



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

Aplicación de sustancias fijadoras en tejidos humanos en
procesos histológicos

**Trabajo de Titulación para optar al título de Licenciado en
Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico**

Autores:

Guamán Valle Yuri Abigail
Aroca Espín Cristóbal Javier

Tutor:

MgS. Yisela Carolina Ramos Campi

Riobamba, Ecuador. 2024

DECLARATORIA DE AUTORÍA

Nosotros, **Yuri Abigail Guamán Valle**, con cédula de ciudadanía **1150778668** y **Cristóbal Javier Aroca Espín**, con cédula de ciudadanía **0250177813**, autores del trabajo de investigación titulado: **Aplicación de sustancias fijadoras en tejidos humanos para procesos histológicos**, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mi exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de nuestra entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 14 de febrero 2024



Yuri Abigail Guamán Valle

C.I:1150778668



Cristóbal Javier Aroca Espín

C.I: 0250177813

DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR

Quien suscribe, MSc. Yisela Ramos Campi catedrático adscrito a la Facultad Ciencias de la Salud, por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: Aplicación de sustancias fijadoras en tejidos humanos para procesos histológicos, bajo la autoría de Yuri Abigail Guamán Valle y Cristóbal Javier Aroca Espín; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación.

Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, a los 26 días del mes de septiembre del 2023



MSc. Yisela Ramos Campi

C.I: 1201790456

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

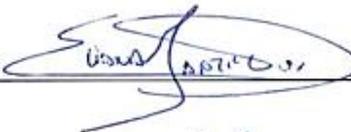
Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación. Aplicación de sustancias fijadoras en tejidos humanos para procesos histológicos, presentado por Yuri Abigail Guamán Valle, con cédula de identidad número 1150778668 y Cristóbal Javier Aroca Espín, con cédula de identidad número 0250177813, bajo la tutoría de MgS Yisela Carolina Ramos Campi; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba de 14 de febrero de 2024.

MSc. Ximena del Rocío Robalino Flores
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO



Mgs. Eliana Martínez Durán
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO





Dirección
Académica
VICERRECTORADO ACADÉMICO

CERTIFICACIÓN

Nosotros, **GUAMÁN VALLE YURI ABIGAIL** con CC: **1150778668** y **AROCA ESPÍN CRISTÓBAL JAVIER** con CC: **0250177813**, estudiante de la Carrera **LABORATORIO CLÍNICO** Facultad de **CIENCIAS DE LA SALUD**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado **"APLICACIÓN DE SUSTANCIAS FIJADORAS EN TEJIDO HUMANO PARA PROCESOS HISTOLÓGICOS"**, cumple con el **9 %**, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **TURNITI** porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 02 de febrero de 2024

MgS. Yisela Carolina Ramos Campi
TUTORA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo especialmente a Dios, por haberme dado la sabiduría y permitirme llegar hasta esta fase tan importante y especial en mi vida como lo es mi formación profesional.

A mi madre, por ser mi pilar fundamental y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones, es la persona que me ha acompañado durante todo mi trayecto estudiantil.

A mi familia en general que, con sus consejos, apoyo me han ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida.

Yuri Abigail Guamán Valle

A Dios, porque su amor y su bondad no tienen fin por haberme permitido sonreír ante todos mis logros que son resultados de su ayuda con gran bendición.

Con todo cariño dedico este proyecto de investigación a mis padres Marco y Ligia por ser un pilar fundamental en mi vida.

A toda mi familia en general por siempre preocuparse por mí, por celebrar mis triunfos y ayudarme a corregir mis errores.

Cristóbal Javier Aroca Espín

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a la universidad Nacional de Chimborazo por haberme abierto las puertas y por confiar en mi conocimiento, por ser aquella Institución que me vio crecer durante la formación estudiantil. A los docentes, por sus palabras sabias, sus conocimientos rigurosos y precisos. A cada uno de ustedes les debo mis conocimientos. Gracias por su paciencia, dedicación, tolerancia y por sus maravillosos consejos que me ayudaron a cumplir mi sueño. A mi tutora MSc. Yisela Ramos Campi, por compartir sus conocimientos de manera profesional y guiarme en el transcurso de mi proyecto de investigación.

Yuri Abigail Guamán Valle

Expreso mis sinceros agradecimientos a todas las personas que contribuyeron a mi formación profesional.

A la Universidad Nacional de Chimborazo por su calidad académica, Autoridades, Personal Docente y Administrativo.

A la MSc. Yisela Ramos Campi, tutora y orientadora del proyecto de Investigación por su paciencia, conocimientos y profesionalidad demostrada.

Cristóbal Javier Aroca Espín

ÍNDICE GENERAL

DECLARATORIA DE AUTORÍA	
DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR	
CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL	
CERTIFICADO ANTIPLAGIO	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	
ÍNDICE DE TABLAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	18
Manejo de muestras de tejido humano.....	18
La fase pre analítica en Anatomía Patológica.....	19
Procesos de fijación en muestras tisulares.....	20
Sustancias fijadoras.....	23
Clasificación de los fijadores.....	24
Sustancias fijadoras con formol.....	30
Sustancias fijadoras sin formol.....	33
Fijadores alternativos.....	34
Fijadores naturales no tóxicos.....	35
Métodos de aplicación de los fijadores.....	35
Ventajas y desventajas.....	36
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	38
Enfoque de investigación.....	38
Según el nivel.....	38
Según el diseño.....	38
Según el cohorte.....	38
Según la cronología de los hechos.....	38

Técnicas de recolección de Datos	39
Población.....	39
Métodos de análisis, y procesamiento de datos.....	40
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Histología formol.....	46
Efectos de la fijación y almacenamiento de muestras de tejido humano	51
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
Conclusiones	54
Recomendaciones.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	62

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Clasificación de diferentes fijadores y detalles sobre sus propiedades.....	24
Ilustración 2. Componentes de KINFix	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Importancia del manejo adecuado de las sustancias fijadoras y de las piezas anatomopatológicas para procedimientos histológicos	43
Tabla 2. Ventajas de las sustancias fijadoras.....	46
Tabla 3. Desventajas de las sustancias fijadoras	47
Tabla 4. Uso correcto del tiempo de fijación.....	50
Tabla 5. Poder de penetración de los tejidos	51

RESUMEN

La fijación se ha constituido en un proceso fisicoquímico complejo que permite interrumpir la degradación que aparece como consecuencia de la muerte celular, tratando de conservar los componentes lo más parecido al organismo vivo. Se utiliza para la prevención de la autólisis y putrefacción de los tejidos. El objetivo del proyecto de investigación es valorar la aplicación de sustancias fijadoras en relación con los tejidos humanos en los procesos histológicos. El trabajo se llevó a cabo con un nivel descriptivo de diseño documental bibliográfico y no experimental. Con una población de 47 referencias bibliográficas en donde se escogió mediante criterios de inclusión y exclusión obteniendo una muestra de 27, tomado de diferentes fuentes bibliográficas como Pubmed, Scielo, Elsevier, Research Gate y Google académico publicados entre los 5 y 10 años. Los resultados obtenidos destacan que las muestras tisulares se deben poner en contacto inmediatamente con la sustancia fijadora según las características del tejido y por su fácil penetración y difusión. Dentro de las diferentes opciones que existe para el proceso de fijación, el Formol Bufferado Neutro al 10% ha demostrado favorables atributos para su utilización siendo así: económico, fungicida, germicida y desinfectante, así como conservante. Las ventajas son la calidad de preservación y fijación tisular, mientras que las desventajas son los efectos tóxicos por inhalación, ingestión, en contacto con la piel y cancerígenos a la exposición del formol. Por último, los tiempos varían según el tipo de tejido y deben ser adaptado a las necesidades de los estudios experimentales.

Palabras claves: fijación, formol, proceso histológico, tejidos humanos.

ABSTRACT

Fixation has been constituted in a complex physicochemical process that allows to interrupt the degradation that appears because of cell death, trying to preserve the components as like the living organism. It is used for the prevention of autolysis and tissue putrefaction. The objective of the research project is to assess the application of fixing substances in relation to human tissues in histological processes. The work was carried out with a descriptive level of bibliographic and non-experimental documentary design. With a population of 47 bibliographic references where it was chosen by inclusion and exclusion criteria obtaining a sample of 27, taken from different bibliographic sources such as PubMed, Scielo, Elsevier, Research Gate and Google academic published between 5 and 10 years. The results obtained highlight that tissue samples should be immediately put in contact with the fixing substance according to the characteristics of the tissue and its easy penetration and diffusion. Within the different options that exist for the fixation process, the 10% Neutral Buffered Formol has shown favorable attributes for its use being this way: Economic, fungicide, germicide, and disinfectant, as well as preservative. The advantages are the quality of preservation and tissue fixation, while the disadvantages are the toxic effects due to inhalation, ingestion, in contact with the skin and carcinogenic effects from exposure to formaldehyde. Finally, times vary depending on the type of tissue and must be adapted to the needs of experimental studies.

Keywords: fixation, formalin, histological process, human tissues.



Reviewed by:
Mgs. Maria Fernanda Ponce
ENGLISH PROFESSOR
C.C. 0603818188

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La fijación es un paso esencial para prevenir la autólisis y la degradación de los tejidos al mismo tiempo la morfología y los detalles celulares para evaluaciones microscópicas. También ayuda en la conservación de las proteínas, los carbohidratos y otros restos bioactivos en su relación con la célula, para que puedan ser estudiados. Durante décadas, el Formol Bufferado Neutro al 10% (4 % formaldehído), diluida en agua o en una solución tamponada, se ha considerado como fijador de elección en histopatología para preservar muestras de tejido durante largos períodos de tiempo a un costo razonable ¹.

A lo largo de la historia, se han estudiado diversas formas de mejorar la visualización tisular observada al microscopio como principal herramienta. Los avances tecnológicos incrementan el desarrollo del procesamiento de muestras, generando conceptos como los tipos de fijación y su aplicación por medio de las características vitales para el diagnóstico en los servicios hospitalarios ².

El proceso de fijar previene la pérdida de componentes celulares como proteínas, DNA, RNA y lípidos ². También, ocasionará alteraciones particulares en el tejido como el volumen que ve afectado, algunos fijadores causan edema y otros como el formol o el glutaraldehído provocan una contracción del tejido del 33% ³.

Los fijadores son de tipo simple y compuesto. Los simples están constituidos de una sustancia ya que coagulan y desnaturalizan proteínas al extraer agua de los tejidos y los compuestos cuando intervienen dos o más sustancias por lo que se enlazan moléculas del tejido mediante uniones químicas donde se encuentra el glutaraldehído y formaldehído⁴. También, encontramos fijadores por deshidratación tisular y fijadores que actúan por cambios en el estado coloidal de las proteínas.

Es necesario usar fijadores diferentes según el órgano para garantizar su compatibilidad con la estructura y características del tejido a fijar, deben cumplir condiciones para conservar la estructura y detalles de las piezas antes de enviarlas al laboratorio de anatomía patológica, evitando distorsiones y artefactos al mínimo. Para estudiar las actividades enzimáticas se debe utilizar un fijador que no cambie los centros activos. Si bien es posible que sea

necesario sacrificar parte de la morfología del tejido, la mayoría de los fijadores no conservan los lípidos ⁵. Para prevenir efectos indeseables es fundamental considerar el tipo y cantidad de fijador a utilizar, así como el tiempo y concentración según el origen de la muestra.

Por lo tanto, al estudiar la ultraestructura celular, se debe proteger los lípidos y las membranas celulares durante el procesamiento de inclusión en resinas, que involucra solventes orgánicos ⁵. Además, la mayoría no eliminan los carbohidratos, sino que estos se mantienen en el tejido al estar unidos a las proteínas.

El formaldehído es un gas incoloro, inflamable y soluble en agua, que se obtiene de la oxidación catalítica del metanol en fase de vapor, de gran utilidad en laboratorios de patología y se ha estandarizado globalmente para la fijación de las muestras. Se vende comercialmente como formaldehído al 40%, que incluye un 10% de metanol para retrasar la formación de polímeros pesados ⁵.

En España, Italia y Estados Unidos, se están sustituyendo el formaldehído por FINE-FIX debido a que conserva las muestras y se obtienen resultados excelentes en procesos histológicos sin perder las características del ADN/ARN y proteínas, lo que permite obtener un diagnóstico confiable ⁶.

Aunque existen una serie de alternativas que ya se han discutido y algunos laboratorios están buscando actualmente reemplazar el formaldehído con un reactivo menos tóxico, en Ecuador el Formol Bufferado Neutro al 10% sigue siendo el fijador de elección porque es asequible, accesible y tiene una característica bioquímica reductora para tejidos. previene la putrefacción de órganos y tejidos humanos, el shock osmótico y la autólisis provocada por la auto digestión enzimática.

A nivel micro no se han publicado escritos que describan los métodos que se utilizan para la fijación de tejidos en procedimientos histológicos, sin embargo hay laboratorios de anatomía patológica en los hospitales de la ciudad de Riobamba, debido a que cada fijador tiene un mecanismo de acción diferente según el tejido de que se trate, los profesionales de

la salud encargados de la obtención, transporte y procesamiento de muestras anatomopatológicas deben poseer los conocimientos necesarios para realizar la fijación.

