

TÉCNICA E12-E6-E600

PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PLASTINADAS Y OBTENCIÓN DE CORTES FINOS PARA RECONSTRUCCIONES DE REGIONES ANATÓMICAS

1. FUNDAMENTO.

Como cualquier técnica de plastinación, la preparación de las piezas sigue los pasos típicos de fijación, deshidratación, impregnación y curado. Posteriormente al curado se deben obtener cortes finos (<1mm) en sierra de banda con impregnación de polvo de diamante. Finalmente, los cortes pueden ser escaneados o fotografiados para análisis detallado de la estructura submacroscópica, cuantificación morfométrica y posible reconstrucción tridimensional.

En principio, se puede impregnar cualquier pieza, pero los tejidos de mayor interés son:

- Aquellos en los que el tejido conectivo desempeñe un importante papel: fascias, ligamentos, tendones, cápsulas articulares, etc.
- Tejidos muy duros como hueso (con o sin implantes), dientes, etc.

2. PREPARACIÓN DE LAS PIEZAS QUE SE VAN A CORTAR

Debemos obtener una pieza tridimensional que contenga la región a estudiar. El tamaño de la pieza debe ser ajustado a un máximo de 10x10x10 cm., debiéndose evitar bloques muy pesados en los que se alcancen dichas dimensiones en los tres ejes. Las piezas pueden estar en estado fresco o proceder de un cadáver embalsamado.

Para fraccionar la pieza se aconseja su congelación en nitrógeno líquido y mantenimiento a -70°C antes de ser seccionada.

Se recomienda que las piezas carezcan de piel, ya que ésta no facilita la deshidratación e impregnación.

2-1. Fijación.

Sólo cuando partimos de piezas en estado fresco. El mejor fijador es el formol usado en disolución acuosa a concentraciones crecientes de 2-3-5-7%, con baños por sustitución.

2-2. Deshidratación

Se utilizan los protocolos habituales de deshidratación por sustitución en baños de acetona. Los baños de acetona, para evitar la retracción del tejido es recomendable que se realicen a bajas temperaturas (-15 a -30 °C). No conviene prolongar mucho los baños de acetona, de ahí que se recomiende verificar la pureza con acetómetro, casi diariamente. Como regla general se puede decir que si la concentración de acetona no desciende durante 3 o más días sucesivos, entonces se cambia a un baño de mayor pureza.

2-3. Transparentación y desengrasado.

La transparentación del tejido conectivo se consigue mediante inmersión de la pieza en diclorometano. El diclorometano no sólo transparenta el conectivo sino que también es un potente desengrasante. Los baños se realizan a temperatura ambiente durante 2 a 4 semanas. Hay que tener siempre presente que el diclorometano es altamente tóxico y volátil.

Otra propiedad interesante del diclorometano es que actúa de forma excelente como medio de transición (solvente intermedio) entre la acetona y la resina epoxi. Esto facilita la fase de impregnación ya que posibilita una penetración de la resina de forma progresiva y completa.

2-4. Impregnación.

El polímero de impregnación incluye las siguientes resinas **E-12 + E-6 + E600** de Biodur. La mezcla de impregnación recomendada se corresponde con la mezcla 4 del protocolo de Biodur (pag-9-11), aunque sin emplear E1010.

2-4-1. Mezcla de impregnación.

- *E12 es la resina* y constituye el componente mayoritario. Su proporción en la mezcla es de **100 partes**, medida en gr. Con el tiempo tiende a precipitar, de modo que si se observan cristales de precipitado se recomienda su disolución mediante estufa a 37-40°C.
- *E6 es el endurecedor* y se añade –también en gr- a la **mitad de proporción que la resina** (50%).

- *E600 es el catalizador* y la cantidad a añadir varía entre un 0.1 y 0.5 %, siendo **0.2 %** lo más habitual. El catalizador E600 se mide en cm³ y se añade a la mezcla de E12 + E6 mediante una jeringa.

