



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DEL IMIDAZOLE EN LA CONSERVACIÓN DE COLOR EN
CABEZAS Y ENCÉFALOS DE ANIMALES DOMÉSTICOS PLASTINADOS
CON LOS MÉTODOS S-10 Y P-40.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
DAVID OVANDO FUENTES**

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. EUGENIA CANDANOSA ARANDA - CEIEPAA-FMVZ
DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR – FES-C
DR. MARIO PÉREZ MARTÍNEZ - FMVZ**

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
4.1 Antecedentes históricos de la reactivación de color en órganos y tejidos.....	7
4.2 Antecedentes históricos de la plastinación.....	11
4.3 Características técnicas de la plastinación.....	14
4.3.1 Sustancias empleadas en la fijación de tejidos.....	15
4.3.2 Formaldehido.....	15
4.3.3 Sustancias empleadas en deshidratación de tejidos.....	17
4.3.4 Acetona.....	17
4.4 Materiales empleados en la técnica de plastinación.....	17
4.4.1 Silicón.....	17
4.4.2 Catalizador.....	18
4.4.3 Gas curador.....	18
4.4.4 Poliéster 35 (P 35).....	19
4.4.5 Poliéster 40 (P 40).....	20
4.4.6 Resinas epóxicas.....	20
4.4.7 Efectos tóxicos de la plastinación.....	21
4.5 Procedimientos técnicos de la plastinación.....	21
4.5.1 Fijación.....	21
4.5.2 Deshidratación.....	22
4.5.3 Impregnación.....	23
4.5.4 Curado.....	23
5. JUSTIFICACIÓN.....	25
6. HIPÓTESIS.....	26
7. OBJETIVO GENERAL.....	26
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
9. MATERIAL Y METODOS.....	27

9.1 Procedimiento experimental I.....	27
9.1.2 Grupo A, plastinación S-10.....	28
9.1.2.1. A) Fijación.....	28
9.1.2.2. B) Deshidratación.....	28
9.1.2.3 C) Impregnación.....	28
9.1.2.4. D) Curación o polimerización.....	29
9.1.3 Grupo B, plastinación S-10 más imidazole.....	32
9.2 Procedimiento experimental II.....	33
9.2.1 Extracción de encéfalos.....	33
9.2.2 Grupo A, plastinación P-40.....	34
9.2.2.1. A) Fijación.....	34
9.2.2.3 C) Impregnación.....	35
9.2.2.2 B) Deshidratación.....	35
9.2.2.4 D) Curado.....	36
9.2.3 Grupo B, plastinación p-40 más imidazole.....	41
9.3 Imágenes fotográficas.....	41
9.4 Evaluación del color.....	41
9.5 Análisis estadístico.....	43
9.5.1 Análisis estadístico técnica S-10.....	43
9.5.2 Análisis estadístico técnica P-40.....	44
10. RESULTADOS.....	45
10.1 Evaluación macroscópica del color en las cabezas con y sin imidazole.....	45
10.2 Evaluación estadística de las cabezas de animales domésticos.....	50
10.3 Evaluación macroscópica del color en encéfalos con y sin imidazol.....	52
10.4 Evaluación estadística de las secciones transversales en encéfalos de animales domésticos.....	57
11. DISCUSIÓN.....	58
12. CONCLUSIÓN.....	68
13. LITERATURA CITADA.....	69

14. ANEXO 1.....	77
14.1 Procedimientos de fijación.....	77
15. ANEXO 2.....	79
15.1 Resultados del análisis estadístico de las cabezas.....	79
16. ANEXO 3.....	83
16.1 Resultados del análisis estadístico de los encéfalos.....	83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de los tamaños de muestra por tratamiento para la técnica de S10.....	43
Cuadro 2 Distribución de los tamaños de muestra por tratamiento para la técnica de P40.....	44
Cuadro 3. Resultados a la medición de color y respuestas al efecto de interacción.....	50
Cuadro 4. Valores para el efecto de interacción con la prueba de Tukey. 0,0= sin reactivo y matanza. 1,1= con reactivo y eutanasia. 1,0= con reactivo y matanza. 0,1= sin reactivo y eutanasia.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación esquemática de un espécimen inmerso en formalina al 4% a temperatura ambiente.....	30
FIGURA 2. Representación esquemática de 2 especímenes inmersos en acetona al 99% a -25°C dentro de la cámara de congelación.....	30
FIGURA 3. Representación esquemática del proceso de impregnación a -25°C.	31
FIGURA 4. Corte sagital de una cabeza de bovino, vista lateral izquierda.....	31
FIGURA 5. Corte sagital de una cabeza de bovino, vista mediana.....	32
FIGURA 6. Representación esquemática del proceso de curado a temperatura ambiente.....	31
FIGURA 7. Representación esquemática de un encéfalo inmerso en formalina al 4% a temperatura ambiente.....	37
FIGURA 8. Representación esquemática de la inclusión en silicón de caucho p48 de un encéfalo.....	37
FIGURA 9. Representación esquemática de la realización de los cortes transversales del encéfalo.	38
FIGURA 10. Representación esquemática de un corte transversal del inmerso en formalina al 4% a temperatura ambiente.....	38
FIGURA 11. Representación esquemática de la cámara de impregnación para la técnica de plastinación P40.....	39
FIGURA 12. Representación esquemática de la cámara de impregnación con el espécimen y su llenado con el poliéster P40.....	39
FIGURA 13. Corte transversal de un encéfalo de equino.....	41
FIGURA 14. Corte transversal de un encéfalo de equino. Extracción de burbujas.....	41
FIGURA 15. Representación esquemática del curado para la técnica de plastinación P40 con lámparas UV.....	42
FIGURA 16. Cabezas de felino, corte longitudinal. Procesados con la técnica de plastinación S10 y S10 más imidazol.....	48
FIGURA 17. Cabezas de porcino, corte longitudinal. Procesados con la técnica de plastinación S10 y plastinación S10 más imidazol.	48

FIGURA 18. Cabezas de canino, corte longitudinal. Procesada con la técnica de plastinación S10 y con la técnica de plastinación S10 más imidazol.....	48
FIGURA 19. Cabeza de bovino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10.	49
FIGURA 20. Cabeza de bovino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol.....	49
FIGURA 21. Cabeza de equino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10.....	50
FIGURA 22. Cabeza de equino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol.....	50
FIGURA 23. Cabeza de caprino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10.....	51
FIGURA 24. Cabeza de caprino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol.....	51
FIGURA 25. Cabezas de ovino, corte longitudinal. Procesados con la técnica de plastinación S10 y con la técnica de plastinación S10 más imidazol.....	51
FIGURA 26. Encéfalos de felino, corte transversal. Procesados con la técnica de plastinación P40 y con la técnica de plastinación P40 más imidazol.....	55
FIGURA 27. Encéfalos de porcino, corte transversal. Procesados con la técnica de plastinación P40 y con la técnica de plastinación P40 más imidazol.....	55
FIGURA 28. Encéfalos de canino, corte transversal. Procesados con la técnica de plastinación P40 y con la técnica de plastinación P40 más imidazol.....	55
FIGURA 29. Encéfalo de bovino, corte transversal. Procesado con la técnica de plastinación P40.....	56
FIGURA 30. Encéfalos de bovino, corte transversal. Procesados con la técnica de plastinación P40 más imidazol.....	56
FIGURA 31. Encéfalos de equino, corte transversal. Procesados con la técnica de plastinación P40.....	57
FIGURA 32. Encéfalos de equino, corte transversal. Procesados con la técnica de plastinación P40 más imidazol.....	57

FIGURA 33. Encéfalos de caprino, corte transversal. Procesados con la técnica de plastinación P40 y con la técnica de plastinación P40 más imidazol.....**58**

FIGURA 34. Encéfalos de ovino, corte transversal. Procesados con la técnica de plastinación P40 y con la técnica de plastinación P40 más imidazol.....**58**

FIGURA 35. Promedio del color en el patrón RGB en las secciones transversales de encéfalo y sus diferentes tratamiento.**59**

EFFECTO DEL IMIDAZOLE EN LA CONSERVACIÓN DE COLOR EN CABEZAS Y ENCÉFALOS DE ANIMALES DOMÉSTICOS PLASTINADOS CON LOS MÉTODOS S-10 Y P-40.

1. RESUMEN

La plastinación es una técnica de conservación de piezas anatómicas, la cual consiste básicamente en extraer el líquido tisular y reemplazarlo mediante un delicado método de impregnación con polímeros como la silicona y la resina poliéster. Los especímenes plastinados se han convertido en un complemento útil en la enseñanza de la medicina ya que permiten reconocer las estructuras que constituyen a los organismos de manera tridimensional. Esta técnica presenta algunas desventajas, como son la pérdida de consistencia y del color. Los objetivos de este trabajo fueron establecer los procedimientos técnicos para la reactivación del color empleando imidazole combinado con los métodos de plastinación S10 y P40 en cabezas y encéfalos de mamíferos domésticos sacrificados con diferentes métodos. Se procesaron un total de 62 cabezas con la técnica de S10 y 14 encéfalos con la técnica de P40, ambas con un grupo control. Los especímenes fueron fotografiados finalizando el proceso de plastinación. Las imágenes fueron analizadas por medio del programa image-pro-plus con el patrón de colores RGB. Los datos obtenidos presentaron una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) al comparar el efecto del reactivo y su relación con la forma de morir en los especímenes tratados con el S10 más imidazole, sin embargo en los especímenes tratados con el p40 más imidazol no se logró obtener una diferencia estadística significativa. En conclusión la técnica de plastinación S10 mezclada con el imidazole en órganos con o sin lesiones es una buena alternativa que ayuda a mejorar la apariencia y la observación de los especímenes. Para la técnica de plastinación con P40, el tejido nervioso resulta ser uno de los más difíciles para llevar a cabo el proceso de restauración de color debido a la escases de vasos sanguíneos, por lo que se requiere continuar, en la búsqueda de un colorante que permita diferenciar las estructuras anatómicas presentes en dicho tejido.

Palabras clave: plastinación, imidazole, silicón S10, poliéster P40.

IMIDAZOLE EFFECTS IN COLOR CONSERVATION OF PLASTINATED DOMESTIC ANIMALS HEADS AND ENCEPHALON WITH S10 AND P40 METHODS.

2. ABSTRACT

The Plastination is a technique for preserving anatomical specimens, which basically involves removing the tissue fluid and replaces it with a delicate method of impregnation with polymers such as silicone and polyester resin. The plastinated specimens have become a useful adjunct in the teaching of medicine and that can recognize the structures that constitute three-dimensional bodies. This technique has some disadvantages, such as loss of consistency and color. The objectives of this study were to establish the technical procedures for the recovery of color using imidazole combined with the methods of plastination in S10 and P40 in heads and brains of slaughtered domestic mammals with different methods. A total of 62 head was processed with the technique of S10 and 14 encephalon with for P40 technique, both with a control group. Specimens were photographed finishing the process of plastination. The images were analyzed by means of image -pro -plus program color RGB pattern. The data showed a statistically significant difference ($P < 0.05$) to compare the effect of the reagent and its relationship in the form of dying in the specimens treated with the S10 plus imidazole, but in the specimens treated with the P40 plus imidazole no statistically significant difference was found. In conclusion S10 plastination technique mixed with imidazole in organs with or without injury is a good alternative to help improve the appearance and observation of specimens. For plastination technique with P40, nervous tissue is one of the most difficult to carry out the restoration process of color due to shortage of blood vessels, therefore it is necessary to continue in the pursuit of a dye to differentiate between different anatomical structures present in the tissue.

Keywords: Plastination, imidazole, S10 Silicone, P40 polyester

3. INTRODUCCIÓN

La Anatomía y Patología Veterinarias, son ciencias que comparten objetivos y proyecciones directas en la conservación de especímenes empleados en la docencia e investigación, que por su alto valor ilustrativo y para su mejor comprensión, requieren de un tratamiento que prolongue y conserve las características tridimensionales propias de los órganos y tejidos (Soorthi, 2011).

Durante los siglos XIX y XX, en los museos se probaron varios métodos de conservación en los especímenes anatómicos o patológicos que se encontraban inmersos en formalina, donde se buscaba que las piezas tuvieran una apariencia natural y atractiva. Sin embargo estos métodos tienen su origen en el antiguo Egipto, donde se empleaban una mezcla de sustancias, incluidos el alcohol metílico, aceites y resinas vegetales como parte del proceso de momificación y fue hasta el siglo XVII donde las piezas conservadas en soluciones ocuparon un lugar importante en los museos de historia natural (Tredwell, 2006).

El origen moderno de la preparación de soluciones conservadoras data de mediados del siglo XVII, periodo en el que William Croone, un físico inglés, mostró a la Royal Society de Londres en junio de 1662 dos embriones de perro conservados en alcohol etílico (“spirit of wine”) durante una semana (Payne *et al.*, 1960). En la misma época, Robert Boyle, un químico de origen irlandés, descubrió que los especímenes pueden ser conservados en alcohol. Boyle concluye en su libro *Usefulness of Experimental Natural Philosophy* que el empleo del “espíritu del vino funciona para la preservación de los cuerpos ante la putrefacción”. De esta manera conservó un ave y una serpiente agregando una pequeña cantidad de sal de amoníaco, montaje que mostró a la Royal Society en 1663 (Fulton, 1960). El botánico y entomólogo farmacéutico inglés James Petiver ilustró como conservar animales en ron, brandy y otros

alcoholes, animando a otros naturalistas viajeros a coleccionar especímenes para él (Camarasa, 2012; Ibáñez, 2006).

El anatomista y médico holandés Federico Ruysch (1638-1731) perfeccionó las técnicas de preparación como las inyecciones de ceras pigmentadas en los vasos sanguíneos y conservó el cuerpo de un hombre utilizando diluciones de alcohol.

En paralelo con la conservación de especímenes en alcohol etílico, se fueron realizando innovaciones para los contenedores donde se mostrarían esas piezas, como la utilización del óxido de plomo para aclarar el vidrio. Las tapas de los recipientes de vidrio fueron cubiertas con vejiga de cerdo blanqueadas con cera para asegurar un cierre hermético y para el siglo XVIII esas tapas se sustituyeron con las fabricadas de plomo. En Francia (1748), René-Antoine Ferchault de Réaumur utilizó alcohol etílico y brandy para conservar aves. En los siglos XVIII y XIX, viajeros y naturalistas recolectaron y enviaron ejemplares desde cualquier parte del mundo en alcohol etílico, como lo demuestran los manuscritos de Darwin durante su viaje por América del Sur (Moore, 2002).

A mediados del siglo XIX, un momento decisivo para la preservación, fue el empleo del formaldehído, sustancia sintetizada por primera vez en 1859 por el científico ruso Aleksandr Mikhailovich Butlerov y categóricamente identificado en 1867 por el químico alemán August Wilhelm von Hofmann, quien en un ejercicio académico desarrollo un método práctico para la síntesis de metanol (Fox *et al.*, 1985). La capacidad del formaldehido para actuar como un preservador de células, fue descrita a finales del siglo XIX, sus propiedades fijadoras fueron observadas accidentalmente por el médico alemán Ferdinand Blum en 1893. Blum participó en un proyecto de investigación sobre las propiedades antisépticas del formaldehído, trabajó con una solución acuosa al 4% de formaldehido y se percató que la piel de sus dedos impregnados con dicha solución se volvió rígida (Puchtler y Meioan, 1985). Numerosos naturalistas probaron esta nueva propiedad, encontrando que el formaldehído conservaba mucho mejor que el alcohol etílico (Moore, 2002).

A través del tiempo se fueron desarrollando diversas soluciones y métodos de fijación con formaldehído, destinados a diversas actividades entre ellas la enseñanza y la investigación. El formaldehído actualmente sigue siendo considerado un fijador universal, por su rápida penetración al tejido, su corto periodo de fijación y no causar endurecimiento total de los tejidos. Sin embargo cuenta con ciertas desventajas como su repercusión en la salud para el personal que manipula órganos conservados con esta solución fijadora. La exposición a sus vapores llega a ocasionar irritación de las mucosas tanto conjuntival como del aparato respiratorio.

Por todo lo anterior, es necesaria la búsqueda de otras técnicas de conservación, para los especímenes empleados en la enseñanza e investigación. Entre estas técnicas destaca la plastinación, la cual fue desarrollada por el Dr. Gunther von Hagens en Heidelberg (1977), Alemania.

La plastinación es una técnica de conservación de piezas anatómicas que se lleva a cabo mediante un delicado método de impregnación forzada con polímeros como la silicona y la resina poliéster (Pashaei, 2010). En este proceso el agua y los lípidos de los tejidos son remplazados por polímeros los cuales se endurecen y como resultado se obtienen especímenes secos, durables y sin olor (Bickley *et al.*, 1981).

Los especímenes plastinados se han convertido en un complemento útil en la enseñanza de la medicina, áreas como la patología y la anatomía se han beneficiado debido a su alto poder ilustrativo y a la relativa facilidad de interpretación (von Hagens *et al.*, 1987). Estas muestras son preferidas por muchos estudiantes y profesores de universidades en el mundo donde se ha venido implementando esta técnica, incluso se ha llegado a considerar como un factor importante en la reducción de la brecha existente entre la anatomía y la práctica clínica al aplicar los conocimientos teóricos adquiridos en dichos especímenes (Dawson *et al.*, 1990).

La plastinación resulta ser una técnica ideal para preservar tejidos de diversas partes corpóreas con el propósito de favorecer el proceso de enseñanza aprendizaje en la medicina veterinaria, una de sus principales ventajas es que los especímenes no tienen rastros del fijador, sin embargo, las únicas características físicas que se modifican en los órganos sometidos al proceso de plastinación son la consistencia y el color, ya que una vez plastinado un órgano se torna de firme a duro, y en ocasiones pierde su color natural. Esta última desventaja se maximiza durante los procesos de fijación y de deshidratación (Sandhyamani, 2005; Méndez *et al.*, 2008). Hoy en día no se cuenta con un reactivo que mejore el color y apariencia de los especímenes plastinados, lo que ha motivado a la búsqueda y empleo de reactivos para mejorar la apariencia natural de los órganos y tejidos plastinados.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA REACTIVACIÓN DE COLOR EN ÓRGANOS Y TEJIDOS

En 1896 Melnikow-Raswedenkow y Kaiserling, trabajaron de manera independiente con las propiedades fijadoras de la formalina y se percataron de que el color de los especímenes se desvanecía. Se realizaron varios experimentos para restaurar el color utilizando baños de alcohol al 95% y glicerina como medio de montaje ya que aumenta la densidad óptica y aportaba claridad en los tejidos. El método finalmente perfeccionado por Kaiserling, fue ampliamente adoptado en los museos patológicos, y cuando los especímenes se preparaban correctamente su color se mantuvo durante algún tiempo (Moore, 2002). El método consistió básicamente en tres soluciones, la primera contenía formalina al 20%, nitrato de potasio 15 g y acetato de potasio 30 g, todo esto diluido en 1 L de agua. La segunda se basó en sumergir al espécimen en alcohol al 80% durante 6 h y posteriormente en alcohol al 95% durante 2 h. La última solución contenía 400 mL de glicerina en 2 L de agua (Pulvertaft, 1950). Kaiserling, hizo hincapié en la importancia de la exclusión de aire y evitar la formación de un medio ácido. A pesar de que estudió la formación y presencia de los pigmentos hemocromógenos por medio de un espectroscopio, el proceso fue en gran medida empírico y los resultados impredecibles. Estas incertidumbres condujeron a la introducción de muchas modificaciones y con el paso del tiempo, algunos de sus principios básicos importantes fueron olvidados y finalmente el método no resultó satisfactorio ya que resulta inestable con el tiempo (Proger, 1963).

En 1931, Schultz utilizó el monóxido de carbono como un agente conservador del color, este gas le confirió un color rojo brillante a los tejidos, sin embargo los riesgos de intoxicación y explosión eran muy altos. En 1934 Robertson y Lundquist adaptaron la técnica para reducir los riesgos de intoxicación. En 1936 Lewis y Gaines mejoraron aún más la técnica y lo mezclaron con el

método de Kaiserling obteniendo buenos resultados. La solución de Kaiserling I se utilizó mientras los especímenes eran gaseados y el montaje final se realizaba en la solución de Kaiserling III (Pulvertaft, 1950).

En 1936, Pulvertaft encontró que el color verde de un cloroma (sarcoma granulocítico) podía ser conservado mediante la adición de hidrosulfito de sodio a la solución III de Kaiserling, además de restaurar parte del color del espécimen (Pulvertaft, 1950). La introducción de este poderoso agente reductor llamó la atención una vez más sobre la importancia de la exclusión de aire que había sido subrayada por Kaiserling. El proceso de hidrosulfito fue desarrollado por Wentworth en Canadá y por Sheen en los Estados Unidos, quienes destacaron la necesidad de un cuidadoso control del pH del medio, otro de los principios de Kaiserling. Sin embargo, no fue del todo satisfactorio ya que las muestras presentaban un color rosa poco natural y la decoloración constante era difícil de prevenir (Proger, 1963).

