



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS
BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



**IMPLEMENTACION DEL FORMOL BUFFERADO COMO LÍQUIDO FIJADOR
IDEAL DE TEJIDOS.**

AUTORES:

**LUIS F. BRICEÑO S.
RENNY J. GUZMÁN G.
LUIS V. MARÍN P.**

TUTOR:

LIC. GREICY GUTIERREZ.

Año: 2013.

VALENCIA, OCTUBRE DE 2013.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS
BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



IMPLEMENTACION DEL FORMOL BUFFERADO COMO LÍQUIDO FIJADOR
IDEAL DE TEJIDOS.

AUTORES:

LUIS F. BRICEÑO S.
RENNY J. GUZMÁN G.
LUIS V. MARÍN P.

TUTOR:

LIC. GREICY GUTIERREZ.

Año: 2013.

RESUMEN.

Para la preservación de la microanatomía en el estudio histopatológico se ha comprobado que una correcta fijación es la base esencial para lograr un diagnóstico veraz, evitándose así diagnosticar falsos negativos ocurridos por una inadecuada fijación. **Objetivo:** Sustituir el uso de la formalina al 10% mediante a la implementación del formol bufferado como el líquido fijador. **Metodología:** se realizara un estudio de tipo documental, basado en la recolección de datos, en la experiencia y conocimientos obtenidos en el laboratorio de procesamiento de biopsias y citología. **Recomendaciones:** Se sugiere la solución de formol bufferado como fijador ideal de tejidos para prevenir los efectos indeseados de fijación que pueden producirse fundamentalmente en cambios conformacionales de proteínas y otros componentes titulares. **Conclusión:** Hoy en día tanto patólogos como histotecnólogos de larga trayectoria y experiencia en el campo, sugieren la implementación del formol bufferado como líquido fijador ideal de tejido. Es preciso destacar que la utilización de la formalina al 10% como fijador ya no es recomendada, como se demostró en el cuadro comparativo, donde se especificaron las desventajas de su utilización.

Palabras Claves: Fijador, Formol, Tejido, Muestra.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS
BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



IMPLEMENTATION OF FORMALDEHYDE BUFFERED AS IDEAL OF TISSUE
FIXATIVE LIQUID.

AUTORES:

LUIS F. BRICEÑO S.
RENNY J. GUZMÁN G.
LUIS V. MARÍN P.

TUTOR:

LIC. GREICY GUTIERREZ.

Año: 2013.

ABSTRACT

For the preservation of the microanatomy the study histopathological found that a correct fixation is the essential basis to achieve a diagnosis truthful, avoiding diagnose false negatives resulting from an inadequate fixation. **Objetive:** replace the use of formalin 10% through the implementation of the formalin buffer as the liquid fixative. **Methodology:** a documentary study, based on data collection, and the experience and knowledge obtaine in the processing of biopsies and cytology laboratory. **Recommendations:** The solution of formalin, buffered as ideal tissue fixative is recommended to prevent the unwanted effects of fixation that may occur primarily in conformational changes of proteins and other components of the holders. **Conclusion:** today both pathologists and histotecnologos of long history and experience in the field, suggest the implementation of buffered formaldehyde as ideal tissue fixative liquid. It should be noted that the use of formalin 10% as a fixative already is not recommended, as demonstrated in the comparative table, where the disadvantages of use specified.

Palabras Claves: Fixative, formalin, tissue, shows.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS
BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



CONSTANCIA DE APROBACION

Quienes suscribimos, Prof. Lisbeth Loaiza, Directora de la Escuela; y Prof. Maira Carrizales, Coordinadora del Comité de Investigación y producción Intelectual de la Escuela. Hacemos constar que una vez obtenidas las evaluaciones del tutor y jurado evaluador de la presentación escrita del trabajo final de grado titulado: **IMPLEMENTACION DEL FORMOL BUFFERADO COMO LÍQUIDO FIJADOR IDEAL DE TEJIDOS**, presentado como requisito para obtener el título de Técnico Superior Universitario en Histotecnología, el mismo se considera Aprobado.

En Valencia, a los Veintiún días del Mes de Octubre del año Dos Mil Trece.

