



## GUÍA PARA LA CORRECTA REMISIÓN DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO EN MEDICINA VETERINARIA

**AUTOR: CARLOS FELIPE ORJUELA ACOSTA-MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**ANATOMOPATÓLOGO VETERINARIO -LABORATORISTA CLÍNICO VETERINARIO**

En este documento encontrará los lineamientos para enviar adecuadamente muestras para diagnóstico histopatológico rutinario en medicina veterinaria. Inicialmente se describirán unos conceptos básicos sobre la fijación para poder entender mejor como fijar adecuadamente las muestras.

### FIJADORES

La fijación consiste en evitar la autólisis y descomposición de tejidos y células, preservando así la arquitectura de los tejidos a analizar. En general los fijadores actúan de dos formas: uno evitando la ruptura de la membrana de organelas como los lisosomas, evitando la fuga de enzimas lisosomales y evitando la autodigestión (autólisis), también coagulando estas enzimas evitando que ejerzan su función lítica; otra función de los fijadores es prevenir la proliferación de microbios, evitando la descomposición o putrefacción de los tejidos (muchos fijadores a su vez son desinfectantes). Hay un amplio abanico de fijadores (etanol, glutaraldehído, Davidson), aunque entre todos resalta la formalina como fijador de elección en diagnóstico rutinario, esto se debe a su bajo costo, poca interferencia con el proceso histotécnico y fácil adquisición.

**¿FORMALDEHIDO? ¿FORMOL-FORMALINA? ¿FORMALINA PURA? ¿FORMALINA ÁCIDA?  
¿FORMALINA BUFERADA?**

Es común encontrar todas estas palabras que suelen generar confusión, pero hay que resaltar que el fijador estándar para muestras de patología es la **formalina buferada o tamponada al 10%**. Para aclarar conceptos hay que indicar inicialmente que el **formaldehído** es un gas que tiene muchos usos industriales y del cual no se profundizará en este texto. La dilución de formaldehído con agua se conoce como **formalina** o **formol**, esta dilución generalmente se comercializa en concentraciones del **37 al 40%** y de acá en adelante se llamará a esta dilución **formalina pura** (figura 1). Es decir, **la formalina pura** (formalina al 100%) contiene entre un **37 a un 40%** de **formaldehído**. **No es recomendable** fijar tejidos en **formalina pura** ya que genera artefactos durante el procesamiento histotécnico afectando la calidad de los cortes histológicos. La formalina naturalmente y sin importar su dilución tiene un pH ácido, siendo conocida como **formalina ácida**. Tras una preparación con ingredientes químicos estabilizadores, el pH de la formalina se estabiliza sobre 7 dando origen a la **formalina buferada o tamponada**.



Figura 1. Presentaciones comerciales de formol/formalina pura. La concentración de formaldehído varía entre un 37 a un 40%, **nunca va a encontrar “formol al 100%”**, recuerde que en este caso se estaría hablando de **formaldehído**, que como se mencionó previamente es un gas . Este formol/formalina pura es el insumo con el que se preparará la formalina al 10%, fijador rutinario en muestras de patología . Imagen de autoría propia.

### FORMALINA ÁCIDA vs FORMALINA BUFERADA COMO FIJADORES

En consenso la formalina buferada al 10% es el fijador de rutina para estudios de histopatología . Para la tamponar la formalina se requieren reactivos como el sodio fosfato monobásico y el sodio fosfato dibásico. Estos ingredientes en muchas ocasiones no pueden conseguirse fácilmente, en especial si se vive en zonas rurales o alejadas de ciudades grandes e intermedias, **por lo que desde un punto de vista práctico puede usarse la formalina sin buferar al 10% (formalina ácida al 10%) como fijador**. Con base en la experiencia de quien escribe este documento la formalina ácida al 10% es un excelente fijador, y salvo artefactos mínimos como la hematina ácida que puede formarse ocasionalmente (artefacto que el analista o anatomopatólogo debe estar en la capacidad de identificar . Figura 2) no afecta el procesamiento e interpretación de montajes histológicos.