Todos los tejidos, ya sea extraídos del organismo o cuando en el que se encuentra muere, hay que impedir los procesos autolíticos que pueden sufrir las células, manteniendo la integridad de la estructura morfológica de las células y tejidos sin que ocurra una modificación en ellos. Además, la fijación disminuye los cambios en los tejidos desde que se obtienen hasta que se observan, tanto en organización estructural como en composición química⁷

Por lo tanto, la fijación detiene la vida de las células y se debe proteger contra el ataque bacteriano, evitar la distorsión y retracción del tejido. Es como tomar una fotografía de un tejido vivo y observarlo al microscopio después del tratamiento lo que su acción garantiza la integridad de las células y tejidos⁷.

Para la elección de sustancias fijadoras dependen de las características y propiedades, así mismo del poder de penetración y difusión, es decir, si queremos estudiar la actividad enzimática, debemos utilizar mecanismos que no alteren sitio activo de las enzimas que nos interesan analizar y es posible que tengamos que sacrificar la morfología y estructura del tejido hasta cierto punto⁷.

¿Cuál es la utilidad de las sustancias fijadoras en los tejidos humanos en los procesos histológicos?

Este trabajo surge de la necesidad de proponer una alternativa segura para fijar tejidos en el laboratorio de histología, manteniendo su calidad, y asegurando la correcta realización de procedimientos. El objetivo es investigar sustancias igual o más efectivas que el formol y ejecutar procesos sin exposición a toxinas y sustancias cancerígenas como el formaldehído^{8,9}.

Además, se examinan los beneficios y desventajas de cada sustancia fijadora y también se vigilan las características físicas y químicas que distinguen la eficacia de un fijador de otro.

Es mediante este proceso que se eligen las partes constitutivas del fijador, desarrollar un fijador que podría ser más práctico de usar ⁹.

Intentando mejorar técnicas de procesamiento y fijación de tejidos utilizando tecnología para alcanzar objetivos en estudios patológicos, donde la condición óptima de los fijadores de tejidos es crucial ¹⁰. Se espera que un fijador ideal endurezca los componentes del tejido y prevenga la descomposición, la putrefacción y la autólisis. La selección de uno en particular generalmente requiere consideraciones múltiples y cuidadosas⁷.

La finalidad fue establecer la sustancia que tiene mayores ventajas, con base a diferentes hallazgos de artículos y publicaciones de revisiones sistemáticas y estudios experimentales que han probado su eficacia y determinar el conocimiento de la aplicación de sustancias fijadoras en tejidos humanos para procesos histológicos, lo que beneficiara notablemente a los médicos anatomopatológicos encargados de garantizar un buen diagnóstico en el análisis de fijación de tejidos así mismo ayudando a obtener resultados de calidad para el paciente.

No existe un fijador universal que pueda utilizarse en todas las aplicaciones posteriores de las ciencias biomédicas y la patología diagnóstica. Es una necesidad identificar las características de cada fijador y su mecanismo de acción puede resultar de gran ayuda a la hora de seleccionar el adecuado.

La presente investigación tiene como objetivo evaluar la aplicación de sustancias fijadoras en relación con los tejidos humanos para procesos histológicos en el área de anatomía patológica mediante la revisión de revistas científicas, describiéndolo en tres ítems.

- Recopilar de las diferentes bases de datos científicas, la importancia del manejo adecuado y fijación de las piezas anatomopatológicas para procedimientos histológicos.
- Describir las ventajas y desventajas de cada sustancia que se emplea en la fijación de estructuras y tejidos de los procesos histológicos.
- Analizar la importancia del uso correcto del tiempo de fijación, su poder de penetración en los tejidos manteniendo intactas las estructuras en procedimientos histológicos.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.

El trabajo en patología, incluyendo el procesamiento de biopsias y piezas quirúrgicas, requiere sincronización, responsabilidad, precisión y un diagnóstico preciso en tiempo mínimo ¹¹.

Es necesario establecer los grados de responsabilidad del equipo médico y paramédico encargado de la citología, biopsia o pieza quirúrgica, desde su resección hasta el conocimiento del resultado por parte del médico solicitante debido a la demanda de hospitalización o urgencia en el tratamiento ¹¹.

Manejo de muestras de tejido humano

Las muestras pueden ser pequeños fragmentos de tejido obtenidos mediante la biopsia de una parte del organismo, o muestras de órganos o parte de ellos que se extraen durante el procedimiento quirúrgico con finalidad diagnóstica de enfermedades y la investigación biomédica. Los tejidos experimentan una rápida degradación inmediatamente después de la ligadura de su suministro de sangre¹². Se emplean diversas técnicas para prevenir la degradación de muestras del tejido como fijación química habitualmente en formol. Con esto se logra mantener la arquitectura celular y permite que el tejido se conserve para el siguiente proceso. Se pueden usar otros tipos de fijadores, dependiendo del tipo de muestra o de las características celulares que se necesitan aumentar.

Sin embargo, los enlaces cruzados resultantes de las interacciones químicas entre el formaldehído y las biomoléculas de las muestras introducen dificultades en la detección y extracción de antígenos para el análisis. Los métodos de procesamiento alternativos, como la fijación química la base de alcohol o el método con congelación, ayudan a evitar la pérdida de antigenicidad debido a la reticulación, pero introducen artefactos morfológicos. Se revisa los métodos de procesamiento de muestras de tejido fresco, así como los efectos de estos procedimientos sobre la morfología y antigenicidad de los tejidos conservados según lo evaluado por histología, inmunohistoquímica, proteómica y genómica¹² (Anexo 3).

Es importante mantener las células en un estado lo más natural posible y prevenir cambios post mortem como resultado de la putrefacción dando como consecuencia la destrucción del tejido por bacterias u hongos y la autólisis es la destrucción del tejido por sus propias enzimas. En el último caso, a medida que las células mueren, liberan enzimas de sus lisosomas y otros orgánulos intracelulares, que comienzan a hidrolizar, es decir, descomponerse al reaccionar con agua los componentes del tejido, como proteínas y ácidos nucleicos con la ayuda de proteasas y nucleasas, respectivamente.

Los casos de autólisis son más graves en tejidos ricos en enzimas como hígado, cerebro, riñón y son menos rápidos en tejidos como las fibras elásticas y el colágeno. Por lo tanto, es fundamental que la fijación se lleve a cabo lo antes posible después de la extracción de los tejidos para evitar la autólisis y la putrefacción, así como para evitar que el tejido sufra shock osmótico, distorsión y contracción. Desafortunadamente, los fijadores pueden, sin querer, introducir artefactos que pueden interferir con la interpretación de la ultraestructura celular (Anexo 8 y 9) ¹³.

La fase pre analítica en Anatomía Patológica

La fase pre analítica en patología abarca todo el proceso que afecta a las muestras biológicas desde que se extraen del paciente hasta su preparación para su análisis. La recolección, fijación, descripción macroscópica, decalcificación, procesamiento de tejidos, inclusión, corte y montaje son realizados ²¹. La muestra debe tener un tiempo de isquemia menor a 1 hora y estar correctamente fijada y decalcificada para realizar pruebas moleculares adicionales. Caso contrario, la muestra no se puede recuperar y no se pueden realizar pruebas complementarias ²¹.

La autólisis y degeneración de proteínas, ADN y ARN inicia tras la extracción (tiempo de isquemia), que se clasifica en isquemia caliente (órgano mantiene temperatura) sin afectar estudios posteriores. La isquemia fría, que es el período entre la extracción de la muestra quirúrgica y su fijación, dificulta el diagnóstico y el uso de pruebas complementarias²¹.

El proceso de fijación interrumpe la degradación tisular mediante reacciones químicas que crean entrecruzamientos entre proteínas y ácidos nucleicos al cesar el suministro sanguíneo¹¹.

Cuando los tejidos se extraen de un organismo o cuando el organismo muere, experimentan dos procesos degradativos: autólisis por enzimas intracelulares y putrefacción por bacterias. El procesamiento histológico del tejido puede degradar las estructuras tisulares al intentar revelar y observar estructuras específicas (Anexo 1).

Procesos de fijación en muestras tisulares

La fijación es una serie compleja de eventos químicos que provocan cambios en los diversos componentes químicos de la célula, como el endurecimiento. Sin embargo, se conservan la morfología de una célula y los detalles estructurales. La fijación del tejido es de suma importancia, poco después de su eliminación del cuerpo, sufrirá cambios degenerativos debido a la autólisis, de modo que se perderá la morfología de la célula individual¹⁴.

El dilema de la fijación es constante porque hay una necesidad de lograr un efecto, los fijadores alteran la composición y física de los tejidos, causando la inactivación enzimática y deteniendo la autólisis al desnaturalizar las proteínas. Proteínas desnaturalizadas difieren de proteínas sin desnaturalizar en perfil químico y antigénico debido a cambios en su configuración espacial^{15, 16}.

La fijación en anatomía patológica es un paso fundamental, mediante este procedimiento se logra prevenir la autólisis y la degradación del tejido, así también conservar todos los componentes del tejido de modo que puedan observarse tanto anatómica como microscópicamente después de la tinción^{17, 18}.

Como la fijación suele ser el primer paso para preparar el tejido para análisis microscópico o de otro tipo, la elección del fijador y del protocolo de fijación es muy importante. El fijador actúa para desnaturalizar las proteínas mediante:

1. Coagulación estructuras proteicas secundarias y terciarias para formar geles

insolubles.

2. Formando compuestos aditivos de entrecruzamiento de grupos terminales de aminoácidos
3. Una combinación de agentes coagulantes y procesos aditivos.
4. Promueven la unión de tintes a componentes celulares particulares abriendo grupos laterales de proteínas a los que se pueden unir los tintes.
5. Eliminan el agua unida para aumentar el índice de refracción del tejido para mejorar la diferenciación óptica.
6. Alteran el índice de refracción de los tejidos para mejorar el contraste para una visualización sin tinciones ¹³.

Características generales

Los fijadores poseen la capacidad de detener los mecanismos vitales de las células, porque preservan la estructura y composición celular tras la muerte. Inhibiendo, los fenómenos autolíticos de post-mortem. Entre las múltiples acciones de los fijadores, sus características más generales se centran en¹⁹:

- Prevenir la autólisis en tejidos separados del organismo ya sea por biopsias o necropsias. Inhabilitan la actividad de las enzimas lisosomales mediante coagulación o floculación de las proteínas. La velocidad de penetración y fijación del tejido depende del tamaño de la muestra y las propiedades del fijador utilizado ¹⁹.
- Funciona matando bacterias y evitando la proliferación de microorganismos descomponedores ¹⁹.
- Evitar contracciones o deformaciones de los tejidos debido a la presión osmótica entre los componentes del tejido y la solución fijadora ¹⁹.
- Fomentar modificaciones en la consistencia de la muestra para su manejo, corte y preparación para teñir. Los fijadores incrementan la intensidad de la tinción del colorante según el tipo de tejido, por lo que no hay un fijador universal ideal, sino que debe elegirse según la especificidad del tipo de tejido y estudio ¹⁹.

Los criterios para obtener una buena fijación son:

- Elección del fijador
- Tamaño de la muestra

- Volumen del fijador
- Tiempo de fijación
- Temperatura de la fijación
- Almacenamiento de las muestras
- Lavado de las muestras fijadas

Tiempo de fijación en tejidos

La duración de la fijación depende de varios factores (tamaño de la muestra, tipo de tejido, temperatura, condiciones estáticas frente a agitación, etc.). El formaldehído puede fijar correctamente un objeto pequeño en 8 h, pero se recomienda fijar las muestras durante al menos 24 h. Las muestras grandes y/o los tejidos densos necesitarán tiempos más prolongados. En el caso del tejido neural (cerebro y médula espinal) se recomienda fijar las muestras durante al menos 48 h o incluso más (Anexo 11) ²⁰.

El intervalo entre la interrupción del flujo sanguíneo al tejido y la inmersión de las muestras en el fijador debe ser lo más corto posible, preferiblemente inmediato, dado que los cambios bioquímicos importantes ocurren en los tejidos en los primeros 10 minutos después de la falta de oxígeno. El tiempo debe reducirse para disminuir el deterioro de ARN y proteínas, especialmente en tejidos con niveles elevados de ARNasas y proteasas ¹⁹.

Volumen de la sustancia fijadora

El fijador debe ser al menos 10 veces mayor en volumen que el tejido a fijar. Puede usarse un papel o una esponja para cubrirlo y facilitar su penetración en ejemplares más grandes. No se recomienda guardar en la nevera un espécimen en formol, ya que el frío retrasa la fijación del formol. La ley de Medawar establece que la profundidad de penetración en el tejido depende del tiempo según la fórmula: $d \text{ (mm)} = K\sqrt{t \text{ (min)}}$ (donde K es 0,78 para el formaldehído a temperatura ambiente) ¹¹.

El tiempo de contacto con el fijador varía según el tipo de fijador, el tamaño y la naturaleza de la muestra, y la temperatura de fijación. La fijación, lograda con sustancias químicas,

mantiene permanentemente la estructura del tejido para tratamientos futuros. Las muestras deben ser sumergidas inmediatamente después de extraerse en el fijador. La fijación por inmersión implica sumergir trozos pequeños de muestra en un recipiente con la solución fijadora.

