimo de actuación. El tiempo ideal es el mínimo necesario, pues si se prolonga demasiado la fijación el tejido puede endurecerse demasiado.
9. Hay varias características físico-químicas que son importantes: la presión osmótica del fijador puede hinchar los tejidos o contraerlos. Esto no nos interesa porque altera la anatomía. El pH debe estar entre 6 y 8.

TIPOS DE LÍQUIDOS FIJADORES

Por su composición:

- Físicos
- Químicos
 - o Fijadores simples
 - o Fijadores compuestos o mezclas fijadoras

Por su mecanismo de acción:

Fijan por deshidratación

- Alcohol
- Acetona

Fijan por formación de sales

- Bicloruro de mercurio
- Dicromato potásico
- Ácido pícrico

Fijan por el cambio del estado coloidal

- Ácido acético
- Ácido tricloroacético
- Ácido crómico

Fijan por reticulación de proteínas

- Formalina
- Glutaraldéhidro
- Tetróxido de osmio

PROPIEDADES DE LOS FIJADORES

Son conservantes porque tienen muchas propiedades, entre las que destacan:

- Inhiben la acción de las enzimas intracelulares (evitan la autólisis).
- Son antisépticos, inhiben el crecimiento bacteriano (evitan la putrefacción), impidiendo el peligro de contagio para el manipulador.
- Coagulan el interior celular, haciendo insoluble a la célula.
- Endurecen el tejido, para que se corte fácilmente, si fuera necesario.

FIJADORES FÍSICOS

- El calor

- El frío (congelación)
- La criodesecación (congelación a -50°C y eliminación de agua a bajas presiones).

Se utilizan por su simplicidad, pero en muchos casos se deben descartar porque alteran irremediablemente las estructuras celulares.

FIJADORES QUÍMICOS

FIJADORES SIMPLES

Son soluciones simples, generalmente acuosas, de una sola sustancia. Los más usados son los siguientes:

- Alcohol etílico

Líquido incoloro, soluble en agua. Se suele usar en concentraciones desde el 70% hasta el 99,5% (absoluto).

Como fijador simple se usa para conservar ciertas enzimas pero tiene muchos inconvenientes: disuelve las grasas y desnaturaliza las proteínas.

Encoge y endurece los tejidos, a no ser que se use a temperaturas bajo cero.

- Formol

El formol o formaldehído es un gas que se utiliza en solución acuosa al 35-40%. Diluido al 10% es el fijador más usado y útil. Por su mecanismo de acción, es un buen fijador de las grasas (no las disuelve) y también de los hidratos de carbono. Con las proteínas, provoca polimerizaciones y complejos de adición. Tiene tendencia a degradarse a ácido fórmico, y por ello muchas veces se usa mezclado con alguna solución tamponadora, constituyendo el formol neutro.

No encoge los tejidos, pero sí los endurece mucho. Pueden permanecer las piezas en él mucho tiempo.

- Ácido acético diluido

Es el más antiguo fijador que se conoce. Se usa en una concentración entre el 0,3 y el 1,5 %, pero no se utiliza solo.

Penetra muy bien y muy rápidamente en los tejidos, no afecta a las grasas y precipita las nucleoproteínas. Es bueno para fijar el núcleo, pero daña las mitocondrias.

- Ácido pícrico

Es un sólido cristalino, amarillo-blanquecino. Cuando se le extrae el agua pasa a ser blanco, en cuya forma es inflamable y explosivo.

Precipita las proteínas, formando picratos (sales). Las soluciones hechas con alcohol fijan bien los hidratos de carbono.

Es el compuesto fundamental del líquido de Bouin, uno de los principales fijadores compuestos.

- Ácido crómico

Se utiliza en solución acuosa (es muy soluble en agua). Precipita las proteínas y raramente se utiliza solo, pues su acción sobre los tejidos es violenta y destructora.

- Dicromato potásico

Es una sal muy soluble y potente oxidante, por lo que es útil para fijar los lípidos. No produce precipitación de las proteínas y disuelve la cromatina.

Se usa mucho en la conservación de las vainas de mielina y los fosfolípidos (previa fijación en formol y en dicromato potásico al 2-3 % durante 3-7 días, para la fabricación de bloques incluidos en parafina).

- Dicloruro de mercurio

Precipita las proteínas, por lo que se utiliza en muchos fijadores compuestos. Deja, sin embargo, los tejidos cubiertos de un precipitado que debe ser eliminado con una mezcla yódica.

Además, hace las coloraciones más brillantes y firmes, pero dificulta la inmunocitoquímica.

- Tetraóxido de osmio

Es un fuerte oxidante, que deja a las estructuras celulares muy parecidas a cuando estaban vivas. Es muy utilizado como fijador en microscopía electrónica.

Fija y tiñe de negro simultáneamente las grasas. No precipita las proteínas. Como inconvenientes encontramos que es muy volátil e irritante para los ojos y tiene escaso poder de penetración.

- Acetona

Es muy soluble en agua y un poderoso disolvente para las grasas. Se usa, a veces, en lugar del alcohol, para lograr una buena deshidratación.

Además, la acetona absoluta a -5°C es muy útil para fijar tejidos cuyas enzimas no se quieren destruir (lipasa y fosfatasa ácida, sobretodo). Es casi el único fijador que no destruye las enzimas.

FIJADORES COMPUESTOS

Los fijadores simples no obtienen resultados óptimos, por lo que es muy frecuente que se empleen mezclados. Esas mezclas se llaman fijadores compuestos, y casi todos ellos se han confeccionado de manera empírica.

Las mezclas más importantes son:

- Alcohol-Formol

Se usa a veces como fijador para el nucleolo y el retículo endoplásmico, en estudios citológicos. También se utiliza en el desparafinado posterior al corte.

Composición: Alcohol absoluto 90 mL y formol 40%.

- Formol neutro

Además de fijador compuesto, forma parte de otras mezclas. La tendencia del formol a degradarse a ácido fórmico se neutraliza con gotas de solución de sosa o de carbonato sódico. Se comprueba la neutralización con papel indicador o con pHmetro.

Composición: Formol al 40% y gotas de solución de sosa o de carbonato sódico.

En este estudio se eligen cinco fijadores:

- Etanol
- Formol
- Líquido de Bouin acuoso
- Líquido de Bouin no acuoso
- Líquido de Winckler

El criterio seguido para la elección de estos fijadores es por su representatividad. El etanol fija por deshidratación, el formol fija por reticulación de proteínas y el líquido de Bouin (acuoso y no acuoso) y el Líquido de Winckler forman parte de fijadores compuestos muy utilizados. Posteriormente se detallará la composición y características de estos fijadores.

Se usaron dos muestras por fijador. El número de muestras es tan reducido por la dificultad de obtener corazones de cerdo sin cortes que dañen su anatomía. El interés por su utilización se basa en la similitud del corazón de cerdo con el de humano, siendo así una herramienta muy importante para la docencia de la Anatomía, como comentaremos más adelante.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nos planteamos si es posible la mejora del proceso de Plastinación con S-10 a baja temperatura, tratando de economizar y conseguir un buen aspecto de la pieza, mediante la utilización de varios fijadores.

Las variables de estudio son:

- 1) Peso
- 2) Aspecto de la pieza

El peso se controla en distintos puntos para ver el nivel de deshidratación que sufrieron las piezas. El aspecto de la pieza se valora al final del proceso, una vez acabada la fase de polimerización o curado y cuando ya está lista para ser utilizada como herramienta docente.