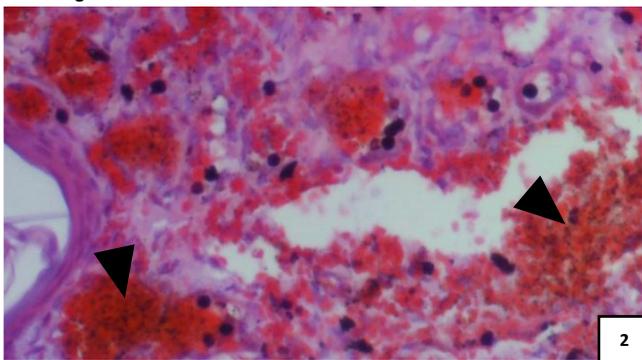


Figura 2. Fotomicrografía de un corte histológico de piel con tinción Hematoxilina-Eosina. El pigmento dorado-marrón superpuesto a los agregados de glóbulos rojos es hematina ácida (cabeza de flecha). Imagen de autoría propia.

### PREPARACIÓN DE FORMALINA ÁCIDA AL 10% PARA REMISIÓN DE TEJIDOS A HISTOPATOLOGÍA

La preparación de formalina es bastante sencilla y se basa en una relación de 9 partes de agua por 1 parte de formalina pura, esto para dar una dilución con aproximadamente 10% de formalina. Por ejemplo, para la preparación de 100 ml de formalina al 10% se requieren 10ml de formalina pura y 90 ml de agua; para preparar 500 ml se requieren 50 ml de formalina pura y 450 ml de agua, siempre manteniendo la relación de 9 partes de

agua por 1 parte de formalina pura. En la figura 4 se muestran los objetos necesarios para la preparación de la formalina, **estos pueden ser reemplazados por recipientes plásticos en caso de que se desee preparar la formalina en campo o en un consultorio veterinario**, la medición de los volúmenes no debe ser en estricto exactas, y con recipientes que permitan una medición de volumen aproximada es suficiente. Las figuras 3, 4, 5 y 6 corresponden a una secuencia donde se explica la preparación de 500 ml de formalina ácida al 10%.