Cuando se fija tejido, es importante mantener el tamaño de la muestra pequeño, si es posible (es decir, 2 a 3 mm³), ya que un mayor espesor retardará la penetración del fijador. El volumen del fijador debe ser de 20 a 25 veces el volumen del tejido. Se debe extraer o perforar el peritoneo o la cápsula que rodea el tejido. La sangre y la mucosidad se deben enjuagar con solución salina. Los tejidos deben cortarse con una hoja de afeitar o bisturí nuevo y afilado, en lugar de tijeras, ya que estas últimas podrían apretar el tejido y causar daño. Algunos tejidos (pulmones, ojos, etc.) requerirán un manejo especial para garantizar que el fijador llegue a todos los componentes internos.

Se debe tener cuidado de asegurar que la muestra tenga uno o más lados cortados para garantizar una buena penetración del fijador. A veces, se puede emplear un instrumento agitador para garantizar que el fijador llegue a todas las superficies. En ningún momento se debe permitir que el tejido se seque¹³.

Cada fijador tendrá su propio tiempo de fijación y tratamiento posterior a la fijación para preservar mejor los detalles celulares. Los fijadores típicos, según el tipo de tejido y la técnica de microscopía prevista, pueden incluir Formol Bufferado Neutro al 10%, fijador de Zenker, fijador de Bouin, fijador de Helly, fijador de Carnoy, glutaraldehído, tetróxido de osmio, ácido crómico, dicromato de potasio, ácido acético, alcoholes (etanol, metanol), cloruro de mercurio y acetona¹³.

Sustancias fijadoras.

Fijar en formol es adecuado para preservar detalles morfológicos, facilitar pruebas inmunohistoquímicas y de hibridación in situ, y conservar ácidos nucleicos. Todos los kits comerciales en inmunohistoquímica, técnicas moleculares y test genéticos están optimizados para este reactivo¹¹.

El formol al 10% reduce la infecciosidad del virus de COVID-19 en 24 horas en muestras de pacientes, por lo que se consideran de bajo riesgo. El virus se vuelve inactivo si se realiza una infiltración de parafina en los tejidos a una temperatura de 60-65 °C durante al menos 2 horas en el procesamiento técnico ²² (Anexo 2).

Clasificación de los fijadores

Existen números fijadores que se utilizan desde décadas como el formaldehído, más de un siglo, pero con el paso del tiempo ha venido surgiendo nuevos métodos de fijación. Los cuales permiten un gran aporte para el estudio de lípidos, proteínas, ARN o ADN y los demás componentes del tejido¹⁸. La ilustración 1 detalla algunos de los fijadores histológicos.

Ilustración 1. Clasificación de diferentes fijadores y detalles sobre sus propiedades.

Fijador químico	Tipo de agente	Fijador	Mecanismo de fijación	de	Función
Fijador simple	Agentes precipitantes	Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Mecanismo de coagulación y deshidratación	de	Preserva pequeñas moléculas no lipídicas como glucógeno, ácidos nucleicos, preserva la actividad enzimática
		Metanol (CH ₃ OH)			
		Acetona (CH ₃ COCH ₃)			
Agentes de reticulación	de	Formaldehído (HCHO)	Mecanismo de reticulación	de	Procesamiento rutinario, Proteínas
		Glutaraldehído (OHC-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CHO)			Microscopía electrónica, Lípidos, RBC
		Acroleína (CH ₂ =CH—CHO)			Fosfolípidos
Agentes oxidantes		Tetróxido de osmio (OsO ₄)	de enlace insaturado		Lípidos, Post fijación en microscopía electrónica

nucleico valiosa, pero tienen defectos en la preservación estructural y, por lo tanto, no son populares entre los patólogos. El mecanismo de reticulación producido por los fijadores de aldehídos proporciona, en cambio, una conservación estándar de los componentes estructurales. De hecho, la fijación de tejido en Formol Bufferado Neutro al 10% con la generación de bloques de tejido FFPE representa el método ampliamente favorecido para el procesamiento de muestras de tejido quirúrgico en patología diagnóstica ²⁴.

El propósito de la fijación es preservar los tejidos de forma permanente en un estado tan real como sea posible. La fijación debe realizarse lo antes posible después de la extracción de los tejidos (en el caso de patología quirúrgica) o poco después de la muerte (con autopsia) para evitar la autólisis. No existe un fijador perfecto, aunque el formaldehído es el que más se acerca. Por lo tanto, una variedad de fijadores está disponibles para su uso, según el tipo de tejido presente y las características que se van a demostrar ²⁵.

Hay cinco grandes grupos de fijadores, clasificados según el mecanismo de acción:

- Aldehídos
- Mercuriales
- Alcoholes
- Agentes oxidantes
- Picrates

El Formol Bufferado Neutro al 10% y el glutaraldehído son tipos de aldehídos. Las proteínas forman enlaces cruzados con residuos de lisina para fijar el tejido. El entrecruzamiento no afecta la estructura proteica y no se pierde la antigenicidad. Entonces, el formaldehído es efectivo en las técnicas inmunohistoquímicas. Penetra bien en los tejidos, pero es relativamente lenta. La solución estándar es formalina tamponada neutra al 10%. Un tampón evita la acidez que promovería la autólisis y provocaría la precipitación del pigmento formol-hemo en los tejidos.

Un ejemplo de una solución a base de aldehído es Formol Bufferado Neutro al 10% que consiste en un 3,7% de formaldehído en agua con un 1% de metanol. Es un agente fijador utilizado en todo el mundo debido a su disponibilidad comercial, facilidad de manipulación, bajo costo y capacidad eficaz de conservación de tejidos con mínima alteración celular. Sin

embargo, tiene algunos efectos secundarios tóxicos preocupantes, como reacciones alérgicas, irritación de la piel y sensación de ardor en los ojos. Además, el formaldehído tiene potencial carcinógeno en humanos que puede causar cáncer de nasofaringe, leucemia mieloide y tumores cerebrales ²⁶.

En histopatología, las muestras de tejido generalmente se obtienen de biopsias y resecciones y se tratan inmediatamente con Formol Bufferado Neutro al 10% con fines de conservación. Es el fijador más utilizado en los laboratorios de patología. Este procedimiento debe garantizar la preservación química del tejido para futuras investigaciones y análisis moleculares después de la fijación.

Aunque ningún fijador cumple con todos estos criterios, cumple con la mayoría de estos requisitos ya que inhibe la autólisis y estabiliza el tejido mediante la reticulación con grupos amino de aminoácidos presentes en péptidos y proteínas. La fijación no destruye los ácidos nucleicos, los carbohidratos y los lípidos. Además, se conserva la estructura tridimensional para que pueda investigarse explícitamente ²⁷.

El glutaraldehído provoca la deformación de la estructura de hélice alfa en las proteínas, por lo que no es bueno para la tinción inmunohistoquímica. Sin embargo, se fija muy rápidamente, por lo que es bueno para la microscopía electrónica. Penetra muy mal, pero da mejor detalle general citoplasmático y nuclear. La solución estándar es glutaraldehído tamponado al 2 % ²⁵.

Los mercuriales fijan el tejido por un mecanismo desconocido. Contienen cloruro de mercurio e incluyen fijadores tan conocidos como B-5 y Zenker. Estos fijadores penetran relativamente mal y provocan cierta dureza en los tejidos, pero son rápidos y proporcionan un excelente detalle nuclear. Se utiliza principalmente para fijar tejidos hematopoyéticos y reticuloendoteliales. Por ser portadores de mercurio, requieren de una disposición adecuada ²⁵.

Los alcoholes, como el metanol y el etanol, desnaturalizan proteínas y no se utilizan habitualmente en tejidos debido a su efecto endurecedor y fragilizante. A pesar de eso, son eficientes para frotis citológicos al ser rápidos y mostrar buenos detalles nucleares. Las lacas

de cabello baratas son equivalentes a las latas de aerosol de fijadores de alcohol para pruebas de Papanicolaou ²⁵.

El material de fijación alternativo que se puede utilizar para almacenar muestras durante un período prolongado es el alcohol. El alcohol ha sido utilizado como material de fijación desde 1922 por Freudenthal. Su investigación fue resumida en 1947 (Freudenthal). En general, recomendó el etanol como material de fijación para todos los tejidos y células excepto para la tinción de grasa. Las investigaciones continúan encontrando el efecto del alcohol en cada tejido desde 1957. Luego, en 1986, se empezó a investigar el etanol como material de fijación para tinciones histoquímicas.

El etanol es un grupo de alcoholes que se utiliza más ampliamente. Según varios estudios, el etanol proporciona una excelente protección para las enzimas fosfatasa alcalina, el colágeno de fibra de coco, el ADN, el ARN y las lipasas. Con base en la investigación, algunas modificaciones de la técnica para aprobar el crecimiento continuo hasta ahora. Sin embargo, ninguno utiliza un microscopio electrónico ²⁸.

Los agentes oxidantes incluyen fijadores de permanganato como el permanganato de potasio, fijadores de dicromato por ejemplo dicromato de potasio y tetróxido de osmio. Entrecruzan las proteínas, pero causan una desnaturalización extensa. Algunos de ellos tienen aplicaciones especializadas, pero se usan con muy poca frecuencia ²⁵.

Picratos incluyen fijadores con ácido pícrico. La más importante de ellas es la solución de Bouin. Tiene un mecanismo de acción desconocido. Funciona casi tan bien como los mercuriales con detalles nucleares, pero no causa tanta dureza. El ácido pícrico es un peligro de explosión en forma seca. Como solución, tiñe de amarillo todo lo que toca, incluida la piel ²⁵.

2.4.1.1 Formaldehído

El formaldehído se considera la solución de oro en el proceso de fijación. Butlerov lo descubrió en 1859, es ampliamente utilizado en todo el mundo para preservar y fijar tejidos durante mucho tiempo, denominado fijador clásico. La solución fijadora ideal debe tener una capacidad notable para penetrar el tejido en poco tiempo, menos daños al tejido durante la

penetración y actuar como fijador y conservante al mismo tiempo. Pocos fijadores podían fijar y preservar el tejido; el formaldehído al 10% se consideraba el mejor de estos fijadores; otros podrían fijar el tejido, pero causan daño tisular durante el largo tiempo de exposición ya que no son adecuados como conservantes, la solución de Bouin es el mejor ejemplo para este tipo de estos fijadores ²⁹ (Anexo 5, 6 y 7).

El formaldehído se utiliza ampliamente para preservar el tejido, actúa como conservante, causa poca retracción del tejido, es compatible con diversas técnicas e tinciones histológicas, incluyendo la inmunocitoquímica y la hibridación de ácidos ribonucleicos. Además, el formaldehído se une a grupos funcionales de las proteínas formando grupos hemiacetales, lo cual inactiva una gran cantidad de enzimas y previene la degradación del tejido por las enzimas hidrolíticas ²⁵. Protege los lípidos adecuadamente, especialmente si se agregan iones de calcio a la solución fijadora (ya que disminuyen la solubilidad de los fosfolípidos), y no genera reacción con los carbohidratos.

Comúnmente se encuentra en forma de una solución de formaldehído al 37%, esto se obtiene al hacer burbujear gas formaldehído a través de agua hasta el punto de saturación. Su forma más común en los laboratorios histológicos es una solución al 10%, es decir, 4% de formaldehído, ya sea diluido en agua (originalmente denominada Formol Bufferado Neutro al 10%) o en una solución tamponada (denominada formalina tamponada neutra o NBF).

Sin embargo, si bien el componente principal de la solución de formaldehído es el formaldehído, el investigador debe tener en cuenta que la oxidación del formaldehído producirá una cantidad desconocida de ácido fórmico, de ahí la razón por la que Formol Bufferado Neutro al 10% no tamponado es ácido y que puede haber entre un 10% y un 15% de metanol en la solución. y actúa como agente estabilizante.

El ingrediente activo en cualquier solución de formaldehído es el metilenglicol, la forma hidratada del formaldehído y los dos químicos coexisten dentro de la solución en un equilibrio que favorece al metilenglicol. Se ha propuesto que la conocida paradoja entre la tasa de penetración del formaldehído y su tasa de fijación puede deberse a la rápida velocidad de penetración del metilenglicol y la lenta tasa de fijación del formaldehído ¹⁸.

La fijación normalmente es de 24 a 50 h, aunque puede ser de 1 a 2 semanas. Si el tejido va destinado a inmunohistoquímica es suficiente con 12-24 h a 4°C¹⁸.

Sustancias fijadoras con formol

Formalina tamponada neutra

El reactivo que se utiliza actualmente para la fijación quirúrgica de tejidos es formalina tamponada neutra (NBF), que se obtiene disolviendo 1:10 la solución saturada (comercial) de formaldehído en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2-7,4. El pH del reactivo es fundamental ya que se sabe que la fijación en formalina ácida produce la fragmentación del ADN y la alteración de las bases. La solución comercial de formaldehído, a partir de la cual se prepara la formalina, es rica en ácido fórmico, lo que produce una acidez en el rango de pH 2. En la solución final tamponada, ligeramente alcalina, el ácido está presente como formiato de sodio, que actualmente se considera como inactivo e irrelevante en el proceso de fijación²⁴.

