

Efecto conservador de soluciones con bajo contenido de formol y sustancias antisépticas en la perfusión arterial de piezas anatómicas

Preservative effect of low formaldehyde and antiseptic content solutions on arterial perfuse of anatomical specimens

Fonseca-Matheus J.¹, Rojas E.¹, Gallardo J.¹, Peraza M.²

¹Área de Anatomía de los Animales Domésticos. Dirección postal: Cabudare estado Lara, Núcleo Héctor Ochoa Zuleta, Decanato de Ciencias Veterinarias, Área de Anatomía de los Animales Domésticos, CP.: 3023.

Teléfono 0251-2592468, e-mail: jfonseca@ucla.edu.ve.

²Área de Patología. Laboratorio de Anatomía Patológica

RESUMEN

Uno de los aspectos más importantes para la enseñanza de la anatomía es la conservación de ejemplares utilizados en la disección. Esta práctica se ve afectada por muchos factores que ocasionan el deterioro del material anatómico, además de convertirlo en un riesgo para la salud de las personas. A este problema se suma el hecho de que el formaldehído recientemente fue declarado como cancerígeno. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de varias soluciones fijadoras-conservadoras alternativas en la perfusión arterial de animales, comparándolas con la solución utilizada rutinariamente en el laboratorio. En estas soluciones alternativas la cantidad de formaldehído utilizado fue reducida y se les adicionaron sustancias con propiedades antisépticas. Los animales empleados para el estudio fueron conejos que se distribuyeron al azar en 4 grupos tratados con soluciones distintas, los mismos fueron disecados y evaluados desde el punto de vista macroscópico. Además, se tomaron muestras de tejido muscular, hepático y cardiaco para la evaluación microscópica y se realizaron cultivos para identificar los hongos observados sobre las piezas afectadas. Se observó que los animales tratados con las soluciones alternativas presentaron características deseables para la disección, la apariencia de los tejidos fue más parecida al animal vivo y no presentaron olor irritante. El tiempo de vida útil de estos ejemplares fue menor que el de los tratados con altas concentraciones de formaldehído, no obstante, representaron un menor riesgo de exposición a este químico. Las soluciones evaluadas permitieron obtener ejemplares adecuados para disección con un tiempo de vida útil menor que los preparados con grandes cantidades de formaldehído.

Palabras clave: Formaldehído, anatomía, disección, fijación.

ABSTRACT

One of the most important aspects for teaching anatomy is the preservation of specimens for dissection. This practice is affected by many factors causing deterioration of the anatomical material, besides making it a health risk to people. This problem is compounded by the fact that formaldehyde was recently identified as a carcinogen. The aim of this study was to determine the effect of various alternative fixing-conservative solutions for arterial perfusion of animals, comparing them with the solution used routinely in labs. In these alternative solutions amount of formaldehyde used was decreased, and substances with antiseptic properties were added. Animals of this study were rabbits randomized into 4 groups treated with different solutions each. All animals were dissected and evaluated macroscopically. Additionally, samples of muscle, liver and heart were taken for microscopic evaluation, and cultures were done to identify the fungi observed on the affected parts. It was observed that animals treated with the alternatives solutions showed characteristics desirable to dissection of tissues, appearance of these was more similar to the live animal and had no irritating odor. Lifetime of these specimens were lower than those treated with high concentrations of formaldehyde; however, these represents less risk of exposure to this chemical. Solutions tested allow obtaining suitable specimens for dissection but with a lifetime less than those prepared with large amounts of formaldehyde.

Key words: Formaldehyde, anatomy, dissection, fixation.