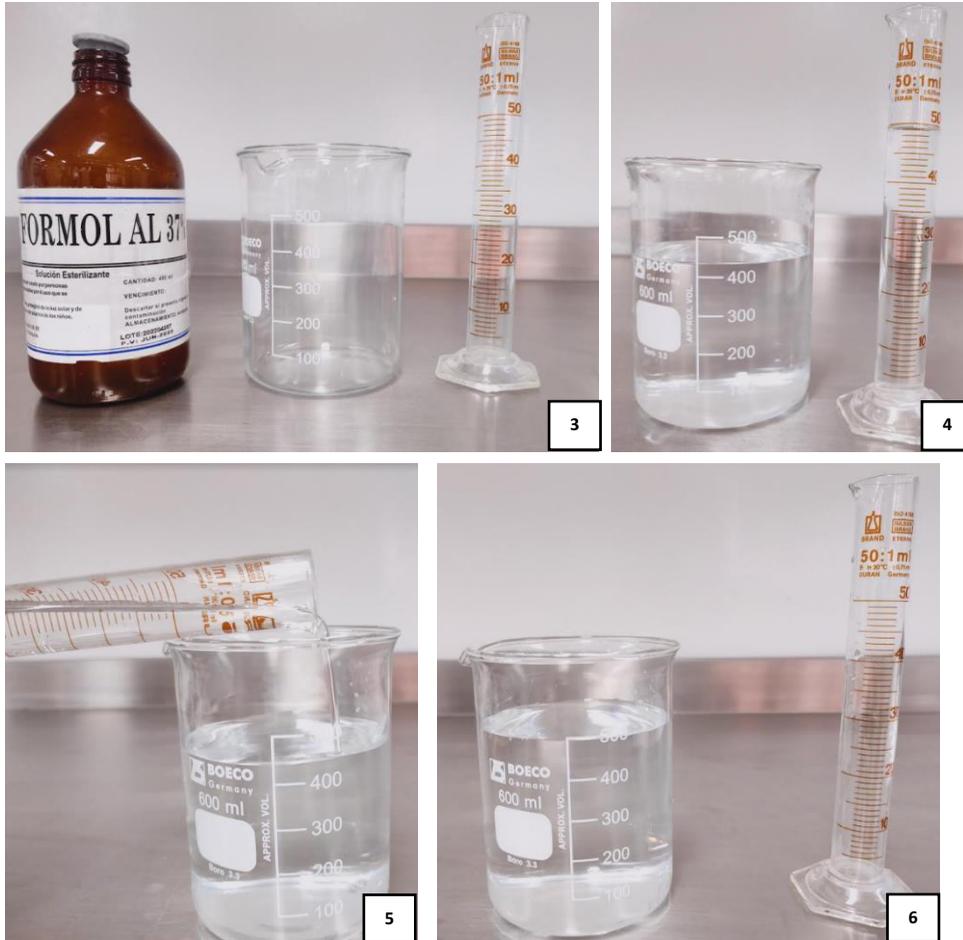


Figura 4. Formalina pura, 2 vasos de precipitado y una probeta, estos elementos pueden ser reemplazados por envases plásticos que permitan tener una medida volumétrica aproximada, en caso de querer hacer la preparación de la formalina al 10% en campo. Figura 5. Para preparar 500 ml de formalina al 10% se toman 450 ml de agua, en este ejemplo se usa el vaso de precipitado (no necesariamente debe ser destilada, con agua de llave o de bebida es suficiente), y 50 ml de formalina pura (probeta). Siempre manteniendo la relación de 9 partes de agua y 1 parte de formalina pura (9:1). Figuras 6 y 7, se agrega la formalina pura al agua y se agita, el líquido resultante es la formalina al 10% y queda lista para almacenar y utilizar para fijar tejidos. Esta formalina debe almacenarse en un recipiente cerrado y en un sitio fresco y protegido de la luz solar, salvo esto no requiere algún otro tipo especial de almacenamiento. Se recomienda usar guantes y tapabocas al momento de preparar la formalina, ya que los gases pueden llegar a ser irritantes. Imagen de autoría propia.

### CONSERVACIÓN DE TEJIDOS OBTENIDOS MEDIANTE BIOPSIA.

Ya preparada la formalina hay algo a resaltar y es la velocidad de fijación. **La formalina al 10% fija los tejidos a una velocidad de 0.5 cm cada 12 horas** (o lo que es lo mismo 1 cm cada 24 horas), y tiene un poder de penetración aproximado de 2 cm en 24 horas. **Esto es clave ya que muestras con un grosor mayor a 2 cm**

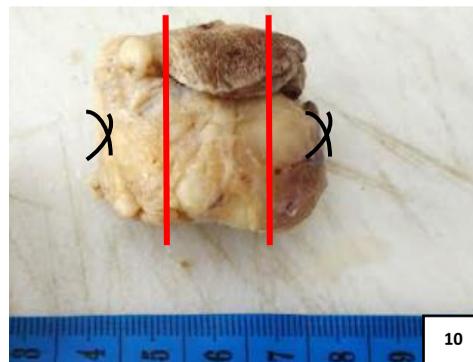
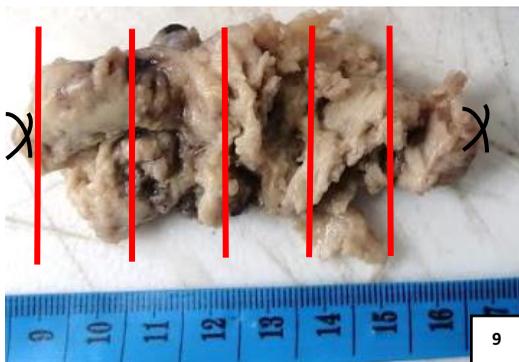
**pueden no fijarse adecuadamente**, siendo este uno de los errores más comunes al momento de remitir muestras para diagnóstico. Los tejidos pobremente fijados o con elevado grado de autólisis dan como resultado montajes histológicos de baja calidad, disminuyendo la sensibilidad y especificidad diagnóstica; en ocasiones y dependiendo del grado de autólisis el patólogo/analista podrá emitir el tan temido reporte **“los avanzados cambios autolíticos impiden un diagnóstico histopatológico preciso”**. Las figuras 7, 8, 9 y 10 muestran ejemplos de biopsias fijadas de forma adecuada y biopsias con defectos en la fijación, asimismo se explican recomendaciones para la remisión y fijación de biopsias de gran tamaño.



Figura 7. Muestras de tejidos con un tamaño adecuado para una correcta fijación. Note que ninguna muestra sobrepasa los 2 cm de grosor. Imagen de autoría propia.



Figura 8. Tejido pobremente fijado y con evidente autólisis. Los tejidos mal fijados se caracterizan por un color rojo vivo evidente al momento de la disección, observe como únicamente los márgenes de la muestra se han logrado fijar, mientras que la “médula” del tejido presenta autólisis. Imagen de autoría propia.