Los objetivos del estudio son descubrir si la utilización de un fijador con alto poder deshidratante hace que la pieza que se obtenga al final muestre un aspecto idóneo para la visualización de estructuras. Consiguiéndose así economizar el tiempo y, en su caso, el coste.

Durante el transcurso de la técnica, se elimina la fase de lavado previa a la deshidratación con acetona que se describen en otros estudios. Esto es porque aquí nos interesa saber de qué manera afectan los fijadores al resto del proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Los materiales utilizados en el estudio fueron corazones de cerdo de un peso entre 360-640 g. La variabilidad del peso se debe a la conservación de estructuras mediastínicas interesantes para la docencia y a la variabilidad debido a los distintos tamaños del animal. Esto se puede observar en la tabla 1 de resultados. Se muestra la pérdida de peso durante el protocolo.

La justificación de uso de este material pasa por su gran similitud anatómica existente entre éste y el corazón humano. Lo que constituirá un recurso docente imprescindible en el estudio de la Anatomía en Medicina y otras Ciencias de la Salud.

Se usaron 10 corazones de cerdo procedentes de matadero. La limitación en el número de muestras viene impuesta por la dificultad de acceder a este tipo de material anatómico ya que la normativa europea regula su comercialización como uso alimentario y no con fines investigadores.

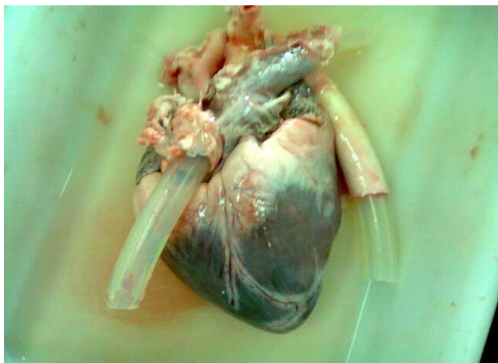


Fig 2. Corazón de cerdo diseccionado e intubado.

2. Métodos

- 2.1. Preparación de muestra
- 2.2. Fijación
- 2.3. Deshidratación
- 2.4. Impregnación
- 2.5. Polimerización o curado
- 2.6. Marcaje de las piezas. Preparación docente

2.1. Preparación de muestra

En primer lugar se realizó un proceso de limpieza. En esta fase se retiró el tejido conjuntivo y pericárdico. Se descubrieron los grandes vasos. La limpieza se realizó con agua corriente para eliminar todos los restos de sangre que pudieran obstruir el tejido. Así quedó perfectamente preparado para el paso siguiente.

Posteriormente, se intubaron los grandes vasos con tubos de goma de una sección de 1 cm² para evitar colapsos. Se marcaron con hilo de algodón de dos colores (rojo y azul) para hacer una distinción entre los dos corazones con el mismo fijador. Y se pesaron con una báscula (marca Shönker).

Las pesadas se realizaron previamente a la fijación, a la deshidratación y a la impregnación (tabla 1) para así monitorizar todo el proceso de pérdida de peso que se produce al eliminar el agua del tejido.

Este paso es muy importante ya que establece un control de una de las variables ya planteada en la introducción.

2.2. Fijación

Se utilizaron cinco fijadores con distintas propiedades químicas. Un fijador para cada dos corazones quedando ya justificado anteriormente. Se quiere saber de qué manera puede interferir la composición del fijador en el aspecto final de la pieza (segunda variable propuesta)

Estos fijadores se consideran de interés para el estudio debido a su uso habitual, además de ser fijadores representativos con distintos mecanismos de acción.

Características:

- Etanol al 96%

El etanol se preparó a partir de etanol absoluto. Se añadió agua destilada hasta conseguir la graduación deseada. Se midió con un alcoholímetro Gay-Lussac calibrado a 20°C.

Etanol absoluto. Marca Scharlau. Ref. 11472801/0012. 25 L. Densidad 0,79 g/cm³

- Formalina (formaldehído al 4%)

La formalina se preparó a partir de formaldehído al 37% (comercial). Se considera al 100%. Se diluye 10 veces con agua destilada para conseguir el 10%. Quedando así la concentración deseada.

Formaldehído al 37%. Marca Panreac. Ref. 141328.1214. 5 L. M= 30,03.

- Líquido de Winckler modificado* (mezcla de etanol al 96%, formaldehído, fenol y agua destilada).

La disolución contiene para 25 L:

2 L de Etanol al 96% (preparada como anteriormente se cita)

2 L de formaldehído al 37%

400 g de fenol (Marca Panreac. Ref. 144852.1211 M= 94,11. 1 Kg)

20 L de agua destilada

* Sin publicación bibliográfica. Por Prof. Jose M^o de Castro Romero, Catedrático de Anatomía y Embriología Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

- Líquido de Bouin acuoso (mezcla de Ácido pícrico, formalina y agua destilada).

La disolución contiene para 5 L:

45 g de Ácido pícrico (ácido pícrico humedecido al 98%. Marca Panreac. Ref. 151048.1610. M= 229,11. 500 g)

1,25 L de formalina (preparada como anteriormente se cita)

3,75 L de agua destilada

- Líquido de Bouin no acuoso (mezcla de ácido pícrico, formaldehído al 4% y etanol al 96%).

La disolución contiene para 5 L:

45 g de Ácido pícrico (ácido pícrico humedecido al 98%. Marca Panreac. Ref. 151048.1610. M= 229,11. 500 g)

1,25 L de formalina (preparada como anteriormente se cita)

3,75 L de etanol al 96% (preparada como anteriormente se cita)

Se sumergieron las piezas en el fijador dentro de un tanque de 30 L de capacidad, quedando bien cubiertas por el líquido.

Los tiempos de cada fijador dependen del aspecto macroscópico de la pieza. Ésta debe tener cierta consistencia, color, dureza. Así se determina el buen estado de fijación. En este sentido, nuestra experiencia en el uso de materiales anatómicos nos da criterio para ello.

2.3. Deshidratación

Al finalizar el proceso de fijación, las piezas pasaron a la fase de deshidratación con acetona. Este proceso debe hacerse de manera

progresiva para que el tejido no se retraiga. Para ello, se procedió a la inmersión de las piezas en acetona al 90% y posteriormente en acetona absoluta.

Se eligió la acetona para esta fase, aun siendo más cara, ya que se obtienen piezas menos oscuras y de textura menos dura y menos seca.

En primer lugar se sumergieron en acetona al 90% durante 3 semanas, en tanques de 30 L. Se dejaron cubiertas las piezas totalmente.

Esta acetona se preparó a partir de acetona absoluta (Marca Panreac. Referencia 161007.0616. 25 L. M= 58,08), a la que se le añadió agua destilada y se midió con un acetómetro la graduación, hasta llegar a 90°.

Como pasos finales, se cambiaron a un baño de acetona absoluta durante una semana y finalmente a un último baño de acetona absoluta durante también una semana.

Se midieron las graduaciones de la acetona para monitorizar el proceso y ver que efectivamente se ha producido una deshidratación progresiva; al finalizar cada baño (tabla 2).

2.4. Impregnación

La fase de impregnación consiste en el intercambio de acetona desde el interior del tejido hacia el exterior, a la vez que se produce una entrada de la silicona. Todo ello forzado con una bomba de vacío.