Prof. Lisbeth Loaiza
Directora

Prof. Maira Carrizales
Coordinadora



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS
BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



CONSTANCIA DE ENTREGA

La presente es con la finalidad de hacer constar que el Trabajo Monográfico titulado:

**IMPLEMENTACION DEL FORMOL BUFFERADO COMO LÍQUIDO FIJADOR
IDEAL DE TEJIDOS.**

Presentado por los bachilleres:

LUIS BRICEÑO C.I. 24.300.418.

RENNY GUZMÁN C.I. 24.499.388.

LUIS MARÍN C.I. 22.225.188.

Fue leído el trabajo monográfico y se considera que cumple con los parámetros metodológicos exigidos para su aprobación. Sin más a que hacer referencia, se firma a los 24 días del mes de octubre del año 2013.

LIC. GREICY GUTIERREZ

C. I. N° 11.153.438

Firma



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS
BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



CONSTANCIA DE ENTREGA

La presente es con la finalidad de hacer constar que el Trabajo Monográfico titulado:

**IMPLEMENTACION DEL FORMOL BUFFERADO COMO LÍQUIDO FIJADOR
IDEAL DE TEJIDOS.**

Presentado por los bachilleres:

LUIS BRICEÑO C.I. 24.300.418.

RENNY GUZMÁN C.I. 24.499.388.

LUIS MARÍN C.I. 22.225.188.

Fue leído y se considera apto para su presentación desde el punto de vista metodológico, por lo que tienen el derecho de hacer la presentación final de su **TRABAJO MONOGRÁFICO**. Sin más a que hacer referencia, se firma a petición de la parte interesada a los 11 días del mes de Octubre del año 2013.

Tutor: LIC. GREICY GUTIERREZ

C. I. N° 11.153.438.

Firma

INDICE DE CONTENIDO.

Contenido.	Pag.
• INTRODUCCIÓN	8.
• DESARROLLO	9-15.
• CUADRO COMPARATIVO, FORMOL BUFFER- FORMALINA.	15.
• CONCLUSIÓN	16.
• RECOMENDACIONES	17.
• BIBLIOGRAFÍA	18.
• ANEXOS	19.

INTRODUCCION.

La fijación es el empleo de sustancias químicas individuales o mezclas de sustancias, para la conservación de la estructura del tejido en forma permanente. Es esencialmente un método para la preservación de la morfología y composición química de la célula. Durante la fijación, se detienen los procesos posmortem y las estructuras se conservan con un mínimo de artificios, preparándolas para tratamientos ulteriores.

Magariños G., hace referencia a la fijación como un método para la preservación de la morfología, la composición química de las células y los tejidos, que consiste en producir la muerte de las células, de manera tal que las estructuras que poseían éstas en el estado viviente se conserven con un mínimo de modificaciones a lo largo del tiempo y de los siguientes pasos que confieren a la técnica histológica.

Mediante la fijación se evitan y se previenen los cambios autolíticos que se producen en los tejidos, a menudo favorecidos por agentes infecciosos, inflamaciones y por un mal manejo físico después de la obtención de la muestra. Es importante decir que el proceso de fijación no solo preserva los tejidos deteniendo la autólisis sino que también permite que los tejidos permanezcan sin cambios luego de subsecuentes tratamientos, provocando que se endurezcan ligeramente pero no se fragmenten permitiendo que las estructuras tisulares no se encojan y que estén muy cerca del estado in vivo.

Para la preservación de la microanatomía en el estudio histopatológico se ha comprobado que una correcta fijación es la base esencial para lograr un diagnóstico veraz, evitándose así diagnosticar falsos negativos ocurridos por una inadecuada fijación. Ante todo lo expuesto anteriormente, surge la siguiente interrogante

¿Se puede generar una mala fijación si no se emplea un correcto fijador?

DESARROLLO.

Un fijador es aquella sustancia o solución que es capaz de inmovilizar y estabilizar los elementos celulares, preservar los tejidos de la putrefacción y la acción autolítica que se generan tras la muerte celular, confiriéndole al tejido una leve firmeza que permite su manipulación, evitando las alteraciones morfológicas y estructurales que pudieran ocasionarse debido al procesamiento histológico, manteniendo intacta la cito arquitectura, la ultra estructura tisular y preservando sus características moleculares. (1)

Los fijadores se clasifican generalmente en:

- Físicos
- Químicos simples
- Mezclas fijadoras.