Romhanyi (1956), publicó un método que se había utilizado con éxito durante más de diez años, dicha técnica se presentó por primera vez en 1941, en una conferencia de la Sociedad Húngara de Patólogos. La base de la técnica de Romhanyi la constituye una reacción hemocromógena. Los hemocromógenos son complejos del grupo hemo que son reducidos por diferentes bases nitrogenadas orgánicas, como piridina, nicotina, amoníaco (NH_3) o el mismo componente N de la globina endógena (Romhanyi, 1956). La reacción hemocromógena de la técnica es causada por una solución acuosa con piridina, nicotina, un agente reductor (hidrosulfuro de sodio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) y formalina, por lo tanto la fijación y adhesión de los colores ocurre al mismo tiempo y en la misma solución. La viveza de los colores, dependían de la concentración de la base nitrogenada aplicada. En este proceso, los hemocromógenos de piridina mostraron un tono de color rojo brillante, mientras que el de nicotina un tono rojo saturado. Al modificar la concentración de la base nitrogenada se podía establecer a discreción el tono de color de los especímenes. Sin embargo, la durabilidad de los hemocromógenos dependía

del estado de reducción y la condición más importante de la misma era el cierre hermético de los contenedores, lo que técnicamente no representó ninguna dificultad, logrando así que los tonos de color de los especímenes preparados permanecieran constantes por más de 10 años (Romhanyi, 1956). Los órganos preparados por Romhanyi, presentaban tonos de color semejantes a los especímenes frescos. La intensidad de color en los órganos dependía considerablemente del contenido de sangre y otros pigmentos del tejido que no son inducidos por la hemoglobina, por ejemplo, los colorantes carotenos del tejido graso se desvanecen paulatinamente durante la fijación mediante procesos oxidativos, por lo que el tejido graso a menudo tiene un aspecto muy blanco, por lo tanto el estado de reducción del líquido de conservación de esta técnica impide el desvanecimiento oxidativo del pigmento en el tejido graso. Otros pigmentos que conservaron su color fueron el exudado purulento de la médula ósea asociado a la leucemia, así como los colores verdes de la bilis. (Romhanyi, 1956). Sin embargo, esta técnica no se hizo popular por varias razones; el protocolo era complicado y el color rojo desaparecía rápidamente, el espécimen se deterioraba irreversiblemente y cambiaba su apariencia a un color marrón.

En 1993, Sakamoto modificó la técnica Romhanyi adicionando el hidrosulfito de sodio como agente reductor e imidazol como base para el medio de montaje que contenía agua, formalina, glicerina y acetato de sodio. Los especímenes que se re-colorizaron con esta modificación e implementación mejorada de la técnica Romhanyi se mantuvieron estables mostrando un color rojo natural por más de 20 años (Sakamoto, 1995).

En el 2005, Sandhyamani desarrolló una modificación de la técnica original de Romhanyi utilizando un medio que contiene citrato-fosfato-dextrosa (CPD) comúnmente empleados para el almacenamiento de sangre y glicerina para control de pH y osmolaridad. Los resultados con la modificación de la técnica fueron satisfactorios, se obtuvo una recuperación del color en los especímenes que se mantuvo estable con un color rojo natural y sin deterioro histológico por

más de 18 años. La modificación de la técnica demostró la formación de complejos de color rojo entre nicotina, piridina y ferro-hemocromógenos tales como la hemoglobina, mioglobina y otros citocromos de los tejidos, permitiendo mejorar aún más en el proceso antiguo de reactivación de color (Sandhyamani *et al*, 2005).

Posteriormente, utilizando estas reacciones básicas como la clave para la restauración de color, fueron adaptadas para plastinar muestras patológicas utilizando sólo el imidazol de los ingredientes líquidos de montaje (Sakamoto *et al.*, 2006), además de modificar previamente con su equipo de trabajo la técnica de plastinación y utilizar silicones japoneses sustitutos (Miyake *et al.*, 1990; Henry, 2007). Sakamoto observó que el uso del imidazol en la técnica de plastinación además de ser un agente restaurador del color también les confiere otras propiedades importantes como la flexibilidad y una disminución del 2 al 5 % del encogimiento. Sin embargo, a pesar de estas enormes ventajas observadas, desafortunadamente el color rojo activado en la superficie del órgano sufre cambios al estar en contacto con el aire presente en la atmósfera por lo que se revierte a café oscuro. Internamente observó que el color rojo restaurado en el tejido sigue sin modificarse, por lo que los órganos pueden ser colocados en vitrinas, o bien en bolsas de plástico y usando estas medidas preventivas, el color rojo activado puede ser mantenido intacto por lo menos durante tres años.

En el 2008, Méndez realizó estudios donde se plastinaron órganos con lesiones, entre los que destacaban pulmones de cerdo y riñones de perro. Fueron impregnados en dos etapas, la primera con el silicón tradicional S-10 y la segunda contenía S-10 a la cual se le agregó imidazole como agente reductor del encogimiento y como agente restaurador del color; al ser evaluados los especímenes, observó que estos conservaron los atributos propios de la lesión, sin embargo no logró obtener una diferencia significativa tanto en el encogimiento como en la restauración del color original de los especímenes.

4.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA PLASTINACIÓN

La plastinación fue concebida en 1978 por el doctor Gunther von Hagens en el Instituto de Anatomía de la Universidad de Heidelberg (von Hagens, 1979). Von Hagens buscaba un método para mejorar la calidad de las muestras renales por lo que comenzó a experimentar con una gran variedad de plásticos y resinas. Finalmente, después de una gran cantidad de ensayo y error en muchos tejidos y órganos, estandarizó los conceptos básicos del método de plastinación. El siguiente paso fue la patente de las técnicas de plastinación y posteriormente la fundación de su propia empresa (Bickley, 1997). Con este método de conservación, se obtienen piezas biológicas reales, secas, carentes de olor, con duración ilimitada y sin el riesgo para quien las manipula, de inhalar sustancias tóxicas y de contagio por contacto con material biológico fresco (Roda *et al.*, 2006).

La técnica se expandió rápidamente a través de los laboratorios de enseñanza en medicina humana y veterinaria, primero en Europa y después en América del Norte. Hoy en día, se utiliza en más de 400 instituciones de 40 países (Biodur, 2006). La primera Conferencia Internacional sobre Plastinación, se celebró en abril de 1982 en San Antonio, Texas. En abril de 1986, se creó la Sociedad Internacional para la Plastinación y casi un año después en enero de 1987, fue publicada y editada la revista de la Sociedad Internacional para la Plastinación (Bickley, 1997).

En 1993, Von Hagens estableció en Heidelberg, Alemania, el instituto para la plastinación. En 1995, por invitación de la Sociedad Anatómica Japonesa, Von Hagens participó en una exhibición en el Museo Nacional de Ciencias de Tokio. Esto fue el umbral de una serie de exhibiciones alrededor del mundo, culminando en su primer Body Worlds que se presentó en Mannheim, Alemania en 1997 (Pashaei, 2010). Mientras tanto en julio de 1996, participantes de 20 países se reunieron en la Universidad de Queensland, Australia para asistir a la

8va. Conferencia Internacional sobre Plastinación, llevando esta técnica a otros lugares del mundo (Grondin, 1998).

Si bien, en todo este tiempo la técnica se ha fortalecido y se le han asociado tanto aspectos y actitudes académicas dentro de las instituciones educativas (Pashaei, 2010). El fenómeno internacional Body Worlds, ha demostrado ser muy popular entre el público de todo el mundo. El cuerpo humano nunca había sido expuesto de una manera tan asequible y llana. Los cuerpos plastinados adoptan posiciones que hacen referencia a los museos victorianos de Londres (Bates, 2006), artistas renacentistas, y otros con temas muy contemporáneos como es el caso de los deportistas. Sin embargo, las exposiciones han sorprendido a muchos, debido a la forma poco convencional de presentar a los cuerpos humanos. Las exposiciones del Body World deben ser consideradas como un modelo a seguir por los anatomistas (Moor y Brown, 2007), que tienen que hacer frente a las oportunidades y desafíos que plantea este fenómeno, utilizando la disección detallada que se presenta al público en general y la adaptación de este en la enseñanza y la investigación (Jones, 2002; Bates, 2006).

Las categorías de los especímenes plastinados en las exhibiciones del Body Worlds pueden ser clasificadas en dos tipos. El primer tipo es familiar a todos los anatomistas tales como las disecciones de las regiones del cuerpo que ilustran la anatomía básica y funciones fisiológicas de los sistemas y aparatos del cuerpo, en este tipo de especímenes también se pueden encontrar secciones transversales del cuerpo donde se visualizan huesos, músculos, órganos y repleciones de vasos sanguíneos en detalles precisos y exactos, órganos como el pulmón de un fumador muestran los daños patológicos en los procesos de enfermedades. El otro tipo de especímenes trata de resaltar un cadáver de su abatida muerte, es decir, aquí los cuerpos exhibidos quizá tienen un sentido de apariencia viva y es evidente que la intención ha sido alejarse de la presentación de cadáveres en un concepto tradicional (Jones, 2002).

Las exposiciones posteriores están diseñadas para enfatizar más sobre la dinámica y la vida cotidiana (Jones y Whitaker, 2009). Esta tendencia ha tenido el efecto de dar a los cadáveres plastinados un rostro acogedor, casi realista, por lo que se hace mucho más fácil la empatía con ellos. Esto se ve acentuado por la serenidad de las expresiones faciales en los especímenes plastinados, procedimiento que debe ser considerado como parte de la técnica en la enseñanza de la medicina (Boyde *et al.*, 2002).

De acuerdo con sus numerosas ventajas, esta técnica ha revolucionado la enseñanza de las ciencias médicas como la anatomía, patología, zoología y botánica (von Hagens, 1985). Así mismo, ha sido empleada como apoyo en el estudio de algunas técnicas de diagnóstico, como son la endoscopia (Resch y Pernecky, 1992) y la resonancia magnética (Ming *et al.*, 2004; Jones, 2002). También han sido reconocidas como herramientas de gran ayuda para fines de instrucción directa o indirecta en la enseñanza de los estudiantes (Henry *et al.*, 1997).

Por otra parte, esta técnica permite también el análisis anatómico mediante secciones milimétricas corporales que muchas veces alcanzan apenas los 2 o 6 milímetros dependiendo de la región y el tipo de tejido (Cook, 2005), de tal manera que un solo cuerpo puede convertirse en decenas de pequeñas rebanadas (Ming *et al.*, 2004). Las secciones milimétricas de la cabeza permiten el estudio *in situ* del encéfalo y de sus estructuras circundantes, de tal forma que estas secciones contienen material de referencia para la formación de estudiantes en la anatomía seccional (Weiglein, 1996; de Boervan Huizen *et al.*, 1992).

Estos especímenes son un recurso de gran valor en las primeras etapas de formación de las áreas médicas, por lo que la plastinación ha resultado ser una herramienta educativa complementaria (Fruhstorfer *et al.*, 2011).

En los últimos años hay una tendencia creciente hacia los especímenes plastinados. Esta tendencia pone de manifiesto los efectos más profundos en la educación, investigación y como herramienta cultural en el mundo de la medicina. En la actualidad se sigue investigando con el propósito de optimizar la técnica para obtener mayor número de muestras en menor tiempo posible.

4.3 CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DE LA PLASTINACIÓN

La plastinación es una técnica de conservación que se basa en sustituir el agua y la grasa contenida en los tejidos por medio de polímeros que al endurecer o curarse conserva de manera sólida o semiflexible a los especímenes tratados.

Existen tres grupos diferentes de polímeros que se utilizan en este método, cada uno de ellos produce muestras con diferentes características físicas. El polímero más utilizado es el hecho de silicona, con diferentes grados de viscosidad (S10, S15, S49 y S14 Red), empleado para producir modelos tridimensionales semiflexibles dependiendo del tipo de tejido. El segundo grupo está compuesto de resina epóxica, también con diferentes grados de viscosidad (E12, E20, PEM 11 y PEM 27), con este polímero se producen modelos rígidos de cortes longitudinales de diversas partes del cuerpo, además de repleciones rígidas de vasos sanguíneos. El tercer grupo de polímero, está hecho con resina poliéster, con dos grados de viscosidad (P35 y P40), este tipo de poliéster es utilizado exclusivamente para la preparación de rebanadas de encéfalo, su característica especial es que mejora el contraste entre la sustancia gris y sustancia blanca. (Von Hagens *et al.*, 1987).

La plastinación consta de cuatro pasos fundamentales:

1. Fijación: en formalina al 4%.
2. Deshidratación: consiste en la remoción de agua mediante el empleo de acetona al 99% a una temperatura de -25°C, su función es permitir su posterior sustitución por el polímero.

3. Impregnación de los tejidos con polímero: se aplica presión de vacío lenta y gradualmente. La mezcla del polímero y su catalizador debe ser homogénea y mantener la temperatura a -25°C .

4. Curación: ésta puede ser con un gas catalizador, luz o calor, dependiendo del polímero utilizado (Grondin, 1998).

4.3.1 SUSTANCIAS EMPLEADAS EN LA FIJACIÓN DE TEJIDOS

En la mayoría de las técnicas de conservación, uno de los primeros pasos en las muestras de tejido fresco es la fijación. La formalina se utiliza universalmente para fijar muestras, tiene la ventaja de difundirse rápidamente en los tejidos y estos pueden ser almacenados por largos períodos (Clark, 1983), sin embargo es aquí donde los especímenes pierden su color, tornándose opacos, grises y sin rasgos distintivos (Sandhyamani, 2005), además de tener repercusiones en la salud para el personal expuesto a los vapores con dicha solución fijadora (Harkema, 1990).

Los fijadores simples se consideran soluciones de un solo químico, como es el caso del metanol, etanol, acetona, ácido acético y el formaldehído, mientras que los fijadores compuestos son mezclas de fijadores simples que se han formulado para compensar y reducir los efectos del fijador. Ambos tipos de fijadores reaccionan con las proteínas de los tejidos actuando como coagulantes y no coagulantes, siendo el caso del etanol y del formaldehído respectivamente (Crocker, 2007).

4.3.2 FORMALDEHIDO

El formaldehído, también conocido como formol, es considerado como un fijador clásico y actualmente es el más usado con estos fines en los laboratorios de anatomía y patología humana y animal, a nivel de anfiteatros y hospitales (Clark, 1983).

El formaldehído (CH_2O) o metanal (IUPAC) es el compuesto químico más simple de los aldehídos, producido por la oxidación del alcohol metílico. Es incoloro, altamente volátil con un olor penetrante y es extremadamente soluble en agua. La solución comercial contiene un 37% formaldehído junto con un 10-15% metanol para inhibir su polimerización. Sin esta inhibición de la fase acuosa lentamente puede polimerizar a paraformaldehído (Clark, 1983). La formalina amortiguada al 4% es la solución más empleada en la mayoría de los laboratorios para la conservación de muestras, tiene la ventaja de que se difunde rápidamente por los tejidos y no causa un endurecimiento total de estos (Puchtler y Meioan, 1985).

El efecto del formaldehído sobre las proteínas hidrosolubles es que éstas se unan a las proteínas estructurales formando una malla (reticular) que estabiliza a un gran número de proteínas lo que permite conservar la estructura y morfología del tejido. Baker, señala que a pesar de que el formaldehído es un fuerte agente reductor, su acción fijadora la lleva a cabo por medio de reacciones oxidativas, formando puentes de metileno entre los grupos amino de la lisina y la glutamina en las diferentes cadenas de proteínas. Estos enlaces cruzados o reticulación de las proteínas requieren de poco tiempo, sin embargo los tejidos deben ser tratados con diluciones simples de formaldehído con un mínimo de 48 horas para que la acción fijadora se lleve a cabo. Los tejidos fijados en períodos más cortos pueden mostrar una fijación mínima con la probabilidad de que el tejido pueda dañarse al momento de aplicar reactivos posteriores a la fijación. Cabe mencionar, que no hay reacciones químicas específicas con los carbohidratos, sin embargo la parte proteínica de las glicoproteínas tiende a reticular y atrapa eficazmente al glucógeno (Baker, 1958).

4.3.3 SUSTANCIAS EMPLEADAS EN DESHIDRATACIÓN DE TEJIDOS

4.3.4 ACETONA

La acetona (C_3H_6O) es un líquido claro, altamente volátil que se puede mezclar con agua, etanol y otros solventes orgánicos. Esencialmente es empleada para llevar a cabo la deshidratación de órganos y tejidos, ya que es más volátil que el alcohol y otros agentes deshidratantes (Prophet *et al.*, 1992). Así mismo, la acetona es empleada para llevar a cabo la etapa de deshidratación en el proceso de plastinación, ya que permite su fácil intercambio por el silicón durante la etapa de impregnación forzada. Dentro de sus desventajas está su rápida acción, que puede causar que el órgano se torne frágil cuando es expuesto por un tiempo prolongado a dicha sustancia y que modifica el color de los tejidos u órganos, y si estos permanecen en contacto con el oxígeno, su superficie se seca y cambia de color tornándose café oscuro y de aspecto quemado (Bancroft y Gamble, 2008).

Los efectos tóxicos que produce al inhalarla son salivación profunda, confusión mental, tos, vértigo, somnolencia, dolor de cabeza, dolor de garganta, pérdida del conocimiento. Al contacto directo con la piel, causa enrojecimiento y que se torne seca. Si dicha sustancia entra en contacto con los ojos, produce enrojecimiento, dolor, visión borrosa y posible daño en la córnea (Prophet *et al.*, 1992).

4.4 MATERIALES EMPLEADOS EN LA TÉCNICA DE PLASTINACIÓN

4.4.1 SILICÓN

El silicón (BIODUR S10), es el compuesto químico más comúnmente utilizado para la impregnación de tejidos. Este compuesto es un polidimetil siloxano y un grupo funcional silanol (Chaynes, 2004). Este compuesto ha sido utilizado por más de 20 años sin mostrar algún efecto tóxico en las personas que lo

emplean; sin embargo, se recomienda utilizarlo en lugares con una adecuada ventilación y equipo de protección como son guantes y lentes protectores (Holladay *et al.*, 2001)

4.4.2 CATALIZADOR

El catalizador (BIODUR S3), es una mezcla de dos agentes químicos, cuyo componente principal está clasificado como dibutiltin dilaurato, mientras que el componente menor corresponde al ácido oleico o tindimetilhidroxi (Chaynes, 2004). Es usado como un agente catalizador, cuya función es unir las cadenas del polidimetil siloxano (silicón) aumentando así el peso molecular de las cadenas e incorporando a las cadenas grupos moleculares más pesados. Así mismo, permite la pre-polimerización potenciando el efecto del gas curador (Holladay *et al.*, 2001). Puede inducir efectos tóxicos tales como la irritación de la piel y de mucosas tanto respiratoria como conjuntiva, de tal forma que su uso se recomienda en lugares con campanas de extracción, manipularlo con guantes y utilizando lentes protectores (Chaynes, 2004; Holladay *et al.*, 2001). La información obtenida respecto a la exposición de animales de laboratorio a altas concentraciones de este producto, han sido proyectadas a los humanos. En los animales de laboratorio se ha observado que afecta al sistema nervioso central y produce desórdenes hematopoyéticos (Holladay *et al.*, 2001).

4.4.3 GAS CURADOR

El gas curador (BIODUR S6), ha sido identificado como tetraetoxisilano (Chaynes, 2004), cuya función es establecer puentes químicos entre las cadenas del polímero, por ello, recibe el nombre de entrecruzador, determinando así el grado de rigidez final del órgano plastinado (Holladay *et al.*, 2001).

Dentro de los efectos tóxicos de este compuesto se encuentra la irritación de la mucosa respiratoria y conjuntiva. Los animales de laboratorio expuestos a concentraciones de 3000 ppm experimentan una extrema intolerancia e irritación de sus membranas mucosas, en especial de la conjuntiva ocular; a una concentración de 1,200 ppm causa lagrimeo. Se ha observado su efecto tóxico, a 700 ppm produciendo una irritación suave de la mucosa respiratoria y ocular. Finalmente a concentraciones de 250 ppm produce irritación de la nariz y los ojos. Así mismo, este compuesto químico puede causar daño en hígado, riñón y deprimir el sistema nervioso central. Se ha postulado que por analogía, los efectos tóxicos observados en animales, se piensa que pueden ocurrir en los humanos (Holladay *et al.*, 2001).

Como medidas preventivas para el empleo de este compuesto químico, se encuentran el uso de mascarilla, lentes protectores y guantes, ya que sus vapores puede irritar la conjuntiva ocular y potencialmente depositar silicona en los pulmones (Holladay *et al.*, 2001; Chaynes, 2004; Méndez, 2008)

4.4.4 POLIÉSTER 35 (P 35)

La introducción del uso del poliéster como método de plastinación y conservación de órganos cortados finamente en rebanadas de 2, 4, 6 y 8 mm se introdujo hace más de dos décadas. Este método ha revolucionado la técnica de estudio de la anatomía del sistema nervioso central, ya que permite obtener cortes semitransparentes que permiten diferenciar la sustancia blanca y gris del cerebro. (de Boer-van *et al.*, 1992; Barnett, 2005)

En 1980 fue introducido por primera vez el P35 y su uso permitió obtener cortes de encéfalo con una alta definición entre las sustancias blanca y gris (Weber y Henry, 1992). Sin embargo, este polímero cuenta con una serie de desventajas, las preparaciones se tornan rígidas y fáciles de fracturar o romperse (Henry *et al.*, 2006; Hermes, 2006). Actualmente también es empleada para conservar otros órganos del cuerpo; sin embargo, no es muy recomendable comparándolo con el uso de resinas epóxicas, ya que produce

falta en la definición del color y transparencia de los cortes (Henry, 2006; Hermes, 2006).