INTRODUCCIÓN

La enseñanza de la anatomía mediante el uso de cadáveres en las carreras médicas ha sido una pieza fundamental durante mucho tiempo [1]. Se ha demostrado que la eliminación de las prácticas de disección afecta de manera significativa el aprendizaje por parte de los estudiantes de pregrado y posgrado; a pesar de los esfuerzos realizados, el uso de simuladores e ilustraciones no ha logrado sustituir las bondades que ofrece la disección [2]. La disección de los tejidos requiere someter el cuerpo a un proceso de conservación mediante el uso de diferentes soluciones, estas últimas contienen sustancias químicas capaces de prolongar su vida útil, con el consecuente retardo en el proceso de descomposición [3]. Una solución conservadora debe cumplir con ciertos requisitos como evitar el riesgo de infección al tener contacto con el cadáver, mantener la apariencia natural de los tejidos, asegurar la preservación del cuerpo y prevenir la contaminación con insectos [4]. Adicionalmente, estas soluciones también deben prevenir el crecimiento de hongos, que con frecuencia afectan las piezas anatómicas y causan su deterioro, representando además un riesgo para la salud del personal [5]. El formol es la sustancia química más utilizada en la fijación y conservación de los tejidos, fue descubierto por Butlerov en 1859 pero fue August Wilhelm Von Hoffmann quien, en 1856, desarrolló el método para su obtención a partir de metanol [6] y desde entonces se ha mantenido como la sustancia conservadora por excelencia. El problema de su uso radica principalmente en sus efectos tóxicos sobre el organismo [7]. Esta sustancia puede causar irritación de la mucosa nasal y ocular, dermatitis por contacto y la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer lo clasificó en el año 2006 como cancerígeno para los seres humanos [8]. Por esta razón, los niveles de formol en el aire del laboratorio deben mantenerse por debajo de 0,3 ppm que es el nivel recomendado [9]. Las soluciones conservadoras utilizadas en los laboratorios de anatomía, en su mayoría, contienen formol como componente principal, al cual se le añaden sustancias coadyuvantes como el fenol, la glicerina, sal, polietilenglicol, alcohol, entre otras [10, 11, 12, 13]. Los componentes de las soluciones conservadoras, así como sus proporciones, varían dependiendo de factores como las condiciones climáticas del laboratorio [2]. La tendencia actual es reducir los niveles de formol presentes en el aire de los laboratorios de anatomía, una forma de alcanzar este objetivo es disminuir la cantidad de esta sustancia en las soluciones fijadoras-conservadoras y adicionar otras menos nocivas que sustituyan o potencien su efecto [10]. Existen otras alternativas para reducir los niveles de formol en el

aire, entre éstas destacan el uso de dispositivos que renuevan constantemente el aire de los laboratorios, campanas de disección que recolectan rápidamente los vapores emitidos por los cadáveres, máscaras que filtran el aire [14] y mesas que succionan los vapores a través de rejillas para evitar que sean inhalados por el disector [15]. El inconveniente de estas técnicas y dispositivos es que son muy costosos, por lo que no están disponibles en la mayoría de los laboratorios de anatomía [14]. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes soluciones fijadoras-conservadoras alternativas en la perfusión de piezas anatómicas, compuestas por bajas concentraciones de formol y sustancias antisépticas, que permitan reducir la cantidad de formol utilizado sin detrimento de su capacidad conservadora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el ensayo fueron seleccionados 32 conejos machos adultos que fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos. Previo a la eutanasia, todos los animales fueron tratados con 200 UI/kg de heparina sódica vía intravenosa. Para la premedicación anestésica se les administró acepromacina a dosis de 0,05 mg/kg vía intramuscular. La anestesia se llevó a cabo mediante la administración de una mezcla de tiletamina y zolacepam a dosis de 10 mg/kg vía intramuscular. Una vez alcanzado el plano anestésico se procedió a diseccionar la arteria carótida común derecha, a la que luego se le introdujo un catéter calibre 16 G para permitir el desangrado. Al ser verificada la muerte, los animales de cada grupo fueron perfundidos con una solución fijadora-conservadora a través de la arteria carótida común derecha [16]. El grupo control fue el número 1 y la solución utilizada en éste contenía altos niveles de formol; los grupos restantes fueron tratados con soluciones alternativas (tabla I). Finalizada la perfusión de los cadáveres, éstos permanecieron a temperatura ambiente durante 24 horas para que se llevara a cabo el proceso de fijación [17]. Pasado este tiempo fueron colocados en una cámara frigorífica a temperaturas entre 1 y 4°C. Una semana después de la preparación se procedió a retirar la piel de los cadáveres y se dio inicio al trabajo de disección [18]. Todos los ejemplares fueron revisados semanalmente para evaluar su aspecto macroscópico y tomar muestras de tejidos para estudio histológico. La preparación, disección y evaluación de todos los animales del estudio se realizó en el Anfiteatro de Anatomía del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". El procesamiento de tejidos para la evaluación microscópica fue realizado en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Decanato y Universidad ya indicados.

Grupo 1 (control)	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Formol al 37%: 220 ml.	Formol al 37%: 100 ml.	Formol al 37%: 50 ml.	Formol al 37%: 25 ml.
Glicerina: 25 ml.	Clorhexidina solución al 2%: 25 ml.	Clorhexidina solución al 2%: 25 ml.	Clorhexidina solución al 2%: 25 ml.
Agua: 755 ml.	Glicerina: 25 ml. Sulfato de cobre 5 gr.	Glicerina: 25 ml. Sulfato de cobre 5 gr.	Glicerina: 25 ml. Sulfato de cobre 5 gr.
	Agua c.s.p 1 l	Agua c.s.p 1 l	Agua c.s.p 1 l

Tabla I. Composición de las soluciones utilizadas para la perfusión de los animales de cada grupo.