Los métodos físicos empleados para la fijación son el calor, la desecación y el microondeado, aunque el frío se utiliza en ocasiones como alternativa a la fijación. El calor produce artificios de retracción violentos y desnaturaliza severamente la estructura proteica, por lo cual casi no se lo emplea. La desecación se emplea para fijar extendidos celulares realizados directamente sobre los portaobjetos a partir de material fresco (por ejemplo una gota de sangre). El microondeado, recientemente incorporado como método de fijación, produce agitación molecular. (2)

Los fijadores químicos se pueden clasificar según su estado físico, según su acción sobre las proteínas en coagulantes y no coagulantes y también se pueden clasificar por su característica oxidante o reductora que le confiere a la célula ciertas condiciones que posibilitan una mejor aplicación de la sustancia colorante, por ejemplo: el alcohol etílico absoluto conserva el glucógeno, el bicloruro de mercurio provoca que las anilinas colorean más brillantes a las fibras colagenas, el bicromato de potasio facilita la coloración de las mitocondrias, el ácido acético permite una mejor tinción de los núcleos, el cloruro de calcio conserva y insolubiliza los lípidos.(2)

Los fijadores No Coagulantes: Producen un efecto aditivo con las proteínas; formaldehído, tetróxido de osmio, ácido acético. (3)

Los fijadores coagulantes: Producen grave alteración de la estructura proteica, desnaturalización y sin embargo hay una buena conservación de los carbohidratos; etanol, metanol, ácido pícrico, cloruro de mercurio. (3)

Las mezclas fijadoras son un conjunto de fijadores que se utilizan a un mismo tiempo para aprovechar las cualidades más sobresalientes de cada uno. Por ejemplo el Carnoy combina al etanol con el ácido acético, ambos muy buenos fijadores para cromatina. El Bouin posee formol, fijador con gran poder de penetración pero lento para actuar, con el ácido acético de gran velocidad penetración y muy buen fijador nuclear, ambos sumados al ácido pícrico que actúa principalmente a nivel citoplasmático. Se lo emplea mucho en biopsias de médula ósea por ser además un buen descalcificador y en biopsias testiculares por sus resultados empíricos. (2)

En la actualidad los fijadores más utilizados para la rutina diaria en los laboratorios de anatomía patológica son los químicos simples y las mezclas fijadoras. Para la elección del fijador a emplear, se deben tomar algunas consideraciones en cuenta como lo es, el tipo de muestra que se desea fijar, los efectos a corto y largo plazo del fijador sobre la muestra y deben poseer ciertas características tales como:

- Prevenir la autólisis
- Preparar el tejido para el procesamiento posterior.
- Prevenir el daño osmótico.
- Preparar al tejido para la tinción posterior.
- Endurecer el tejido para facilitar su fácil sección, sin que se provoque excesiva retracción o hacerles quebradizos.
- Hacer que los componentes tisulares resistan la extracción por el agua y los solventes orgánicos.

- Preservar el tejido en un estado similar al estado vivo. (3)

A pesar de estas características que son utilizadas a nivel mundial, no existe un fijador que cumpla con todos estos requerimientos, pero si se ha establecido un fijador denominado como “universal” por su capacidad de fijar una gran variedad de tejidos, por su fácil manipulación, sus características aportadas cuando se emplea en conjunto con otros fijadores y por acarrear menos artificios al tejido, este fijador es conocido con el nombre de Formalina o formol (nombre comercial). Es utilizado en casi todos los laboratorios de España, Hispano América, el Reino Unido y Rusia, en otros países es el fijador de preferencia en cerca del 67%. (4)

Con el nombre de formol se conoce la solución acuosa al 40% de formaldehído. Esta solución se diluye al 10% en agua para su utilización y recibe el nombre de formalina o formalina al 10%, en esta solución el formaldehído se encuentra al 4%. El formaldehído se utiliza en esta disolución porque en condiciones normales es un gas. La solución de formalina al 10% tiene un extraordinario poder de penetración a los tejidos, pudiéndose fijar con ella piezas relativamente grandes, pero su velocidad de penetración y de fijación es lenta, demorando para ello no menos de 8 horas y siendo lo óptimo entre 12 y 24 horas. (2)