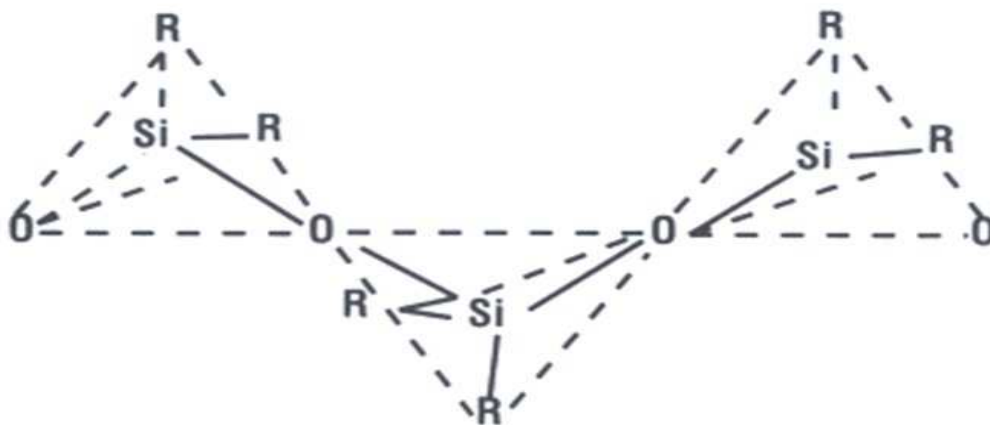


Fig 3. Estructura química de una silicona. Disposición espacial de los grupos.

El material que nuestro equipo ha empleado:

- Arcón congelador horizontal 180 cm x 60 cm x 86 cm (mantiene la temperatura deseada: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Tanque de acero inoxidable, con dos cristales de vidrio templado, reforzado 115 cm x 45 cm x 53 cm. Para hacer el vacío en su interior.
- Recipientes de plástico 39 cm x 57 cm x 40 cm. Se llena de la mezcla de impregnación.
- Bomba de vacío. Marca Vacuubrand. Modelo RZ16. $18\text{ m}^3/\text{h}$.
- Cestas de fibra de fibra de vidrio. Se usan para evitar pérdidas de piezas pequeñas en el tanque.
- Sonda de temperatura de control.
- Manómetro de Bennert. Mide presiones en mmHg. Se usa al final del proceso.
- Manómetro de esfera. Mide presiones en mbar. Se usa al principio del proceso.
- Válvula de bola. Poca precisión. Para altas presiones.
- Válvula de aguja. Mucha precisión. Para bajas presiones.
- Tubos de plástico
- Tubos de de hierro
- Gatos (4 unidades)



Fig 4. Equipamiento necesario para la fase de Impregnación

El proceso comenzó con una desgasificación de la mezcla de siliconas (S10, polialquilsiloxano, y S3, endurecedor con estaño) de los tanques para evitar cualquier resto de acetona residual que pudiera permanecer tras la última impregnación.

Los pasos que se siguieron son:

- Se calentó la bomba durante 15 minutos
- Se cerró el tanque hermético y cuidadosamente, ayudándose con los gatos
- Se desgasificó la mezcla haciendo vacío. Posteriormente, se sumergieron las piezas.
- Se dejaron a presión atmosférica durante 24 horas para que comenzara la difusión de la silicona y la acetona a través del tejido sin brusquedad
- Se inició la fase de impregnación propiamente dicha

El objetivo es hacer el vacío en el interior del tanque de forma progresiva.

Se fijó la presión en 210 mbar, una vez comenzado el vacío se observaron burbujas medianas de forma esporádica. Esto indicó el inicio de la impregnación, en la que comenzó el intercambio entre la acetona que ha deshidratado al tejido y la mezcla de siliconas que se encuentran en el tanque.

La impregnación duró 9 días en los que se fue disminuyendo la presión poco a poco. Siendo la cantidad de burbujas el condicionante de este aumento. Los primeros días se observaron burbujas de pequeño tamaño y al final de la impregnación burbujas grandes que ya no consiguen estallar (tabla 3). Indicador de que el proceso está llegando a su fin.

Una vez finalizado el proceso se apagó la bomba y se dejó que el vacío se perdiera paulatinamente hasta el día siguiente que se dejaron escurriendo los corazones a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, cambiándolos de posición ocasionalmente para conseguir un mejor resultado. Tras 24 horas, las piezas pasaron a temperatura ambiente para conseguir eliminar la mayor cantidad posible de la mezcla de siliconas procedente de la impregnación. Una buena eliminación de siliconas hace que la polimerización posterior no deje tanto residuo.

Después de 5 días, se introdujeron en el frigorífico a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preenfriarlos previamente al corte (durante toda la noche). Se cortaron los corazones con una sierra (marca Medoc. BRG 400. L= 3155 mm). Se

escogieron cortes que ayudaran a una buena visualización de las estructuras internas para la docencia.

Al día siguiente se perfeccionó la disección que ya se inició previo al proceso de Plastinación, en la que se retiró parte del tejido conjuntivo.

Tras detectar un olor intenso a acetona en las cavidades internas, se procedió a realizar una RE-IMPREGNACIÓN para conseguir unos mejores resultados en cuanto al aspecto y conservación de la pieza anatómica. Esto no es necesario en todos los casos.

El procedimiento utilizado fue:

1. Una inmersión en acetona absoluta durante 5 días (con dos mediciones de la graduación)
2. Desgasificación
3. Inmersión en silicona a presión atmosférica
4. Re-impregnación

Se prepararon dos tanques de acetona absoluta y se introdujeron en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los corazones se agruparon de 5 en 5 (por fijadores) y se refrigeraron a 4°C para que estuvieran preenfriados antes del paso siguiente y así evitar alteraciones bruscas de temperatura.

Al día siguiente se sumergieron las piezas en acetona. Se hizo la primera medición a los dos días de la re-deshidratación, en la que no se apreciaron diferencias. Se mantuvo la graduación a 100° .

Se desgasificó la mezcla de siliconas S10+S3 para eliminar todos los residuos de acetona disuelta que pudiera haber quedado de la impregnación. Las piezas se quedaron sumergidas a presión atmosférica hasta el día siguiente.

Al quinto día se volvió a hacer la medición de la acetona y tampoco mostró variación.

Se comenzó la re-impregnación. La presión se fijó inicialmente a 320 mbar. En esta ocasión el proceso fue menos extenso ya que las piezas sólo debieron intercambiar la acetona que tienen en las cavidades internas. La monitorización se hizo de igual forma que la impregnación (tabla 4).

Una vez finalizada la re-impregnación se pusieron a escurrir las piezas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en primer lugar y posteriormente a temperatura ambiente. Procediendo de la misma manera que en la fase de impregnación.

2.5. Polimerización o curado

Se introdujeron los corazones seccionados y escurridos en la cámara de polimerización o curado. Estas cámaras se mantuvieron cerradas herméticamente. Contenían el polímero volátil de silicona, S6, que provocó la reticulación del polímero de silicona introducido mediante la impregnación. Se consiguió así el endurecimiento total de la pieza y la fijación definitiva de su posición.

Este proceso se tiene que llevar en unas condiciones de mínima humedad. Para ello, se utilizó Gel de Sílice como agentes desecante. De esta manera el proceso será más rápido ya que las moléculas de polímero (volátil) no tendrán que competir con las de agua, que puedan estar en el ambiente. También posible utilizar cloruro cálcico como desecante pero éste no permite su reutilización como en el caso del Gel de Sílice que tras un calentamiento en estufa elimina toda el agua absorbida.