4.4.5 POLIÉSTER 40 (P 40)

En 1994, von Hagens introdujo el P40 mejorando la técnica de conservación, así como el tiempo de curado y manteniendo el contraste entre la sustancia blanca y gris del encéfalo. Además permitió obtener una serie de cortes semitransparentes en un lapso menor de tiempo, comparado con el P35. Los ejemplares plastinados con este poliéster se adjudicaron rápidamente en fines educativos y de investigación (Barnett, 1997; Weiglein y Feigl, 1998; Weiglein *et al.*, 1999; Sora *et al.*, 1999). A pesar de estar diseñados para la plastinación de rebanadas de encéfalo, el P-40 también puede ser utilizado para plastinar rebanadas de partes corporales (Latorre y Henry, 2007). Sin embargo, el P40 no está libre de desventajas, ya que comparte ciertas similitudes con el P35, tales como sufrir fracturas durante la etapa de curado, así como la formación de manchas color naranja en la sustancia blanca del sistema nervioso, aún se desconoce el mecanismo por el cual se forman. No obstante se han postulado varias teorías de su origen, como son una fijación incompleta, empleo de fijadores de mala calidad, una impregnación incompleta y la presencia de peroxidasas en el tejido (Barnett, 1997; Barnett *et al.*, 2005; Henry, 2006; Méndez, 2008). El catalizado del P-40 se basa en la radiación ultravioleta (UV) la cual puede ser de manera artificial empleando lámparas o de forma natural exponiendo indirectamente a los rayos UV, esta última tiene la desventaja de retrasar hasta 40 min el proceso de catalizado (Reed *et al.*, 2008).

4.4.6 RESINAS EPÓXICAS

Existen otras sustancias empleadas para la conservación de cortes semifinos de otros órganos del cuerpo como son las resinas epóxicas. Dentro de sus características destacan el ser un medio viscoso y posterior a su curación los cortes semifinos conservan una transparencia, una firmeza y en ocasiones

hasta cierto grado de flexibilidad (von Hagens, 1987). Estos especímenes se emplean en la enseñanza de la anatomía topográfica y comúnmente se hacen comparaciones con las imágenes obtenidas por tomografía computarizada y resonancia magnética (Aufdemorte *et al.*, 1985).

4.4.7 EFECTOS TÓXICOS DE LA PLASTINACIÓN

Hay limitada información en la literatura que haga referencia del potencial tóxico de las sustancias químicas utilizadas para el procesamiento de órganos por el método de conservación por plastinación (Méndez *et al.*, 2008). Las principales sustancias utilizadas son el silicón S10 con su catalizador S3 y el gas curador S6, las resinas y el poliéster son menos comunes, sin embargo no dejan de ser valiosas en la conservación de especímenes.

4.5 PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LA PLASTINACIÓN

El proceso de plastinación consta de cuatro pasos fundamentales como son: fijación, deshidratación, impregnación forzada y curado. Los últimos dos son una parte importante del proceso de plastinación (Diz *et al.*, 1994; Grondin, 1998; Pashaei, 2010).

4.5.1 FIJACIÓN

En las técnicas de conservación, la fijación es una parte fundamental y la plastinación no es la excepción. La incorporación de los químicos presentes en el fijador hace que la estructura molecular del tejido mejore sus condiciones para resistir la contracción durante las etapas subsiguientes, además los cambios *postmortem* en los tejidos se pueden retardar o prevenir mediante el uso de fijadores químicos dando tiempo a la disección del espécimen. En un cadáver sin fijador algunas enzimas logran mantenerse intactas y se mantienen biológicamente activas originando un olor de putrefacción ligera (Oostrom, 1987). Los métodos establecidos para la fijación en la plastinación están

indicados de acuerdo a los métodos empleados en el Instituto de Anatomía de Heidelberg, Alemania (von Hagens, 1985) (**ANEXO I**).

La formalina al 4% se emplea cuando los especímenes necesitan ser fijados por inmersión, inyección en vasos sanguíneos, infiltración de músculos y para distensión de órganos huecos. Este paso puede durar entre 1 y 3 semanas dependiendo del tipo de tejido y en el caso del encéfalo se recomienda un periodo de tiempo más largo (Oostrom, 1987). Las principales ventajas que presenta la formalina al 4% es que penetra rápidamente el tejido, por lo tanto se requiere de un periodo de fijación relativamente corto y puede ser usada para el almacenamiento de tejidos u órganos a largo plazo (Crocker, 2007).

4.5.2 DESHIDRATACIÓN

Los diferentes polímeros empleados en la plastinación no son miscibles con el agua. Por lo tanto, los especímenes deben ser absolutamente deshidratados. Su contenido de agua debe ser remplazado por un solvente intermediario que permita la penetración del polímero dentro del espécimen (von Hagens, 1986). Para este procedimiento se utiliza acetona al 99% a una temperatura de -25°C . Una ventaja que se tiene con la acetona a -25°C es que se puede trabajar por debajo de su punto de volatilidad, reduciendo la emisión de vapores, facilitando la sustitución de líquido por congelación y reduciendo el tiempo de la deshidratación. Así mismo, cuando se sumerge las piezas en acetona a -25°C , las muestras se congelan inmediatamente, esto estabiliza su forma y reduce considerablemente el encogimiento.

Este proceso generalmente requiere de 3 a 5 semanas, con tres cambios de acetona aproximadamente, considerando que el contenido de agua debe ser inferior al 1%. Las muestras con lípidos abundantes requerirán más cambios de acetona hasta lograr la pérdida de grasa y agua para poder ser impregnados (Grondin, 1998).

4.5.3 IMPREGNACIÓN

El proceso de impregnación, llamado impregnación forzada, se realiza en una cámara de vacío que contiene el polímero líquido y donde son sumergidos los especímenes saturados con acetona. La cámara se encuentra conectada a una bomba de vacío equipada con un manómetro para regular que la presión disminuya poco a poco dentro de ésta. La acetona contenida en las muestras es sustituida a partir de su fase líquida a vapor por aspiración de la bomba de vacío. La extracción de la acetona crea un vacío dentro de los tejidos que favorece la fuerza de la penetración del polímero en ellos, hasta sus niveles microscópicos. Debido a la gran diferencia de alta presión entre el vapor de la acetona y la baja presión de vapor del polímero, la acetona se extrae cuando el vacío se aplica. (Grondin, 1994). La extracción y la velocidad de la impregnación se controlan mediante la observación de la formación de burbujas de gas en la superficie del polímero. La extracción de acetona no debe hacerse con rapidez, ya que conduciría al colapso de la muestra por la cantidad de polímero viscoso que entra con presión. Por lo general, la impregnación con silicona dura de 3 a 4 semanas, mientras que con la resina epóxica o poliéster, debido a la delgadez de los cortes (2 a 6 mm), se impregnan en pocos días.

4.5.4 CURADO

Después de la impregnación, los especímenes son removidos de la cámara de vacío con polímero. El polímero restante o residual es líquido y se puede emplear para futuras impregnaciones. Existen tres especificaciones para la técnica de curado, dependiendo del polímero que se esté usando:

Muestras impregnadas con silicona: estas se exponen en una cámara cerrada con una atmósfera que está saturada con el gas curador (Weiglein y Henry, 1993). Este paso se realiza a temperatura ambiente, la silicona se expande y se destila en la superficie de las muestras. Estos jugos se deben de limpiar un

par de veces durante los primeros días de curado. Por lo general, después de 2 a 4 días, la superficie está sellada y las muestras están disponibles para demostración o para las actividades de enseñanza. Sin embargo, es recomendable guardarlos en una bolsa sellada para acelerar el fraguado completo que puede durar varios meses.

Las muestras impregnadas con resina epóxica: se realiza un tratamiento térmico a 45°C. El curado final es en un horno que tarda aproximadamente una semana (Weber y Henry, 1993).

Rebanadas de encéfalo impregnadas con poliéster: se inicia con 45 minutos de exposición a la luz UV y se puede terminar en un horno a 45 °C por 5 días (Weber y Henry, 1992).

5. JUSTIFICACIÓN

La descomposición de los especímenes biológicos es un proceso inexorable en la naturaleza particularmente cuando se exponen a condiciones atmosféricas normales, esto muchas veces resulta ser un impedimento para los estudios morfológicos, la docencia y la investigación. Los especímenes cadavéricos empleados en la enseñanza de la anatomía, se encuentran previamente fijados con formalina permitiendo así el desarrollo de la habilidad manual del alumno. Los estudiantes y los profesores tienen que lidiar con vapores nocivos cuando emplean especímenes anatómicos y patológicos conservados con formalina. Por lo tanto, siempre ha sido un objetivo para los profesores encontrar técnicas adecuadas de preservación (Mehra, 2003).

Los efectos adversos del formaldehído se han discutido alarmantemente por varios autores (Alexanderson *et al.*, 1982; Bardana, 1986; Berk, 1987). Sin embargo, aún de sus desventajas se continúa empleando en diferentes laboratorios en donde el personal expuesto en muchos casos supera el umbral de irritación de los ojos y del aparato respiratorio superior. Todos estos factores de riesgo asociados con el formaldehído limitan su utilidad como método primario de preservación en lugares donde las instalaciones tienen ventilación deficiente (Pabs, 1987; Yamato *et al.*, 2005).

La plastinación resulta ser una técnica ideal para preservar tejidos, una de sus principales ventajas es que los especímenes no presentan rastros de la formalina, pueden ser manipulados sin guantes y se conservan intactos por muchos años. Sin embargo los órganos y tejidos preservados con fijadores convencionales como la formalina e incluso con la plastinación, pierden paulatinamente su color natural tornándose grises o café, impidiendo la observación adecuada de sus características particulares y sus lesiones en algunos especímenes. Debido a esto, se buscan alternativas que favorezcan una mejor coloración y apariencia de los órganos y tejidos preservados, especialmente los utilizados para la enseñanza e investigación.

6. HIPÓTESIS

Las piezas anatómicas procesadas con las técnicas S10 y poliéster P40 combinadas con imidazol reactivarán el color natural de cabezas y tejido nervioso de animales domésticos fijados previamente con formalina, mejorando a la observación y conservación de sus estructuras, sin detrimento de la capacidad fijadora de la formalina y del proceso de plastinación.

7. OBJETIVO GENERAL

Establecer los procedimientos técnicos para la reactivación del color empleando imidazol combinado con los métodos de plastinación S10 y P40 en cabezas y encéfalos de mamíferos domésticos sacrificados con diferentes métodos.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Colectar cabezas y encéfalos de animales domésticos que hayan sido sacrificados con métodos aceptados en la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995
- ❖ Determinar la cantidad y procedimientos para la aplicación del imidazol durante la técnica de S-10 y P-40.
- ❖ Obtener imágenes fotográficas de las piezas anatómicas después de procesarlas con las diferentes técnicas.
- ❖ Evaluar el color de las piezas anatómicas por medio de un analizador de imágenes con el patrón de colores Red-Green-Blue (RGB).
- ❖ Analizar el color para comparar el efecto del reactivo y su relación con la forma de morir.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron 62 cabezas y 14 encéfalos de animales domésticos, entre los que destacan:

Equino (*Equus ferus caballus*)

Bovino (*Bos primigenius taurus*)

Ovino (*Ovis orientalis aries*)

Caprino (*Capra aegagrus hircus*)

Porcino (*Sus scrofa domestica*)

Canino (*Canis lupus familiaris*)

Felino (*Felis silvestris catus*)

Todos ellos previamente sacrificados con métodos humanitarios de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995. La colecta de material biológico de especies de abasto se realizó en los siguientes lugares; el rastro municipal de Cadereyta, Qro.; casa de matanza de Tequisquiapan, Qro., la Carnicería “Leal” en el pueblo del Vizarrón de Montes, Qro; sala de necropsias de la Unidad de Servicios Diagnósticos y de Constatación del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano; sala de necropsias de la FMVZ –UNAM. La donación de cabezas de canino y felino se realizó en los Centros de Control Canino de las delegaciones Iztapalapa y Tláhuac, D.F.

9.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL I

Se emplearon 62 cabezas completas que fueron congeladas a -25°C durante una semana, posteriormente se les realizó un corte longitudinal sobre plano mediano con una sierra de banda (Torrey® ST-295-AI). Las cabezas se dividieron en dos grupos: grupo A procesadas con técnica tradicional de plastinación S10, y grupo B con la técnica S10 combinada con imidazol.

9.1.2 GRUPO A. PLASTINACIÓN S-10

9.1.2.1 A) Fijación.

Las cabezas cortadas longitudinalmente fueron fijadas con formalina acuosa al 4% durante 20 días. El tipo de fijación que se empleó en este experimento fue por inmersión, que de manera general consiste básicamente en sumergir las piezas anatómicas en la solución fijadora (Figura 1).

9.1.2.2 B) Deshidratación

Esta consistió en sumergir los especímenes en acetona 99%. Los contenedores con las cabezas y acetona fueron colocados en un congelador (Nieto CPA25) a una temperatura de -25°C. Se realizó un control semanal de la concentración, color y turbidez de la acetona. Se efectuaron cambios de acetona y mediciones semanales hasta que la concentración final fuera del 97-99%, lo cual sucedió aproximadamente entre la tercera y la cuarta semana. Para las mediciones se utilizó un acetómetro (Biodur-HD01 0%-100% calibrado a +20°C), estas se realizaron tomando una muestra de 250 mL directamente del contenedor, se dejó reposar en una probeta hasta que la muestra alcanzó los 20°C, posteriormente se introdujo el acetómetro y de acuerdo al nivel de inmersión se hizo la lectura del porcentaje de acetona. Realizado esto se consideró que la cantidad de agua residual que permaneció en el órgano no fue superior a 1 ó 2% (Figura 2).

9.1.2.3 C) Impregnación

Una vez completada la deshidratación, los órganos ingresaron al proceso de impregnación con silicón. Previamente se hizo la mezcla de silicón Biodur® S-10 y Biodur® S-3 con una relación de 100:1 a temperatura ambiente, mezclando por 15 min aproximadamente y se dejó reposar por 30 min permitiendo así la salida de aire de la mezcla. El silicón fue vertido a la cámara de impregnación a -25°C y se dejó reposar durante 24 h permitiendo nuevamente la salida de burbujas y que el silicón alcanzara una temperatura de -25°C. Posteriormente, se colocaron los especímenes que se encontraban en acetona al 99% en el interior de la cámara con la mayor rapidez posible, observando que estos estuvieran cubiertos totalmente por el silicón. Se cerró la

cámara con un vidrio templado y se mantuvieron los especímenes sumergidos en el silicón durante 24h. Posteriormente, se encendió la bomba de vacío (ME-8-NT max. 70 mbar) que está conectada a la cámara de impregnación por medio de mangueras manteniendo una presión de 35 hPa=26.2 mm Hg. La medición del vacío se hizo directamente del manómetro instalado en los componentes de la bomba de vacío.

Los especímenes permanecieron en impregnación hasta que se observó que no había evidencia de burbujas en la superficie del silicón, este proceso tuvo una duración de dos a tres semanas (Figura 3).

Se apagó la bomba de vacío y una vez liberada la presión lentamente de la cámara se colocó una rejilla en el interior para poner sobre de ella los especímenes para que escurrieran el exceso de silicón (Figuras 4 y 5). Se sacaron las piezas impregnadas de la cámara y se dejaron escurrir a temperatura ambiente sobre rejillas y toallas de papel durante 24 h.

9.1.2.4 D) Curación o polimerización.

Los órganos impregnados fueron colocados en la cámara de curación mantenida a temperatura ambiente. Durante las primeras 24 h tuvieron una pre-polimerización, los especímenes continuaron escurriendo el silicón, el cual fue retirado por medio de toallas de papel. Posteriormente, en el interior de la cámara se colocó una botella de gas endurecedor Biodur® S6 con una bomba de oxigenación y un ventilador para distribuir homogéneamente el gas para iniciar el curado de las cabezas. El curado en la superficie del órgano tardó aproximadamente 48 h. Nuevamente se retiró el exceso de polímero persistente cada 2-3 h, cambiando la posición de las cabezas para favorecer un curado homogéneo. Se Interrumpió la polimerización cada 12 h, las 2da y 3ra semana para realizar una limpieza profunda del excedente de polímero (Figura 6). Después de la tercera semana se sacaron los especímenes y fueron empacados en bolsas de plástico donde se terminó la fase de curado.



FIGURA 1. Representación esquemática de un espécimen inmerso en formalina al 4% a temperatura ambiente.



FIGURA 2. Representación esquemática de 2 especímenes inmersos en acetona al 99% a -25°C dentro de la cámara de congelación.

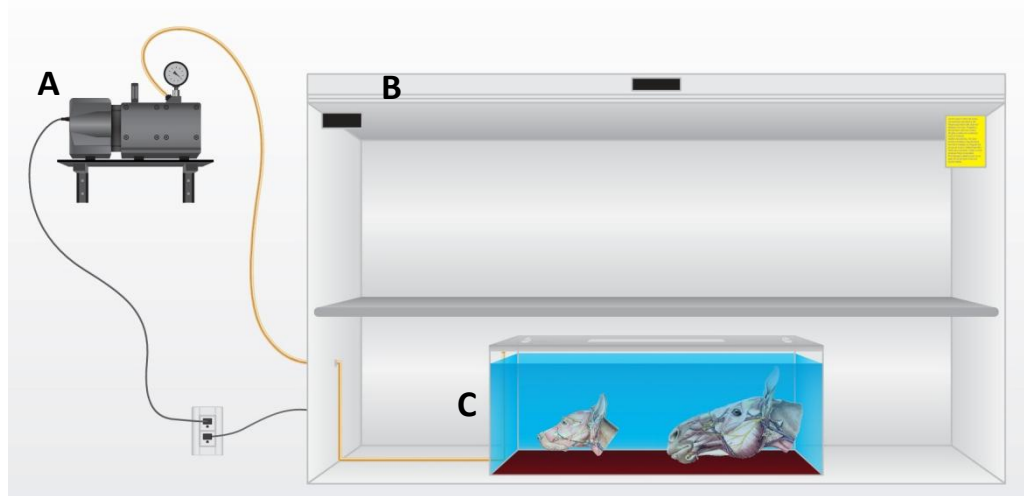


FIGURA 3. Representación esquemática del proceso de impregnación a -25°C . A, Bomba de vacío. B, Cámara de congelación. C, Cámara de impregnación forzada con dos especímenes inmersos en el S10+S3 conectada a la bomba de vacío.



FIGURA 4. Corte sagital de una cabeza de bovino, vista lateral izquierda. Etapa final del proceso de impregnación, el espécimen se colocó sobre la rejilla para que escurra el excedente de silicón.



FIGURA 5. Corte sagital de una cabeza de bovino, vista mediana. Etapa final del proceso de impregnación, el espécimen se colocó sobre la rejilla y se rota periódicamente para que escurra el excedente de silicón.

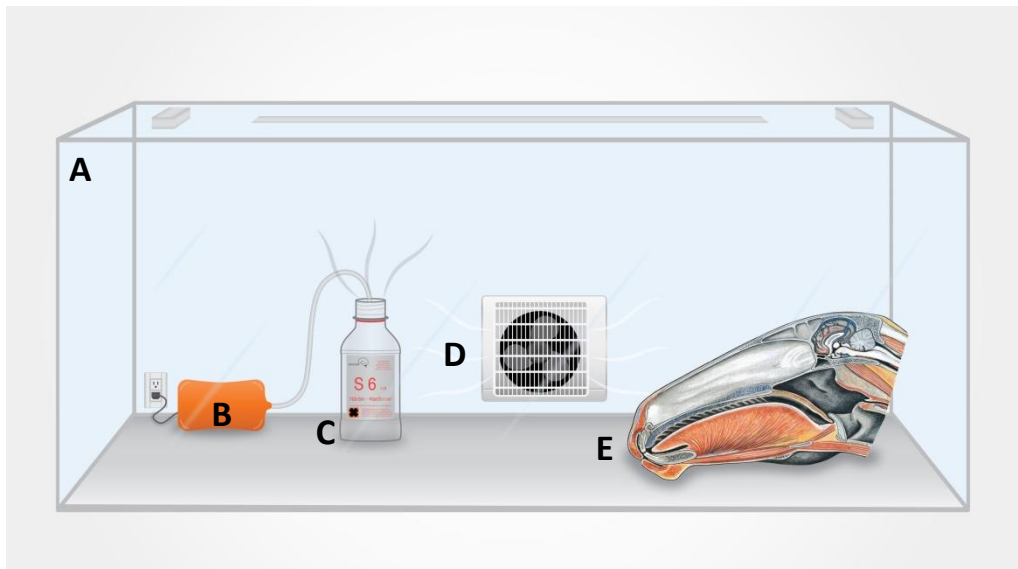


FIGURA 6. Representación esquemática del proceso de curado a temperatura ambiente. A, Cámara de curado. B, Bomba de aire. C, S6 Gas curador. D, Ventilador. E, Corte longitudinal de cabeza de caballo impregnada con silicón S10+S3.