Figuras 9 y 10. Muestras con tamaño inadecuado para fijación. Es recomendable seccionar longitudinalmente la muestra en porciones de 1 a 2 cm para facilitar la penetración de la formalina. Para los márgenes quirúrgicos puede usarse una sutura para diferenciarlos. Las líneas rojas indican como deberían seccionarse las muestras de gran tamaño, las **x** en color negro son los márgenes quirúrgicos. Se recomienda siempre marcar márgenes quirúrgicos laterales y margen quirúrgico basal. Imagen de autoría propia.

## CONSERVACIÓN DE TEJIDOS OBTENIDOS MEDIANTE NECROPSIA

La histopatología no solo se utiliza para diagnóstico de lesiones tumorales, también puede y debe usarse en caso de necropsias y determinación de la muerte de animales, tanto de compañía como de producción. Esto es bastante útil en una amplia gama de situaciones, que van desde enfermedades infecciosas afectando un hato ganadero o una granja avícola, hasta problemas legales asociados a la muerte de una mascota. Siempre que se pueda es recomendable complementar el diagnóstico macroscópico con histopatología. En estos casos el manejo de las muestras no difiere respecto a los tejidos obtenidos mediante biopsia. Se recomiendan muestras de tamaño no mayor a 2 cm de grosor, esto asegura una adecuada penetración de la formalina y una correcta fijación. **Es recomendable varias muestras pequeñas del mismo órgano vs una única muestra de gran tamaño.** Puede usarse un recipiente para cada órgano, aunque si se incluyen una gran variedad de órganos en un mismo recipiente no está mal, el patólogo/analista en la mayoría de las ocasiones deberá estar en la capacidad de identificar los órganos al microscopio mediante sus conocimientos en histología. En las figuras 11 y 12 se muestran ejemplos de necropsias “en frasco” que fueron enviadas para un concepto histopatológico; hay que recalcar que una mala fijación afecta la precisión del diagnóstico histopatológico.



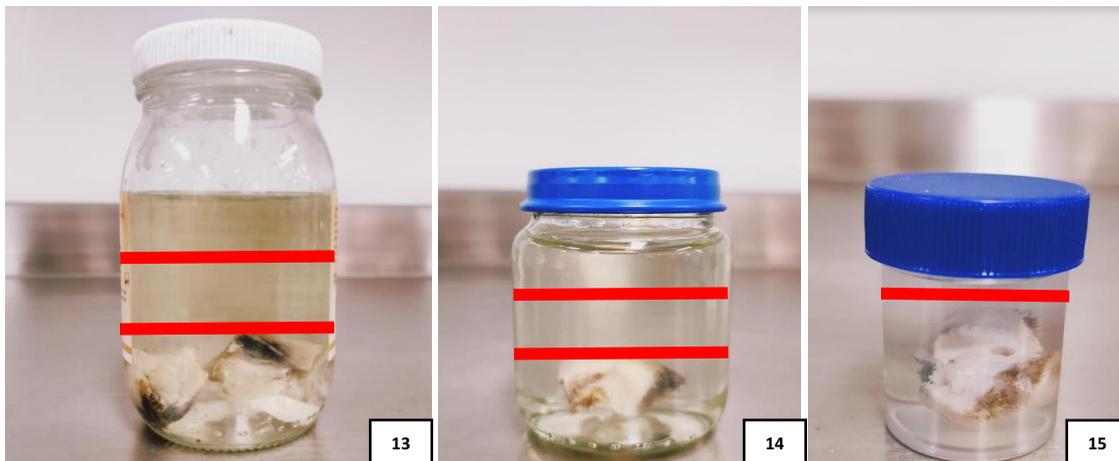
Figura 11. Ejemplo de necropsia correctamente remitida a diagnóstico histopatológico. Observe que hay un total de 12 muestras de órganos tubulares y parenquimatosos obtenidos de un cadáver de un canino. Los tamaños no sobrepasan los 2 cm de grosor, permitiendo una correcta penetración de la formalina y una adecuada fijación de los tejidos. Es importante tomar varias muestras pequeñas de cada órgano según la inspección anatomopatológica del cadáver. Imagen de autoría propia.



Figura 12. órganos remitidos para diagnóstico histopatológico obtenidos de una necropsia de un bovino. Este es el ejemplo de como no deben tomarse muestras para fijación y remisión a histopatología. Note que la mayoría de muestras son órganos completos o porciones en extremo de gran tamaño, la mayoría sobrepasa los 10 cm. En este caso y debido a la pobre fijación, las submuestras enviadas a procesamiento histotécnico y los resultantes montajes histológicos fueron de mala calidad, lo que no permitió aproximar o precisar un diagnóstico mediante histopatología. Esto lleva a que se pierda el trabajo de quien hizo la necropsia y el tiempo desde que fueron remitidas las muestras a diagnóstico y la emisión del informe de patología inconcluso. Imagen de autoría propia.