Preparación de 1 litro de solución de Formol Bufferado neutro al 10%.

- Formol comercial.....100 mL
- Agua destilada.....900 mL
- Fosfato monobásico de sodio.....4 g
- Fosfato dibásico de sodio.....6.5 g

Líquido de Bouin: frecuentemente utilizada como sustituto del Formol Bufferado Neutro al 10% para la fijación de tejidos como la piel, órganos endocrinos, testículos y tejido embrionario. No está establecido para realizar biopsias renales debido a la distorsión severa que causa. Las muestras se deben lavar con etanol a 70% con un tiempo de fijación de 4 a 48 horas³⁰.

Preparación del fijador

- Solución acuosa de ácido pícrico.....750ml
- Formalina concentrada.....250ml
- Ácido acético glacial.....50ml

Fijador de Bouin-Hollander: esta es una versión modificada del líquido de Bouin que se usa para fijar cilindros de biopsias de médula ósea. Esta solución se conserva a temperatura ambiente el tiempo de fijación oscila entre 48-72 horas. También puede conservar las muestras durante 48 horas sin endurecerse demasiado ¹⁹ (Anexo 12).

Preparación del fijador

- Acetato neutro de cobre.....2.5gr
- Ácido pícrico4.0 gr
- formalina concentrada.....10ml
- Ácido acético glacial.....1.5 ml
- Agua destilada100ml

Buin alcohólico (fijador de Dubosq-Brasil): es una opción líquida Bouin para piezas de mayor tamaño, con mayor rapidez de penetración. Se emplea asimismo para una fijación concreta de sustancias hidrosolubles como el glucógeno para prevenir la disolución, además, se usa para fijar hígado, cerebro, riñones, músculo¹⁵. El tiempo de fijación medio para fragmentos con un espesor de aproximadamente 5 milímetros es de 2 a 3 horas cuando se mezcla antes de usar.

Preparación del fijador

- Alcohol etílico 80%.....75.0ml
- Ácido pícrico.....0.5gr
- Formalina concentrada..... 30.0ml
- Ácido acético glacial.....7.5ml

Líquido de Gendre: está diseñado especialmente para fijar el glucógeno y los pigmentos derivados de la hemoglobina. La fijación tarda entre 1 y 4 horas. Después del proceso, deben hacerse dos lavados sucesivos en etanol a 80, 95 y 100°.

Preparación del fijador

- Alcoholetílico 70%.....75.0ml
- Ácido pícrico.....0.5gr
- Formalina concentrada.....15.0ml

- Ácido acético glacial.....7.5ml

Fijador de Müller: la importancia actual del Monobromonapto se basa en su uso para la fabricación de fijadores de Orth y de Zender. La solución principal que denominamos madre. Fijación durante 4 y 8 horas. Después de la fijación, es preciso enjuagar con agua corriente durante algunas horas.

Preparación del fijador

- Dicromato de potásico.....2.5gr
- Sulfato sódico.....1.0gr
- Agua destilada.....100.0ml

Fijador de Orth: actualmente se usa solo en técnicas de sujeción de tejido nervioso específicas. Los tejidos nerviosos se fijan durante 48 horas, después se lavan y se almacenan en alcohol etílico al 70% ³⁰.

Preparación del fijador

- Solución stock.....90.0ml
- Formalina concentrada.....10.0ml

Solución de B5 y Zenker-formol (Líquido de Nelly): Las dos mezclas son prácticamente iguales. B5 se refiere a la versión alterada de Zenker; Zenker-formol, con dicromato de potásico y sulfato sódico, es el fijador preferido para riñones, hígado, tejido conectivo y fibras ³⁰.

Preparación del fijador

- Cloruro mercuríco.....5gr.
- Dicromato potásico.....2,5 gr.
- Sulfato sódico.....1 gr.
- Agua Destilada100 ml.

Sustancias fijadoras sin formol

La fijación se realiza mediante la acción del alcohol presente en la solución, que actúa provocando la desnaturalización de las proteínas con la eliminación de agua en los grupos carboxilo, hidroxilo, amino, amido e imino libres de las proteínas, lo que da como resultado la coagulación de las proteínas y la contracción del tejido, por ejemplo, Zenker y Carnoy¹⁸. La fijación es esencial en el procesamiento de muestras de tejido para preservar su estructura celular y composición". Los fijadores alcohólicos son alternativas prometedoras a Formol Bufferado Neutro al 10% ¹.

Líquido de Zenker: busca unir los beneficios del sublimado y del dicromato potasio. Se reemplazó por B5 en la práctica habitual. Se limita principalmente a mejorar el proceso de refinamiento y decalcificación de las biopsias de médula ósea fijadas inicialmente con B5. No se debe exceder las 48 horas de tiempo de fijación. Después de fijarlo, hay que tratar el material con sulfato de sodio al 5% durante 1-2 horas ³⁰.

Preparación del fijador

- Bicloruro de mercurio.....5 g
- Bicromato potásico.....2.5 g
- Sulfato sódico.....1 g
- Agua destilada.....100 ml
- Ácido acético glacial.....5m

Líquido de Carnoy: Se sabe que fija el glucógeno, los carbohidratos simples en general, las proteínas fibrilares y especialmente las miofibrillas. Arregla las cosas muy rápidamente y al mismo tiempo deshidrata el tejido. Los efectos secundarios son hemólisis y retracción hística excesiva. eritrocitos masivos y preservación estructural inadecuada del ADN ³⁰.

Para contrarrestar los efectos de la contracción del etanol y producir la fijación del tejido mediante enlaces de hidrógeno de los componentes al tejido, el fijador de Carnoy añade cloroformo y ácido acético a la mezcla. El ADN no estaba bien conservado estructuralmente. El tiempo de fijación puede ser acorde hasta 3 horas¹⁸.

Preparación del fijador

- Etanol absoluto..... 60ml.
- Cloroformo..... 30ml
- Ácido acético glacial..... 10ml

Fijadores alternativos

Durante las dos últimas décadas se busca nuevas formas de reemplazar a los fijadores tradicionales, dando como resultado la introducción de varias soluciones a base de alcohol de los cuales se puede mencionar a FineFIX, RCL2 y PAXgene, que, según se ha informado, conservan la morfología de los tejidos, así como las proteínas y los ácidos nucleicos.

Finalmente, la distribución comercial de los fijadores alternativos se debe a tres preocupaciones principales: primero, sus costos de adquisición son de 3 a 10 veces mayores en comparación con la Formol Bufferado Neutro al 10%; en segundo lugar, los productores pueden discontinuar los productos en cualquier momento (como sucedió en el caso de RCL2); en tercer lugar, las recetas no reveladas crean incertidumbre sobre si se puede garantizar un archivo a largo plazo en el futuro (Anexo 10) ¹².

Sistema de fijación de tejido PAXgene

En tejidos orales frágiles son difíciles de procesar para aplicaciones histológicas, ya que son expuestos a sufrir daños en el procesamiento, como desgarros, arrugas y caída del tejido en los portaobjetos. Esto conduce a una pérdida de información morfológica y a retrasos innecesarios en la experimentación. Se ha caracterizado el nuevo sistema de fijación de tejido PAXgene en tejido de la mucosa bucal de patología normal y cancerosa para aplicaciones histológicas e inmunohistoquímicas de rutina ³¹

Fijadores naturales no tóxicos.

A pesar de sus beneficios, el Formol Bufferado Neutro al 10% se conoce desde hace muchos años como un potente irritante de la piel y la cavidad nasal, y es citotóxica en dosis altas. Se considera un carcinógeno para los cánceres nasofaríngeo, linfático y hematopoyético, incluida la leucemia. Debido a su naturaleza peligrosa, se han estudiado numerosos fijadores naturales para buscar una alternativa a los fijadores.

La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha alentado enormemente la investigación en curso para buscar un reemplazo más seguro y ecológico de los fijadores de Formol Bufferado Neutro al 10%. Dado que la exposición constante a largo plazo al formaldehído pone en peligro la salud del personal de laboratorio, los productos naturales a base de azúcar se han convertido en interesantes fijadores alternativos al formaldehído debido a sus propiedades conservantes y antibacterianas. Sin embargo, existen hallazgos controvertidos sobre los efectos fijadores de los fijadores naturales ³².

Métodos de aplicación de los fijadores

En general, el fijador de tejidos se puede aplicar mediante cuatro métodos principales, como calor, microondas, perfusión e inmersión; el último método es el protocolo más común y ampliamente utilizado, ya que todas las muestras de tejido se obtienen de la operación quirúrgica o del examen post mortem. Muchos factores influyen en la acción de la solución fijadora, como la temperatura, la osmolalidad, el tamaño y el espesor de la muestra, el volumen del fijador, el pH del tampón fijador, el tiempo de fijación y la concentración del fijador.

La fijación de tejidos utiliza una solución química como Formol Bufferado Neutro al 10% y puede considerarse una reacción química ya que la fijación del tejido se produce mediante uno de estos tres mecanismos: fijación por enlace covalente, fijación por coagulación de proteínas y fijación mediante la formación de precipitados, considerado como un fijador de enlaces covalentes ²⁹.

Ventajas y desventajas

Las ventajas de los fijadores con formol para tejidos humanos son:

- Los fijadores con formol mejoran considerablemente la tinción nuclear, lo que facilita la visualización de las estructuras celulares
- Tiene un fuerte efecto mordiente, lo que ayuda a preservar las características morfológicas y moleculares de los tejidos
- Son efectivos para preservar la estructura celular, lo que permite un análisis histológico más preciso

Sin embargo, también es importante tener en cuenta las desventajas de los fijadores con formol:

- El formol puede causar retracción en el tejido, lo que puede afectar la interpretación de los resultados histológicos.
- El formol puede alterar la composición antigénica del tejido, lo que puede afectar la detección de ciertos marcadores o antígenos
- El formol es una sustancia tóxica y cancerígena, por lo que se deben seguir las indicaciones de seguridad al manipularlo.

Las ventajas de los fijadores sin formol en tejidos humanos son:

- Los fijadores sin formol son efectivos para preservar la estructura celular, lo que permite un análisis histológico más preciso.
- Son adecuados para tejidos blandos, duros y resistentes
- Los fijadores sin formol son menos tóxicos que los fijadores con formol.

Las desventajas de los fijadores sin formol para tejidos humanos son:

- No son adecuados para ciertos tipos de tejidos algunos tipos de tejidos pueden requerir fijadores específicos que no sean sin formol.
- Pueden no ser tan efectivos como los fijadores con formol sirven para preservar las características morfológicas y moleculares de los tejidos.

La fijación prolongada puede dar como resultado el enmascaramiento químico de dianas proteicas específicas y la prevención de la unión de anticuerpos durante los protocolos de inmunohistoquímica. En tales casos, se podrán incorporar métodos de fijación alternativos dependiendo del material biológico. Por lo tanto, no existe un fijador universal que cumpla con todos los requisitos. Cada fijador tiene propiedades y desventajas específicas.

No existe un fijador único, o una combinación de fijadores, que tenga la capacidad de preservar y permitir la demostración de cada componente del tejido. Algunos fijadores tienen sólo aplicaciones especiales y limitadas, mientras que pueden ser necesarias mezclas de dos o más reactivos para emplear las propiedades especiales de cada uno. Por lo tanto, es importante identificar específicamente qué estructuras histológicas se están tratando de demostrar, así como los efectos del almacenamiento de los tejidos a corto y largo plazo ¹³.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.

Enfoque de investigación

El presente trabajo tiene un enfoque cualitativo, porque se obtuvo información por medio del análisis de datos existentes en documentos científicos sin que se tome en cuenta la estadística como base fundamental ni se involucre mayormente datos cuantitativos.

Según el nivel

Es de carácter descriptivo debido a que se permitió especificar detalladamente las variables, haciendo énfasis en qué y cómo se manifiestan a través de procesamientos, conceptos y estudios que se enfocan en sustancias fijadoras de tejidos humanos para procesos histológicos que fueron analizados.

Según el diseño

Se elaboró con un diseño no experimental sin manipulación de variables de estudio, si no que se analizó el fenómeno tal cual como se presentó. Es de tipo documental, porque se basa en una revisión bibliográfica y estudios publicados en sitios web oficiales.

Según el cohorte

La secuencia temporal es transversal en vista de que se realizó el análisis en un momento determinado y con un solo bloque de resultados.

Según la cronología de los hechos

Este trabajo fue de tipo retrospectivo ya que este estudio recogió datos de artículos científicos, informes, libros actualizados y revistas de hechos que ya sucedieron, realizándose la búsqueda, selección y recolección de información.

Técnicas de recolección de Datos

La técnica utilizada es una revisión sistemática utilizándose el método Prisma, desarrollándose una preselección de artículos hasta la selección final de aquellos que se evaluaron según los buscadores seleccionados como: Scielo, Pub Med, como resultado se obtuvo fundamentos del proceso de fijación tisular, principios generales de la fijación en tejidos y clases de agentes fijadores según su mecanismo de actuación.

