



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del rendimiento de la técnica de procesamiento histotecnológico libre de xilol versus la técnica convencional en el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia

Iván Leonardo Mojica Figueroa

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Patología

Bogotá D.C.

2012

Evaluación del rendimiento de la técnica de procesamiento histotecnológico libre
de xilol versus la técnica convencional en el Laboratorio de Patología
Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia

Evaluación del rendimiento de la técnica de procesamiento histotecnológico libre de xilol versus la técnica convencional en el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia

Iván Leonardo Mojica Figueroa

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de:
Patólogo Anatómico y Clínico

Director (a):
Dr. Angel Yobany Sanchez Merchán

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Patología
Bogotá D.C.
2012

Evaluación del rendimiento de la técnica de procesamiento histotecnológico libre
de xilol versus la técnica convencional en el Laboratorio de Patología
Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia

Dedicado a mi esposa y a mi hija por ser el motivo,
la inspiración, la fuerza, el entusiasmo y la razón de mi vida.
También a ti madre por ser el sustento sobre el cual se cimentó
este sueño de ser Patólogo.
Gracias a ustedes este proyecto fue posible.

Agradecimientos

A Dios porque aunque no merecemos nada, su gracia y su amor son tan infinitos que me permitieron cumplir mi sueño.

A mi esposa y a mi hija por el amor y la paciencia que tuvieron para que pudiera culminar este proyecto.

A mi madre porque su esfuerzo e incondicionalidad, me han llevado a volar más alto de lo que nunca pude imaginar.

A mi profesor, el Dr. Angel Yobany Sánchez Merchán, porque su guía, acompañamiento e iniciativa fueron claves para el desarrollo del presente trabajo

A la Dra. María Teresa Vallejo y a la Estadística Ruth Barrera, por su aporte en el análisis estadístico de los resultados.

A la Señora Susana Contreras, Maritza Ramírez y Octavio Jiménez, por su colaboración para la realización del proyecto.

Finalmente, a la Universidad Nacional de Colombia, a mis profesores y a mis compañeros de residencia porque gracias a ustedes estos cuatro años siempre quedarán en mi corazón.

Resumen

El reconocimiento de los efectos tóxicos de los reactivos utilizados en el laboratorio de patología han obligado a los investigadores a buscar nuevas alternativas de procesamiento histotecnológico; una de estas nuevas técnicas es la denominada “libre de Xilol”.

El propósito del siguiente trabajo fue el diseño de un estudio experimental para evaluar el rendimiento de la técnica libre de xilol versus el procesamiento histotecnológico convencional tendiente a valorar la viabilidad de implementar una técnica de procesamiento alterna menos lesiva que la actualmente empleada.

Las características principales de los preparados obtenidos fueron la presencia de un adecuado contraste de la coloración, ausencia de retracciones tisulares, ausencia o mínimas zonas de desprendimiento, ausencia de zonas de fragmentación tisular, excelente detalle nuclear y excelente conservación de los tejidos ricos en grasas.

La evaluación de los patólogos mostró que el 95% de los preparados libres de Xilol coloreados con Hematoxilina & Eosina fueron calificados como aceptados para hacer diagnóstico comparados con el 92% de los preparados convencionales.

La coloración de PAS fue calificada como aceptada en el 92% de los casos procesados libres de xilol, resultados similares a la coloración PAS convencional. El 82% de las coloraciones TM libres de xilol fueron calificadas como aceptadas.

Después de estandarizar la técnica y realizar el estudio se demostró que la calidad de los preparados libres de xilol tienen características similares a las obtenidas con la técnica

convencional del Laboratorio de Patología Interfacultades, con un costo 30% menor que el de la técnica convencional.

Palabras Clave: Técnicas de Laboratorio, Técnica Histológica, Procesamiento de tejidos, Isopropanol, Alcohol isopropílico, Xilenos.

Abstract

The identification of the toxic effects of the reagents used in the pathological laboratory has forced researchers to look for new alternatives in Histotechnologists processing; one of these new techniques is the called “xylene-free”

The aim of the following project was designing an experimental study to evaluate the xylene-free technique performance against the conventional processing focused on the assessment the feasibility of implementing an alternative, less harmful processing technique than the currently used.