EVALUACIÓN DE LAS PIEZAS

Para evaluar el efecto de las soluciones se tomaron en cuenta aspectos macroscópicos y microscópicos. La evaluación macroscópica se llevó a cabo durante las disecciones mediante observación directa, disección y palpación de los tejidos. Este procedimiento consistió en determinar la consistencia y flexibilidad de los mismos [5, 19], la diferenciación tisular, la facilidad de disección, el olor a formol, la presencia de descomposición y crecimiento de hongos sobre la superficie [12, 13]. Para evaluar la consistencia de los tejidos se utilizó una escala de valoración del 1 al 3, en la que 1 significaba consistencia muy dura o firme, 2 consistencia moderada y 3 consistencia muy blanda. La escala de valoración para el olor a formol estuvo conformada por tres categorías en las que 1 significaba intenso olor a formol (irritante), 2 ligero olor a formol y 3 sin olor a formol. Al evaluar la facilidad de disección fue tomada en cuenta la facilidad con la que el disector pudo identificar y separar las diferentes estructuras, en este caso la escala de valoración tenía dos categorías que son 1. fácil y 2. difícil.

Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de tejido muscular (tríceps braquial y glúteo medio), hepático y cardiaco a los 7, 30 y 60 días post mórtem. Estas muestras fueron colocadas en envases plásticos con la misma solución utilizada para la perfusión del cadáver, luego se les realizaron cortes histológicos que fueron teñidos con hematoxilina y eosina. La evaluación al microscopio se realizó con la finalidad de confirmar la eficacia de las soluciones utilizadas [10], en la misma fueron considerados la presencia de detalle nuclear y citoplasmático como indicadores de fijación y conservación. El análisis microbiológico fue realizado a los cadáveres que presentaron formación de placas compatibles con

crecimiento fúngico en la superficie. Para este fin se recolectaron muestras de las placas y del tejido circundante, colocándolas en recipientes plásticos estériles. Estas muestras fueron procesadas en el laboratorio de micología para cultivo e identificación de hongos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de las diferentes variables estudiadas fueron analizados con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago IL, USA). Las variables cualitativas fueron analizadas mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2) y los correspondientes coeficientes de asociación (coeficiente de contingencia, phi y V de cramer para datos nominales; gamma, d de somers y Tau-b de Kendall para datos ordinales). Las variables cuantitativas fueron analizadas mediante la prueba ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos estudiados. Todos los resultados fueron considerados estadísticamente significativos para un valor de p 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la evaluación de los ejemplares de cada grupo se observó que la consistencia de los tejidos en los grupos 2, 3 y 4 fue deseable en la mayoría de los animales. En el grupo 1 (control), los tejidos de todos los animales presentaron una consistencia muy dura, esta es una característica indeseable cuando las piezas se destinan a la docencia, en la que se requiere que los tejidos mantengan características muy similares a las del animal vivo [5, 20]. La flexibilidad de los tejidos fue moderada en los animales de los grupos 2 al 4 y escasa en los animales del grupo 1. En los animales de los grupos 2 al 4 se observó una ligera coloración azul de los tejidos, principalmente en los