Su uso se inició durante la última década del siglo XIX, Primero como antiséptico al 10% v/v de concentración de formaldehído, sin embargo ninguna fórmula de fijadores publicadas entre 1841-1879 contenía formol, entre 1880-1899 aparece en 25 de 159 fórmulas de fijadores publicadas, Entre 1900-1954 el formol forma parte de 193 de 413 fórmulas de fijadores publicadas, en total entre 1841-1954 se publicaron 585 fórmulas de fijadores y el formol aparece en 217 de ellas. (4)

Desde el punto de vista químico el formol posee dos cualidades esenciales, la primera es de ser una pequeña molécula de modo de poder “acomodarse” entre las moléculas de la materia viviente. El formol actúa sobre el tejido formando puentes cruzados con los grupos amino, carboxilo e indol de las proteínas y dando lugar a fuertes uniones entre moléculas proteicas, y se produce entonces uniones de metileno no solo en una misma proteína sino que además lo hace con otras moléculas proteicas adyacentes, este efecto se conoce como cross-linking

(por su nombre en ingles), por esta característica es llamado fijador formador de puentes cruzados o fijador no coagulante. (3)

El Formaldehído corresponde a la formula HCHO constituida por 1 carbono, 1 grupo aldehído. La solución fijadora de formaldehído actúa sobre la célula cuando una unión entre su grupo aldehído y los grupos NH_2 de las proteínas.

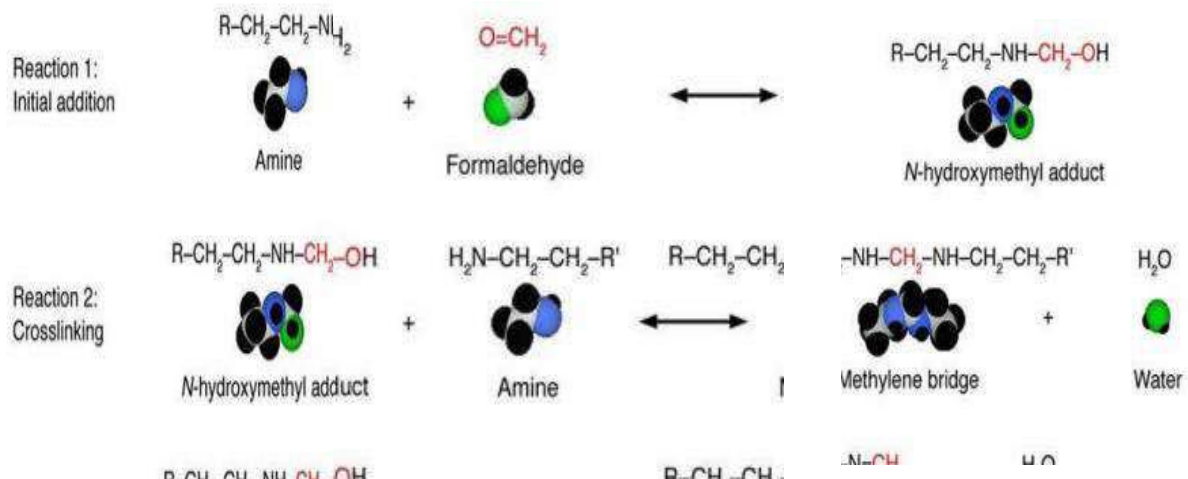


Fig. 1: Interacción de la molécula de formol con los grupos amino de la célula.

EL formol Coagula las proteínas en la célula pero no permite que estas se precipiten.

La solución de formalina al 10% corresponde a ser una degradación de formol puro (37-40% Formaldehído) en agua destilada, es muy utilizada en los laboratorios de anatomía patológica como solución fijadora de rutina, por los amplios beneficios que el formaldehído aporta al tejido, entre los cuales están:

- Su penetración en el tejido es 1 mm por hora.
- Es bactericida y fungicida.
- No produce endurecimiento ni retracción tisular.
- Es un fijador y conservador.
- Compatible con la mayoría de tinciones.
- Su velocidad de penetración esta en relación-temperatura.