Ejemplo: en el mismo vaso de plástico (1litro aprox.) se hará la mezcla y la impregnación.

100g de E12 (báscula) + 50g de E6 (báscula) + 0.2ml de E600 (balanza de precisión).

Primero se mezcla el E12 + E600 con espátula en un vaso contenedor y, a continuación, se añade desde la jeringa el E600 y se sigue mezclando.

2-4-2. Preparación de la cámara.

- En el fondo del vaso de la mezcla se sitúan 2-3 rejillas con el fin de que la pieza no contacte directamente con el suelo.
- Al añadir la pieza a la mezcla, ésta tenderá a flotar en ella. Para evitarlo se debe mantener sumergida cubriéndola con 2-3 rejillas y pesas, si es necesario.
- Cubrir el vaso con una tapa de papel transparente (foil). Fijarlo con pinzas y perforarlo en 2-3 puntos
- Introducir el vaso en la cámara a temperatura ambiente, y dejar reposar durante la noche.

2-4-3. Conexión de la cámara de vacío en estufa.

La impregnación implica empleo de estufa con control de temperatura (T^a amb). Con esto se incrementa la fluidez de la mezcla de impregnación y así su poder de penetración. Además, se facilita la total evaporación del diclorometano.

- Primeros 3-4 días: 30°C
- Último día: 60°C. *Punto crítico:* al principio, la mezcla parece fluidificarse, pero progresivamente va endureciendo y las burbujas se hacen muy escasas y amplias. Esto indica el comienzo de la fase de polimerización.
- El protocolo de impregnación es el habitual de la Epoxi. El final lo marca la ausencia total de burbujeo ante una presión de vacío de que marque 2-3 mmHg.

2.5. Curado.

La polimerización o curado depende del tipo de endurecedor, de la temperatura y del porcentaje de acelerador en la mezcla. La curación (endurecimiento) de la pieza se realiza en estufa.

- Extraer todas las rejillas del vaso de plástico (la pieza ya no flota).
- Introducir el vaso en la estufa.
- Secuencia de temperaturas:
 - 45°C---3-5 días
 - 60°C--- 3-5 días
 - 70°C--- 2-3 días
- Este paso es bastante crítico, ya que nunca sabremos con seguridad si el centro de la pieza está totalmente endurecido. La duración del proceso depende del tamaño y naturaleza de la pieza impregnada.

2-6. Tallado de la pieza curada.

- Finalizado el curado debemos sacar del vaso el bloque de epoxi, con la pieza en su interior.
- Taladrar en el bloque cuatro puntos cardinales alrededor de la pieza.
- Rellenar los agujeros del taladro con E20+E2: de esta forma se crean puntos de referencia coloreados alrededor de la pieza, que serán imprescindibles para la orientación de las secciones finas obtenidas en la sierra.
- Tallar el bloque ajustándolo a las dimensiones finales deseadas (no conviene rebasar 8x8x8cm).

3. UTILIZACIÓN DE LA SIERRA EXAKT E-310 CP



3-1. Pegado de la pieza al porta.

Se utilizan portas de vidrio o metacrilato de 5-10cm. Sobre el porta se pega la pieza con pegamento de epoxi o similar de dos componentes (epoxipol®, uku®). Una vez hecha la mezcla del pegamento, 1/1 cada componente, dejamos transcurrir 5-10 minutos para que el pegado sea efectivo.

3-2. Fijación de la pieza a la sierra.

El porta con la pieza pegada debe fijarse a la placa succionadora de vacío. La placa succionadora se monta en la sierra fijándola desde el tornillo central. Para ello debe evitarse la oscilación del soporte con la pieza de anclaje.

Una vez atornillada la pieza succionadora se enciende la bomba de vacío y se fija por succión la pieza a la placa. Para ello debemos darle al interruptor de la sierra y encender la bomba de vacío. El porta debe quedar totalmente fijado a la placa de vacío. Esto se comprueba mojando las ranuras entre el porta y la placa, y verificando que el agua no es succionada a través de ellas.



3-3. Alineación de la pieza a la hoja.