globos oculares y mucosas, esta coloración se debe al sulfato de cobre y la clorhexidina presentes en la solución utilizada. Los tejidos muscular y adiposo de estos animales presentaron una coloración muy similar al animal vivo, pero fue más pálida en el caso del grupo 1. Las diferencias observadas entre el grupo 1 y el resto de los animales, en cuanto a consistencia, flexibilidad y coloración de los tejidos, probablemente se debe a que la solución utilizada en este caso contenía una mayor concentración de formol (22%), lo que se traduce en mayor fijación y endurecimiento de los tejidos con la consecuente pérdida de flexibilidad y mayor palidez de los mismos [13]. La pérdida de coloración además de afectar la apariencia natural de los tejidos disminuye la diferenciación tisular, lo que se traduce en una mayor dificultad para diseccionar las diferentes estructuras presentes en una pieza anatómica. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la diferenciación de los tejidos. En el caso de la facilidad para diseccionar los tejidos, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados en el día 60 ($p < 0,01$), esto se debe a la pérdida de consistencia, que dificulta la manipulación de los tejidos y que fue más acentuada en los grupos 3 y 4 ($p < 0,01$). Dicha pérdida de consistencia pudiera relacionarse con la baja cantidad de formol utilizado en la perfusión, lo que indica que las piezas tratadas con estas fórmulas tienen un tiempo de vida útil menor. Recientes estudios han demostrado que el proceso de fijación es reversible, por lo que disminuye con el tiempo [21], lo que hace suponer que el factor tiempo y la menor cantidad de formol, presente en las fórmulas bajo estudio, causaron una mayor pérdida de consistencia en los animales de estos grupos. La coloración y la consistencia de los órganos, ubicados en las cavidades torácica y abdominal, fueron más parecidas a las del tejido vivo en el grupo 4, la solución fijadora-conservadora utilizada en este grupo contenía menor cantidad de formol (2,5%). En los animales del grupo 1 los órganos torácicos y abdominales tomaron una coloración con diferentes tonos de marrón indicando buena fijación, aunque con un endurecimiento excesivo; no se observó descomposición ni oscurecimiento de los músculos abdominales. Ninguno de los animales del grupo 1 presentó descomposición de los tejidos durante el estudio; los animales de los grupos 2, 3 y 4 permanecieron en buen estado hasta el día 60 en el que se evidenció que 50% de los animales del grupo 2 y 100% de los animales de los grupos 3 y 4 presentaron signos de descomposición, principalmente en la cavidad abdominal. Una vez evaluado el olor a formol emitido por las piezas durante la disección, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos ($p < 0,01$). Este olor fue muy irritante

en los animales del grupo 1 y prácticamente imperceptible en el resto de los grupos, resultados que coinciden con los reportados en estudios anteriores en los que se han utilizado menores concentraciones de formol [12, 22]. El cultivo para hongos reveló que en el 87,5% de los animales se desarrolló el hongo *Penicillium* sp. En los animales afectados el crecimiento de hongos se observó sobre la superficie corporal, comenzando sobre el dorso y región inguinal para luego diseminarse al resto de la misma. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos con respecto al tiempo de aparición de estos microorganismos ($p < 0,01$), el grupo 1 fue el menos afectado (sólo 50% de los animales) y en el que la aparición de éstos fue más tardía. Asimismo, se observó que existe una asociación altamente significativa entre el tipo de solución y el crecimiento de hongos sobre la superficie de las piezas tratadas ($p < 0,01$). El análisis de riesgo permitió demostrar que luego de 22 días, las piezas tratadas con las soluciones 2, 3 y 4 tienen una mayor probabilidad de desarrollar hongos en su superficie que las tratadas con la solución control. Específicamente se puede decir que el riesgo fue mayor que con la solución control a razón de 4 veces, 8 veces y 2,66 veces para las soluciones 2, 3 y 4 respectivamente. A partir del día 29 esta probabilidad mostró un claro descenso, el riesgo para las soluciones 2, 3 y 4 fue apenas 0,5 veces mayor que para la solución control. Una alternativa para evitar este inconveniente podría ser la modificación del manejo de las piezas, mantenerlas en inmersión con la solución utilizada o realizar aspersiones frecuentes con la misma [5, 21, 23, 24]. Al realizar el análisis microscópico de los tejidos se observó que la arquitectura de los mismos no presentó cambios marcados en todos los grupos de estudio, durante la evaluación de los cortes fue posible reconocer el órgano de procedencia. No obstante, en la mayoría de los tejidos evaluados se pudo observar que, aunque los núcleos de las células permanecieron intactos, el citoplasma presentó alteraciones que impedían ver con claridad sus límites. Estos resultados difieren de los reportados en estudios previos, en los que el aspecto microscópico de los tejidos se mantuvo inalterado hasta un año después de la preparación de los cadáveres [5, 10], lo que podría deberse a la composición de las soluciones utilizadas, diferencias entre especies o al manejo aplicado a los ejemplares luego de su preparación.

CONCLUSIONES

Los animales tratados con las soluciones alternativas presentan características macroscópicas deseables para la disección y no despiden olor irritante

debido a la escasa cantidad de formaldehído utilizada en su formulación.

Es posible reducir la cantidad de formaldehído en la preparación de piezas anatómicas, sin detrimento de su conservación ni de las características de los tejidos durante el tiempo necesario para su disección.

Desde el punto de vista microscópico ninguna de las soluciones evaluadas en este estudio permite conservar de manera óptima la estructura de los tejidos, aunque si conservan las características necesarias para su identificación.

El tiempo de vida útil de los ejemplares preparados con las soluciones alternativas es menor que el de los tratados con altas concentraciones de formaldehído pero representan un menor riesgo de exposición a este químico.