Población

La población en estudio estuvo conformada por un total de 47 artículos científicos relacionados con la aplicación de sustancias fijadoras en tejidos humanos para procesos histológicos, los cuales aportaron con información relevante para la investigación de sustancias fijadoras de tejidos humanos en procesos histológicos, fueron publicados en revistas científicas y bases de datos que tienen impacto regional y mundial entre las que se ubican, ProQuest, Elsevier, Scielo, PubMed, Dialnet además sitios web como, Organización Mundial de la Salud y repositorios de revistas digitales del período 2013 al 2023, facilitaron información ligada al tema de investigación durante el periodo de investigación.

Muestra

La muestra de este trabajo investigativo estuvo conformada por 27 fuentes bibliográficas relacionadas con el tema de estudio, publicadas, entre los 5 y 10 años anteriores, estos tenían una estrecha relación con la parte medular del tema de los cuales destacan Elsevier (1), Scielo (5), Dialnet (3), ProQuest (3), PubMed (5), OMS (3), Atlas (2), repositorios (5).

Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión: Se emplea criterios de inclusión como:

- Artículos con contenido vigente referidos a la aplicación de sustancias fijadoras en tejidos humanos para procesos histológicos.
- Libros con información relevante sobre la composición de sustancias fijadoras.
- Fuentes de primera mano con información completa respecto a sustancias fijadoras.

Exclusión: Se emplea criterios de exclusión como:

- Investigaciones experimentales sobre el tema, pero sin hallazgos concluyentes.
- Información relevante, pero con más consistencia en fijación de necropsias.
- Artículos de anatomía patológica que tienen una gran información poco enfocada en sustancias fijadoras de biopsias y tejidos.

Métodos de análisis, y procesamiento de datos.**Métodos de análisis**

Como proyecto de revisión bibliográfica se aplicó el método teórico, donde se realizó un análisis y síntesis de la información sobre las sustancias fijadoras para los procesos histológicos.

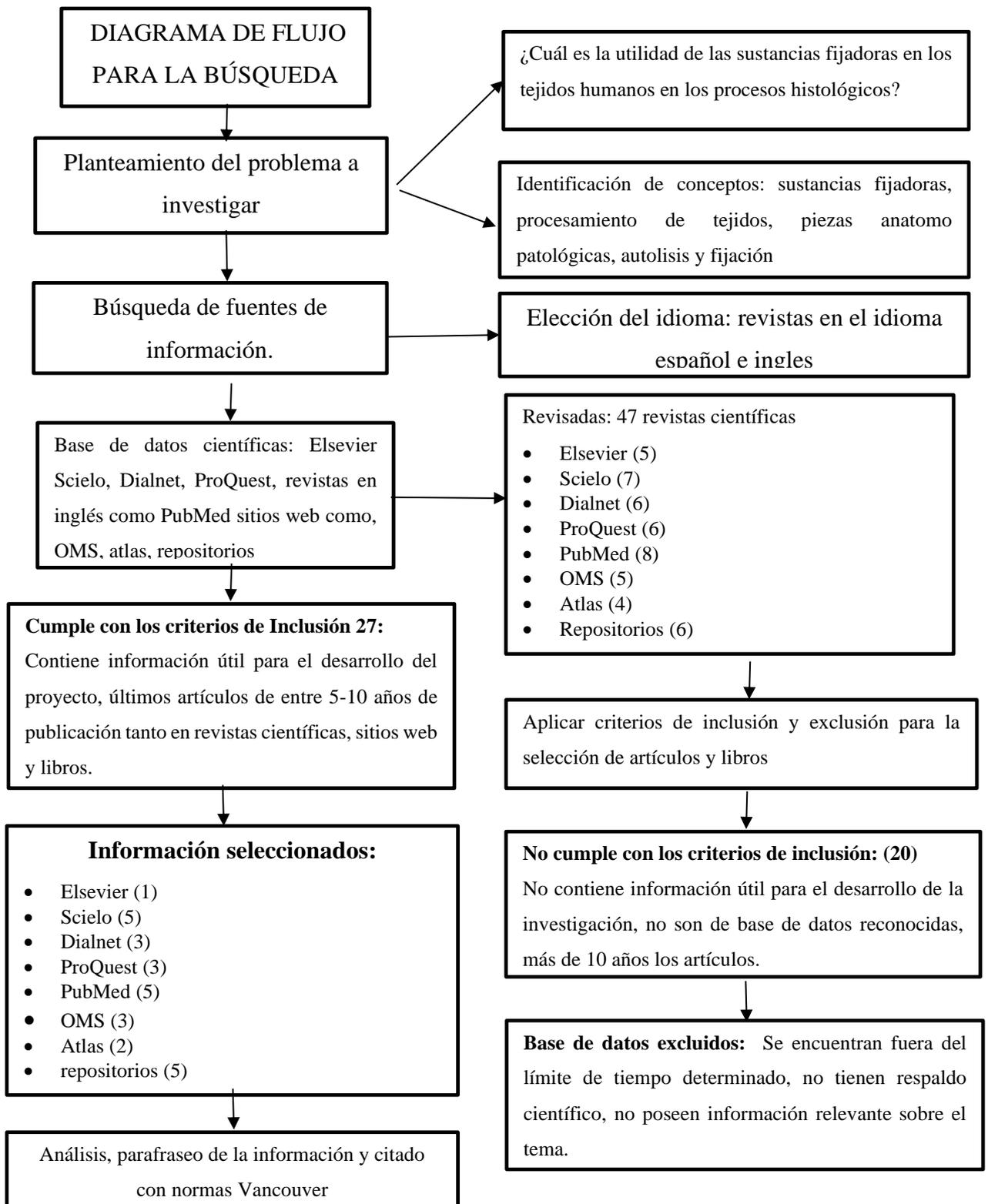
Procesamiento de datos

La presente investigación se realizó mediante el análisis de contenidos relevantes y útiles para el desarrollo del tema, esto mediante la recolección de información de forma bibliográfica para ser analizada.

Consideraciones éticas

No es necesario un comité de ética para este proyecto de revisión bibliográfica porque no se utilizarán sujetos humanos, animales o plantas y no se efectuó ninguna manipulación de muestras biológicas.

Estrategia de búsqueda bibliográfica



CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de resultados

Para desarrollar los resultados se seleccionaron 27 artículos científicos, aplicándose la metodología prisma, con la finalidad de efectuar un análisis comparativo de los hallazgos de los artículos de estudios experimentales con muestras específicas y revisiones sistemáticas que emplean comparaciones, así establecer las ventajas y desventajas, beneficios de aplicación de sustancias fijadoras alternativas. Las tablas presentan el autor, el año de publicación, nombre de la revista, estudio, muestra, hallazgo y sustancia fijadora utilizada. Para la presentación de la información se establecieron aspectos que responderán a los objetivos específicos de la investigación, mencionados a continuación:

1. Importancia del manejo adecuado de las sustancias fijadoras y de las piezas anatomopatológicas para procedimientos histológicos.
2. Ventajas y desventajas de las sustancias fijadoras.
3. Uso correcto del tiempo de fijación y poder de penetración en los tejidos.

Tabla 1. Importancia del manejo adecuado de las sustancias fijadoras y de las piezas anatomopatológicas para procedimientos histológicos

Titulo	Autor	Tipo de estudio	Muestra	Resultado
Procesamiento de tejido mediante un dispositivo de recolección con temperatura controlada para preservar los biomarcadores tumorales.	Gündisch et al. ³⁴	Estudio experimental	50 tumores hepáticos primarios y metastásicos	Se comparo entre la fijación estándar y la fijación en frío, logrando una conservación satisfactoria de las proteínas en los dos métodos. La diferencia no es tan significativa, pero mencionan una tendencia que apunta a una mejor conservación fijando a 4 °C
Efecto de la fijación prolongada de formalina sobre la expresión de proteínas en tejidos cerebrales humanos.	Korzhevskii et al. ³⁵	Estudio experimental	28 bloques de tejido de la corteza frontal, prefrontal prefijados en formalina.	La fijación produce una preservación alta del tejido cerebral humano no se observó contracción del tejido ni distorsión de la estructura celular, los componentes celulares se retuvieron en sus compartimentos nativos y las células se presentaron con una apariencia microscópica distinta y detallada.
Método analítico para determinar la fijación óptima de los tejidos en tiempo real.	Bauer et al. ³⁶	Estudio experimental	87 muestras de amígdalas	Desarrollo de un modelo estadístico en tiempo real y un sistema de procesamiento de tejidos modificado a medida que determina cuándo una muestra se difunde lo suficiente como para producir tinciones de alta calidad a partir de ensayos IHC posteriores.
Evaluación integral de la fijación de PAXgene en tejidos cancerosos orales.	Lahiri et al. ³¹	Estudio experimental	Tejido de la mucosa oral y bucal.	La tinción con hematoxilina y eosina mostró una morfología comparable entre los tejidos fijados con formalina y con PAXgene. Se observó una inmunotinción de buena calidad y ligeramente superior para las proteínas p53 y CK5/6 asociadas al cáncer en tejidos fijados con PAXgene sin recuperación de antígeno que en tejidos fijados con formalina.
fijadores a base de alcohol pueden preservar mejor la morfología de los tejidos que la formalina.	Haque et al. ¹	Estudio experimental	Tejido de hígado, bazo y corteza cerebral.	Se evaluaron fijadores a base de alcohol y la formalina en cuanto a las características morfológicas, estructuras y componentes tisulares. La fijación de EthMeth y metacarn arrojaron resultados satisfactorios en la morfología y la posterior identificación de las características del mismo. los tejidos fijados con formalina mostraron cierta peculiaridad, tal como una fijación inadecuada, disminución del tamaño y alteraciones de los componentes del tejido.

La tabla 1 presenta la importancia del manejo adecuado de las sustancias fijadoras y la fijación de las piezas anatomopatológicas para procedimientos histológicos. La fijación con formol tiene hallazgos significativos y muestran que es la opción más adecuada ya que ayuda a la conservación del tejido, pero es necesario establecer el tiempo entre otras variables.

Discusión

De acuerdo al autor Gündisch et al.³⁴ el examen histológico mostró un patrón uniforme de carcinomas invasivos que crecían como nudos sólidos y grupos de células cancerosas con una citología monótona. La fijación en CF, a diferencia de FE, permitió una conservación satisfactoria de las proteínas. Mientras Haque et al.¹, muestra resultados morfológicos y de identificación de tejido satisfactorios, con buena conservación de los detalles celulares utilizando los fijadores a base de alcohol,

De la misma forma que Korzhevskii et al.³⁵, menciona que la fijación prolongada en tejido cerebral humano no presenta contracción ni distorsión de la estructura celular, los componentes celulares se retuvieron en sus compartimentos nativos y las células se presentaron con una apariencia microscópica óptima para los estudios en el laboratorio.

De acuerdo a los estudios anteriores la falta de estandarización del manejo y procesamiento de tejidos dificulta el desarrollo y validación de nuevos biomarcadores en entornos clínicos y de investigación. En este sentido, la estandarización y optimización de los procedimientos preanalíticos y el procesamiento de tejidos son requisitos básicos para obtener datos confiables y reproducibles. Los estudios presentan información acerca de los mismos, pero se menciona la necesidad de mejores aplicaciones, sumado a ello, la mayor parte son efectuados a nivel internacional. En Latinoamérica y Ecuador son escasas las investigaciones, sin un enfoque de la necesidad de su aplicación en la práctica clínica.

El autor Bauer et al.³⁶ explica que encontró una correlación entre las propiedades de difusión de cada tejido y los tiempos de difusión determinados empíricamente necesarios para producir una tinción posterior ideal. Mientras Lahiri et al.³¹ encontró que los tejidos fijados con PAXgene mostraron una caída de tejido significativamente menor de los portaobjetos.

Estos estudios demuestran que el manejo adecuado requiere de contar con todas las sustancias fijadoras, pero algunos estudios muestran que se requiere de otras opciones por diferentes emergencias incluso hasta disponibilidad. Pero al no ser adecuado el retraso en la fijación presenta algunos inconvenientes como cambios en la estructura del tejido, afectándose los resultados. Los estudios usaron el muestro no probabilístico por

conveniencia porque los investigadores usaron las muestras que tenían a la mano, sin considerarse otros criterios, porque se deseaba establecer la fijación en el tejido.

Las investigaciones han utilizado una serie de nuevas opciones, por ejemplo, Paxgene en general trabajándose en estudios comparativos con el Formol Bufferado, estas sustancias ayudan a la conservación de tejido. Las técnicas que se apliquen deben ser adecuadas y basadas en el conocimiento de la anatomía. La fijación con Formol Bufferado entre el 5% al 10% tienen hallazgos significativos y muestran que es la opción más adecuada, pero es necesario establecer el tiempo y otras variables, según los fines establecidos.