The main features of the preparations obtained were the presence of a suitable color contrast, no tissue retraction, absent or minimal areas of detachment, absence of tissue fragmentation zones, excellent nuclear detail and excellent preservation of the tissues rich in fat.

The pathologists` evaluation showed that 95% of xylene-free preparations stained with hematoxylin and eosin were rated acceptable for diagnosis compared with 92% of conventional preparations.

The PAS staining was rated acceptable in 92% of the xylene-free cases processed; these results are similar to conventional PAS staining. 82% of the xylene-free TM colors were rated as acceptable.

After standardizing the technique and performing the study it was demonstrated that the quality of xylene-free preparations have similar characteristics to those obtained with the conventional technique used in the pathology laboratory, costing 30% less than the conventional technique.

Key words: Laboratory technics and procedures, histological technique, tissue process, isopropanol, isopropyl alcohol, xylenes.

Contenido

Pág.

Resumen	9
Lista de ilustraciones	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de Gráficos	XVIII
Introducción	1
1. Planteamiento del problema	3
2. Justificación	5
3. Objetivos	7
3.1 Objetivo general.....	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4. Marco referencial	9
4.1 Definición de técnicas histológicas y reseña histórica.....	9
4.2 Procesamiento histotecnológico de tejidos convencionales.....	10
4.2.1 Fijación.....	12
4.2.2 Deshidratación tisular	19
4.2.3 Aclaramiento	21
4.2.4 Impregnación	24
4.2.5 Inclusión.....	25
4.3 Alcohol isopropílico y procesamiento de tejidos libre de xilol.....	27
4.3.1 Alcohol isopropílico y el laboratorio de patología	27
4.3.2 Procesamiento histológico libre de xilol	28
4.3.3 Efectos tóxicos del alcohol isopropílico.....	30
4.4 Estrategias para disminución de costos en el laboratorio de patología	31
4.5 Control de calidad en el laboratorio de patología	34
5. Estandarización de la técnica libre del xilol	39
5.1 Obtención de muestras y procesamiento de tejidos	39
5.2 Proceso de coloración.....	40
5.3 Resultados obtenidos	41
5.4 Conclusiones y recomendaciones.....	42

6. Metodología.....	45
6.1 Diseño metodológico	45
6.1.1 Criterios de inclusión	45
6.1.2 Criterios de exclusión	45
6.1.3 Realización de la prueba	45
6.1.4 Planilla para control de la calidad del proceso histotecnológico	46
6.1.5 Consideraciones éticas	47
6.2 Procesamiento de la información.....	48
6.2.1 Descripción del conjunto de datos	48
6.2.2 Análisis de la información.....	48
7. Resultados.....	49
7.1 Hematoxilina & eosina	49
7.2 Coloración de pas y tricrómico.....	51
7.3 Observaciones y comentarios.....	53
8. Discusión.....	55
9. Conclusiones y recomendaciones.....	59
A. Anexo A: Planilla de control de calidad del proceso histotecnológico.....	61
B. Anexo B: Guía para el diligenciamiento de la planilla de control de calidad.....	63
Bibliografía	71

Lista de ilustraciones

Pág.		
	Ilustración 4-1: Pasos del procesamiento histológico de tejidos.	10
	Ilustración 4-2: Técnica de procesamiento convencional UNAL	11
	Ilustración 4-3: Procesador automatizado de tejidos Cytadell® 2000	26
	Ilustración 4-4: Estación de inclusión	26
	Ilustración 4-5: Procesamiento libre de xilol	29
	Ilustración 4-6: Comparación métodos de procesamiento de tejidos	30
	Ilustración 4-7: Desparafinización, tinción y montaje	31
	Ilustración 4-8: Mama. Comparación de los métodos de procesamiento.. ..	32
	Ilustración 4-9: Elementos de un proceso	35
	Ilustración 5-1: Proceso de estandarización de la técnica libre de xileno	41
	Ilustración 5-2: Esquema de procesamiento libre de xilol implementado	40
	Ilustración 5-3: Proceso de desparafinización y coloración implementado	41
	Ilustración 5-4: Riñón 10X y 20X. Comparación de las técnicas de Procesamiento	43
	Ilustración 7-1: Piel. Procesamiento libre de Xilol	53