9.1.3 GRUPO B. PLASTINACIÓN S-10 MÁS IMIDAZOLE

La congelación, corte longitudinal, fijación y deshidratación se realizó de la misma manera que el grupo A. La preparación del silicón difiere en que se le agregó el imidazole como se describe a continuación:

Se preparó una mezcla de silicón Biodur® S10 y catalizador Biodur® S3 en una proporción 100:1 a la cual, se le agrega una solución saturada de imidazole en alcohol etílico, en una proporción de 100:0.05 mezclando uniformemente con una varilla de metal y posteriormente, esta mezcla se vertió en la cámara de impregnación forzada a -25°C. Se dejó reposar durante 24h con la finalidad de que brotaran las burbujas que se forman durante la mezcla y el silicón alcanzara una temperatura de -25°C. Posteriormente se colocaron los especímenes que se encontraban en acetona al 99%, se cerró la cámara y se mantuvieron sumergidos en el silicón durante 24h. Posteriormente, se encendió la bomba de vacío manteniendo una presión constante de 35 hPa=26.2 mm Hg. Este proceso tuvo una duración de dos a tres semanas.

Los órganos impregnados fueron colocados en la cámara de curación mantenida a temperatura ambiente, en la cual se colocó una botella de gas endurecedor Biodur® S6 con una bomba de oxigenación y un ventilador para distribuir homogéneamente e iniciar el curado de las cabezas. Posteriormente se retiró el exceso de polímero persistente cada 2-3 h, cambiando la posición de las cabezas para favorecer un curado homogéneo. Se Interrumpió la polimerización cada 12 h, las 2da y 3ra semana para realizar una limpieza profunda del excedente de polímero. Después de la tercera semana se sacaron los especímenes y fueron empacados en bolsas de plástico donde se terminó la fase de curado.

9.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL II

Se emplearon 14 encéfalos que fueron divididos en dos grupos de 7 encéfalos cada uno, grupo A técnica P40 y grupo B Técnica P40 más imidazol.

9.2.1 EXTRACCIÓN DE ENCÉFALOS

Se desarticuló la cabeza a nivel de la articulación atlantooccipital, se colocaron sobre la mesa y se separaron piel y músculos del cráneo para poder cortar los huesos con mayor facilidad. En todas las especies se hicieron dos cortes con sierra o con hacha en los límites laterales del foramen magno hacia la base del proceso cigomático del temporal.

En bovinos, los cortes se hicieron de los límites laterales del foramen magno hasta la cara interna de los procesos cornuales y de allí a los forámenes supraorbitarios, uniendo los dos por medio de otro corte transverso a través del hueso frontal.

En ovinos y cabras, los cortes se hicieron de los límites laterales del foramen magno siguiendo por la base del proceso cigomático hacia el margen supraorbitario y de allí, a los forámenes supraorbitarios, uniendo los dos por medio de otro corte transverso a través del hueso frontal.

En cerdos se cortó de la base del proceso cigomático hacia el margen supraorbitario y de allí, pasando ligeramente hacia la parte medial al foramen supraorbitario, en línea oblicua hasta la línea mediana, donde este corte se encuentra con el del lado opuesto.

En perros y gatos se cortó desde la base de los procesos cigomáticos hasta los márgenes supraorbitarios y se unen los dos cortes por medio de un corte transverso a través del hueso frontal.

En caballos el corte se continuó por el hueso parietal hacia la cara medial del margen supraorbitario y finalmente se unen estos dos cortes laterales por medio de otro corte transverso a través del hueso frontal.

Una vez efectuados estos cortes descritos en las diferentes especies, se levantó la parte desprendida de los huesos para exponer el encéfalo. Para extraerlo, se cortó la duramadre y levantando la cabeza de adelante hacia atrás, se desprende la masa encefálica junto con la glándula hipófisis, en algunos casos (Aluja, 2002).

En ambos grupos, a todos los encéfalos se les retiraron las meninges para permitir una mejor apreciación de sus estructuras y la penetración del fijador.

9.2.2 GRUPO A. PLASTINACIÓN P-40

9.2.2.1 A) Fijación.

Los encéfalos fueron fijados con formalina al 4% durante 15 días por inmersión (Figura 7). Posteriormente los encéfalos fueron incluidos en un bloque de silicón de caucho (Poliformas® Polisil P-48) para facilitar su manipulación al momento de realizar los cortes transversales con una rebanadora de carnes frías (Torrey® modelo SS-300) (Figura 8).

Una vez incluidos los encéfalos en los bloques de silicón de caucho se enfriaron a -25°C por 2 h; se determinó el grosor del corte (4 mm aproximadamente) y se calibró la sierra de disco / rebanadora. Después de cada corte se limpió el disco de la sierra con agua y toallas de papel para facilitar el deslizamiento del bloque (Figura 9). Los cortes obtenidos se ordenaron y colocaron en contenedores de plástico con formalina al 4% donde permanecieron por una semana (Figura 10), posteriormente se lavaron con agua corriente durante 2 h para retirar el excedente de fijador.

9.2.2.2 B) Deshidratación.

Una vez lavadas las piezas se sumergieron en acetona 99% a 5°C y periódicamente se removía la acetona en el transcurso del día para facilitar que la pieza se embebiera durante la deshidratación. Se realizaron 3 baños de acetona, cada uno con 48 horas de duración cuidando la turbidez de la acetona.

9.2.2.3 C) Impregnación.

Después del último baño de acetona se hizo una pre-impregnación sumergiéndolos cortes de encéfalo en el polímero P-40 a 5°C durante 2 días. Posteriormente, se hizo el montaje de una cámara de impregnación por cada corte. La cámara está formada por dos placas de vidrio de 15 x 15 cm transparente y liso, de aproximadamente 3mm de grosor, lo que facilita la disipación del calor producido durante la polimerización. Entre cada placa de vidrio se colocó una junta selladora de silicón a unos 2 cm de la periferia del vidrio y para la unión de ambas placas se utilizaron pinzas porta documentos de 32 mm (Figura 11).

Posteriormente se llenaron las cámaras con P40, hasta un máximo de tres cuartas partes de su capacidad, se colocaron los cortes dentro de la cámara empleando una espátula, cuidando que esté a la misma temperatura para prevenir que los cortes floten (Figuras 12 y 13).

Con un estilete se extrajeron las burbujas grandes colocando la cámara en un ángulo de 45° (Figura 14). Las burbujas atrapadas se extrajeron con un alambre de 1 mm. Finalmente, se insertaron 1 ó 2 balines de acero pequeños y se rellenó la cámara con polímero hasta 2 cm antes del borde superior de la cámara. Se comprimieron manualmente los extremos de la junta selladora entre los cristales y en la zona donde se unen los dos tubos se colocó la pasta selladora de Biodur® HS 80. Para la extracción de burbujas y posición del corte de encéfalo en la cámara sellada se utilizaron los balines previamente introducidos utilizando un imán.

Se colocaron las cámaras de vidrio selladas en una cámara de refrigeración a 5°C durante 2 días en posición horizontal previniendo que el corte se desplace hacia el fondo de la cámara y contacte con la junta selladora.

9.2.2.4 D) Curado

Antes de iniciar con el curado se temperaron las cámaras de vidrio durante 4 h, posteriormente se exponen a la lámpara UV y en 45 min se obtiene el polimerizado total (Figura 15). Una vez curado el poliéster se desmontan las cámaras y se colocan en una superficie plana durante 24h.



FIGURA 7. Representación esquemática de un encéfalo inmerso en formalina al 4% a temperatura ambiente.

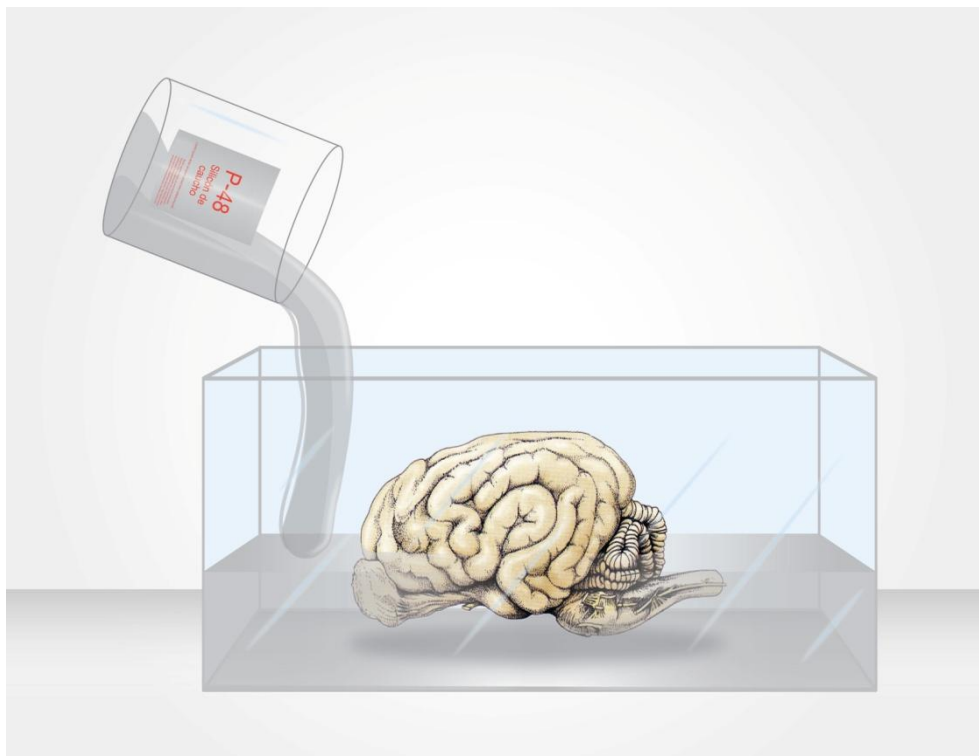


FIGURA 8. Representación esquemática de la inclusión en silicón de caucho p48 de un encéfalo.

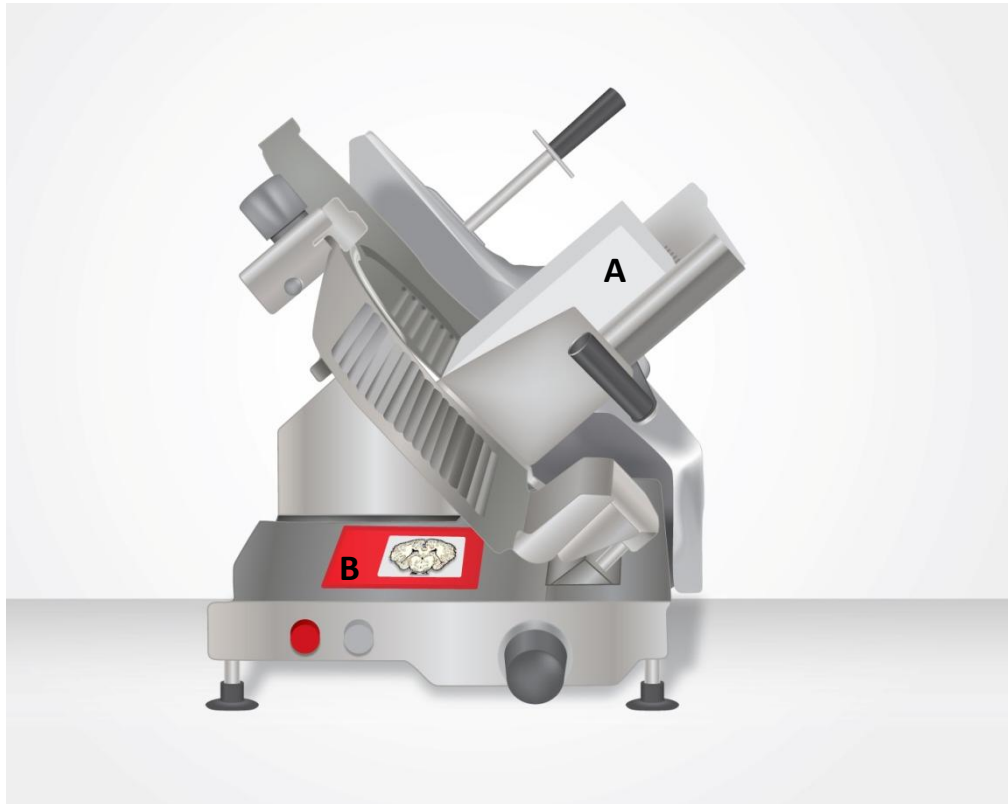


FIGURA 9. Representación esquemática de la realización de los cortes transversales del encéfalo. A, Bloque de silicón con encéfalo. B, Corte transversal



FIGURA 10. Representación esquemática de un corte transversal del inmerso en formalina al 4% a temperatura ambiente.

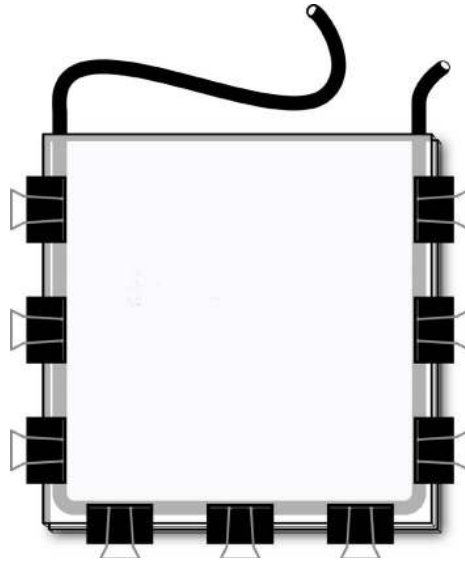


FIGURA 11. Representación esquemática de la cámara de impregnación para la técnica de plastinación P40.

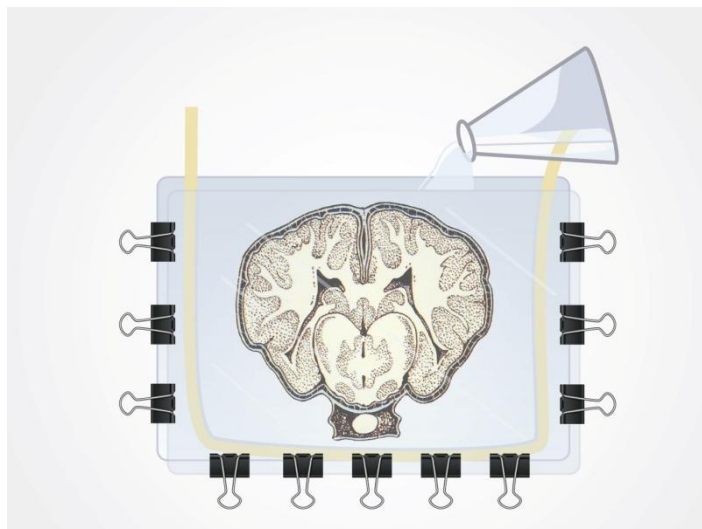


FIGURA 12. Representación esquemática de la cámara de impregnación con el espécimen y su llenado con el poliéster P40.

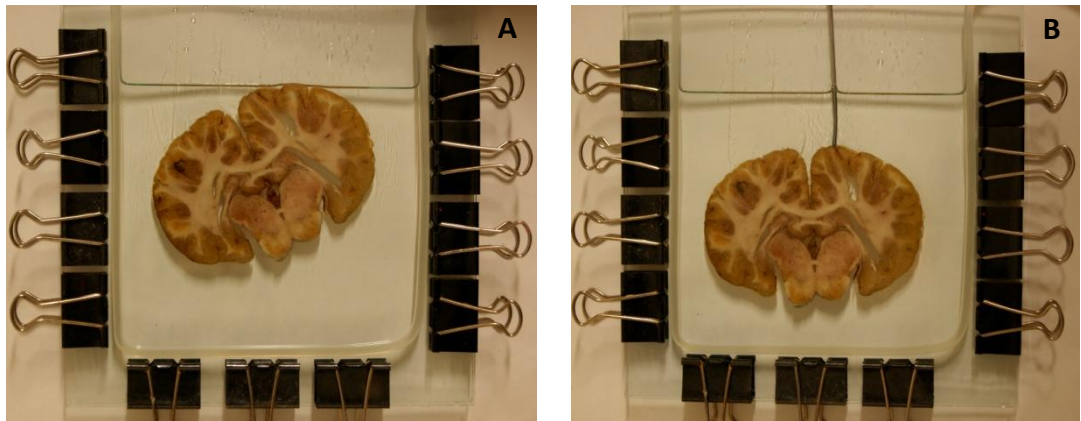


FIGURA 13. Corte transversal de un encéfalo de equino. A, Especimen con diferencia de temperatura con respecto al poliéster. B, el espécimen se posiciona nuevamente sobre el centro de la cámara para obtener una impregnación homogénea.

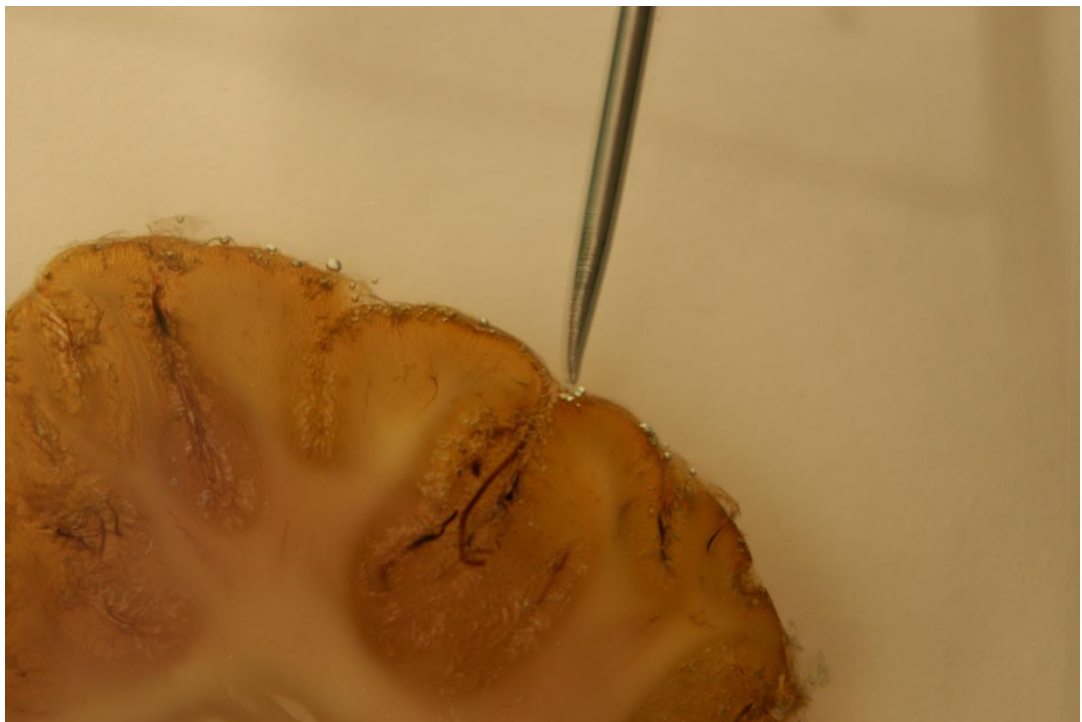


FIGURA 14. Corte transversal de un encéfalo de equino. Extracción de burbujas durante el proceso de impregnación.

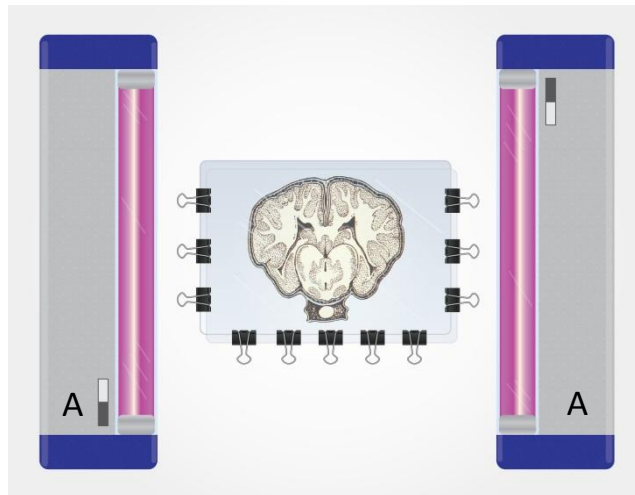


FIGURA 15. Representación esquemática del curado para la técnica de plastinación P40. A, lámparas UV.