Tabla 2. Ventajas de las sustancias fijadoras

Título	Autor	Tipo de estudio	Muestra	Ventajas
El propóleo como posible nuevo fijador de tejidos histológicos.	Bugshan et al. ²⁶	Estudio experimental	70 muestras de tejido de lenguas	La fijación de muestras de tejido colocadas en propóleo al 6,6% fue estadísticamente significativamente mejor que la de las muestras colocadas en Formol Bufferado Neutro al 10% y solución salina al 0,9% en diferentes momentos.
Fijadores naturales alternativos al formol en histopatología.	Yee et al. ³²	Revisión sistemática	15 estudios, 9 estudios utilizaron un fijador natural con diferentes diluciones, 6 utilizaron varios fijadores naturales.	La tinción nuclear y citoplasmática reveló una demostración similar a la de los fijados con Formol Bufferado Neutro al 10%.
KINFix: un fijador no comercial sin formalina optimizado para análisis histológicos	Stefanits et al. ¹²	Estudio experimental	15 muestras diferentes de tumores cerebrales primarios, evaluación según los criterios de la clasificación de tumores del sistema nervioso central.	RCL2 y KINFix ofrecen una histomorfología semejante a la del Formol Bufferado Neutro, por la combinación del bajo precio, fácil manipulación y disponibilidad.
Histología formol	Buesa ³⁸	Revisión sistemática	57 artículos científicos que comparan las ventajas y desventajas.	Formol Bufferado se puede utilizar de forma segura es más rápida a temperatura superior al ambiente.
Evaluación histomorfológica de fijadores en patología quirúrgica diagnóstica	Kubalady et al. ³⁹	Estudio experimental	90 tejidos de hígado y músculo esquelético obtenidos durante las autopsias.	Los tejidos conservados con formol tienen una fijación rápida y mejor preservación a largo plazo en comparación con la acetona y el alcohol.
Caracterización de Fijadores y su aplicación en histopatología.	Farzaneh et al. ²³	Búsqueda bibliográfica sobre la caracterización de fijadores y su aplicación en histopatología en bases de datos inglesas.	20 artículos y publicaciones científicas que describen las sustancias fijadoras	El formaldehído tiene propiedades como fácil uso, rentabilidad, conservación y rápida permeabilidad a los tejidos.

Tabla 3. Desventajas de las sustancias fijadoras

Título	Autor	Tipo de estudio	Muestra	Desventajas
El propóleo como posible nuevo fijador de tejidos histológicos.	Bugshan et al. ²⁶	Estudio experimental	70 muestras de tejido de lenguas	Formol Bufferado (10%), se considera la solución fijadora estándar de oro por sus atributos. Sin embargo, tiene efectos secundarios preocupantes, como propiedades cancerígenas y potencialmente irritantes.
El efecto de la fijación prolongada del Formol Bufferado sobre la expresión de proteínas en los tejidos cerebrales humanos.	Wu et al. ⁴⁴	Estudio experimental	28 bloques de tejido de la corteza frontal prefrontal media de cerebros humanos.	Los tejidos fijados con Formol Bufferado durante mucho tiempo mostraron cambios proteicos dependientes del tiempo y de la molécula. Se recomienda un tiempo corto de fijación de Formol Bufferado Neutro al 10% cuando se utilizan tejidos cerebrales PPF. E.
Fijación con formol como preprocesamiento de tejidos para espectroscopia óptica multimodal utilizando el ejemplo de secciones transversales de tumores cerebrales humanos	Stefanakis et al. ²⁷	Estudio experimental	Se extirparon ocho tumores cerebrales humanos malignos y tipos de tejido y se transfirieron inmediatamente a nitrógeno líquido.	El preprocesamiento de tejido con Formol Bufferado está ampliamente establecido. Sin embargo, la fijación produce alteraciones de la química y morfología del tejido, por ejemplo, mediante entrecruzamiento de proteínas.
Fijación de tejidos	Howat & Wilson ¹⁸	Estudio experimental	10 muestras de testículos	El fijado de Bouin no es apto para biopsias renales por que provoca una severa distorsión.

La tabla 2 y 3 hace referencia a las ventajas y desventajas de las sustancias fijadoras. Entre las ventajas tenemos que es de un fácil uso y se integran fácilmente en la estructura de la muestra. En cambio, en las desventajas es que el Formol Bufferado Neutro al 10% tiene efectos tóxicos y cancerígenos.

Discusión

El autor Bugshan et al. ²⁶ explica que la fijación de muestras de tejido colocadas en propóleo al 6,6% fue estadísticamente significativamente mejor que la de las muestras colocadas en Formol Bufferado Neutro al 10% y solución salina al 0,9% en diferentes momentos. Mientras que el autor Yee et al. ³² la tinción nuclear y citoplasmática reveló una demostración similar a la de los fijados con Formol Bufferado Neutro al 10%. De la misma forma que Stefanits et al. ¹² KINFix como fijador disponible gratuitamente podría superar algunas de las dificultades relacionadas con los agentes comerciales. Y el autor Buesa ³⁸ el Formol Bufferado se puede utilizar de forma segura, y cuando las presiones diagnósticas resulten en pruebas de diagnóstico molecular más frecuentes y variadas, es seguro que se necesitarán algunos instrumentos automatizados especiales.

De la misma forma que coincide con Kubalady et al. ³⁹ en su estudio encontro que la arquitectura del tejido y las características de los bordes celulares del alcohol y la acetona resultaron satisfactorias en comparación con fijadores: formol (10%),

Los estudios anteriores demuestran que los nuevos fijadores tienen una variedad de ventajas por su fácil uso, se integran fácilmente en la infraestructura actual para la recolección y el procesamiento de muestras, y realizó una evaluación histológica del tejido de manera comparable. Pero la selección de la técnica adecuada ayudará a la calidad de los procesos. Los resultados mejoran la calidad de la preservación y fijación del tejido con Formol Bufferado. Por ejemplo, el propóleo se puede utilizar como medio provisional para preservar biopsias de tejido antes de la fijación con Formol Bufferado.

Es así que Farzaneh et al. ²³ explica que el formaldehído tiene propiedades como fácil uso, rentabilidad, conservación y rápida permeabilidad a los tejidos. Mientras que Bugshan et al. ²⁶ el formaldehído se considera la solución fijadora estándar de oro por sus atributos. Sin embargo, tiene efectos secundarios preocupantes, como propiedades cancerígenas y potencialmente irritantes.

Los estudios anteriores demuestran que, por las desventajas de formaldehído, que es la mayormente citada por los autores, muestran la concentración de esfuerzos en encontrar fijadores alternativos del formol. Una de esas opciones son los fijadores a base de alcohol se

encuentran entre las opciones más adecuadas. También se han desarrollado estudios de fijadores naturales, pero hay limitada información por lo cual se usará formol de manera habitual hasta obtener mejores evidencias.

Wu et al.⁴⁴ explica que los tiempos de fijación constituyen un parámetro crítico en términos de preservación de los tejidos de manera óptima, por lo cual son variables entre sí, los hallazgos presentan diferencias por lo cual se requiere adecuada planificación, presentan tiempos cortos e incluso largo, aunque se sugiere tiempos cortos en el caso de la Formol Bufferado

Stefanakis et al.²⁷ explica que las preocupaciones sobre la seguridad de los efectos tóxicos y cancerígenos de la exposición a la formol han atraído cada vez más atención a la búsqueda de fijadores alternativos de bajo riesgo para el procesamiento de muestras de tejido. Además el autor Howat & Wilson¹⁸ nos menciona que el fijador Bouin no es útil para biopsias renales ya que provoca distorsión, así mismo endurece la muestra dificultando el corte histológico.

El formaldehído es un fijador ampliamente utilizado, pero la exposición conlleva riesgos potenciales que constituye una de las desventajas más críticas, por lo cual se buscan nuevas opciones. Los estudios muestran opciones para brindar entornos más seguros y opciones alternativas, pero que necesitan evaluarse en futuras investigaciones.

Tabla 4. Uso correcto del tiempo de fijación

Título	Autor	Tipo de estudio	Muestra	Tiempo de fijación
Fijadores: un estudio innovador.	Rajanikanth et al. ⁴¹	Estudio experimental	El estudio se llevó a cabo utilizando tejido lenguas	El Formol Bufferado Neutro al 10%. puede fijar tejidos 1 mm por hora es decir en un tiempo de 12 – 24 horas.
Preparación de hemisferios cerebrales para Disección de Tractos.	Guerrero et al. ³⁷	Revisión bibliográfica y sistemática	Del total de hemisferios cerebrales analizados fue de 410	El tiempo de fijación con formol varió de 10 a 180 días, con una temperatura y tiempo de congelación de -10 °C y -20 °C durante 8 a 30 días.
Evaluaciones histomorfológicas y moleculares de los tiempos de fijación comparando fijadores.	Chung et al. ⁴²	Estudio experimental	Los riñones y el bazo de se fijaron como órganos completos. El hígado se diseccionó hasta un espesor de 2 a 3 mm antes de la fijación.	El fijador Zenker posee un tiempo de penetración entre 2 y 4 horas en tejidos pequeños y en tejidos grandes tiene un máximo de 24 horas.
Efectos de la fijación a corto y largo plazo en tejidos.	Panzacchi et al. ⁴³	Estudio experimental	En necropsia se recogieron bazo, hígado y riñón de catorce humanos	La fijación con alcohol a corto y largo plazo, la morfología del tejido y los detalles celulares de los tejidos, se conservaron de manera óptima en comparación con la fijación con Formol Bufferado Neutro al 10%. La inmunorreactividad de las proteínas mostrando resultados satisfactorios cuando el período de fijación no superó 1 año.

Tabla 5. Poder de penetración de los tejidos

Título	Autor	Tipo de estudio	Muestra	Poder de penetración
Fijadores con formol para la fijación de tejido testicular	Cabrera et al. ⁴⁵	Estudio experimental	Para el ensayo de penetración, se cortaron 84 cubos de tejido testicular	Los fijadores a base de etanol mostraron buenas tasas de penetración, baja contracción del tejido y conservaron una morfología suficiente para permitir la identificación de las etapas del ciclo del epitelio seminífero.
Efectos de la fijación y almacenamiento de muestras de tejido humano	Nam et al. ⁴⁶	Estudio experimental	Muestra del tejido canceroso gastrointestinal	Todas las muestras fijadas con Formol Bufferado Neutro al 10% tiene una velocidad cerca de 1 mm x hora.
La fijación de tejidos con Formol Bufferado	Berrino et al. ²⁴	Estudio comparativo de cohorte y diseño experimental	27 muestras de tejido (10 de normales, 17 de lesiones tumorales de pulmón, mama, colon, páncreas, riñón y tejido adiposo.	Se observó que la penetración es estable en el tejido fijado en comparación con los tejidos fijados con formalina.
Fijación con fijadores con formol	Rahman et al. ⁴⁷	Estudio experimental	Se recogieron muestras de tejido fresco del hígado (lóbulo derecho) y del cerebro (corteza cerebral).	Los resultados de la fijación con fijadores que poseen formol tienen una rápida penetración de los tejidos, y se fijó idealmente tan pronto como a las 8 h de la fijación.

En la tabla 4 y 5 ostenta el uso correcto del tiempo de fijación y poder de penetración en los tejidos. La sustancia fijadora más utilizada es el Formol Bufferado Neutro ya que posee tiempo y capacidad de penetración eficiente y rápida, así mismo depende de las características y el tamaño de la muestra.

Discusión

Rajanikanth et al. ⁴¹ explica que los tejidos fijados con Formol Bufferado e incluidos en parafina (FFPE) se han utilizado ampliamente en las investigaciones. Al igual que el autor Guerrero et al. ³⁷, en su estudio el tiempo de fijación varió de 12- 24, con una temperatura y tiempo de congelación de -10 °C y -20 °C durante 8 a 30 días. Mientras que Chung et al. ⁴² indica que el fijador Zenker posee un tiempo de fijación entre 2 y 4 horas en piezas de pequeño tamaño y en los tejidos de más tamaño un máximo de 24 horas.

Además, el autor Panzacchi et al. ⁴³ explica que depende del tipo de tejido, la sustancia y la estandarización de los procedimientos utilizados y su aplicación. Los tres estudios explican que se encontró que un tiempo prolongado de fijación de Formol Bufferado es un factor limitante para la detección exitosa de proteínas o ácidos nucleicos, probablemente debido a la actividad de entrecruzamiento del Formol Bufferado entre proteínas, ARN y ADN.

Cabrera et al. ⁴⁵ explica que la necesidad de estandarizar los métodos sin Formol Bufferado y armonizar el diagnóstico en los departamentos de patología de todo el mundo. Los estudios revisados se centran en desarrollar un análisis comparativo de los rendimientos, estableciéndose diferentes opciones, pero todavía existe mayor preferencia por Formol Bufferado. Nam et al. ⁴⁶ en cambio indica que el formaldehído es el fijador de mayor preferencia por su rendimiento en las tasas de penetración tiene una velocidad cerca de 1 mm x hora, aunque se han probado nuevas opciones por sus desventajas. Por ejemplo, EMA es una alternativa potencial porque los resultados de la fijación fueron satisfactorios y preservan los tejidos.