Lista de Tablas

Pág.	
Tabla 4-1: Características del fijador ideal	12
Tabla 4-2: Mecanismos de fijación	13
Tabla 4-3: Efectos tóxicos del formaldehído	15
Tabla 4-4: Otros fijadores.....	19
Tabla 4-5: Agentes deshidratantes	20
Tabla 4-6: Agentes aclarantes	22
Tabla 4-7: Tipos de parafina	25
Tabla 4-8: Soluciones fijadoras que utilizan alcohol isopropílico.....	28
Tabla 4-9: Estrategias para disminución de costos en los laboratorios de patología	33
Tabla 4-10: Criterios para evaluar la calidad de las láminas de histología.....	37
Tabla 5-1: Componentes del jabón para platos utilizado en el proceso de desparafinización	42
Tabla 7-1: Comparativo de los criterios de evaluación para la coloración H & E	49
Tabla 7-2: Comparación del puntaje total obtenido por las dos técnicas de Procesamiento	51
Tabla 7-3: Comparativo criterios de evaluación coloraciones de PAS y TM.....	52
Tabla 8-1: Evaluación económica.....	58

Lista de gráficos

Gráfico 7-1: Puntaje total obtenido por número de casos	51
Gráfico 7-2: Puntaje total obtenido por técnica de procesamiento.....	52

Introducción

La histotecnología se encarga de estudiar los fundamentos técnicos y la secuencia necesaria para llevar a cabo el análisis de los tejidos por medio de preparaciones histológicas y la demostración microscópica de la morfología celular, la composición química y la función de los tejidos normales y anormales.

A pesar de la inclusión de algunas coloraciones nuevas, el procesamiento rutinario de tejidos y la coloración con hematoxilina y eosina continúan siendo la piedra angular en el diagnóstico patológico sin presentar cambios significativos en sus técnicas durante los últimos 150 años; mientras en otras áreas del conocimiento se han dado importantes desarrollos, en la histotecnología los avances corresponden principalmente a la implementación de procesos de automatización quedando rezagada la innovación de nuevos métodos en el laboratorio de patología.

Recientemente el descubrimiento de la toxicidad de muchos de los componentes del procesamiento y la necesidad de disminuir costos y tiempo de procesamiento han obligado a buscar alternativas más rápidas, menos costosas y menos tóxicas para realizar estos procesos, como la incorporación del microondas al procesamiento de tejidos, la utilización de nuevos fijadores como el UMFIX^R y la aplicación de nuevas estrategias administrativas tendientes a disminuir costos

Siguiendo esta tendencia, hace quince años en Suecia se desarrolló un nuevo método histotecnológico de procesamiento de tejidos conocido "libre de xilol" obteniendo resultados que se encuentran a la par del procesamiento de rutina utilizado en los laboratorios de patología. El principal elemento innovador de esta técnica es la suspensión de los agentes aromáticos del proceso de aclaramiento, disminuyendo la exposición laboral a los efectos tóxicos de estas sustancias.

En el trabajo que mostramos a continuación se implementó y estandarizó la técnica de procesamiento histológico libre de xilol para después evaluar la calidad de los preparados histológicos procesados con esta técnica y compararla con la técnica convencional utilizada en Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia.

1. Planteamiento del Problema

El laboratorio de patología ha mostrado poco desarrollo en comparación con otras áreas de apoyo diagnóstico como el laboratorio clínico y las técnicas de imágenes diagnósticas. El proceso primordial de diagnóstico (la técnica de H&E) se mantiene relativamente igual a como fue desarrollada hace ya más de 150 años.

El reconocimiento de los efectos tóxicos de los reactivos utilizados durante los procesos del laboratorio, han obligado al aumento de controles ambientales y laborales, a la utilización de mecanismos de protección laboral y la identificación de agentes menos tóxicos que mantengan la misma eficiencia de los utilizados en la rutina.