Hoy en día esta solución está pasando a un plano inferior en lo que respecta a su utilización ya que a pesar de sus amplias características positivas sobre el tejido, el formol puro o diluido es un mal fijador pues acarrea ciertas consecuencias que producen que el tejido o muestra posterior a la fijación sean inadecuadas para el estudio diagnóstico, las principales consecuencias que con lleva la fijación con de solo formalina al 10% son:

- Produce hinchamiento de los tejidos
- En órganos muy vascularizados el formol produce pigmentos formólicos.
- Degrada en ácido fórmico, el cual actúa en el tejido de forma negativa
- Al estar las muestras sumergidas en formalina durante tiempo prolongado hace imposible la recuperación antigénica.
- Vacuoliza las células o bien les da una apariencia de sobre fijación.
- Disminuye los contrastes entre citoplasma y núcleo.
- Produce cambio osmótico.
- Es de tendencia acidófila por lo que no todos los colorantes se expresan en su totalidad. (5)

A pesar de estas consecuencias la formalina al 10% es el fijador de rutina más utilizado en los centros públicos de salud del estado Carabobo, ya que es un fijador de bajo costo, de fácil manipulación y su preparación es sencilla. Seguir usando este fijador para las piezas patológicas no es recomendable, ya que las consecuencias que acarrea consigo no son favorables para el tejido y por consiguiente para un buen diagnóstico.

Para solventar estas deficiencias de la formalina al 10% era sugerible acompañar su uso con carbonato de calcio, que neutraliza su degradación en ácido fórmico. Esta solución es conocida con el nombre de formol neutro, a pesar de obtenerse mejores resultados que con solo formalina al 10%, poseía un gran inconveniente que era el de formar pequeños depósitos de calcio los cuales constituían un grave problema en su procesamiento.

Hoy en día se propone con este proyecto dar a conocer de la solución de formol bufferado para su implementación en los centros de salud del estado Carabobo en comparación a formalina al 10%, con la principal finalidad de mejorar la calidad del procesamiento de la muestra y así de esta manera evitar falsos negativos producido esencialmente por la mala elección del agente fijador.

El formol bufferado es una solución que corresponde de igual manera que la formalina al 10% a una degradación de formol puro, con una diferencia en este caso que va presente el agregado de las sales monobásicas y dibasicas para neutralizar y poder así estabilizar el pH alcalino de formol consiguiéndose con ello una solución de formol bufferado de pH equivalente entre 6.7 a 7.2 en la escala pH.

El formol bufferado es adoptado casi universalmente en los laboratorios, siendo reconocido por instituciones de alto prestigio en patología como el AFIP (Armed Forces Institute of Pathology) quienes recomiendan su uso.

La formula de preparación del formol bufferado para una solución de 1.000 ml es:

- Formol Puro (37% a 40 %) 100 ml.
- Agua corriente 900ml.
- Fosfato de sodio monobásico 4g.
- Fosfato de sodio dibasico 6,5g.

Tanto para los patólogos como para los histotecnologos la solución de formol bufferado es de preferencia por sus características aportadas al tejido en comparación con la formalina al 10%. En el siguiente cuadro se pueden observar claramente estas diferencias:

Cuadro 1: cuadro comparativo, formol buffer- formalina.

Formol Buffer		Formalina al 10%	
Ventajas.	Desventajas.	Ventajas.	Desventajas.
• Penetración rápida. • Fácil manipulación. • No produce retracción o endurecimiento. • pH neutro. • Mejor conservación a largo plazo. • Proporciona al tejido una mayor afinidad con los reactivos colorantes. • No produce cambios osmóticos. • Mejora el contraste nucleo-citoplasma. • Garantiza una correcta fijación.	• Pigmentación formolica en órganos muy vascularizados. • Toxico.	• Penetración rápida. • Fácil manipulación. • No produce retracción o endurecimiento.	• Degrada en acido formico. • pH alcalino. • Produce pigmentación formolica y apariencia de sobre fijación. • Produce alteraciones osmóticas. • Disminuye el contraste nucleo-citoplasma. • Los elementos acidofilos son resaltados, mas coloreados. • Toxico.

Hechas estas comparaciones, se pueden observar en el anexo 1, algunos de los efectos que se obtienen mediante la fijación con formol buffer en comparación con la fijación en formalina al 10%.

CONCLUSION.