Día a día se renovó el desecante, reponiendo el polímero y cambiando de posición las piezas para evitar los cúmulos de silicona en la superficie. En primer lugar, se polimerizó la superficie y posteriormente la estructura interna. Dependiendo del tamaño de la pieza es recomendable que la pieza se encuentre en la cámara de polimerización de una a dos semanas. Un mayor tiempo de exposición asegura que la red tridimensional que se forma al reticularse el polímero esté totalmente formada. Los corazones, para asegurar una buena polimerización, se dejaron durante 4 semanas.

2.6. Marcaje de las piezas. Preparación docente

Una vez que se obtuvieron las piezas se procedió a señalar las estructuras anatómicas con alfileres con punta redonda y coloreada. Las letras nos indican el corazón al que se refiere y los números corresponden a una estructura que va descrita en fichas. Así, se facilitará el estudio al alumno de Anatomía. (Fichas anexas).

RESULTADOS

Se realiza la pesada de las piezas para hacer una monitorización sobre el mayor o menor contenido de agua en el tejido. Para ello se escogen varias etapas: pre-fijación, pre-deshidratación y pre-impregnación, coincidiendo con períodos claves de la técnica.

En la tabla 1 se observa una disminución del peso (gramos) conforme avanza el proceso de Plastinación.

En el caso del Etanol, fijador con carácter deshidratante, se ve disminuido el peso de la pieza ya en las dos primeras medidas, al igual que ocurre con el Bouin no acuoso (en etanol).

En los casos de fijadores acuosos (Formalina, Winckler y Bouin acuoso) se produce un aumento del peso tras la fijación ya que éstos actúan rehidratando la pieza.

Cuando la medida se hace en la pre-impregnación el peso ha disminuido considerablemente. En este momento las piezas han sufrido una deshidratación severa, y por tanto, su peso es menor. Recordemos que esto es absolutamente necesario, pues la ausencia de agua es lo que asegura la entrada del polímero.

Tabla 1. CONTROL DE LA PESADA DE LOS CORAZONES

PESO (GRAMOS)			
FIJADOR/MARCAS	PRE-FIJACIÓN	PRE-DESHIDRATACIÓN	PRE-IMPREGNACIÓN
ETANOL (ROJO*)	430	420	400
ETANOL (AZUL)	510	440	410
BOUIN NO ACUOSO (ROJO)	550	400	330
BOUIN NO ACUOSO (AZUL)	520	480	400
FORMALINA (ROJO)	360	390	290
FORMALINA (AZUL)	440	450	280
WINCKLER (ROJO)	500	510	320
WINCKLER (AZUL)	480	490	380
BOUIN ACUOSO (ROJO)	640	650	360
BOUIN ACUOSO (AZUL)	550	570	340

*Marca para la identificación por parejas de los corazones.

En la fase de deshidratación es imprescindible la medida de la graduación de las acetonas donde se sumergen las piezas. Así se sabrá en qué porcentaje el corazón intercambia el líquido fijador en el que previamente se ha sumergido por la acetona. Una graduación muy alta estará relacionada con un grado de deshidratación más idóneo para la siguiente fase de impregnación.

Valores iguales o superiores a 98° muestran una deshidratación aceptable para la técnica. En la tabla se recogen estos valores. La toma de muestra se realiza a -20 °C pero el acetómetro utilizado está calibrado a 20 °C con lo que se hace necesario el calentamiento progresivo a temperatura ambiente de esta acetona. La variabilidad de grados se corrige mediante la fórmula:

$$X = G + 0,4 (T - 20)$$

Donde:

X: Grado de acetona real

G: Grado de acetona leído

T: Temperatura de la mezcla

Tabla 2. CONTROL DE LA DESHIDRATACIÓN DE LOS CORAZONES

GRADUACIÓN DE ACETONA

FIJADOR	TEÓRICA (PRIMER PASE)	REAL (PRIMER PASE)	TEÓRICA (SEGUNDO PASE)	REAL (SEGUNDO PASE)
FORMALINA	84°	83°	99°	100°
ETANOL AL 96%	88,5°	88,5°	98,5°	99,7°
BOUIN NO ACUOSO	86,5°	86,5°	99°	100°
WINCKLER	85°	86,6°	98,5°	99,7°
BOUIN ACUOSO	83,5°	85,1°	98°	99,2°

NOTA: Los cálculos reales están hechos a partir de datos tomados a temperaturas distintas a las de calibración del acetómetro que es 20°C

Durante la fase de impregnación se hizo un seguimiento amplio de cada paso. Desde el momento en que se comienza a desgasificar hasta que se rompe el vacío. La tabla que se adjunta muestra todas las presiones a las

que se ha ido llegando al comenzar a hacer el vacío en la cámara. Esto se hace de manera muy progresiva para evitar retracciones del tejido.

Tabla 3. CONTROL DE LA IMPREGNACIÓN

FECHA	HORA	PRESIÓN ANTERIOR	PRESIÓN POSTERIOR	OBSERVACIONES
4/6/12		--		DESGASIFICACIÓN
5/6/12		--		INCLUSIÓN A P ATMOSFÉRICA
6/6/12	12:30	--	210 mbar	
6/6/12	14:13	210 mbar	150 mbar	
6/6/12	16:20	115 mbar	115 mbar	
6/6/12	18:17	115 mbar	115 mbar	
7/6/12	8:00	100 mbar	80 mbar	
7/6/12	10:30	80 mbar	60 mbar	
7/6/12	14:40	60 mbar	50 mbar	
8/6/12	8:05	20 mmHg	16 mmHg	
8/6/12	11:00	15 mmHg	11 mmHg	
8/6/12	14:00	11 mmHg	8 mmHg	
9/6/12	14:30	7 mmHg	6 mmHg	
10/6/12	20:00	6 mmHg	6 mmHg	
11/6/12	8:00	6 mmHg	6 mmHg	
12/6/12	8:15	6 mmHg	5 mmHg	
12/6/12	12:20	4 mmHg	3 mmHg	
12/6/12	14:20	3 mmHg	3 mmHg	
13/6/12	8:00	3 mmHg	3 mmHg	
13/6/12	12:00	3 mmHg	760 mmHg	SE ROMPE EL VACÍO
				<u>FIN DE LA IMPREGNACIÓN</u>

Para la re-impregnación se hizo el mismo control de presión. En este caso la variabilidad de presiones es menor. Se comienza a presiones más bajas y se disminuye más rápido debido a que el intercambio de acetona por silicona en el tejido es menor que en la impregnación.

Tabla 4. CONTROL DE LA RE-IMPREGNACIÓN

FECHA	HORA	PRESIÓN ANTERIOR	PRESIÓN POSTERIOR	OBSERVACIONES
2/7/12		--		DESGASIFICACIÓN
3/7/12		--		INCLUSIÓN A P ATMOSFÉRICA
4/7/12	10:00	--	185 mbar	
5/7/12	9:00	160 mbar	100 mbar	
5/7/12	12:00	80 mbar	7 mmHg	
5/7/12	13:45	7 mmHg	7 mmHg	
6/7/12	9:30	7mmHg	2 mmHg	
7/7/12	12:30	0 mmHg	0 mmHg	SE ROMPRE EL VACÍO
				<u>FIN DE LA RE-IMPREGNACIÓN</u>

La finalidad de este proyecto es sobretodo docente, aunque también museístico. Por ello las mejoras que se buscan son para facilitar el estudio de las estructuras anatómicas por parte de los alumnos de Medicina y otras disciplinas relacionadas con las Ciencias de la Salud. Por eso afirmábamos que la utilización del corazón de cerdo se debe a la gran similitud con el corazón humano.