9.2.3 GRUPO B. PLASTINACIÓN P-40 MÁS IMIDAZOLE

La fijación del encéfalo, los cortes en rebanadora de disco, deshidratación, impregnación y curado es igual que el grupo A, solamente en el primer baño de acetona difiere en que se le agrega el imidazole como se describe a continuación:

Al no existir antecedentes previos del uso del imidazole con el P40, se hicieron pruebas previas donde se adicionó junto con el poliéster, dando como resultado la presencia de algunos precipitados de color blanco, posteriormente se decidió aplicar el imidazol en los baños de acetona, siendo el primero el más óptimo, ya que se obtiene una mejor reactivación del color de la sangre, además de que en el segundo y tercer baño se facilita la eliminación de los residuos persistentes.

Se hizo una solución saturada de imidazol con alcohol etílico, en una proporción de 100:0.05 mezclando uniformemente con una varilla de metal y posteriormente esta mezcla se vertió en el primer baño de acetona. Se dejó reposar durante 24 h con la finalidad de que la mezcla alcanzara una temperatura de 5°C. Posteriormente, las piezas fueron inmersas en la mezcla de acetona más imidazole durante 48 h y periódicamente se removía la acetona en el transcurso del día para facilitar que la pieza se embebiera durante la deshidratación.

9.3 IMÁGENES FOTOGRÁFICAS

Terminados los procesos del experimento 1 y 2, a todos los órganos se les tomaron fotografías digitales sobre un fondo blanco utilizando una cámara Sony modelo alfa 230 con una lente de 18-55 mm.

9.4 EVALUACIÓN DEL COLOR

Para evaluar el color de los especímenes las fotografías digitales fueron analizadas mediante el programa de análisis de imágenes image-Pro-premier.

De cada cabeza seccionada longitudinalmente se tomaron imágenes tanto del lado izquierdo como del lado derecho, y para los encéfalos se tomaron imágenes de todas las rebanadas obtenidas.

Para poder realizar un análisis con el programa, la imagen debe ser transformada en su forma numérica, este proceso se conoce como digitalización de imágenes. En este proceso se fragmenta la imagen en una cuadrícula horizontal denominada matriz, la cual contiene regiones muy pequeñas llamados elementos de imagen o píxeles. En el programa la imagen está representada por una rejilla digital o mapa de bits. Cada píxel en el mapa de bits se identifica por su posición en la rejilla, es decir se identifica por su posición en la fila (eje X) y por su posición en la columna (eje Y). Posteriormente, se abre la imagen y automáticamente se analiza por el modelo RGB. El modelo de color RGB (por sus siglas en inglés: rojo, verde, azul) utiliza la forma más sencilla de representar el color en las imágenes digitales. El RGB representa los tres colores primarios luminosos. Este modelo es utilizado por la mayoría de los dispositivos de imágenes digitales, como son, los monitores y las cámaras digitales con pantalla a color. En un mapa de bits, cada píxel tiene un valor de 24 bits, llamado "tripleto" RGB o "fragmento". Este tripleto RGB se compone de tres muestras de 8 bits. Cada muestra representa el nivel de brillo de su respectivo canal de color: rojo, verde o azul. Estos niveles se representan dentro de una escala de 256 niveles. La primera muestra es el nivel de rojo, que puede ir desde 0 (Negro) a 255 (rojo brillante). La segunda muestra representa el nivel de verde, donde su nivel más alto formara un verde brillante y sus niveles bajos representan todas las posibles combinaciones con el rojo. La tercera muestra es el nivel de azul, donde su nivel más alto formara un azul brillante y sus niveles bajos representan todas las combinaciones con el rojo y verde. Este análisis proyecta una tabla estadística donde se aprecian los valores independientes del tripleto RGB, con su media aritmética y su desviación estándar, además de valores mínimos y máximos. Todos estos valores son compatibles con otros modelos de color como el HSI (Hue[matiz], saturación, intensidad) y HSV (Hue[matiz], saturación, brillo) (Image-Pro® Plus Reference Guide).

9.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó un modelo univariado o análisis de parcelas divididas en el tiempo. Entre los supuestos que se emplearon para este método de análisis fueron: muestreo aleatorio de la población, independencia de las observaciones, normalidad y la homogeneidad de varianzas de las diferencias en las respuestas. (Sánchez *et al.*, 2001; Ducoing, 2009).

9.5.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO TÉCNICA S-10

Características de la muestra:

Se evaluaron 62 cabezas de animales domésticos de la siguiente manera: 37 cabezas con S10 y 25 cabezas con S10 adicionado con imidazol. De acuerdo con los métodos de sacrificio, eutanasia y matanza; 24 especímenes (38.70 %) correspondían a cabezas de pequeñas especies sacrificados con métodos químicos (sobredosis de anestésicos) y 38 especímenes (61.29%) correspondían a cabezas de animales de abasto sacrificados con método físico (embolo oculto) (cuadro 1).

Cuadro 1 Distribución de los tamaños de muestra por tratamiento para la técnica de S10.

	S10	S10 imidazol	Total
Matanza	23	15	38
Eutanasia	14	10	24
Cabezas totales	37	25	62

Se decidió utilizar como variable proxi para el análisis, la forma de morir que puede influir fuertemente en el color de la imagen. De este modo se utilizó el tipo de muerte con dos niveles: eutanasia o matanza.

A cada cabeza se le hizo un corte longitudinal sobre el plano mediano y se tomaron imágenes del lado izquierdo y derecho, por lo que se tiene un diseño

factorial con dos factores: aplicación del reactivo y la forma de morir. Finalmente se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Tukey para determinar a qué tratamientos se debía el efecto de interacción.

9.5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO TÉCNICA P-40

Se evaluaron 14 encéfalos de animales domésticos que se distribuyeron de la siguiente manera: 7 procesados con P40 y 7 procesados con P40 adicionado con imidazol. De acuerdo con los métodos de sacrificio, eutanasia y matanza 4 casos (28.57%) correspondieron a encéfalos de pequeñas especies sacrificados con métodos químicos (sobredosis de anestesia) y 10 (71.42%) fueron encéfalos de animales para abasto sacrificados con métodos físicos (embolo oculto) (cuadro 2).

Cuadro 2 Distribución de los tamaños de muestra por tratamiento para la técnica de P40.

	P40	P40 imidazol	Rebanadas totales
Matanza	5 encéfalos	5 encéfalos	190
Eutanasia	2 encéfalos	2 encéfalos	64
Rebanadas	129	125	254

Se decidió utilizar como variable proxy la forma de morir que puede influir fuertemente en el color de la imagen. De este modo se utilizó el tipo de muerte con dos niveles: eutanasia o matanza.

A cada encéfalo se le hizo un número determinado de cortes transversales que dependían del tamaño del encéfalo por lo que se seleccionó un corte que fuera común para todos los encéfalos, con el propósito de comparar el efecto del reactivo y de la forma de morir. Finalmente se tiene un diseño factorial con dos factores: aplicación del reactivo y tipo de muerte.

10. RESULTADOS

10.1 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL COLOR EN LAS CABEZAS CON Y SIN IMIDAZOLE.

Una vez plastinadas las cabezas seccionadas, se observó que las cabezas tratadas con el S10 más imidazole presentaban una coloración rojiza comparadas macroscópicamente con las cabezas tratadas de manera convencional con el S10 (Figuras 16-24). Las lesiones generadas por el método de matanza en ambas técnicas se conservaron adecuadamente, sin embargo las tratadas con imidazole presentaron un mejor contraste de color (Figuras 17 y 23).

La presencia del imidazol entre los animales que murieron por matanza, permitió una mejor apariencia en comparación con los animales que murieron por eutanasia (Figuras 16, 18, 19-24). Aquellos animales que murieron por matanza presentaron una mejor apariencia a pesar de no recibir el reactivo, de tal manera que los especímenes que presentaban el daño por embolo oculto manifestaron una mejor apariencia en la zona de lesión (Figuras 17, 19-23).



FIGURA 16. Cabezas de felino, corte longitudinal. A, Cabeza de felino procesada con la técnica de plastinación S10. B, Cabeza de felino procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol.

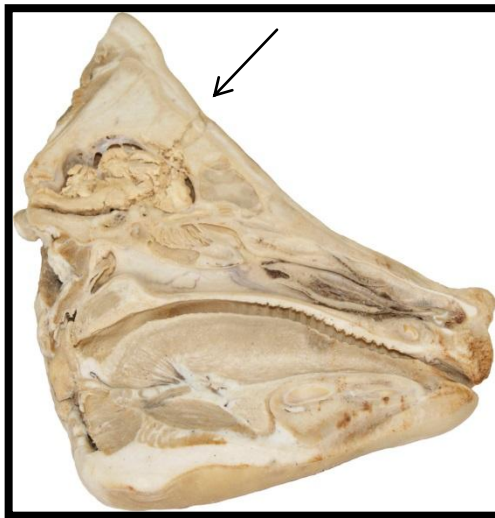


FIGURA 17. Cabezas de porcino, corte longitudinal. A, Cabeza de porcino procesada con la técnica de plastinación S10. B, Cabeza de porcino procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol. Daño generado por el embolo oculto (flecha)



FIGURA 18. Cabezas de canino, corte longitudinal. A, Cabeza de canino procesada con la técnica de plastinación S10. B, Cabeza de canino procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol.

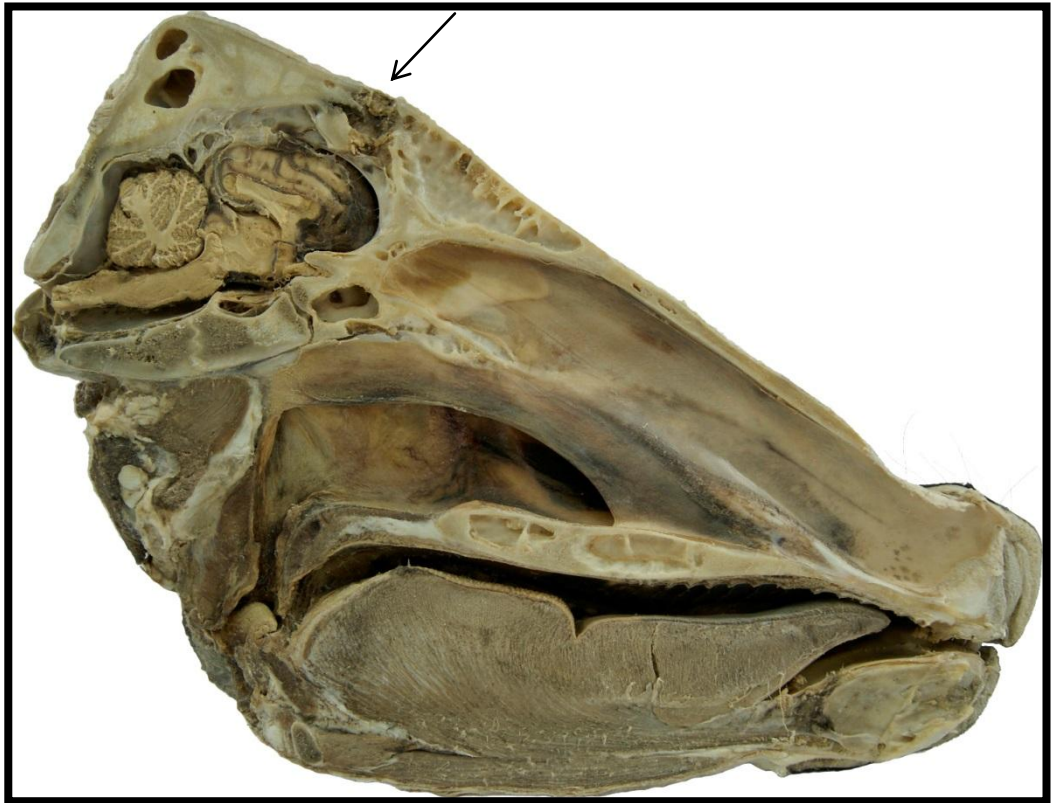


FIGURA 19. Cabeza de bovino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10. Daño generado por el embolo oculto (flecha).

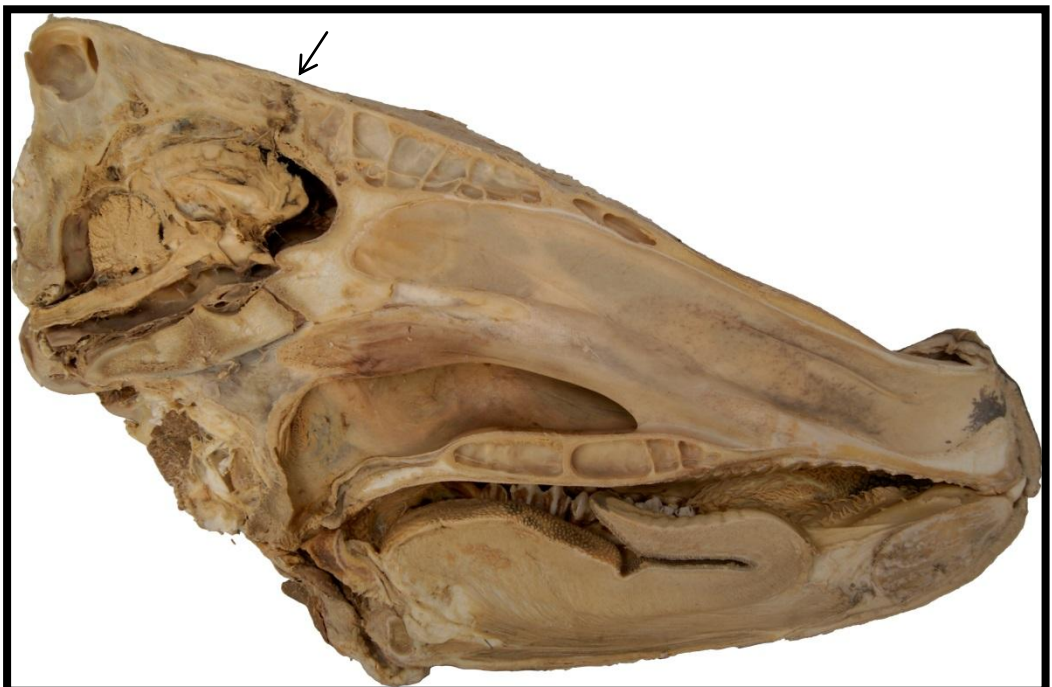


FIGURA 20. Cabeza de bovino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol. Daño generado por el embolo oculto (flecha).



FIGURA 21. Cabeza de equino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10.

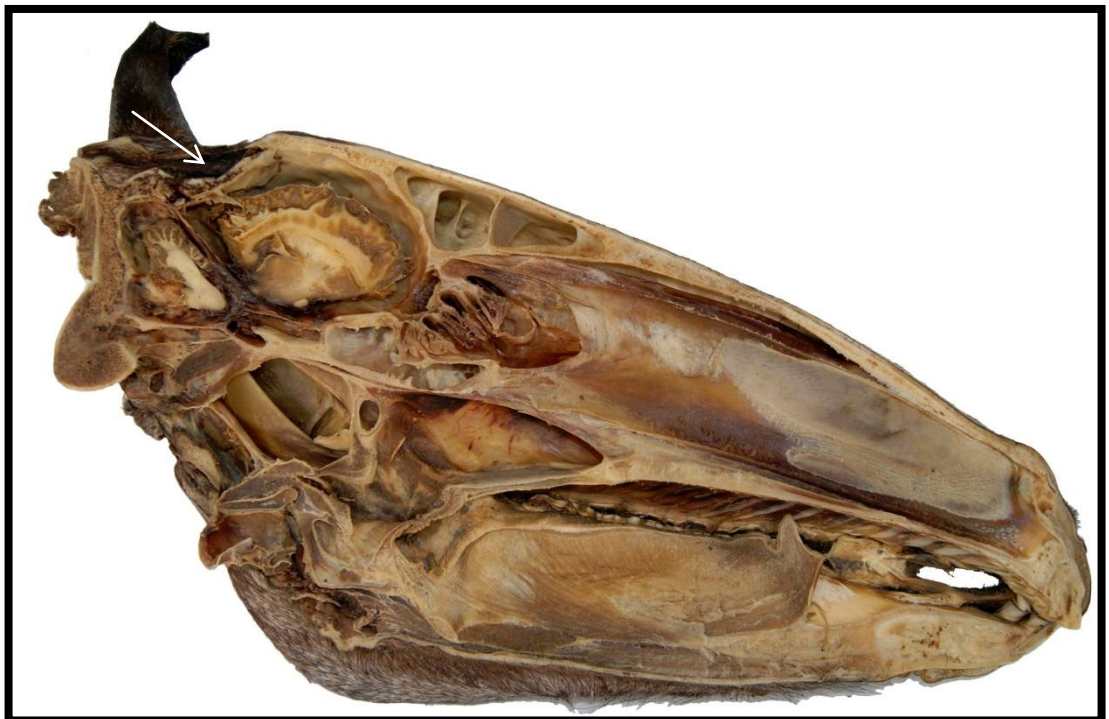


FIGURA 22. Cabeza de equino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol. Daño generado por el embolo oculto (flecha).



FIGURA 23. Cabeza de caprino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10.

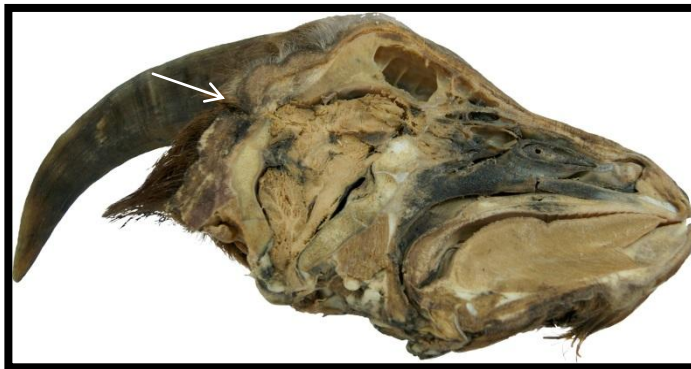


FIGURA 24. Cabeza de caprino, corte longitudinal procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol. Daño generado por el embolo oculto (flecha).



FIGURA 25. Cabezas de ovino, corte longitudinal. A, cabeza de ovino procesada con la técnica de plastinación S10. B, cabeza de ovino procesada con la técnica de plastinación S10 más imidazol.

10.2 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS CABEZAS DE ANIMALES DOMÉSTICOS

Una vez analizada la información de cada uno de los cortes longitudinales se observó que el único efecto significativo fue la interacción entre la aplicación del imidazole y la forma de morir, es decir, los especímenes tratados con S10 adicionado con imidazol, presentaron una mejor apariencia a la reactivación de color (Prob > F 0.0004) encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0.001$) en el modelo de colores RGB (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados a la medición de color y respuestas al efecto de interacción.

Fuente	SS	MS Num	F Ratio	Prob > F
Tratamientos (Con y Sin imidazol)	18.1629	18.1629	0.0689	0.7938
Forma morir (Eutanasia y Matanza)	381.714	381.714	1.4490	0.2336
Vista (Izquierda y Derecha)	7.32185	7.32185	0.1331	0.7166
Tratamientos - forma morir	3769.56	3769.56	14.3096	0.0004
Tratamientos – vista	23.167	23.167	0.4210	0.5190
Forma morir – vista	183.149	183.149	3.3282	0.0733
Forma morir – vista - tratamientos	2.48422	2.48422	0.0451	0.8325
Cabezas [Tx, forma morir]&Random	15278.8	263.428	4.7871	<.0001

Tx: tratamientos. SS: suma de cuadrados. MS: cuadrados medios. F Ratio: valor de F.

Posteriormente se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Tukey para determinar a qué tratamiento se debía el efecto de interacción y los resultados se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Valores para el efecto de interacción con la prueba de Tukey. 0,0= sin imidazole y matanza. 1,1= con imidazole y eutanasia. 1,0= con reactivo y matanza. 0,1= sin imidazole y eutanasia.

Tratamiento* Forma de morir			Medias por Cuadrados Mínimos	Error Estándar
0,0	a		170.51939	2.3930516
1,1	a	b	167.65355	3.6292425
1,0		b	159.80043	2.9632641
0,1		b	155.33550	3.0672697

*Los literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

Esto significa que se encontraron diferencias estadísticas por la presencia o ausencia del imidazole entre los que murieron por matanza, es decir la presencia del imidazole entre los animales que murieron por matanza, presentaron una mejor coloración y las lesiones provocadas por el émbolo oculto se podían diferenciar mejor ($P < 0.05$). Además se encontraron diferencias estadísticas entre la forma de morir y entre los que no recibieron el imidazole, es decir, aquellos animales que murieron por matanza presentaron una mejor coloración a pesar de no recibir el imidazole, de tal manera que los especímenes que presentaban el daño por embolo oculto manifestaron una mejor coloración en la zona de lesión (Anexo 2).

Si bien, puede haber un efecto de la especie en la medida de color, en nuestro estudio se decidió no incluir esta variable en el análisis porque en particular para cerdos no se contaba con muestras suficientes ya que es una especie que por su alto contenido de grasa requiere de mayor tiempo durante su proceso además de impurificar el silicón, es decir, especímenes que por su alto contenido de grasa requieren seis baños de acetona, tres a temperatura ambiente y tres a -25°C , cada baño de acetona tiene una duración de una semana, sin embargo a pesar de los esfuerzos por retirar la grasa, el silicón y la cámara de impregnación tienden a contaminarse de residuos grasos, lo que afecta la calidad de los especímenes subsecuentes.