### ¿QUÉ CANTIDAD DE FORMALINA AL 10% SE DEBE USAR PARA UNA CORRECTA FIJACIÓN?

Esta es una pregunta frecuente por parte de los médicos veterinarios interesados en enviar muestras para diagnóstico histopatológico. La recomendación más común al respecto (tanto en la academia como en textos científicos) es que por cada parte (1) de tejido anexar nueve (9) partes de formalina al 10%, o sea una relación de 1:9. Desde un punto de vista práctico y basado en la propia experiencia del autor, con una relación muestra-formalina de 1:3 (por cada parte de muestra anexar 3 partes de formalina al 10%) es suficiente para una adecuada fijación y conservación de tejidos, **siempre y cuando se acaten las recomendaciones sobre el tamaño adecuado de las muestras acá especificadas**. En las Figuras 13, 14 y 15 se muestran ejemplos de muestras con una correcta cantidad de formalina al 10% y un ejemplo de una muestra con deficiente cantidad de fijador.



## PREGUNTAS FRECUENTES SOBRE LA FIJACIÓN DE TEJIDOS

### ¿Se deben refrigerar las muestras luego de depositarlas en un recipiente con formalina?

No, las muestras en formalina no necesitan refrigeración para una correcta fijación, así que no se requiere cava o geles refrigerantes para transportar tejidos en formalina.

### ¿Cuánto tiempo puede conservarse una muestra en un recipiente con formalina?

Desde que la muestra esté fijada adecuadamente, puede durar años sin descomponerse.

### ¿Puedo fijar los tejidos en formalina pura/sin diluir?

No se recomienda fijar tejidos en formalina pura, ya que esto afecta la calidad de los montajes histológicos y puede comprometer el diagnóstico histopatológico.

### ¿Qué otro fijador puedo utilizar en caso de no contar con formalina?

En casos **de emergencia** y si no hay formalina a disposición, una alternativa es el alcohol al 70% (comercial) respetando las directrices respecto a tamaño de la muestra y cantidad de fijador, **sin embargo, se debe traspasar las muestras a formalina lo más pronto posible ya que el alcohol deshidrata los tejidos**, generando montajes histológicos de mala calidad y pudiendo comprometer el diagnóstico histopatológico. **La solución salina no preserva tejidos**, así que no se deben conservar muestras en este fluido.

### ¿Se pueden conservar biopsias, cadáveres o muestras de necropsia en congelación para diagnóstico histopatológico?

No, la congelación de los tejidos forma cristales de hielo, al descongelarse los cristales se rompen, causa lisis de células y tejidos dando cortes histológicos de mala calidad y afectando el diagnóstico histopatológico.

### ¿El recipiente para la conservación de tejidos en formalina debe ser de algún material específico?

Recipientes de plástico o vidrio sin importar su origen sirven para guardar tejidos para diagnóstico histopatológico, la principal recomendación **es que sean frascos de boca ancha** y que permitan un cierre adecuado, esto para evitar pérdida de la formalina por mal tapado del recipiente y una incorrecta fijación. En casos de emergencia y siempre y cuando se trate de una muestra de tamaño pequeño, recipientes como jeringas o tubos de ensayo para hematología tapa roja hasta bolsas resellables pueden servir para almacenar muestras para histopatología.

### ¿En el caso de enviar muestras de necropsia de diferentes órganos, debo enviar cada órgano por separado o se pueden enviar todos los órganos en un mismo recipiente?

Ambas opciones son válidas mientras se respeten las indicaciones sobre tamaño de las muestras y cantidad adecuada de formalina; el analista-patólogo debería, en la mayoría de los casos, estar en la capacidad de identificar los órganos al microscopio con base en sus conocimientos de histología.

### ¿Órganos o tejidos con autólisis pueden utilizarse para procesamiento histotécnico y diagnóstico histopatológico?

No es recomendable ya que los tejidos autolizados dan montajes histológicos de mala calidad, sin embargo, y en casos excepcionales (fetos, cadáveres con moderado grado de descomposición) puede intentarse analizar los cortes histológicos y en ocasiones esto puede dar una aproximación diagnóstica.

**AUTOR: CARLOS FELIPE ORJUELA ACOSTA-MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**