El proyecto concluye con la preparación de los corazones. Se fijan números a las estructuras del corazón y se relacionan en una ficha anexa. Así estará el material listo para las prácticas.

FICHAS:

<p>A. CORTE ANATÓMICO VENTRÍCULOS IZQ. Y DCHO.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. AORTA (Ao) 2. TRONCO BRAQUIOCEFÁLICO IZQ. 3. VENA CAVA SUPERIOR. 4. TRONCO PULMONAR. 5. VENAS PULMONARES. 6. AURÍCULA DERECHA (AD). 7. VENTRÍCULO DERECHO (VD). 8. AURÍCULA IZQUIERDA (AI). 9. VENTRÍCULO IZQUIERDO (VI). 10. TABIQUE INTERVENTRICULAR. 11. MÚSCULO PAPILAR. 	<p>C. CORTE CORONAL CARDÍACO. RELACIONES CON APARATO DIGESTIVO Y RESPIRATORIO.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ESÓFAGO. 2. AP. RESPIRATORIO (bronquio y subdivisión). 3. VC SUPERIOR. 4. RECESO TRANSVERSO. 5. TABIQUE INTERVENTRICULAR MEMBRANOSO. 6. ORIFICIO AURÍCULO-VENTRICULAR. 7. MÚSCULO PAPILAR.
--	--

<p>B. ANATOMÍA SECCIONAL TRANSVERSAL.</p> <p>B3. 1. AORTA 2. TRONCO BRAQUIOCEFÁLICO IZQUIERDO. 4. TRONCO PULMONAR.</p> <p>B2. 3. VENA CAVA SUPERIOR. 5. AURÍCULA IZQ. 6. VENAS PULMONARES. 7. AURÍCULA DERECHA.</p> <p>B1. 8. CAVIDAD AI (entradas venas pulmonares, zona vascular y avascular y valva aurículoventricular). 9. CAVIDAD AD VD. 10. AGUJERO A-V. 11. CONO EYECTIVO Ao.</p> <p>B. 12. ÁPEX. 13. TABIQUE INTERVENTRICULAR. 14. EPICARDIO. 15. MIOCARDIO. 16. ENDOCARDIO. 17. MÚSCULO PAPILAR POSTERIOR.</p>	<p>D. CORTE DIAGONAL LATERO-MEDIAL SAGITAL.</p> <p>1. VD. 2. VI. 3. ORIFICIO A-V. 4. CAVIDAD AI.</p>
	<p>E. ANATOMÍA SECCIONAL TRANSVERSA MEDIA; ANATOMÍA SECCIONAL CORONAL MEDIA Y MEDIA INFERIOR.</p> <p>1. AP. RESPIRATORIO. 2. RECESO TRASNVERSO. 3. ZONA VASCULAR Y AVASCULAR (músculos pectinados) AURICULAR. 4. VALVA A-V. 5. MÚSCULOS PAPILARES.</p>

<p>F. CORTES CORONALES ANTERIOR Y POSTERIOR.</p> <p>1. ESÓFAGO. 2. AP. RESPIRATORIO. 3. MÚSCULOS PECTÍNEOS. 4. MÚSCULOS PAPILARES. 5. VALVA A-V. 6. CONO EYECTIVO PULMONAR+VALVA SIGMOIDEA PULMONAR. 7. CONOEYECTIVO Ao+VALVA SIGMOIDEA AÓRTICA.</p>	<p>I. CORTES SAGITALES MEDIO Y PARASAGITAL IZQ.</p> <p>1. VÁLVULA MITRAL. 2. PARTE VASCULAR AI (atrabeculada). 3. PARTE AVASCULAR AI (trabecular). 4. PAPILAR POSTERIOR. 5. PAPILAR ANTERIOR. 6. ESQUELETO CARDÍACO CARTILAGINOSOS (continúa con capa media valvular).</p>
--	---

<p>G. SECCIONES TRANSVERSALES.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. VENA CAVA. 2. AD. 3. VD. 4. TP. 5. VENAS PULMONARES. 6. AI. 7. VI. 8. CONO EYECTIVO Ao. (observad valvas sigmoideas aórticas). 9. MÚSCULO PAPILAR. 10. MUSCULATURA VENTRICULAR. 	<p>J. ESTRUCTURAS Y RELACIONES.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. TRONCO PULMONAR. 2. ART. PULMONAR DERECHA. 3. ART. PULMONAR IZQUIERDA. 4. ESÓFAGO (VAGO), COLUMNA VERTEBRAL, TRONCO SIMPÁTICO, CONDUCTO LINFÁTICO TORÁCICO). 5. PARED MEDIASTÍNICA PULMÓN IZQ. 6. NERVIO FRÉNICO. 7. CENTRO TENDINOSO DIAFRAGMÁTICO. 8. ÁPEX RELACIÓN SUPERFICIAL CON 5 E.I.I. (espacio intercostal izquierdo).
<p>H.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ARTERIA VERTEBRAL. 2. AP. RESPIRATORIO. 3. VENA CAVA SUPERIOR. 4. VENAS PULMONARES. 5. TRONCO PULMONAR. 6. GRASA PERICÁRDICA. 7. VALVAS SIGMOIDEAS Ao Y SU CONO EYECTIVO. 8. ORIFICIO A-V. 9. SURCO INTERVENTRICULAR ANTERIOR. (Para art. Interventricular anterior /DAI/ y v. cardiaca mayor). 10. SURCO ARTERIA CIRCUNFLEJA. 11. SURCO ART. MARGINAL IZQ. 12. SURCO ART. MARGINAL IZQ. DEL VI acompañada de vena cardiaca menor. 13. SURCO INTERVENTRICULAR POSTERIOR para art. Descendente posterior (DP)+vena cardiaca media. 	

CORAZONES DE CERDO PLASTINADOS (Marcados):