10.3 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL COLOR EN ENCÉFALOS CON Y SIN IMIDAZOLE.

Una vez plastinados los cortes transversales de encéfalo, se observó que los cortes tratados con el P40 más imidazole presentaban un mejor contraste entre la sustancia gris y la sustancia blanca comparadas macroscópicamente con los cortes procesados sin imidazole (Figuras 26-34). Las secciones transversales de encéfalo, conservaron sus características tanto anatómicas como la lesión provocada por el método de matanza, sin embargo a la evaluación macroscópica no se observaron diferencias significativas en la saturación de color de algunos especímenes (Figuras 29 y 30), mientras que en otras secciones fue más que evidente (Figura 31-34).

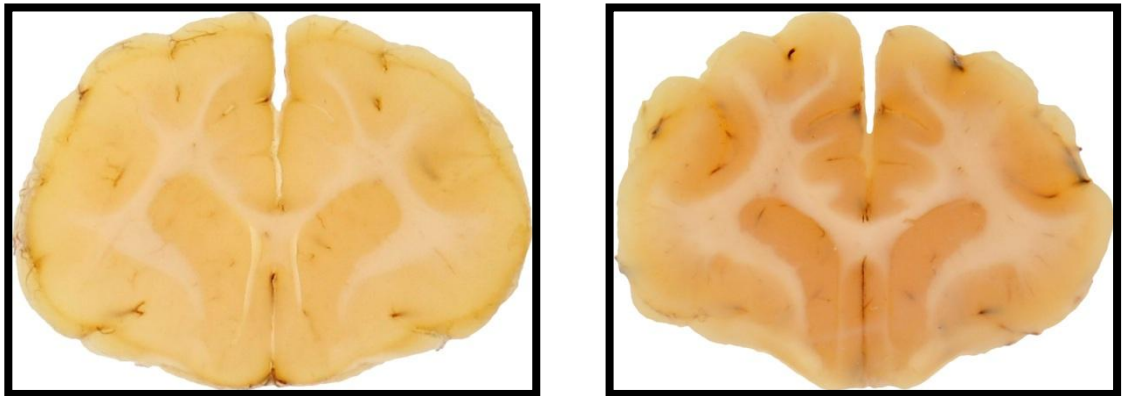


FIGURA 26. Encéfalos de felino, corte transversal. A, encéfalo de felino procesado con la técnica de plastinación P40. B, encéfalo de felino trabajado con la técnica de plastinación P40 más imidazole.

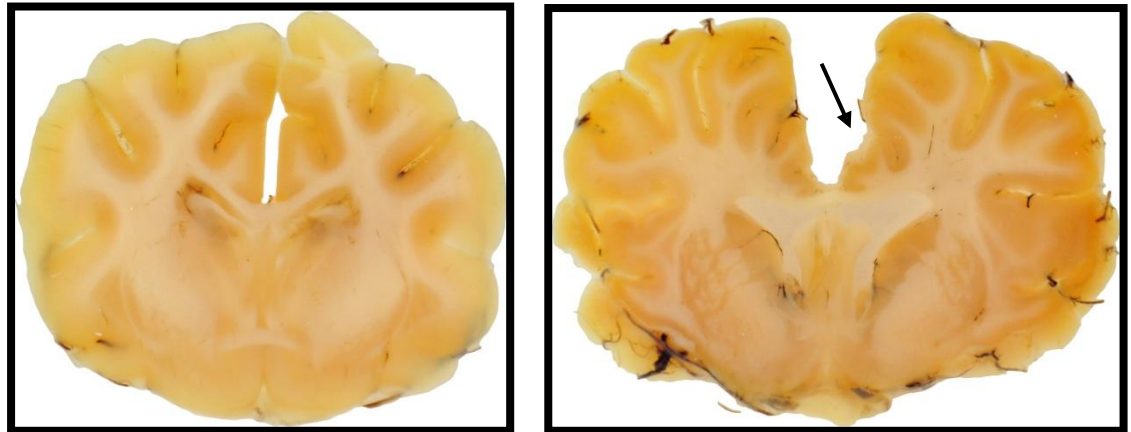


FIGURA 27. Encéfalos de porcino, corte transversal. A, encéfalo de porcino procesado con la técnica de plastinación P40. B, encéfalo de porcino procesado con la técnica de plastinación P40 más imidazole. Daño generado por el embolo oculto (flecha).

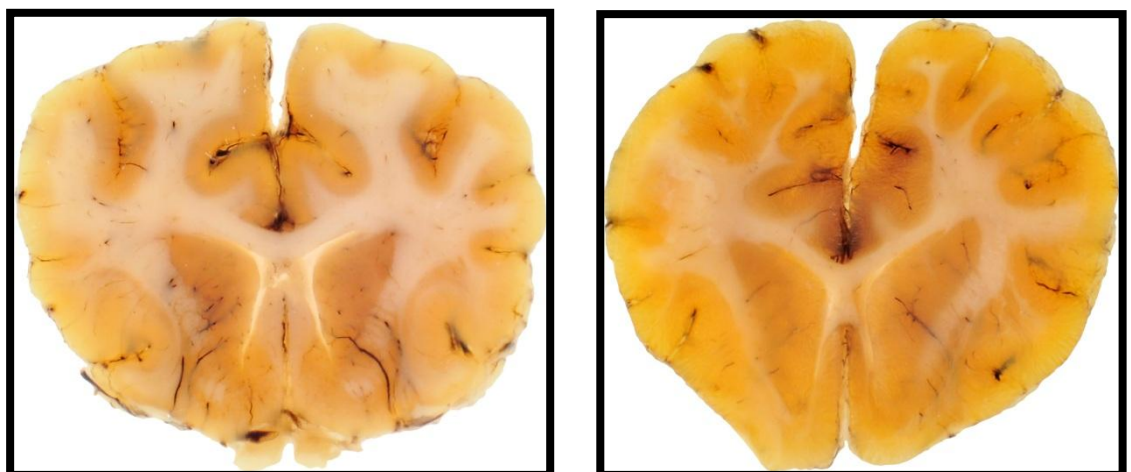


FIGURA 28. Encéfalos de canino, corte transversal. A, encéfalo de canino procesado con la técnica de plastinación P40. B, encéfalo de canino procesado con la técnica de plastinación P40 más imidazole.

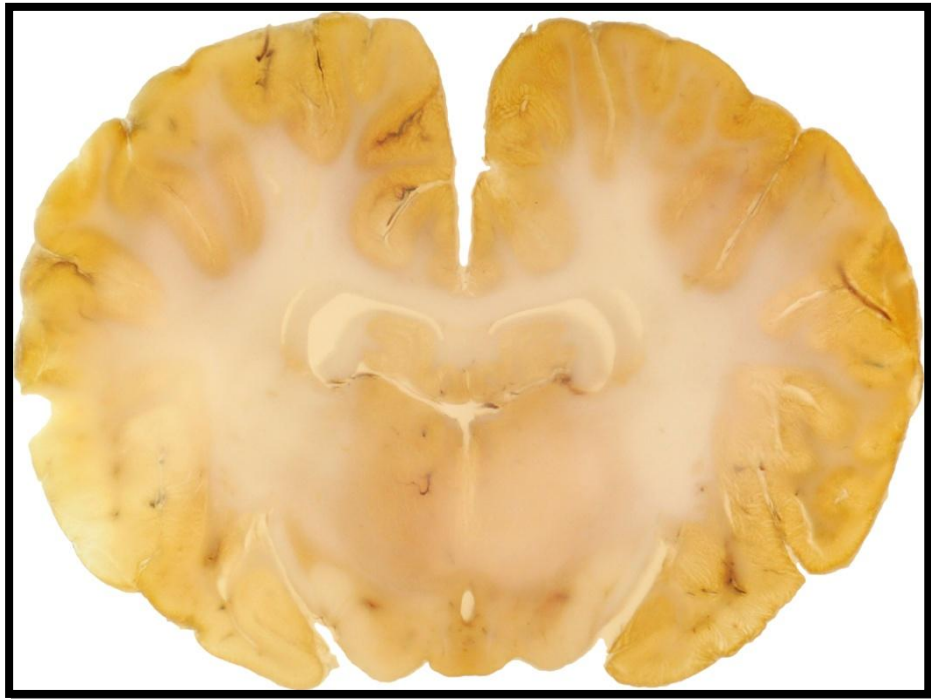


FIGURA 29. Encéfalo de bovino, corte transversal. Procesado con la técnica de plastinación P40.

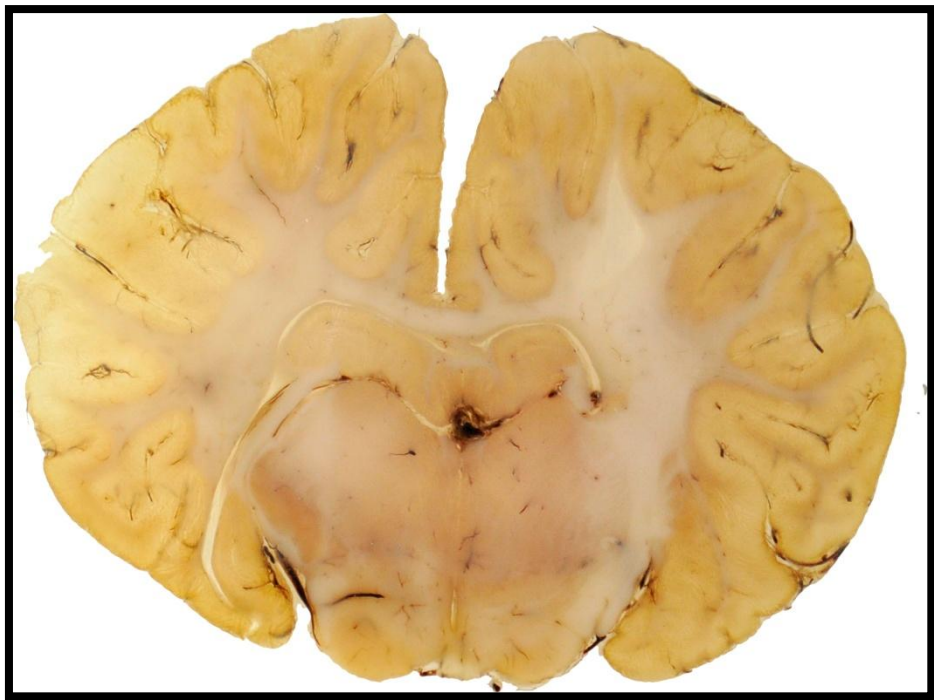


FIGURA 30. Encéfalos de bovino, corte transversal. Procesado con la técnica de plastinación P40 más imidazole.



FIGURA 31. Encéfalos de equino, corte transversal. Procesado con la técnica de plastinación P40.

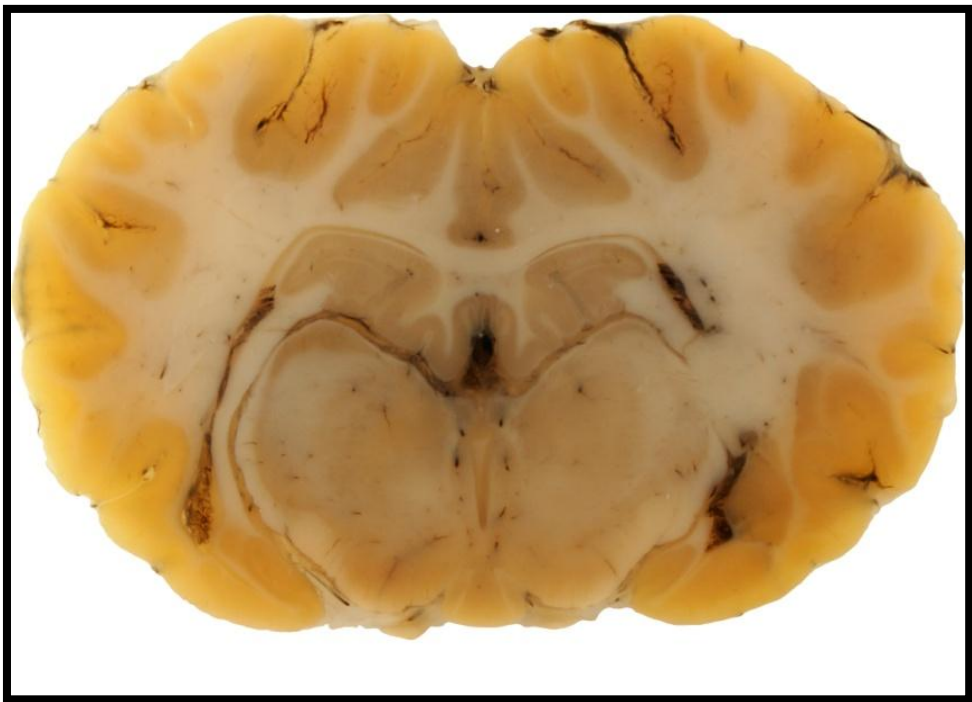


FIGURA 32. Encéfalos de equino, corte transversal. Procesado con la técnica de plastinación P40 más imidazole.

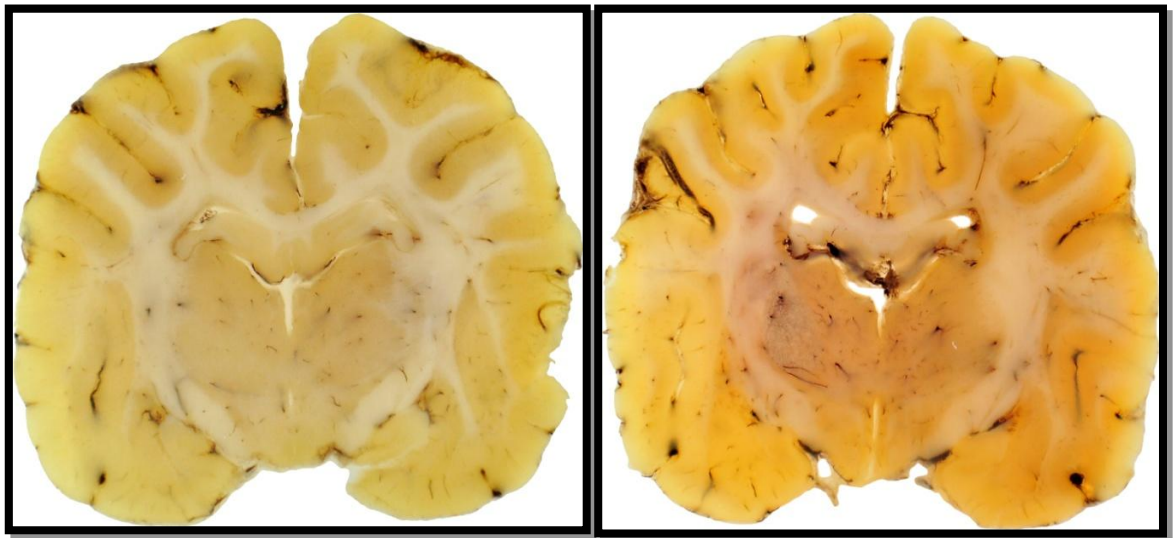


FIGURA 33. Encéfalos de caprino, corte transversal. A, Encéfalo de caprino procesado con la técnica de plastinación P40. B, encéfalo de caprino procesado con la técnica de plastinación P40 más imidazole.

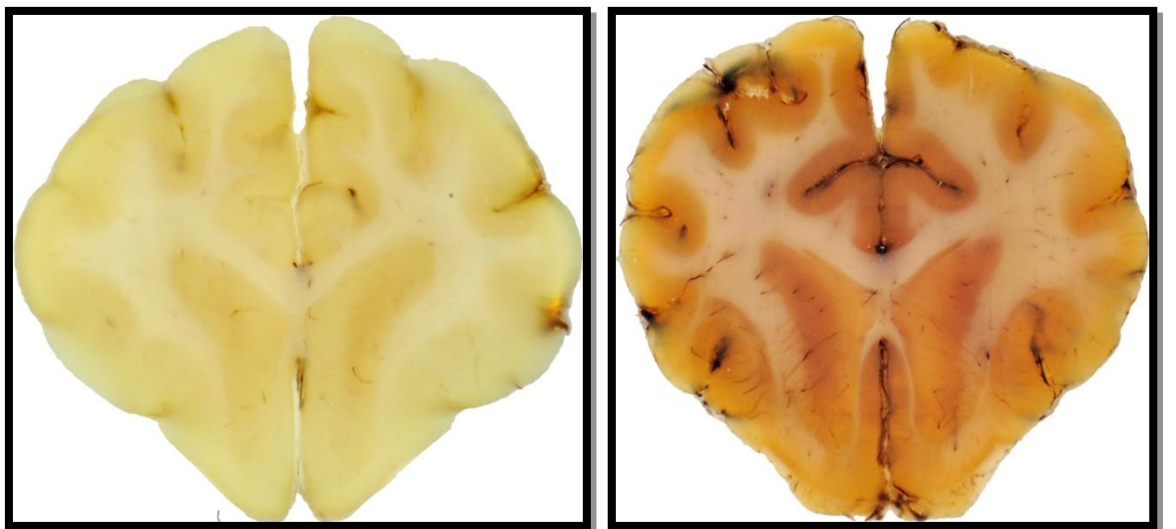


FIGURA 34. Encéfalos de ovino, corte transversal. A, Encéfalo de ovino procesado con la técnica de plastinación P40. B, encéfalo de ovino procesado con la técnica de plastinación P40 más imidazole.

10.4 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS SECCIONES TRANSVERSALES EN ENCÉFALOS DE ANIMALES DOMÉSTICOS

Una vez analizados los valores obtenidos de los encéfalos se observó que los cortes transversales tratados con imidazole no presentaron diferencias estadísticas. Al analizar el modelo los valores no presentaron una distribución normal y los residuales presentaban heterocedasticidad y aunque se aplicaron algunas transformaciones para alcanzar la homogeneidad de varianzas nunca se logró obtenerla, por lo que se decidió hacer una prueba exacta de Kruskal Wallis para comparar el efecto del imidazole y su relación en la forma de morir y la prueba resultó no significativa ($P > 0.05$) (Anexo 3).

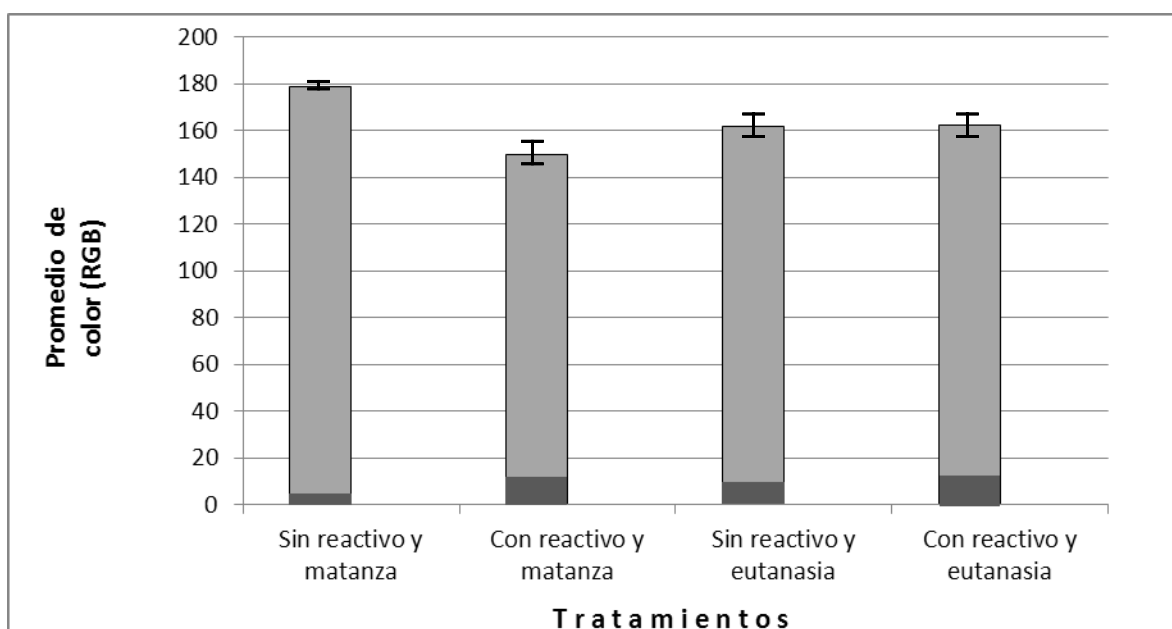


Figura 35. Promedio del color en el patrón RGB en las secciones transversales de encéfalo y sus diferentes tratamiento. Los valores se expresan como promedio \pm EE. No se encontró diferencia significativa entre los grupos ($P > 0.05$).

11. DISCUSIÓN

En este trabajo se emplearon dos técnicas de plastinación (S10 y P40) utilizando imidazole para la reactivación del color natural en las piezas anatómicas, obteniendo resultados satisfactorios en el procedimiento experimental donde se trabajó con la técnica de S10 con imidazole, por lo que consideramos que para esta técnica es una buena alternativa para mejorar la apariencia y la observación de los especímenes.