Se hace "a ojo", aproximando la pieza a la hoja de la sierra, y estabilizando la distancia entre ellas con los tornillos.



La utilización de un puntero láser facilita mucho las cosas.

3-4. Corte

- La primera sección suele desecharse por su grosor irregular.
- Se conecta la sierra y se comienza a cortar en "lineal point", primero a bajas revoluciones y al cabo de unos segundos a mayor velocidad. Una vez que la hoja haya avanzado unos milímetros, cambiamos a modo "contact point".
- Para controlar el "contact point" nos valemos de los mandos reguladores:



Se puede controlar tanto el número de oscilaciones de la pieza en el plano sagital a la hoja, como el ángulo máximo de cada oscilación. En relación a estos parámetros, conviene recordar que cuanto mayor es la pieza se programarán una menor frecuencia y menor ángulo de oscilación.

- Una vez obtenida la primera sección debemos volver a alinear la pieza para obtener la 2ª sección, ésta ya del grosor deseado.
 - Parar la sierra (no la bomba)
 - Llevar la pieza a la posición de inicio.
 - Estabilizar el tornillo central.
 - Avanzar 1mm la posición de la pieza respecto a la hoja de la sierra. Esto se consigue dando 8-10 vueltas al tornillo (cada vuelta de tornillo la pieza avanza 100 μm). Según esto, para saber el grosor de la 2ª sección debemos tener en cuenta que:

$$\text{Grosor del corte} = \text{Avance de la pieza} - \text{Grosor de la hoja} - \text{Grosor de la impregnación de diamante}$$

donde

Avance de la pieza: si hemos dado 10 vueltas de tornillo 1mm

Grosor de la hoja sierra 0.3-0.4 mm

Grosor de la impregnación de diamante: 0.05-0.1mm



Ejemplo:

$$\text{Grosor corte} = 1\text{mm (10 vueltas de tornillo)} - 0.4\text{mm (grosor hoja)} - 0.1\text{mm (grosor impregnación)} = 0.5\text{mm}$$

Es interesante observar que el grosor de la hoja y el de la impregnación es una constante (aprox. 0.5 mm), de modo que el grosor final de la sección realmente dependerá del número de vueltas que le demos al tornillo que hace avanzar a la pieza.

- La sierra corta sola, únicamente hay que vigilar que no haya problemas durante las 2-3 primeras secciones. Después, durante el tiempo que se tarda en obtener las diferentes secciones 10-25 min. no hace falta esperar (es muy útil disponer de un mecanismo de aviso, timbre o similar, que se active cuando se ha acabado de obtener una sección).
- Normalmente se recomienda cortar una pieza de una vez. Con ello evitamos tener que parar la bomba, lo que determina la pérdida de vacío y de la alineación de la superficie de corte.

3.4. Recogida del corte.

Los cortes caen en el agua del depósito de la sierra. Se recoge con la mano o pinzas y se mantiene entre dos placas de vidrio para evitar que se combe.

Es importante enumerar cada sección, a medida que se obtiene.

* Si se posee una unidad de pulido, en este punto, el corte se pega a un porta y se lleva a la pulidora hasta rebajar el grosor hasta 15-20 μm . Sobre estas secciones pulidas se pueden aplicar técnicas histológicas convencionales.

4. PROCESADO FINAL.

Las secciones deben ser incluidas en resina epoxi para preservarlas de por vida. Para ello se cubre con resina E12 + E1 (proporción 100g + 28g) formando un "sándwich":

- Cubrir una de las placas de cristal, hoja de acetato o similar con la resina.
- Situar la sección sobre la resina
- Cubrir la cara expuesta de la sección con resina.
- Cubrir todo con la otra placa de cristal o similar
- Envolver todo con foil
- Llevar a estufa: 24-48 h.
- Quitar el foil y las placas.

Como resultado obtenemos cortes transparentes que pueden ser estudiados bajo lupa estereoscópica o escaneados para poder realizar la reconstrucción tridimensional.