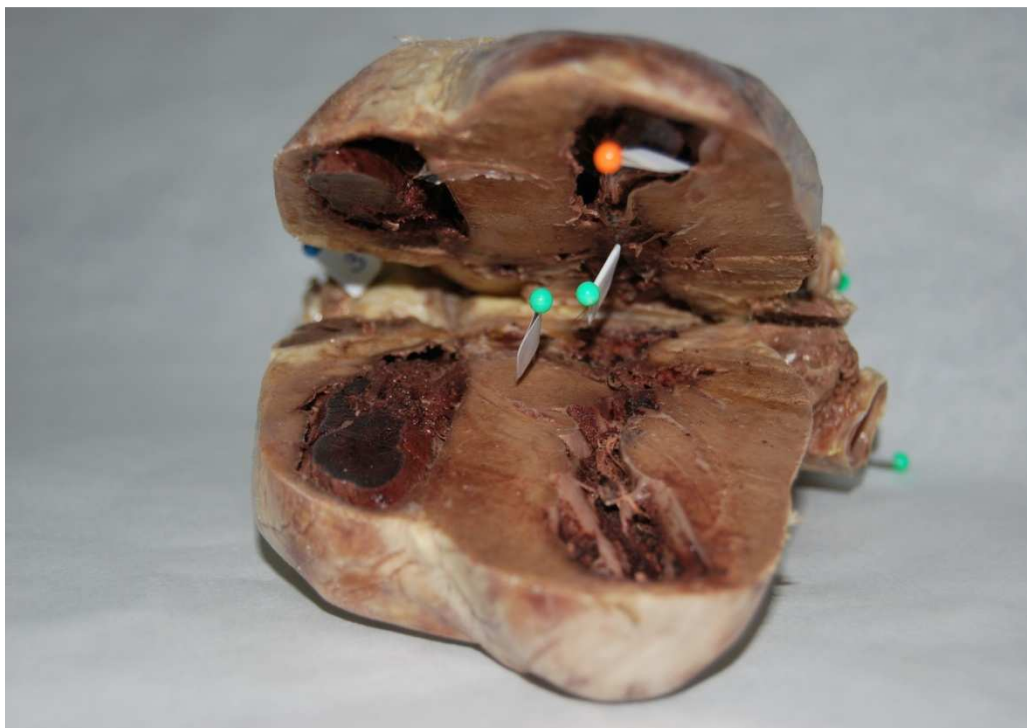


Fig 5. Corazón plastinado utilizando Etanol como fijador (C)



Fig 6. Corazón plastinado utilizando Etanol como fijador (F)

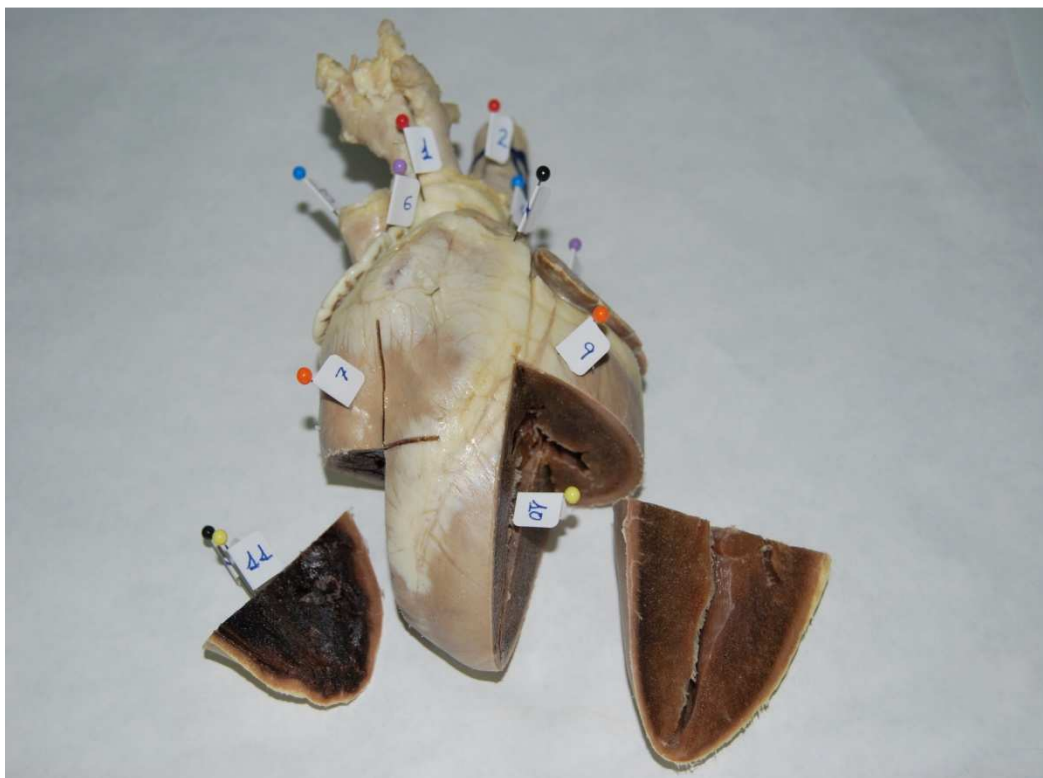


Fig 7. Corazón plastinado utilizando formalina como fijador (A)

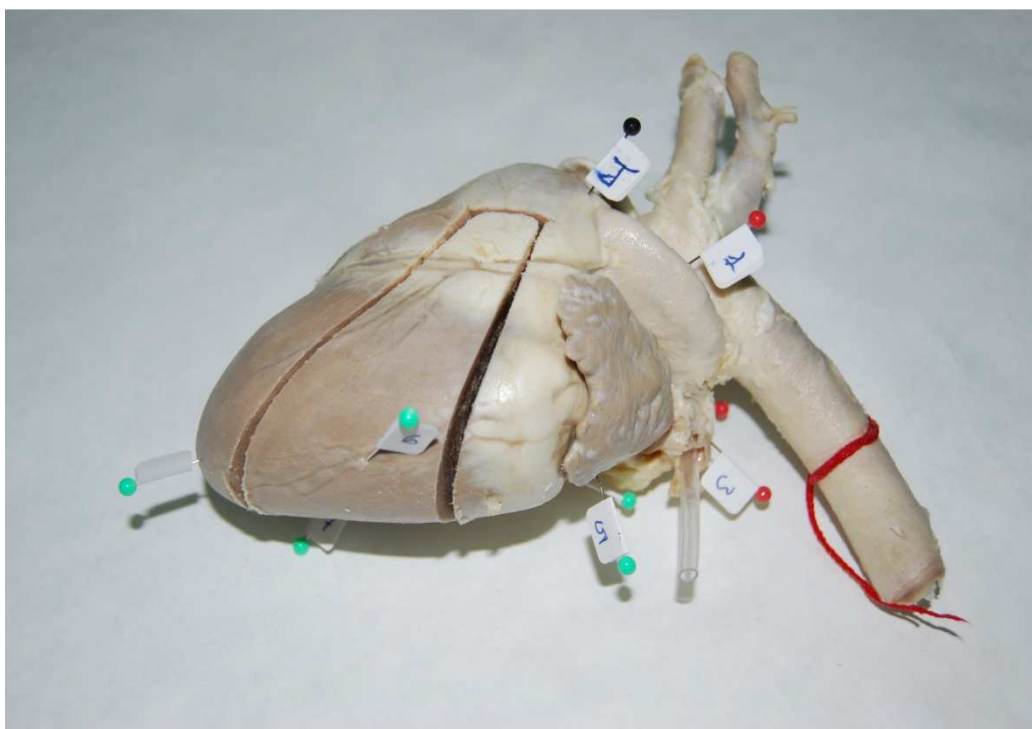


Fig 8. Corazón plastinado utilizando formalina como fijador (J)