Observamos que en el análisis de color de las cabezas que presentaban la lesión provocada por el método de matanza tratadas con S10 más imidazol, presentaron una diferencia estadística significativa comparadas con las cabezas de especies con eutanasia (métodos químicos) tratadas con S10 más imidazol. En estas últimas se pudo notar que la ausencia parcial de eritrocitos en los tejidos impidió que el imidazol formara complejos de hemocromógenos con la hemoglobina y mioglobina presentes en los tejidos, dando como resultado ausencia del color rojo natural, lo cual, coincide con lo citado por Romhanyi, (1956). Este autor diseñó una técnica para la recuperación del color en especímenes preservados para su exposición en museos. La reacción hemocromógena de la técnica es causada por una solución acuosa con piridina, nicotina, hidrosulfuro de sodio y formalina, por lo tanto la fijación y adhesión de los colores sucedía al mismo tiempo y en la misma solución. La viveza de los colores, dependía de la concentración de piridina y nicotina, mostrando un rojo brillante y un rojo saturado respectivamente. Finalmente observó que la intensidad de color de los órganos dependía considerablemente del contenido de sangre presente en los tejidos.

Se pudo apreciar que las cabezas plastinadas con las técnicas S10 y S10 más imidazol conservaron sus características tanto anatómicas como de la lesión provocada por el método de matanza, lo cual concuerda con los trabajos llevados a cabo por Sakamoto *et al.*, (2006), en donde se realizaron dos modificaciones a la técnica de plastinación, la primera utilizando silicones

sustitutos y la segunda agregando el imidazol en la fase de impregnación. Sakamoto observó que el uso del imidazol en la técnica de plastinación además de ser un agente restaurador del color de los órganos, también les confiere propiedades importantes como la flexibilidad y una disminución del 2 al 5 % del encogimiento. En nuestro estudio se notó que el tejido nervioso en contacto con el gas S6, una semana posterior a la impregnación, ayudó a una disminución en la reducción de la masa encefálica, aunque no se realizaron mediciones ya que los encéfalos se mantuvieron dentro de la bóveda craneana.

Sandhyamani (2005) desarrolló una modificación de la técnica de Romhanyi utilizando un medio que contenía citrato-fosfato-dextrosa (CPD) y glicerina. Los resultados obtenidos a la modificación de la técnica fueron satisfactorios, los especímenes se mantuvieron estables con un color rojo natural por más de 18 años, demostrando la formación de complejos de color rojo entre nicotina, piridina, hemoglobina y mioglobina.

En un estudio previo (Méndez, 2008) utilizó el imidazole como agente restaurador del color en una proporción de 100:0.05, sin embargo, los especímenes fueron tratados con dos procesos de impregnación: la primera se basó en una mezcla tradicional de S10/S3, a una temperatura de -20°C con una presión de 5 mm Hg, con una duración de cuatro semanas, posteriormente los especímenes fueron inmersos en una segunda mezcla que contenía S10/S3 más imidazole, con las mismas condiciones de temperatura y presión, con una duración de dos semanas. En este estudio previo, el proceso de impregnación tardó alrededor de 6 semanas, mientras que nuestro experimento tuvo una duración de dos a tres semanas en el proceso de impregnación.

En el estudio de Méndez (2008), una de sus desventajas más evidentes, fue el que se hayan lavado los especímenes antes de la fijación, lo que provocó que el excedente de sangre con el cual reaccionaría el imidazole fueran eventualmente retirados, provocando una reactivación de color de baja intensidad. Otra diferencia fue haber utilizado dos fases de impregnación, lo que nos hace suponer que en la primera fase, los especímenes se impregnaron

completamente, restando la efectividad de la segunda fase de impregnación con el imidazole. En nuestro trabajo, los lavados se hicieron posteriormente a la fijación, lo que ayudó a que el imidazole reaccionara con una mayor cantidad de sustrato durante la fase de impregnación. Aunado a esto, también se adicionó imidazole en la fase de deshidratación en la técnica del P40, obteniendo una reactivación temprana del color de la sangre, sin embargo la escasa cantidad de sangre presente en el tejido nervioso limitó la actividad del imidazole en la reactivación de color. Si bien, el imidazole tiñe selectivamente las zonas que tienen mayor cantidad de sangre, como sucedió con los órganos parenquimatosos, el tejido nervioso resulta ser uno de los más difíciles para llevar a cabo este proceso debido a su histoarquitectura (Geneser, 2000).

En el análisis de color entre los encéfalos plastinados con P40 y P40 más imidazol no se encontraron diferencias estadísticas significativas. Sin embargo en el presente trabajo los encéfalos tratados con la técnica de P40 agregando el imidazol en la fase de deshidratación, conservaron sus características tanto anatómicas como la lesión provocada por el método de matanza, lo que concuerda con los diferentes autores que han plastinado tejido nervioso con la técnica de P40. Henry y Latorre (2007), enfatizan que el método de cortes de encéfalo se ha convertido en un estándar para la conservación de los tejidos biológicos y la técnica del P40 está desarrollada como un método menos complejo para la preservación de secciones encefálicas (von Hagens, 1994), esta técnica permite básicamente producir cortes translúcidos y/o diáfanos de encéfalo, que muestran una anatomía seccional, real y excelente para la enseñanza práctica especialmente cuando se hace el comparativo con imágenes modernas de diagnóstico, como son la tomografía computarizada, la resonancia magnética y ecografía, sin embargo con el paso del tiempo se tornan amarillas y llega a perder el límite entre la sustancia blanca y la sustancia gris. Otros autores han tratado de optimizar la técnica y de justificar el empleo del P40. Sora *et al.*, (1999) trabajó con un encéfalo humano utilizando diferentes condiciones de temperatura en la impregnación, obteniendo como resultado una disminución en la reducción del espécimen al momento del curado. Latorre *et al.*, (2004), ejecutaron un protocolo para el uso

de P40 en la elaboración de rebanadas de las diferentes regiones del cuerpo y las compararon con el método E12. En su trabajo realizaron cortes transversales en un cadáver de gato para posteriormente procesarlas y encontraron otras ventajas adicionales del P40 sobre otros tejidos, observaron que las rebanadas resultantes se tornaban semi-transparentes, mientras que con el método E12 se tornan amarillas, el método resultaba ser rápido ya que el tiempo de impregnación es relativamente corto. Las secciones del cuerpo plastinadas con P40 mostraban excelentes detalles anatómicos en todos los tejidos, además de ser excelentes herramientas para la enseñanza de la medicina.

Al no existir antecedentes previos del uso del imidazole con el P40, en el presente estudio se hicieron pruebas previas donde se adicionó el imidazol junto con el poliéster, dando como resultado la presencia de manchas de color blanco, disminuyendo a la observación las características anatómicas del espécimen, por tal motivo se decidió aplicar el imidazol en el primer baño de acetona. Dadas las características del P40 este al catalizar siempre debe tornarse diáfano (Latorre *et al.*, 2004), sin embargo algunos residuos del imidazol o pequeños precipitados del P40 pueden estar presentes al momento del catalizado generando turbidez en la periferia de la muestra, para lo cual se recomienda el filtrado tanto del P40 como de todas las soluciones empleadas durante la técnica, además de la limpieza constante de la cámara de impregnación. Sumado a todo esto, se recomienda realizar los cortes con previo enfriamiento e inclusión del encéfalo en silicón de caucho, con la finalidad de obtener cortes más uniformes.

El motivo por el cual se decidió trabajar en estos modelos fue, principalmente, lograr una preservación del daño generado por el émbolo oculto sobre la corteza cerebral al momento de la matanza en animales para abasto, logrando así la obtención de especímenes secos, sin olor, no tóxicos (Roda *et al.*, 2006), de manipulación y almacenamiento que no requieren del uso de equipo de bioseguridad (Von Hagens ,1987).

La plastinación proporciona especímenes adicionales para complementar los cursos habituales de disección, en países de Europa, todos los planes de estudios de las áreas médicas comprenden cursos de disección de cadáveres en la licenciatura y posgrado. Las técnicas de plastinación más empleadas son los métodos S-10 y P-40, debido a que ambas técnicas son complementarias, ya que cada una muestra diferentes perspectivas de la anatomía y el tipo de técnica se rige por el tipo de tejido o estructura a mostrar (Riederer, 2013).

El método S10 es ideal para muestras previamente diseccionadas y segmentos grandes del cuerpo. Estas piezas se convierten en especímenes rígidos y resistentes que se emplean en la práctica clínica, en la capacitación de estudiantes en abordajes endoscópicos (Musumeci *et al.*, 2003), otros autores (Resch y Perneczky, 1992) han sugerido que la intervención de los modelos plastinados en la enseñanza de la neuroanatomía han optimizado en los estudiantes de medicina el abordaje quirúrgico y la neuroendoscopia. (Dawson *et al.*, 1990), así como en la formación de cirujanos para demostrar los puntos críticos de la inervación, como son los puntos de compresión, entrapamientos de nervios y cómo evitar el dolor postoperatorio (Spinosa y Riederer, 2007; Riederer y Spinosa, 2011).

Otras ventajas sobre la técnica de S-10, son las mencionadas por Stuart y Henry (2002), describen como los especímenes plastinados mejoraron la calidad conceptual en los laboratorios de biología de la UNCA (University of North Carolina Asheville). Se presentó un aumento en el número de estudiantes que se oponían a las disecciones tradicionales basados en dos aspectos negativos, en primer lugar, algunos estudiantes rechazaban el olor y la naturaleza de los especímenes frescos dentro del laboratorio de biología y en consecuencia una menor motivación intelectual. El segundo punto se basó en la comprensión inconclusa de algunos estudiantes acerca de las diferentes corrientes filosóficas sobre los derechos de los animales relacionados con el bienestar animal. Sin embargo es inminente considerar que existe una disminución de la fauna silvestre, por lo tanto, el grupo de académicos tuvo que

eliminar los modelos típicos de disección relacionados con especies amenazadas. La solución a esta serie de problemas fue simplemente reorientar los objetivos de la disección en los cursos de iniciación. Si bien, hoy en día la tendencia actual en las ramas de la biología está orientada tanto a la biología celular y molecular, es de suma importancia que los alumnos comprendan por medio de la disección cómo están relacionados los órganos de manera tridimensional y cómo funcionan cada uno de estos. Existen diferentes razones académicas para el uso de la disección como una herramienta de enseñanza y que en la actualidad no es menos válida como ocurría hace 50 o 100 años. La introducción de especímenes plastinados se basó prácticamente en minimizar los aspectos negativos de la disección y del manejo de muestras biológicas que generan fluidos y malos olores, sin embargo en los cursos avanzados se sigue utilizando la disección, únicamente para desarrollar y construir los conceptos básicos. El resultado final de la utilización de especímenes plastinados en el laboratorio de biología tuvo muchas ventajas, entre las que se destaca un aumento en el índice de aprovechamiento académico, ya que al eliminar gran parte de la percepción desagradable, es decir, sin la incomodidad del olfato y el tacto viscoso de especímenes frescos, los estudiantes no son tan propensos a los distractores, se encuentran dispuestos a las discusiones de la diversidad y la función biológica, además de ser capaces de reconocer a una administración responsable con los recursos naturales, ya que al plastinar especies silvestres en serio declive, no será necesario la obtención desmedida de poblaciones en peligro de extinción (Stuart y Henry, 2002).

Si bien, en todo este tiempo las técnicas de plastinación se han fortalecido y se les asocia cada vez más en los campos de la investigación dentro de las instituciones educativas, muchos autores proponen modificaciones y nuevas aplicaciones a las técnicas. Marks *et al.*, (2008) diseñaron un protocolo para obtener imágenes tridimensionales a partir de especímenes plastinados, los cuales fueron escaneados con tomografía de coherencia óptica (TCO), tomografía óptica difusa (TOD) y microscopía ultraestructural (Two-photon laser scanning fluorescence microscopy), evidenciando así, otras aplicaciones a las

técnicas de plastinación. Marks y su grupo de colaboradores (2008) reconocen a las técnicas de plastinación como un método que conserva la estructura tridimensional y se compara su relación entre las técnicas histológicas. Las muestras biológicas tratadas con métodos histológicos se utilizan en gran medida a la investigación de estructuras en dos dimensiones debido a la sección requerida para producir muestras ópticamente delgadas para la microscopía convencional. Cabe mencionar, que la histología es una herramienta indispensable para la comprensión de la anatomía microscópica y la patología de los tejidos. La diversidad de los diferentes métodos de fijación, cortes y tinciones utilizados en la preparación histológica la convierten en una herramienta de investigación biomédica, sin embargo ante la inminente aparición de la tecnología para obtener imágenes tridimensionales, se necesitan métodos de preparación de tejido que interrumpen mínimamente la estructura tridimensional. Los modelos plastinados parecen ser una alternativa y se requiere, probar y comparar su rendimiento ante los instrumentos ópticos. Marks *et al.*, detallan los procedimientos de plastinación para impregnar los tejidos con polímeros como la silicona y la resina epoxi. La impregnación con resina epoxi también se utiliza en la microscopía ultraestructural para preservar los detalles de los tejidos. La Plastinación con resina epoxi Biodur E12/E6, produce especímenes muy transparentes y rígidos. La transparencia es una ventaja para el análisis microscópico y la rigidez ayuda a estabilizar la microestructura. Los especímenes impregnados con silicona tienen una textura gomosa y apariencia opaca, y para los propósitos del investigador, la turbidez presentada por el Biodur S10 hace que no sea adecuado para el método TCO y decide utilizar un silicón sustituto (Sylgard 184 polidimetilsiloxano) (Marks *et al.*, 2008).

El método P40 es excelente en la preparación de cortes finos de tejido nervioso, lo que permite la visualización de estructuras profundas que son fáciles de identificar dependiendo el tipo de corte y el nivel al que se realiza. El tejido cerebral plastinado con P40 se emplea en la enseñanza de la neuroanatomía ya que las estructuras anatómicas profundas se destacan

mucho mejor (Weiglein, 1997). Durante el curado del P-40 el tejido cerebral se vuelve rígido, por lo tanto, las estructuras profundas necesitan ser previamente seccionadas. La visualización de la sustancia gris y sustancia blanca se puede mejorar mediante el uso de métodos de tinción, tales como el azul de Prusia (Thompsett, 1955) que se pueden combinar con la plastinación (Suriyaprapadilok y Withyachumnarnkul, 1997).

Dentro de las desventajas que se presentan con la técnica de plastinación S10 más imidazol, es que, estos sufren cambios oxidativos en la superficie que se manifiestan por el cambio de color de rojo brillante a café oscuro por contacto directo con el oxígeno de la atmósfera (Sakamoto, 2006). En el presente trabajo esta desventaja fue observada en la superficie de los cortes longitudinales de las cabezas conservados con el S10 más imidazole, pero no así en los encéfalos ya que el P40 al catalizar aísla completamente al espécimen del oxígeno atmosférico.

A pesar de esta desventaja, el uso de imidazol es una posibilidad para reactivar y preservar el color rojo natural en los órganos comparados con los pigmentos de BIODUR: Rojo AC10, Pastas Colorantes AC50, AC52, AC55 y la tinción Stain. La tinción Rojo AC10 tiñe superficialmente a las muestras de color rosa pastel durante la fijación y la deshidratación (Biodur, 2006), las pastas colorantes se usan después del curado del S10, usando una mezcla de silicón, pasta colorante (2%) y el adhesivo AS70 (Biodur, 2006). La tinción, se adiciona con la técnica de plastinación S10 y tiñe de color rosa la superficie de los órganos; sin embargo, al realizar un corte profundo en estos, el interior está completamente pálido (Henry, *et al.*, 1997). El imidazole tiñe selectivamente las zonas que tienen mayor cantidad de sangre, lo que sucede normalmente con los órganos parenquimatosos, los cuales contienen más sangre y se tiñen más oscuros.

Dentro de las desventajas que se presentan con la técnica de plastinación P40, es que el polímero es sensible a la luz y a la temperatura del medio ambiente,

por lo que es necesario mantener el P40 en refrigeración y en un cuarto oscuro. La presencia de manchas de color naranja sobre el tejido nervioso es otra desventaja que causan un detrimento a la observación de las características anatómicas y/o patológicas del espécimen (Henry, 1998). En el presente trabajo se observaron dichas manchas naranjas en algunos cortes de encéfalo. La exposición directa del poliéster al oxígeno atmosférico en una cámara de impregnación no sellada se evita el curado, retrasando así el procedimiento y provocando curados parciales (Latorre *et al.*, 2004). El tejido nervioso resulta ser uno de los más difíciles para llevar a cabo el proceso de reactivación del color debido a su histoarquitectura, por lo que se requiere la búsqueda de un colorante que pueda mantener sus estructuras visibles y que no afecte la capacidad del P40. Se recomienda no lavar en exceso al tejido nervioso, para que la sangre presente reacción con el imidazole, ya que tiñe selectivamente las zonas que tienen mayor cantidad de sangre.

En este trabajo se tomaron en cuenta todas las consideraciones técnicas necesarias para obtener una reactivación de color durante todo el procedimiento de plastinación, sin embargo es importante considerar los factores extrínsecos para obtener un color óptimo en los productos cárnicos que señala la American Meat Science Association (AMSA 2012). El color de los alimentos cárnicos gira en torno a la mioglobina, que es el pigmento rojo primario en la carne y la hemoglobina, pigmento propio de la sangre. El color percibido se ve afectado por muchos factores tales como la especie, la genética de los animales, la base nutricional, los cambios *postmortem* en el músculo (en particular la dinámica del pH y la disminución de la temperatura), transportación prolongada, enfermedades, actividad bacteriana y todo aquello que afecte desnaturalizando a las proteínas responsables del color, además de considerar la fisiología intramuscular y el tiempo de almacenamiento antes de ser procesada. Esto nos indica que aunado a los procedimientos técnicos para reactivar el color, la especie, la raza, la dieta y los cambios *postmortem* son factores que en el futuro se deben considerar para obtener una mejor coloración en los órganos y tejidos preservados. Otro factor importante parece

ser la edad del animal, como lo menciona Rivera *et al.*, (2009), el cual realizó un análisis multivariado aplicado a los tiempos de deshidratación en especímenes procesados con S-10. Sus resultados mostraron que los tiempos de deshidratación se ven fuertemente influenciados por la edad del animal pero no por la posición (lado izquierdo, lado derecho) ni por el peso del órgano. Sin embargo no existe bibliografía suficiente relacionada con su efecto en la fijación o más aún con la reactivación de color en especímenes plastinados tanto con S10 como con P40, pese a todo esto no deja de ser un factor a considerar en la reactivación de color.

12. CONCLUSIÓN

Se concluye que la técnica de plastinación S10 mezclada con el imidazole en órganos con o sin lesiones es una buena alternativa que nos permite mejorar la apariencia natural y la observación de los especímenes, ya que las piezas tratadas de manera convencional con el S10, no presentaron contraste en su color y apariencia. Asimismo se logró determinar la cantidad y procedimientos técnicos para la aplicación del imidazole en las diferentes técnicas (S-10 y P-40) sin detrimento de su capacidad conservadora. Se logró observar el efecto de interacción entre los métodos de sacrificio y la presencia del imidazole, lo que nos indica que el efecto del imidazole está fuertemente influenciado por la presencia o ausencia de la lesión patológica, y que debido a esta interacción son variables que se deben estudiar de manera conjunta. Con los resultados obtenidos se logra un avance en la reactivación de color en especímenes fijados previamente con formalina y tratados con las técnicas de plastinación. Se considera necesario continuar con el estudio del P40 mezclado con imidazole, observando el efecto en diferentes órganos y tejido con distintas concentraciones.

13. LITERATURA CITADA

1. Pashaei S. A brief review on the history, methods and applications of plastination. *Int. J. Morphol.* 2010; 28:1075-1079.
2. Bickley HC, von Hagens G, Townsend FM. An improved method for preservation of teaching specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 1981; 105:674- 6.
3. von Hagens G, Tiedemann K, Kriz W. The Current Potential of Plastination. *Anat Embryol.* 1987; 175:411-421.
4. Dawson TP, James RS, Williams GT. How do we teach Pathology? Silicone plastinated pathology specimens and their teaching potential. *J Pathol.* 1990; 162:265-72.
5. Sandhyamani S, Sindhu JK, Sriramachari S. Recolorization of museum specimens: a modification of Romhanyi's technique based on pyridine/nicotine hemochromogen reactions. *Virchows Arch.* 2005; 447: 94–98.
6. Méndez BA, Romero RL, Trigo FJ, Henry RB, Candanosa AE. Evaluation of Imidazol for Color Reactivation of Pathological Specimens of Domestic Animals. *J Inte Soc Plastination.* 2008; 23:17-24.
7. Soorthi BR, Vidya MB. Plastination: a novel, innovate teaching adjunct in oral pathology. *Journal oral maxillofacial path.* 2011; 15: 133-137.
8. Latorre RM, García-Sanz MP, Moreno M, Hernández F, Gil F, López O, Ayala MD, Ramírez G, Vázquez JM, Arencibia A, Henry RW. How Useful Is Plastination in Learning Anatomy? *JVME.* 2007; 34:172-176.
9. Oostrom K. Fixation of Tissue for Plastination: General Principles. *J Int Soc Plastination.* 1987; 1: 3-11.
10. Moor S. Fluid Preservation; do we really understand it? A brief history of fluid preservation, some basic facts about it, including labels and inks. *NatSci Cons Group News-letter.* 2002; 19: 21-24.
11. Resch KDM, Perneczky A. The use of plastinated specimens in planning microsurgical approaches to the skull and brain base. *J Int Society for Plastination.* 1990; 4:12.