Las soluciones alternativas son menos eficientes que la solución control para disminuir el crecimiento de hongos en los ejemplares conservados.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" por el financiamiento otorgado (Proyecto 003-VE-2012) y al Laboratorio de Anatomía Patológica del Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA por su apoyo en el procesamiento de las muestras de tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cornwall J, Stringer MD. The wider importance of cadavers: educational and research diversity from a body bequest program. *Anat Sci Educ* 2009; 2: 234-237.
- [2] Tolhurst DE, Hart J. Cadaver preservation and dissection. *Eur J Plast Surg* 1990; 13: 75-78.
- [3] Saeed M., Rufai A., Elsayed S. Mummification to plastination. *Saudi Med J* 2001; 22 (11): 956-959.
- [4] Dixit D, Athavia P, Pathak H. Toxic effects of embalming fluid on medical students and professionals. *JIAFM* 2005; 27(4): 209-211.
- [5] Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, Kaessmeyer S, Plendl J. Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy-A study based on histo- and microbiological analyses. *Ann Anat* 2011; 193(1): 71-75.
- [6] Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1985; 33(8): 845-853.
- [7] Viegas S, Ladeira C, Nunes C, Malta-Vacas J, Gomes M, Brito M, Mendonca P, Prista J. Genotoxic

effects in occupational exposure to formaldehyde: A study in anatomy and pathology laboratories and formaldehyde-resins production. *J Occup Med Toxicol* 2010; 5(1): 25.

[8] International Agency for Research on Cancer (IARC). Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropanol-2-ol. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC 2006; 88: 39-325.

[9] Paustenbach D, Alarie Y, Kulle T, Schachter N, Smith R, Swenberg J, Witschi H, Horowitz SB. A recommended occupational exposure limit for formaldehyde based on irritation. *J Toxicol Environ Health* 1997; 50(3): 217-263.

[10] Coleman R, Kogan I. An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J Anat* 1998; 192(3): 443-446.

[11] Al-Saraj A. Use of saturated sodium chloride solution as a tissue fixative. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 2010; 24(1): 53-58.

[12] Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, Richardson KC, Plendl J. A pilot study on ethanol-polyethylene glycol-formalin fixation of farm animal cadavers. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2011; 124(5-6): 225-227.

[13] Jaung R, Cook P, Blyth P. Comparison of embalming fluids for use in surgical workshops. *Clin Anat* 2011; 24: 155-161.

[14] Whitehead MC, Savoia MC. Evaluation of methods to reduce formaldehyde levels of cadavers in the dissection laboratory. *Clin Anat* 2008; 21: 75-81.

[15] Ohmichi K., Matsuno Y., Miyaso H., Yamamoto H., Toriuchi M., Shimane M., Mori C. Pilot study of a dissection table for gross anatomy laboratory equipped with a photocatalytic device that decomposes formaldehyde. *J Occup Health* 2007; 49(6): 499-503.

[16] Ajayi IE, Shawulu JC, Ghaji A, Omeiza GK, Ode OJ. Use of formalin and modified gravity-feed embalming technique in veterinary anatomy dissection and practicals. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 2011; 3(6): 79-81.

[17] Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microsc Today* 2000; 8 (1): 8-12.

[18] Muñetón GC, Ortiz JA. Conservación y elaboración de piezas anatómicas con sustancias diferentes al formol en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Salle. *Rev Med Vet* 2011; 22: 51-55.

[19] Silva RM, Matera JM, Ribeiro AA. New alternative methods to teach surgical techniques for veterinary medicine students despite the absence of living animals. Is that an academic paradox? *Anat Histol*

Embryol 2007; 36(3): 220-224.

[20] Guimarães da Silva RM, Matera JM, Ribeiro AA. Preservation of cadavers for surgical technique training. *Vet Surg* 2004; 33(6): 606-608.

[21] Helander KG. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*. 1994; 69(3): 177-179.

[22] Groscurth P, Eggli P, Kapfhammer J, Rager G, Hornung JP, Fasel JDH. Gross anatomy in the surgical curriculum in Switzerland: improved cadaver preservation, Anatomical models, and course development. *Anat Rec* 2001; 265: 254-256.

[23] Pretorius WF. Formula for embalming of cadavers for student dissection and the modification thereof for plastination. *JISP* 2006; 9(1): 35-36.

[24] Wolff KD, Kesting M, Mücke T, Rau A, Hölzle F. Thiel embalming technique: a valuable method for microvascular exercise and teaching of flap raising. *Microsurgery* 2008; 28: 273-278.