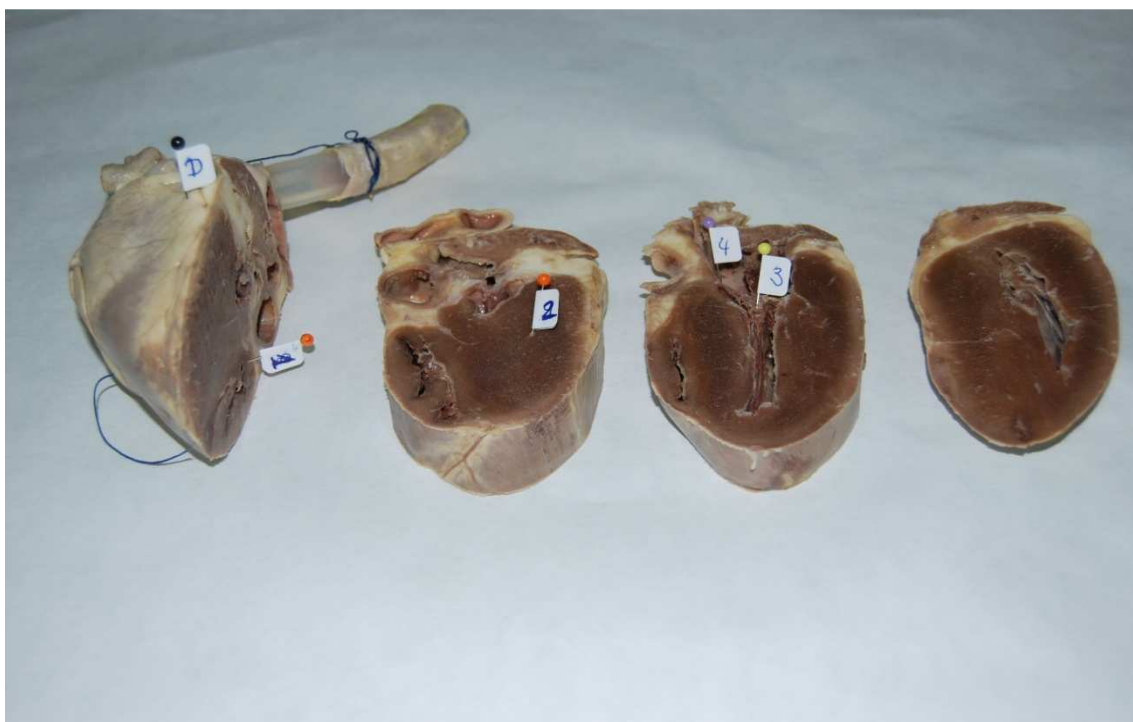


Fig 9. Corazones plastinados utilizando Líquido de Winckler como fijador (D)

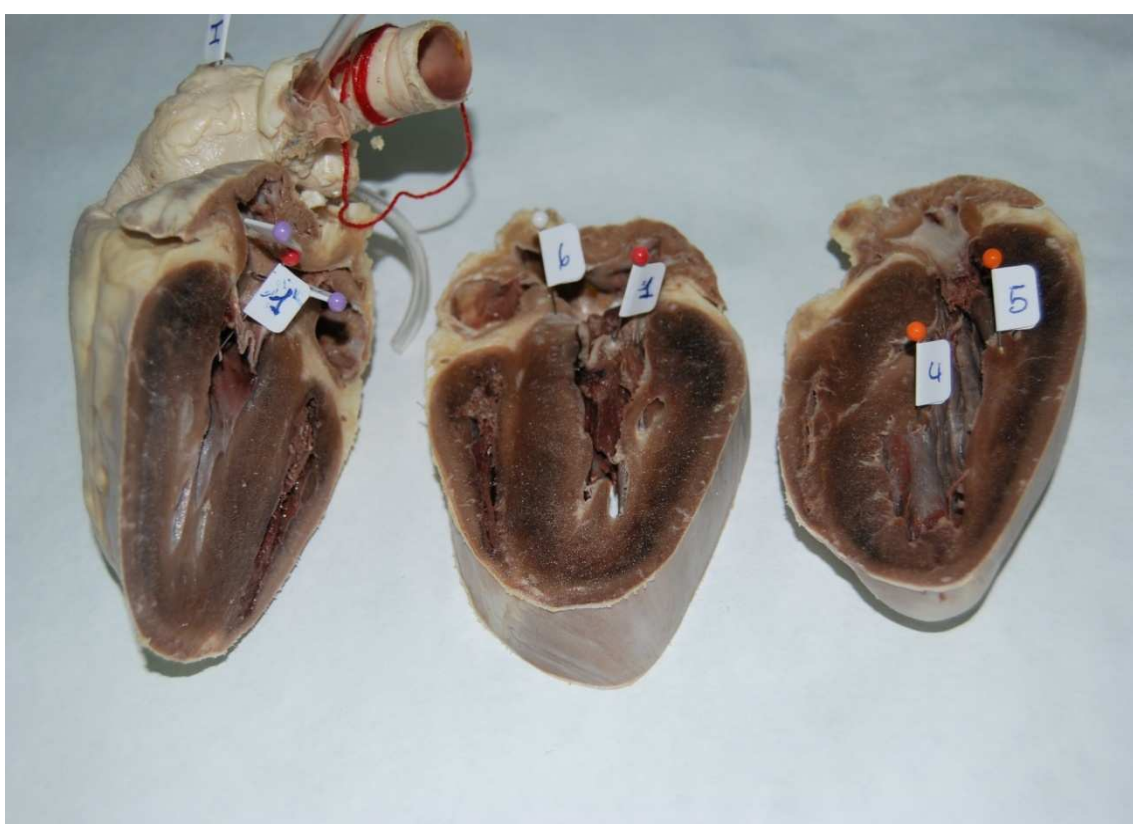


Fig 10. Corazones plastinados utilizando Líquido de Winckler como fijador (I)



Fig 11. Corazones plastinados utilizando Líquido de Bouin acuoso como fijador (B)



Fig 12. Corazones plastinados utilizando Líquido de Bouin acuoso como fijador (G)



Fig 13. Corazón plastinado utilizando Líquido de Bouin no acuoso como fijador (H)

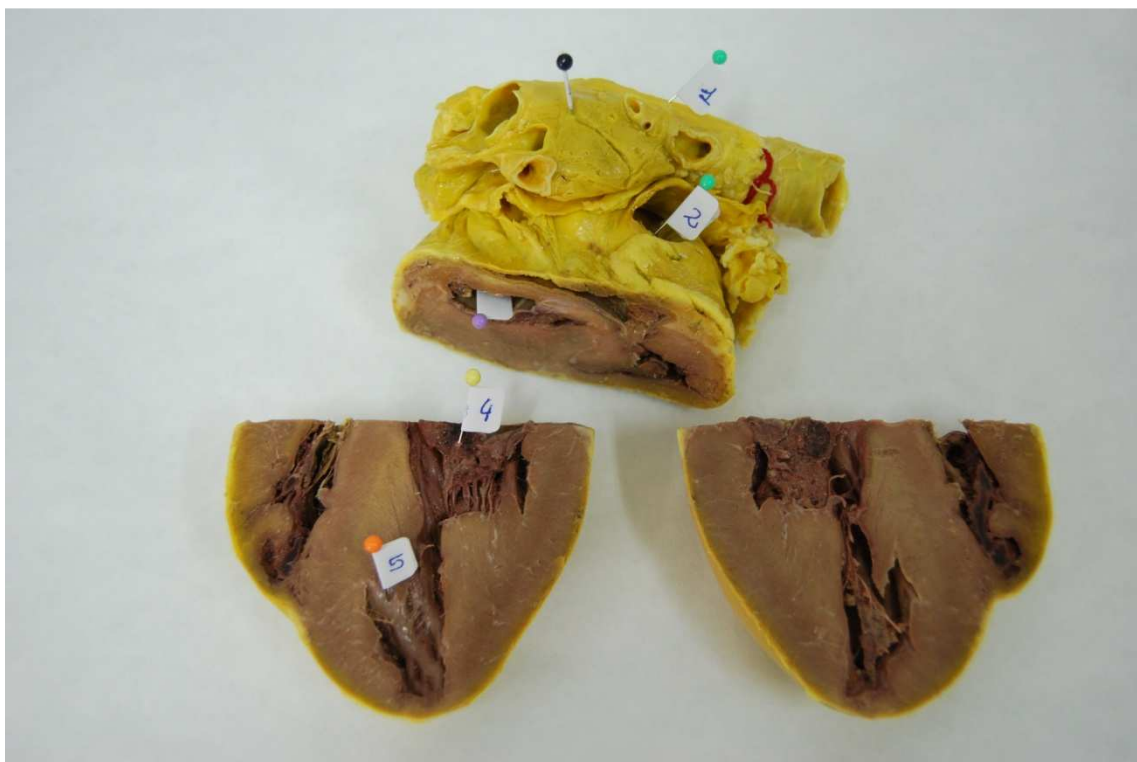


Fig 14. Corazón plastinado utilizando Líquido de Bouin no acuoso como fijador (E)