De acuerdo a los estudios anteriores, se han usado diferentes opciones en la revisión sistemática se menciona los fijadores naturales que mostraron resultados prometedores en la fijación de tejidos. Sin embargo, optimizar las concentraciones y condiciones de los fijadores naturales es difícil debido a los diferentes componentes químicos y pasos de producción. Se necesitan estudios más completos para su aplicación³². También se indican otras alternativas, por ejemplo, la fijación a base de alcohol es la alternativa superior a Formol Bufferado para la preservación de la morfología del tejido. Sin embargo, es necesario estandarizar los métodos sin Formol Bufferado y armonizar el diagnóstico en el laboratorio en todo el mundo¹

Los alcoholes son fijadores rápidos, pero siempre producen cierta contracción y endurecimiento del tejido, actúan mediante la coagulación de proteínas y colapsan los ácidos nucleicos que sustancialmente revierten a su tamaño original cuando se rehidratan; Además, la inclusión de metanol y ácido acético en cualquier fórmula fijadora permitirá la fijación de muestras más grandes. La utilización segura puede garantizar buenos resultados ³⁸. Los estudios han sugerido que no se puede utilizar un solo tipo de fijador para la conservación de tejidos para evaluar todos los biomarcadores ²³.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Las diferentes bases de datos científicas analizadas de las publicaciones evaluadas determinan que es importante la estandarización para el manejo adecuado de la fijación de las piezas anatomopatológicas para procedimientos histológicos, la mayor parte de estudios reflejan comparación entre Formol Bufferado y otras sustancias, la primera tiene mayor preferencia por su utilización frecuente y la comprobación de sus resultados. Los hallazgos muestran que algunos tejidos requieren un manejo especial para que la sustancia fijadora llegue a los componentes. Además, muestra la necesidad de evaluar la calidad de la fijación en tiempo real, los protocolos de fijación deben diseñar con base las técnicas de fijación estándar, así garantizar una tinción estandarizada. En general, es necesario garantizar la calidad del proceso de manipulación y procesamiento del tejido, se recomienda la fijación por Formol Bufferado en un 10%, pero en los estudios se aplicó en un 80%, pero dependerá de la concentración, el tipo de sustancia, el tiempo y la temperatura.
- Las ventajas y desventajas de las sustancias que se emplean en la fijación de tejidos en los procesos histológicos dependen de las características de la muestra y sustancia fijadora. Cabe indicar que la fijación de tejido en Formol Bufferado representa el método ampliamente favorecido para el procesamiento de muestras de tejido quirúrgico en patología diagnóstica, entre las ventajas, tiene mejor calidad de preservación y conservación óptima en la fijación del tejido y las desventajas son los efectos tóxicos y cancerígenos de la exposición al Formol Bufferado. Los fijadores con formol y sin formol han surgido como alternativas, la ventaja es que posee una fijación más rápida, pero su lenta adopción no ha permitido mejores evidencias de su capacidad de fijación.
- Los estudios indican que es necesario considerar de manera adecuada el uso correcto del tiempo de fijación, su poder de penetración en los tejidos manteniendo intactas las estructuras en procedimientos histológicos, pero que varía según el tipo de tejido y deben ser adaptado a las necesidades de los estudios experimentales. El tiempo de fijación fue variable entre 10 a 180 días, se usaron tiempos prolongados. Cada fijador tiene su propio tiempo de fijación según los estándares establecidos adaptados a las

necesidades de procedimientos histológicos. Los tiempos de fijación son un parámetro crítico, en el caso del Formol Bufferado se sugieren tiempos cortos.

Recomendaciones

Los profesionales que incursionan en esta área se recomienda realizar estudios de campo porque tienen un aspecto importante en la investigación y permite analizar la calidad de la sustancia fijadora con los tejidos a trabajar, así mismo se verificará la eficiencia del fijador en condiciones reales.

Para los futuros profesionales, se recomienda crear líneas de investigación relacionadas con las características de mejorar el mecanismo de fijación utilizando enfoques analíticos adicionales a través de estudios de metaanálisis para establecer la eficiencia entre las investigaciones, pero con la intervención de un equipo multidisciplinario y la selección de publicaciones de carácter experimental desarrollados en la última década.

Para las instituciones hospitalarias, se recomienda desarrollar un análisis bibliográfico comparativo sobre la aplicación del Formol Bufferado y la tendencia de aplicación de uso de los nuevos fijadores alternativos, su finalidad comparar ventajas y desventajas, pero con modelos estadísticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haque Z, Rahman MA, Khan MZI, Hussan MT, Alam MM. Alcohol-based fixatives can better preserve tissue morphology than formalin. *Int J Morphol* [Internet]. 2020;38(5):1371–5. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022020000501371
2. Poveda H, Calvache Z. Conocimiento sobre la técnica de fijación de muestras anatomopatológicas por parte del personal que labora en una institución prestadora de servicios de salud hospital San José [Internet]. Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud; 2021. Disponible en: <https://repositorio.fucsalud.edu.co/handle/001/1946>
3. Hoyos B. Alternativas al formol como fijador y conservador de estructuras y tejidos en los laboratorios de patología [Internet]. Universidad Autónoma de Manizales; 2022. Disponible en: https://repositorio.autonoma.edu.co/bitstream/11182/1287/1/Alternativas_Formol_Fijador_Conservador_Estructuras.pdf
4. Ceballos A, Sua L, Mejía J, Rodríguez P, Rendón-Henao J, Matute-Turizo G, et al. Guía básica de calidad: preanalítica para el procesamiento de bioespecímenes en patología molecular. Recomendaciones de la Sociedad Colombiana de Patología (ASOCOLPAT). *Patologia (Mex)* [Internet]. 2016;54(3):123–30. Disponible en: <http://www.revistapatologia.com/content/250319/2016-3/10-Ceballos.pdf>
5. Megías M, Molist P, Pombal M. Técnicas histológicas de fijación [Internet]. Universidad de Vigo. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.; 2018. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/391965993/tecnicas-fijacion>
6. Suárez Aguirre ND. Comparación del Fine Fix con el formol en las técnicas de fijación y coloración hematoxilina-eosina y especiales [Internet]. Trabajo de grado - Pregrado. Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud - FUCS; 2021. Disponible en: <https://repositorio.fucsalud.edu.co/handle/001/1826>
7. Universidad de Vigo. Técnicas histológicas. *Atlas Histol Veg y Anim* [Internet]. 2023; Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-fijacion.php>
8. Barragan JL. Técnicas de tinciones especiales para el estudio de patologías en tejidos humanos [Internet]. Trabajo de Titulación. Universidad Nacional de Chimborazo; 2021. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/7935>

9. Tapia MD. Impacto de PH del fijador, tiempo de fijación, tiempo previo sin fijación en la expresividad de marcadores moleculares de inmunohistoquímica. *Anatomía Digit* [Internet]. 2022;5(1). Disponible en: <https://www.cienciadigital.org/revistacienciadigital2/index.php/AnatomiaDigital/article/view/1966>
10. Bello A, Torres C. Desarrollo de un fijador Citológico a nivel laboratorio para la empresa Proquilab LTDA. Proyecto Integral de Grado para optar el título de: Ingeniero Químico. Fundación Universidad de América; 2018.
11. Tresserra F, Martínez Lanao MA, Soler MT. Manejo de las muestras para test inmunohistoquímicos, moleculares y genéticos en el cáncer de mama. *Rev Senol y Patol Mamar* [Internet]. 2016;29(1):26–31. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-senologia-patologia-mamaria--131-pdf-S0214158215001206>
12. Stefanits H, Bienkowski M, Galanski M, Mitulovic G, Ströbel T, Gelpi E, et al. KINFix-A formalin-free non-commercial fixative optimized for histological, immunohistochemical and molecular analyses of neurosurgical tissue specimens. *Clin Neuropathol* [Internet]. 2016;35(1):3–12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4766796/>
13. Shields VDC, Heinbockel T. Introductory Chapter: Histological Microtechniques. En: Heinbockel T, Shields VDC, editores. *Histology* [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.5772/intechopen.82017>
14. Bhat AH, Hussein S. Fixation and different types of fixatives: Their role and functions: A review. *Int J Clin Diagnostic Pathol* [Internet]. 2021;4(4):113–9. Disponible en: <https://www.patholjournal.com/articles/433/4-3-37-909.pdf>
15. De Dios Soler M, Acosta Haab G. Guía de Inmunohistoquímica para Técnicos [Internet]. Instituto Nacional del Cáncer. 2018. 46 p. Disponible en: <http://iah.salud.gob.ar/doc/Documento203.pdf>
16. Fonseca J. La técnica de plastinación, sus fundamentos y alternativas de menor costo. *Gac Ciencias Vet* [Internet]. 2017;22(2):43–7. Disponible en: <https://revistas.uclave.org/index.php/gcv/article/view/321/162>
17. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob J Health Sci* [Internet]. 2015;8(3):72–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4804027/>

18. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* [Internet]. noviembre de 2014;70(1):12–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4240801/>
19. Hernández L. Biopsia de la médula ósea. Perspectiva clínico-patológica [Internet]. Dacie y Lewis. *Hematología Práctica*. Fundación Española de Hematología y Hemoterapia; 2017. 99–111 p. Disponible en: https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2018/08/Biopsia_de_la_médula_ósea_2ª_edición_2017.pdf
20. Carriel V, Campos F, Aneiros-Fernández J, Kiernan JA. Tissue fixation and processing for the histological identification of lipids. *Methods Mol Biol*. 2017;1560(February):197–206.
21. Espitia LS, Malagón LM, Montenegro LM. Informe de pasantía de macroscopía anatomopatológica [Internet]. Proyecto de grado. Fundación Universitaria Ciencias de la Salud; 2022. Disponible en: <https://repositorio.fucsalud.edu.co/handle/001/1823>
22. Romero Rojas N, Chavez Torres H, Abad Licham M, Maquera G, Arenas Gamio JL, Castro H, et al. Recomendaciones para el procesamiento de muestras y necropsias en anatomía patológica ante la pandemia de la COVID-19. *Rev Peru Ciencias la Salud* [Internet]. 2021;3(4):e356. Disponible en: <http://revistas.udh.edu.pe/index.php/RPCS/article/view/356e/222>
23. Farzaneh S, Jadidi-Niaragh F, Ehsan S, Sattar A, Akbari E, Abedian S, et al. Characterization of Fixatives and their Application in Histopathology. *Biomed J Sci Tech Res* [Internet]. 2023;47(5):38945–53. Disponible en: <https://biomedres.us/pdfs/BJSTR.MS.ID.007563.pdf>
24. Berrino E, Annaratone L, Detillo P, Grassini D, Bragoni A, Sapino A, et al. Tissue Fixation with a Formic Acid-Deprived Formalin Better Preserves DNA Integrity over Time. *Pathobiology* [Internet]. 2023;90(3):155–65. Disponible en: <https://karger.com/pat/article/90/3/155/836425>
25. Suarez DL. Cumplimiento de los procedimientos para la Fijación de biopsias en el hospital de especialidades [Internet]. Tesis para optar el grado académico en Maestro en Salud Pública. 2021. p. 1–80. Disponible en: <https://repositorio.unp.edu.pe/handle/20.500.12676/3562>
26. Bugshan AS, AlJanobi HA, AlMunif RA, AlShubaili RR, AlHarbi NM, Khusheim SA, et al. Propolis as a Potential Novel Histological Tissue Fixative: A Preliminary