Para la Histotecnología poder visualizar las imágenes de los tejidos al microscopio con la mayor similitud entre la imagen real e imagen equivalente es el objetivo más importante en su función. En la actualidad la solución fijadora más utilizada para la rutina de trabajo en la mayoría de los centros públicos de salud en el estado Carabobo es la formalina al 10%, empleándose sin conocerse las consecuencias y desventajas que conlleva su implementación, la formalina es denominada como fijador “universal” por su bajo costo, su fácil manipulación y las características que aporta al tejido.

A nivel mundial la formalina al 10% ya no es de preferencia como líquido fijador debido a que son mayores los inconvenientes que acarrea que las ventajas aportadas al tejido para su estudio y diagnóstico.

Hoy en día tanto patólogos como histotecnólogos de larga trayectoria y experiencia en el campo, sugieren la implementación del formol bufferado como líquido fijador ideal de tejido. Es preciso destacar que la utilización de la formalina al 10% como fijador ya no es recomendada, como se demostró en el cuadro comparativo, donde se especificaron las desventajas de su utilización.

RECOMENCACIONES.

Se sugiere la solución de formol bufferado como fijador ideal de tejidos para prevenir los efectos indeseados de fijación que pueden producirse fundamentalmente en cambios conformacionales de proteínas y otros componentes titulares o con resultados infructuosos en técnicas tales como hibridación in situ, PCR o enzimo e inmunohistoquímica.

Para lograr una mejor fijación en formol bufferado se sugiere:

- El volumen del fijador debe ser de quince a veinte veces el de la muestra, recordando que primero se coloca el fijador y luego la muestra.
- El tamaño ideal de la muestra a fijar debe ser de 1 x 1 cm, para obtener mejores resultados, ya que el formol en si penetra el tejido 1mm por hora.
- En el caso de neoplasias de gran tamaño se recomienda realizar cortes transversales separados por una distancia de 1cm y paralelos entre si para no retardar el tiempo de fijación.
- El tiempo mínimo de fijación es de 24 horas y para muestras milimétricas de urgencia en el diagnostico el tiempo puede reducirse a 12 horas.
- Si ha de conservarse la muestra por un tiempo prolongado se recomienda cambiar periódicamente el fijador.
- Como recipiente para el envío de muestras se sugiere frascos de boca ancha, plásticos con tapa de rosca. (véase anexo 2)

BIBLIOGRAFIA.

- (1). Prophet E. Instituto de patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP). EEUU: ARP, ed. Métodos Histotecnológicos, Capitulo 4: Fijación de Tejidos.
- (2). Magriño G. Técnica histológica [En línea]. Disponible en: <http://www.dermato101.com.ar/tecnica.pdf>
- (3). Segura L. Curso para técnicos de anatomía patológica. [En línea] Disponible en: http://www.seap.es/c/document_library/get_file?uuid=7b45149e-f73f-4760-a0c4-6fd6ca0812ef&groupId=10157
- (4). Buesa R. Situaciones inseguras y riesgosas en el laboratorio de histopatología. [En línea]. Disponible en: http://apatologicaehistoria.ugr.es/pages/anatomia_patologica/pdf_cursos/gr1situacionesinsegurasenhistopatologia/
- (5). Manual de procedimiento y técnicas histopatológicas [En línea] Disponible en: <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/110/1/MANUALDEPROCEDIMIENTOSYTECNICASHISTOPATOLOGICAS.pdf>
- (6). Laboratorio de procesamiento de biopsia y citología. Licda. Greicy Gutiérrez Muestras para fotografiar.

ANEXOS.

Anexo 1: Mucosa nasal, fijación formol buffer y fijación en formalina al 10%.



Comparación macroscópica de los efectos de la fijación con formol bufferado (A) en comparación con fijación en formalina al 10% (B).

Fotografía tomada Viernes 11/10/13, con teléfono celular Blackberry 9360, en el laboratorio de procesamiento de biopsia y citologías. (6)

Anexo 2: Envases para Muestras.



Sugerencias de envases de boca ancha, con tapa rosada para el envío de muestras ha estudio.

Fotografía tomada Viernes 11/10/13, con teléfono celular Blackberry 9360, en el laboratorio de procesamiento de biopsia y citologías. (6)