DISCUSIÓN

A la vista de los resultados, podemos afirmar que en relación a las distintas pesadas, hay una disminución importante del peso de los corazones conforme avanza el proceso de Plastinación. Encontrándose el momento previo a la impregnación como punto álgido. Estos resultados son acordes a lo esperable salvo en que el fijador que muestra más reducción de peso es el líquido de Bouin acuoso y no el etanol como sería previsible según lo visto en la introducción. La acusada diferencia se puede deber a que en el proceso, además de que haya una pérdida de agua, también la hay de grasa, ya que los fijadores utilizados no son totalmente polares. El cierto carácter lipófilo de los componentes del Líquido de Bouin hacen que haya grasas que se disuelvan total o parcialmente y ello conlleve a una pérdida de peso importante, unido al poder deshidratante (tabla 1). En la composición química del Líquido de Bouin y Winckler tenemos compuestos de baja polaridad como el ácido pícrico (trinitrofenol) y el fenol. Su composición y geometría molecular hace que no se puedan formar puentes de hidrógeno con el agua y así conseguir una interacción molecular que permita la solubilización. De este modo, la pieza sufrirá pérdidas de peso debidas a la pérdida de agua, y de otros componentes de otra naturaleza.

Las mediciones realizadas en la fase de deshidratación son para controlar la graduación de la acetona. En todos los casos, después del segundo pase, los valores son superiores a los 98° con lo que se considera apto para la fase posterior. Prácticamente, ausentes de agua estarán preparados para permitir la infiltración de una sustancia lipófila como la silicona.

Para realizar la deshidratación utilizamos acetona. El coste económico en el caso de ésta es mayor que en el caso del alcohol absoluto pero el color final de las piezas con acetona es más natural y provoca menos retracciones en el tejido que las deshidratadas con alcohol¹. Esto nos lleva a decantarnos por la primera. En la fijación, el uso de alcohol de 96° frente al alcohol absoluto se realiza por ser más económico.

Los valores recogidos en las tablas de presiones de la impregnación y reimpregnación se fijan en función de las burbujas que aparezcan en el interior del tanque al hacer el vacío. La acetona tiene un punto de inflamación <-18 °C con lo que al estar el tanque a -20°C es más favorable su volatilización. El aumento de la presión en el interior del tanque también

contribuye. Dependiendo de la concentración de acetona el burbujeo será mayor o menor.

La impregnación de corazones de cerdo realizada a temperatura ambiente (22-25 °C) dura 4 semanas mientras que la impregnación a bajas temperaturas (-20 °C) dura 3 semanas². En ambos casos se obtienen los mismos resultados, con lo cual, la impregnación a temperatura ambiente, podría ser un método alternativo en el que se ahorrarían costes ocasionados del enfriamiento. Sin embargo, a bajas temperaturas, además de disminuir el tiempo en esta fase, el polímero de silicona conserva mejor sus propiedades a estas temperaturas y evita su deterioro. Una alta temperatura supondría una polimerización previa con su consiguiente endurecimiento. Algo que dificultaría bastante su entrada por los intersticios de la pieza.

Para valorar el aspecto de las piezas tenemos en cuenta el color. Éste debe ser agradable a la vista, lo más parecido al órgano original, que mantenga las relaciones con estructuras vecinas -vasos, nervios, etc- tan importantes en anatomía. En la fijación con Líquido de Bouin tanto acuoso como no acuoso, no se consigue del todo. El ácido pícrico deja un color amarillo intenso en el epicardio que desvirtúa el aspecto real de la pieza. En el caso del miocardio y endocardio sí que se pueden observar adecuadamente las estructuras sin que resulten teñidas. Fijadores como la formalina y el Líquido de Winckler mantienen una coloración bastante natural (más blanquecina cuando el contenido en grasa es mayor). En el caso del etanol, se produce una retracción del tejido. Esto es muy importante para piezas en los que la disposición espacial es clave para el estudio.

CONCLUSIÓN

La técnica de Plastinación ha supuesto un avance en el estudio de la Anatomía. Con este estudio nos hemos replanteado las condiciones del proceso de Plastinación. Teniendo en cuenta que desde las primeras descripciones, hasta nuestro estudio nadie se ha planteado alternativas al protocolo básico. Nuestras conclusiones son:

1.- Existen alternativas al protocolo elemental que merecen ser analizadas; y que rentabilizarían mucho las posibilidades que se tienen a la hora de elegir un fijador para un tejido y de qué manera ello afecta a su aspecto final.

2.- A la luz del proceso fijador y/o deshidratador, exclusivamente, pensamos que de los fijadores usados el más oportuno es la formalina.

3.- Ahora bien, desde un punto de vista global que incluya la toxicidad del paraformaldehído, las propiedades químicas (como la polaridad) y la utilización de piezas histológicas concretas, como segunda opción igualmente válida a tener en cuenta sería el Líquido de Winckler.

4.- El proceso aún puede ser mejorado. Otros estudios deben ir encaminados a optimizar la técnica en cuanto a una disminución de los costes, del tiempo y la experimentación, fundamentalmente centrando la atención en el uso de otros polímeros plásticos con los que se podrían obtener resultados que tendríamos que valorar.

AGRADECIMIENTOS

Prof. Andrés Diz Plaza, profesor titular de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

Prof. J. Arturo Prada Oliveira, profesor titular de Anatomía y Embriología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz.

José Bancalero de los Reyes, alumno colaborador del Departamento de Anatomía y Embriología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz.

BIBLIOGRAFÍA

¹Kongkiat Srisuwatanasagul, Sayamon Srisuwatanasagul, Adisorn Adirekthaworn, Damri Darawiroj. Comparative Study between using acetona and absolute alcohol for dehydration in plastination procedure. *Vet. Med.* 2010. 40(4):437-440.

²Damri Darawiroj, Adisorn Adirekthaworn, Sayamon Srisuwatanasagul Kongkiat Srisuwatanasagul. Comparative study of temperatures used in silicone impregnation of porcine hearts plastination. *Proc. 9th CU. Vet Sci Ann Con.*, 2010.

³K. de Jong and Robert Henry. Silicone plastination of biological tissue: cold-temperature technique BiodurTM S10/S15 technique and products. *Journal of the International Society for plastination* 22:2-14 (2007).

⁴Atlas fotográfico de anatomía cardíaca. Robert H Anderson y Anton E. Becker. Ediciones Doyma.

⁵Body Worlds. The original exhibition of real human bodies. Gunther von Hagens. Editorial Arts and Sciences.