- Analysis. Appl Sci [Internet]. 2022;12(19). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/19/9842>
27. Stefanakis M, Lorenz A, Bartsch JW, Bassler MC, Wagner A, Brecht M, et al. Formalin Fixation as Tissue Preprocessing for Multimodal Optical Spectroscopy Using the Example of Human Brain Tumour Cross Sections. *J Spectrosc* [Internet]. 2021;55. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jspec/2021/5598309/>
 28. Dewi AK, Anwar C, Komohara Y. Brain structure morphology after being fixated with ethanol on electron microscope. *Int J Morphol*. 2020;38(2):305–8.
 29. Al-Sabawy HB, Rahawi AM, Al-Mahmood SS. Standard techniques for formalin-fixed paraffin-embedded tissue: A Pathologist's perspective. *Iraqi J Vet Sci* [Internet]. 2021;35(1–3):935–43. Disponible en: https://www.mosuljournals.com/article_169996.html
 30. Díaz N. Manual de procedimientos en anatomía patológica Manual de procedimientos en anatomía patológica [Internet]. Quito: Roche; 2010. Disponible en: https://www.academia.edu/36641273/MANUAL_PROCEDIMIENTOS_ANATOMIA_PATOLOGICA
 31. Lahiri P, Mukherjee S, Ghosh B, Das D, Lahiri B, Varshney SK, et al. Comprehensive evaluation of paxgene fixation on oral cancer tissues using routine histology, immunohistochemistry, and ftir microspectroscopy. *Biomolecules*. 2021;11(6).
 32. Yee A, Synn P, Nway S, Wei-Jet L, Chia VC, Krishnappa P. Natural fixatives alternative to formalin in histopathology: A systematic review. *Med J Malaysia* [Internet]. 2023;78(1):98–108. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36715199/>
 33. Singhal P, Sreedhar G, Singh NN, Sharma D, Bannerji S, Gowhar O. Evaluation of histomorphometric changes in tissue architecture due to fixation delay. *J Oral Maxillofac Pathol* [Internet]. 2017;21(1):70–5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406822/>
 34. Gündisch S, Annaratone L, Beese C, Drecol E, Marchiò C, Quaglinò E, et al. Critical roles of specimen type and temperature before and during fixation in the detection of phosphoproteins in breast cancer tissues. *Lab Investig*. 2015;95(5):561–71.
 35. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik O V., Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanolformaldehyde. *Eur J Histochem* [Internet]. 2015;59(3):5–9. Disponible en:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4598599/>
36. Bauer DR, Leibold T, Chafin DR. Making a science out of preanalytics: An analytical method to determine optimal tissue fixation in real-time. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(10 October):1–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0258495>
 37. Guerrero M, Del-Sol M, Ottone NE. Preparación de Hemisferios Cerebrales para Disección de Tractos. *Int J Morphol* [Internet]. 2019;37(2):533–40. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022019000200533
 38. Buesa RJ. Histology without formalin? *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2013;12(6):387–96. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1092913408000816>
 39. Kubalady J, Fathima H, Hosapatna KP. Histomorphological Assessment of Formalin versus Nonformalin Fixatives in Diagnostic Surgical Pathology. *J Lab Physicians* [Internet]. 2020;12(04):271–5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7773438/>
 40. Berrino E, Annaratone L, Miglio U, Maldi E, Piccinelli C, Peano E, et al. Cold Formalin Fixation Guarantees DNA Integrity in Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissues: Premises for a Better Quality of Diagnostic and Experimental Pathology With a Specific Impact on Breast Cancer. *Front Oncol*. 2020;10(February):1–9.
 41. Rajanikanth M, Ravi Prakash A, Sreenath G, Sonia Bai JK, Shyam N V.D. Transit fixatives: An innovative study. *J Clin Diagnostic Res* [Internet]. 2015;9(3):ZM01–3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413175/>
 42. Chung JY, Song JS, Ylaya K, Sears JD, Choi L, Cho H, et al. Histomorphological and Molecular Assessments of the Fixation Times Comparing Formalin and Ethanol-Based Fixatives. *J Histochem Cytochem*. 2018;66(2):121–35.
 43. Panzacchi S, Gnudi F, Mandrioli D, Montella R, Strollo V, Merrick BA, et al. Effects of short and long-term alcohol-based fixation on Sprague-Dawley rat tissue morphology, protein and nucleic acid preservation. *Acta Histochem* [Internet]. 2019;121(6):750–60. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128119301631>
 44. Wu X, Deng C, Su Y, Zhang C, Chen M, Tian K, et al. The effect of prolonged formalin fixation on the expression of proteins in human brain tissues. *Acta*

- Histochem [Internet]. 2022;124(4):151879. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128122000381>
45. Cabrera NC, Espinoza JR, Vargas-Jentzsch P, Sandoval P, Ramos LA, Aponte PM. Alcohol-based solutions for bovine testicular tissue fixation. *J Vet Diagnostic Investig.* 2017;29(1):91–9.
 46. Nam SK, Im J, Kwak Y, Han N, Nam KH, Seo AN, et al. Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic acid preservation. *Korean J Pathol.* 2014;48(1):36–42.
 47. Rahman MA, Sultana N, Ayman U, Bhakta S, Afrose M, Afrin M, et al. Alcoholic fixation over formalin fixation: A new, safer option for morphologic and molecular analysis of tissues. *Saudi J Biol Sci [Internet].* 2022;29(1):175–82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8716893/>

ANEXOS

Anexo 1. Fijación de tejidos



Figura 1: Proceso de fijación en biopsia

Anexos 2. Fijación con formol

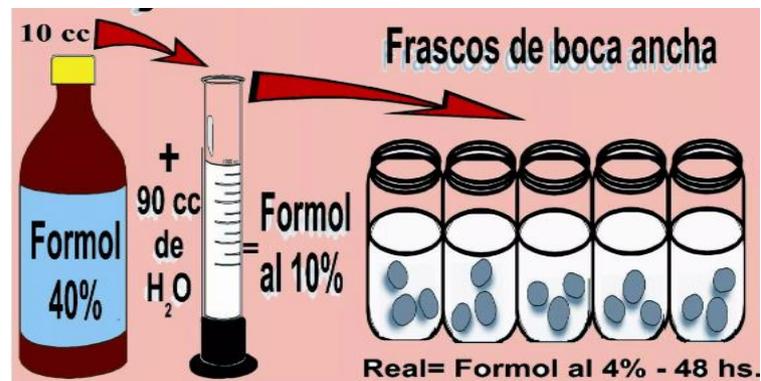


Figura 2. Sustancia fijadora con formaldehído

Fuente: Tamayo 2021: <https://prezi.com/p/ix5skak2tr4o/tecnica-histologica-fijacion/>

Anexo 3. Sustancias que componen de KINFix

Ilustración 2. Componentes de KINFix

Ingrediente	Cantidad	Costos	Producto	Almacenamiento	Declaraciones de peligro
ddH ₂ O	2,463 mL	N/A	Producción interna	RT	Ninguno
Ácido acético 100%	537 mL	21.40 €	VWR, BDH, productos químicos Prolabo #20104.298	RT	H226, H303, H312, H314, H317, H331.H402
trehalosa	480 g	471.40 €	Roth #5151.3	RT	H303
Etanol 100%	5,000 mL	106.80 €	VWR, BDH, productos químicos Prolabo #20821.330	RT	H225, H315, H320, H335, H401
Total	8,000 mL	599.60 €			

Nota. Componentes de KINFix. Costos de las alícuotas utilizadas para 8.000 mL de solución de trabajo (en base al precio del producto utilizado en nuestro laboratorio). Declaraciones de peligro según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos.

Anexo 4. Recopilación de muestras de tejidos



Figura 3: Recopilación de muestras tanto para muestras de tejido fresco como fijadas con Formol Bufferado

Anexo 5. Fijación de tejidos

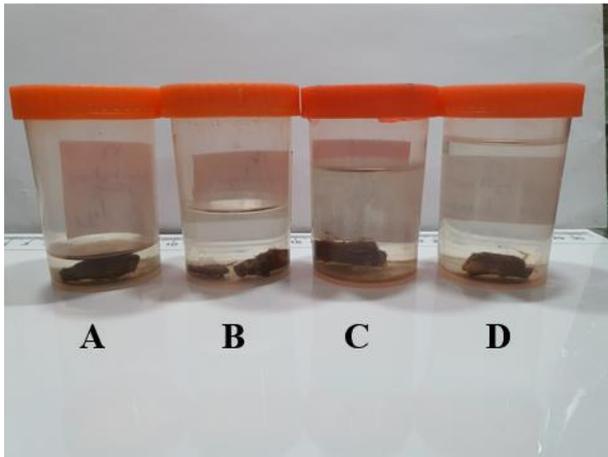


Figura 4. Fijación de tejido

Nota: Fijación de tejido, los contenedores A y B tienen una solución fijadora inadecuada, mientras que el contenedor C tiene el volumen apreciado de fijador, mientras que el contenedor D tiene la proporción perfecta de volumen de fijador a tejido.

Anexo 6. Diferencias entre tejido fijo y fresco de hígado



Figura 5. Fijación de tejidos y diferencias

Nota: Fijación de tejidos: las diferencias entre fijo y tejidos frescos del hígado.

Anexo 7. Muestras de tejidos fijados en Formol Bufferado

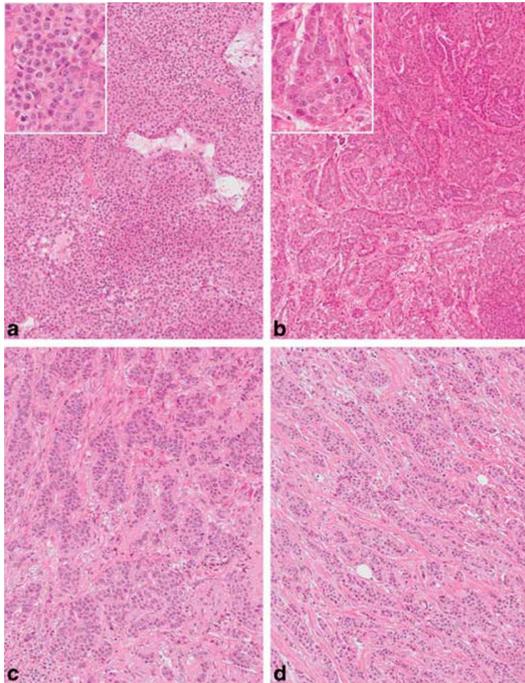


Figura 6. Muestras de tejidos fijados en Formol Bufferado

Nota. Muestras de cáncer de mama fijadas alternativamente en formalina fría (a, c) o en formalina tamponada neutra a temperatura ambiente y teñidas con hematoxilina y eosina. Figuras a y b: cáncer de mama de ratones BALB-neuT. (a) Muestras de tiempo 0, fijadas en formalina fría. (b) Muestra con tiempo de ischemia fría de 5 h a temperatura ambiente, seguido de fijación estándar con formalina tamponada neutra a temperatura ambiente. Tenga en cuenta que la morfología es similar mientras que, como se muestra en la Figura 3, la conservación de los marcadores de fosfoproteínas es dramáticamente diferente. (c y d) Carcinoma de mama humano (mismo caso), fijado alternativamente en formalina fría (c) o en formalina a temperatura ambiente (d). Las características histológicas no se ven afectadas por la temperatura del fijador (aumento: 200 ×; recuadros en las figuras a y b: 400 ×)

Anexo 8. Cerebelo observado al microscopio óptico

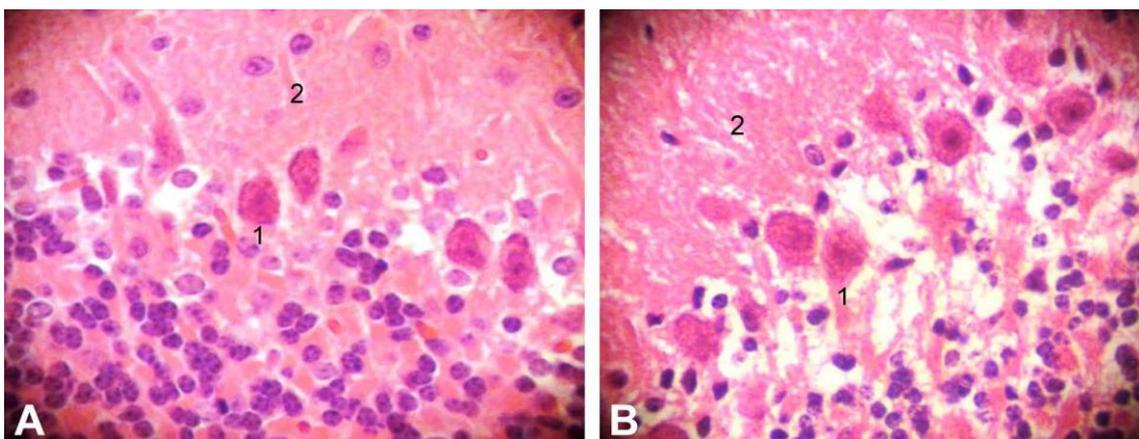


Figura 7. Cerebelo observado al microscopio óptico

Nota. Cerebelo observado al microscopio óptico con 400 aumentos, tinción HE. A. 10% BF; B. 50 % de etanol (1. Célula de Purkinje, considerando membrana celular y núcleo, 2. Neutrófilo).

Anexo 9. Comparación en diferentes soluciones de fijación

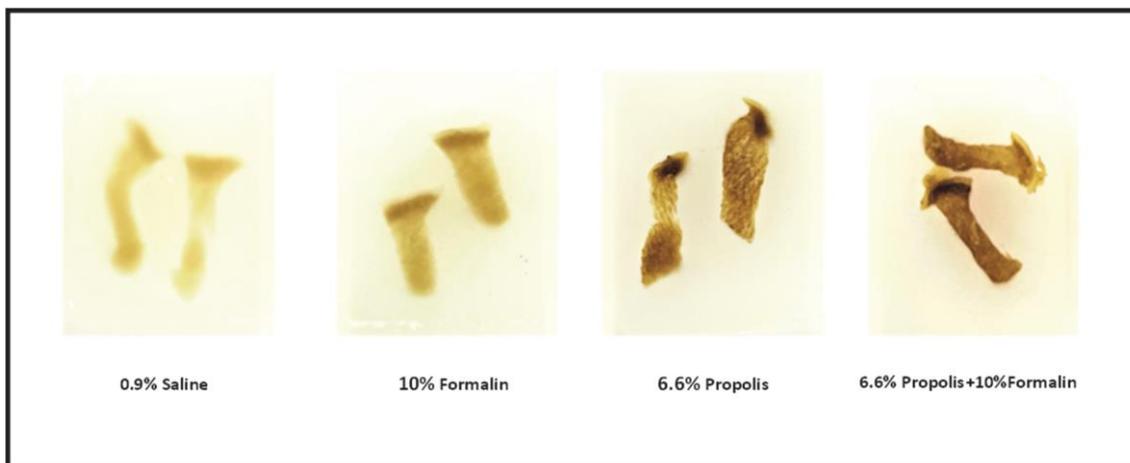


Figura 8. Bloques incluidos en cera de parafina

Nota. Bloques incluidos en cera de parafina que muestran una coloración marrón oscura en los tejidos colocados en propóleo al 6,6% en comparación con los colocados en otras soluciones.