12. Tredwell E. Botanical Spirit Collections, Spirit Collection Manager, Royal Botanic Gardens Kew Herbarium. In: Papworth V, Editor, Natural Sciences Collection Association. NatSCA Biochemistry Seminar 9th November, 2006; 9: 2-3.
13. Payne LM, Leonard G, Harold W, Harold H. William Croone, F.R.S. (1633-1684). Notes Rec. R. Soc. 1960; 15: 211-219.
14. Fulton JF. The Honourable Robert Boyle, F.R.S. (1627-1692). Notes Rec. R. Soc. 1960; 15: 119-135.
15. Camarasa JM, Ibáñez N. Joan Salvador and James Petiver: the last years (1715–1718) of their scientific correspondence. Arch of nat hist. 2012; 39: 191-216.
16. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1985; 33:845-853.
17. Puchtler H, Meioan SN. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. Histochemistry. 1985. 82:201-204.
18. Pulvertaft RJV. Museum Techniques: A review. J clin Pathol. 1950; 3:1-23.
19. Proger LW, Chambers HW. Colour preservation in pathological museum. Ann R Coll Surg England. 1963; 33: 245–248.
20. Romhányi G. Einfaches Verfahren zur Konservierung in natürlichen Farben. Virchows Archiv. Bd 328. 1956; 573-575.
21. Sakamoto Y, Miyake Y, Hirokawa M, Yamashita K. Gross pathology specimens-A new method for plastination (Japanese). Japanese Society of Pathology Technology. 1995; 51; 15-16.
22. Sakamoto Y, Miyake Y, Kanahara K, Kajita H, Ueki H. Chemically reactivated plastination with Shin-Etsu Silicone KE-108. J Int Soc Plastination. 2006; 21: 11-16.
23. Miyake Y, Sakamoto Y, Hirokawa M, Yamashita K. Modified von Hagens' method using silicone KE108 (Japanese). Pathol and Clin Med. 1990; 8: 1439-1441.

24. von Hagens G. Impregnation of soft biological specimens with thermosetting resins and elastomers. *Anat Rec.* 1979; 192:247-255.
25. Bickley HC. A brief chronology of plastination. *J Int Soc Plastination.* 1997; 12: 37-38.
26. Roda MO, López SM, Roda MA, Ramírez OI. Plastination in the teaching of Neuroanatomy. *Eur Journal Anat.* 2006; 10: 85-89.
27. Grondin G. Plastination: a modern approach to chiropractic teaching. *J Can Chiropr Assoc.* 1998; 42: 107-112.
28. Bates AW. Dr Kahn's Museum: obscene anatomy in Victorian London. *J of the Royal Soc of Med.* 2006; 99:618-624.
29. Moore CM, Brown CM. Experiencing Body Worlds: Voyeurism, Education, or Enlightenment? *Journal Med Humanit.* 2007; 28:231-254.
30. Jones DG. Re-inventing Anatomy: The Impact of Plastination on How We See the Human Body. *Clin Anat.* 2002; 15: 436-440.
31. Jones GD, Whitaker MI. Engaging With Plastination and the Body Worlds Phenomenon: A Cultural and Intellectual Challenge for Anatomists. *Clin Anat.* 2009; 22:770-776.
32. Boyde A, Fraher JP, Morris JF; Moxham BJ, Bennett JP, Newell R, Soames RW, Dangerfield P. Dissections in display. *Independent.* 2002; 2.
33. von Hagens G. Heidelberg Plastination folder 1985. Collection of all Technical Leaflets for Plastination. Second English Edition-March 1986.
34. Resch KDM, Pernecky A. Use of plastinated crania in neuroendoscopy. *J Int Soc Plastination.* 1992; 6:15-16.
35. Ming GQ, Shao XZ: Three Dimensional computational reconstruction of lateral skull base with plastinated slices. *Anat Rec.* 2004; 437-442.
36. Henry WR, Janick L, Henry C. Specimen preparation for silica plastination. *J Int Soc Plastination.* 1997; 12: 13-17.
37. Cook P. Epoxy and Polyester Sheet Plastination. Ohrid, 8th Interim Conference on Plastination; 2005 July 5-11. Lake Ohrid, Macedonia. *J Int Soc Plastination;* 2005: 20; 33-42.

38. Weiglein A. Plastination of brain slices. *J Int Soc Plastination*. 1996; 11:34.
39. de Boer-van Huizen RT, Cornelissen CJ, tenDonkelaar HJ. Sheet plastination of the human head. *J Int Soc Plastination*. 1992; 6: 20-24.
40. Fruhstorfer BH, Palmer J, Brydges S, Abrahams PH. The use of plastinated dissections for teaching anatomy: the view of medical students on the value of this learning resource. *Clin Anat*. 2011; 24:246-52.
41. Clark RP, Formaldehyde in pathology departments. *J Clin Pathol* 1983; 36: 389-46.
42. Harkema JR. Comparative Pathology of the Nasal Mucosa in Laboratory Animals Exposed to Inhaled Irritants. *Environ Health Perspect*. 1990; 85: 231-238.
43. Crocker J, Burnet D. La ciencia del diagnóstico de laboratorio. McGRAW-HILL Interamericana editores. 2da ed. México. 2007:5-7.
44. Baker JR. Principles of biological microtechnique. A study of fixation and dyeing. Methuen and Company Ltd. Great Britain. 1958: 20-31.
45. Prophet BE, Mills B, Arrington BJ, Sobin, MD. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) Washington D. C. 1992:27-30.
46. Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th ed. Philadelphia USA, Churchill Livingstone. 2008.
47. Chaynes P, Mingotaud AF. Analysis of commercial plastination agents. *Surg Radiol Anat*. 2004; 26: 235–238.
48. Holladay SD, Blaylock BL, Smith B.J. Risk Factors Associated with Plastination. Chemical toxicity Considerations. *J Int Soc Plastination*. 2001; 16:9-13.
49. Méndez BA. Evaluación de diferentes métodos de conservación de órganos con lesiones de animales domésticos (Tesis de maestría). México, DF. Universidad Nacional Autónoma de México. 2008.

50. Barnett RJ, Burland G, Duxson M. Plastination of coronal slices of brain from cadavers using the P35 technique. *J Int Soc Plastination*. 2005; 20:16-19.
51. Weber W, Henry RW. Sheet plastination of the brain - P35 technique, filling method. *J Int Soc Plastination*. 1992; 6:29-33.
52. Henry RW. Polyester plastination technique: Specific troubles and problems. Abstracts 13th Int Conf Plast; July 2006 2-7; Vienna Austria. *J Int Soc Plastination*. 2006; 21: 31.
53. Hermes B: Plastination an additional tool to teach anatomy. *Int J Morphology*. 2006; 24: 475- 480.
54. Barnett RJ. Plastination of Coronal and Horizontal Brain Slices using the P40 Technique. *J Int Soc Plastination*. 1997; 12: 33-36.
55. Weiglein AH, Feigl G. Sheet plastination of brain slices according to the P35 and P40 procedures. *J Int Soc Plastination*. 1998; 13:30.
56. Weiglein AH, Henry RW, Lyons W. Sheet plastination of brain slices; p35 procedure. 6th International Conference on Plastination; 1999 July 11-16; Rochester, New York, U.S.A. *Journal of the International Society for Plastination*. 1999: 31-32.
57. Sora MC, Brugger P, Traxler H. P40 Plastination of Human Brain Slices: Comparison between different Immersion and Impregnation conditions. *J Int Soc Plastination*. 1999; 14: 22-24.
58. Latorre R, Henry RW. Polyester plastination of biological tissue: P40 technique for body slices. *J Int Soc Plastination*. 2007; 22:69-77.
59. Reed RB, Helms L. Rowe JA. Curing Times of P40 Exposed to Different Light Sources. *J Int Soc Plastination*. 2008; 28:25-29.
60. Aufdemorte TB, Bickley HC. Krauskopf DR, Townsend FM. An epoxy and silicone impregnation technique for the preservation of oral pathology teaching specimens. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*. 1985; 59: 74-76.
61. Diz, A, Miró F, Rodríguez MV, Rivero JLL, Galisteo AM, Conde-Pérez AJ. La plastificación como técnica de conservación del material anatómico. *An Vet Murcia*. 1994; 9: 49-56.

62. Weiglein A, Henry RW. Curing (hardening, polymerization) of the polymer-Biodur S10. *J Int Soc Plastination*. 1993; 7:32-35.
63. Weber W, Henry RW. Sheet plastination of body slices - E12 technique, filling method. *J Int Soc Plastination*. 1993; 7:16-22.
64. Mehra S, Choudhary R, Tuli A. Dry preservation of cadaveric hearts: An innovative trial. *J Int Soc Plastination* 2003; 18:34-6.
65. Alexanderson R, Hedenstierna G, Kolmodin Hedman, B. Exposure to Formaldehyde. Effects on pulmonary function. *Arch Environ Hith*. 1982; 37: 279-284.
66. Bardana EJ, Montaro, A. Formaldehyde asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1986; 77: 384-385.
67. Berk J. Cytologic Examination of the nasal Mucosa in formaldehyde exposed Workers. *Occup Med*. 1987; 29: 681-684.
68. Pabst R. Exposure to formaldehyde in Anatomy: an Occupational Health Hazard? *Anat Rec*. 1987; 219:109- 112.
69. Yamato H, Nakashima T, Kikuta A, Kunugita N, Arashidani K, Nagafuchi Y, Tanaka I. A Novel Local Ventilation System to Reduce the Levels of Formaldehyde Exposure during a Gross Anatomy Dissection Course and its Evaluation Using Real-Time Monitoring. *J Occup Health*. 2005; 47: 450-453.
70. Aluja AS y Constantino, FC. Técnicas de necropsia en animales domésticos. 2da edición. México: Editorial El Manual Moderno, 2002: 45-47.
71. Sánchez GMG, Ducoing WAM, Méndez RI, Gutiérrez OC. El análisis de varianza multivariado para observaciones repetidas en un estudio sobre los niveles de selenio en ovinos. 2001: Monografías 10; 24. IIMAS, UNAM: 8-11.
72. Méndez I, Posadas A, Mundo E, Marín S. Análisis de experimentos; con observaciones repetidas. Un ejemplo farmacológico. 1994. Monografía 4; 13. IIMAS, UNAM. 1-6.
73. Ducoing AW. Introducción a la estadística. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México, 2009:66-80.

74. Geneser F. *Histología*. 3ra edición. México: Editorial Medica Panamericana, 2000:365-369.
75. Henry RW, Latorre R. Polyester plastination of biological tissue: P40 technique for brain slices. *J Int Soc Plastination*. 2007; 22:59-68.
76. Latorre R, Arencibia A, Gil F, Rivero M, Ramírez G, Vázquez-Autón JM, Henry RW. Sheet plastination with polyester: An alternative for all tissues. *J int Soc Plastination*. 2004: 19; 33-39.
77. Riederer BM. Plastination and its importance in teaching anatomy. Critical points for long-term preservation of human tissue. *J Anat*. 2013: 223; 1-7
78. Musumeci E, Lang F.J.W, Duvoisin B. Riederer B.M. Plastinated Ethmoidal Region: II. The Preparation and Use of Radio-opaque Artery Casts in Clinical Teaching. *J Int Soc Plastination*. 2003: 18; 29-33
79. Spinoso JP, Riederer BM. De l'importance de l'anatomie. *L'agenda Gynecol*. 2007: 49; 6-8.
80. Riederer BM, Spinoso J-P. Teaching clinical anatomy of the female pelvic floor to undergraduate students: a critical review of neuralgic points. 2011. *Anatomy*: 5; 1-6.
81. Weiglein AH. Plastination in the Neurosciences. *Acta Anat*. 1997: 158; 6-9.
82. Thompsett DH. Differential staining and mounting of human brain slices. *Med Biol Illustr*. 1955: 5; 29-34.
83. Henry RW. Update on polyester plastination (p40)! Where have all the "orange spots" gone? 9th International Conference on Plastination. 1998 July 5-10. Trois-Rivieres, Quebec, Canada. *J Int Soc Plastination*. 1998: 31.
84. Suriyapradilok L, Withyachumnarnkul B. Plastination of stained sections of the human brain: comparison between different staining methods. *J Int Soc Plastination*. 1997: 12; 27-32.
85. American Meat Science Association. *Meat Color Measurement Guidelines*. Illinois USA. AMSA, 2012.

86. Stuart MD, Henry RW. Plastinated Specimens Can Improve the Conceptual Quality of Biology Labs. *Am. Biol. Teach.* 2002; 64; 130-134.
87. Marks DL, Chaney EJ, Boppart SA. Plastinated tissue samples as three-dimensional models for optical instrument characterization. *NIH Public Access.* 2008; 29; 16: 16272–16283.
88. Rivera MC, Bonino F, Fioretti C, Galán M, Gigena S, Moine R, Mouguelar H, Natali J, Quinteros R. Análisis Multivariado Aplicado a la Etapa de Deshidratación en la Técnica de Plastinación del Riñón de Caballo. *Int. J. Morphol.* 2009; 27; 855-859.

ANEXO 1

Von Hagens G. Heidelberg Plastination folder 1985. Collection of all Technical Leaflets for Plastination. Second English Edition-March 1986.

PROCEDIMIENTOS DE FIJACIÓN

- INMERSIÓN

Término empleado para sumergir las piezas en una solución de formalina al 4 ó 5% recomendada para especímenes gruesos y para especímenes delgados se utiliza una solución de formalina al 1 o 2%. La inmersión está especialmente recomendada para muestras delgadas. Una temperatura de 1 a 5°C servirá para retrasar la putrefacción y no afecta la penetración del fijador.

- INFILTRACIÓN

Se define como una inyección directa del fijador sobre el tejido. No se utilizan los vasos sanguíneos. La infiltración es utilizada para las muestras que son demasiado gruesas para la inmersión. Es útil para los especímenes cuyo sistema vascular se ha dañado.

- DILATACIÓN

Este término representa la distensión de un órgano hueco mediante la aplicación del fijador bajo presión hidrostática. El fijador se difunde a través de las paredes del órgano, por lo tanto, la fijación del órgano será en su forma distendida.

ANEXO 2

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CABEZAS.

El único efecto significativo fue la interacción entre aplicación del reactivo y forma de morir. Se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Tukey para determinar a qué tratamientos se debía el efecto de interacción y los resultados fueron los siguientes:

Tratamiento* Forma de morir			Least Sq Mean	Std Error
0,0(sin reac y matanza)	A		170.51939	2.3930516
1,1(con reac y eutanasia)	A	B	167.65355	3.6292425
1,0(con reac y matanza)		B	159.80043	2.9632641
0,1(sin reac y eutanasia)		B	155.33550	3.0672697

Esto significa que se encontraron diferencias significativas por la presencia o ausencia de reactivo entre los que murieron por matanza. se encontraron diferencias entre la forma de morir entre los que no recibieron el reactivo

Response medida color

Summary of Fit

RSquare	0.864429
RSquare Adj	0.712495
Root Mean Square Error	7.418136
Mean of Response	164.0352
Observations (or Sum Wgts)	124

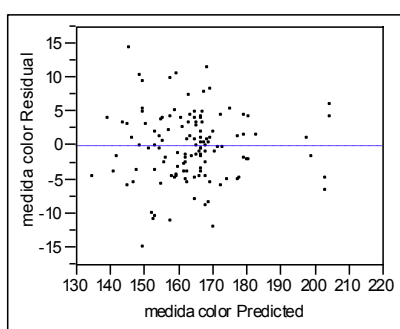
Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	65	20350.670	313.087	5.6895
Error	58	3191.667	55.029	Prob > F
C. Total	123	23542.338		<.0001

Tests wrt Random Effects

Source	SS	MS Num	DF Num	F Ratio	Prob > F
tx	18.1629	18.1629	1	0.0689	0.7938
forma morir	381.714	381.714	1	1.4490	0.2336
Vista	7.32185	7.32185	1	0.1331	0.7166
tx *forma morir	3769.56	3769.56	1	14.3096	0.0004
tx *vista	23.167	23.167	1	0.4210	0.5190
forma morir*vista	183.149	183.149	1	3.3282	0.0733
forma morir*vista*tx	2.48422	2.48422	1	0.0451	0.8325
cabeza[tx ,forma morir]&Random	15278.8	263.428	58	4.7871	<.0001

Residual by Predicted Plot



tx Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob > F
18.162898	0.0689	1	0.7938

Denominator MS Synthesis:

cabeza[tx ,forma morir]&Random

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean
0	162.92745	1.9451761	164.774
1	163.72699	2.3426660	162.942

forma morir

Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob > F
381.71388	1.4490	1	0.2336

Denominator MS Synthesis:

cabeza[tx ,forma morir]&Random

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean
0	165.15991	1.9044442	166.288
1	161.49453	2.3758969	160.468

vista

Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob > F
7.3218509	0.1331	1	0.7166

Denominator MS Synthesis:

Residual

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean
1	163.07340	0.98408065	163.990
2	163.58104	0.98408065	164.080

tx *forma morir

Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob > F
3769.5574	14.3096	1	0.0004

Denominator MS Synthesis:

cabeza[tx ,forma morir]&Random

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
0,0	170.51939	2.3930516
0,1	155.33550	3.0672697
1,0	159.80043	2.9632641
1,1	167.65355	3.6292425

LSMeans Differences Tukey HSD

Alpha=

0.050 Q=

2.64511LSMean[i] By LSMean[j]

Mean[i]-Mean[j]	0,0	0,1	1,0	1,1
Std Err Dif				
Lower CL Dif				
Upper CL Dif				
0,0	0	15.1839	10.719	2.86584
	0	3.89035	3.80889	4.34719
	0	4.89348	0.64403	-8.633
	0	25.4743	20.7939	14.3646
0,1	-15.184	0	-4.4649	-12.318
	3.89035	0	4.26487	4.75179
	-25.474	0	-15.746	-24.887
	-4.8935	0	6.8161	0.25097
1,0	-10.719	4.46493	0	-7.8531
	3.80889	4.26487	0	4.68533
	-20.794	-6.8161	0	-20.246
	-0.644	15.746	0	4.5401
1,1	-2.8658	12.3181	7.85312	0
	4.34719	4.75179	4.68533	0
	-14.365	-0.251	-4.5401	0
	8.63297	24.8871	20.2463	0

Level		Least Sq Mean
0,0	A	170.51939

1,1	A	B	167.65355
1,0		B	159.80043
0,1		B	155.33550

tx *vista

Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob > F
23.167025	0.4210	1	0.5190

Denominator MS Synthesis:

Residual

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
0,1	162.22212	1.2572966
0,2	163.63277	1.2572966
1,1	163.92467	1.5142207
1,2	163.52932	1.5142207

forma morir*vista

Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob > F
183.14931	3.3282	1	0.0733

Denominator MS Synthesis:

Residual

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
0,1	166.17556	1.2309688
0,2	164.14426	1.2309688
1,1	159.97123	1.5357001
1,2	163.01782	1.5357001

forma morir*vista*tx

Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob > F
2.4842218	0.0451	1	0.8325

Denominator MS Synthesis:

Residual

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error
0,1,0	171.23139	1.5467883
0,1,1	161.11973	1.9153545
0,2,0	169.80739	1.5467883
0,2,1	158.48113	1.9153545
1,1,0	153.21286	1.9825803
1,1,1	166.72960	2.3458206
1,2,0	157.45814	1.9825803
1,2,1	168.57750	2.3458206

cabeza[tx ,forma morir]&Random

Effect Test

Sum of Squares	F Ratio	DF	Prob > F
15278.825	4.7871	58	<.0001

Denominator MS Synthesis:

Residual

ANEXO 3

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS ENCÉFALOS

Las medias y errores estándar de la medida de color en cada uno de los cuatro tratamientos se presentan a continuación, pero como se mencionó en el párrafo anterior no se encontraron diferencias.

Tratamiento	Media	Error Estándar
Sin reactivo y matanza	178.86	2.66
Con reactivo y matanza	149.93	11.92
Sin reactivo y eutanasia	161.50	10.835
Con reactivo y eutanasia	162.33	14.67

Kruskal-Wallis Test

Tratxfor mor	N	Mean Rank
medicolor 1	5	10.50
2	5	5.10
3	2	6.50
4	2	7.00
Total	14	

Test Statistics^{a,b}

	medicolor
Chi-Square	4.370
df	3
Asymp. Sig.	.224
Exact Sig.	.236
Point Probability	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tratxformor