Por lo tanto el Laboratorio de Patología se enfrenta actualmente a múltiples desafíos que exigen el desarrollo de estrategias técnicas y administrativas que le permitan mantenerse dentro de los sistemas de salud y las condiciones ambientales actuales.

El propósito de este trabajo es comparar los preparados obtenidos con la técnica libre de xileno versus la técnica convencional en el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia.

2. Justificación

Los elevados costos de los servicios de salud han obligado también a que los departamentos y laboratorios de patología se vean enfrentados a ser dependencias más productivas y eficientes en el uso de los recursos. En tal sentido se han investigado estrategias relacionadas con la disminución de costos, disminución del impacto ambiental producto de los insumos y reactivos usados, y la disminución del tiempo en los procesos que se cumplen dentro del laboratorio.

Comparado con los grandes laboratorios de referencia los pequeños y medianos laboratorios son esencialmente manuales, lo que dificulta la implementación de estas estrategias y aumenta el riesgo laboral, el tiempo de ejecución de los procesos y la estandarización de los mismos.

Si bien están descritas múltiples estrategias administrativas para la contención de costos y optimización de los recursos en los laboratorios de patología, es escasa la literatura sobre técnicas innovadoras y de alto impacto que permitan obtener resultados de calidad similar o mejor a los obtenidos con las técnicas rutinarias.

El presente trabajo tiene relevancia en el Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional de Colombia, pues permite la estandarización de nuevos métodos que podrían modificar los costos de procesamiento y el riesgo ambiental, facilitarían la aplicación de técnicas de biología molecular o inmunopatología y por otra parte, aumentaría el interés académico por las técnicas del laboratorio.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Establecer el rendimiento de la técnica libre de xilol versus el procesamiento histotecnológico convencional en muestras de especímenes quirúrgicos recibidas para estudio histopatológico.

3.2 Objetivos específicos

- Implementar y estandarizar el método de procesamiento histotecnológico conocido como “libre de xilol” en el Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional de Colombia.
- Describir y evaluar las características técnicas de los preparados histológicos obtenidos con el uso del procesamiento convencional versus la técnica “libre de xilol”.
- Categorizar el material obtenido mediante el uso del procesamiento convencional versus la técnica “libre de xilol” de acuerdo con la escala de valoración de calidad propia del Laboratorio de Patología Interfacultades, modificada de acuerdo a los criterios de evaluación del Colegio Americano de Patólogos.
- Comparar el resultado de los preparados histológicos procesados con la técnica libre de xilol y el método convencional de procesamiento utilizado en el Laboratorio de la Universidad Nacional de Colombia.

4. Marco referencial

4.1 Definición de técnicas histológicas y reseña histórica

Se consideran como técnicas histológicas la serie de procesos a los que se someten la totalidad o una parte de los tejidos para su estudio microscópico con la finalidad de investigar su estructura y composición ó para el diagnóstico e identificación etiológica de la enfermedad.

Históricamente solo dos siglos después a la invención del microscopio y del descubrimiento de las células por Hooke en 1665, Schleiden y Schwann describen la teoría celular lo cual induce una explosión en la búsqueda de técnicas histoquímicas¹. Hacia 1825, Raspail y Caventou son los primeros en utilizar el yodo como colorante para el almidón en el proceso de fertilización de flores. Durante cerca de 40 años el desarrollo de la histoquímica permaneció estático siendo lentos los avances principalmente en el área de la botánica, teniendo en cuenta que inicialmente las técnicas producían importante alteración estructural y estaban encaminados a demostrar componentes tisulares específicos.

Solo hasta después de 1860 los estudios de Bencke introducen los colorantes de anilina como actores fundamentales en los procesos histoquímicos, generando un cambio revolucionario en la práctica histológica diaria. Esto permitió que se emplearan múltiples colorantes diferentes y mezclas de los mismos para poder correlacionar la tinción con la estructura tisular. Ehrlich, Witt y Mann inician la búsqueda de las bases químicas de las tinciones, mientras que se desarrollaban nuevas técnicas histoquímicas como la hematoxilina y la eosina.

¹ Geneser F. "Histología" Ed. Panamericana, 2000, p. 1

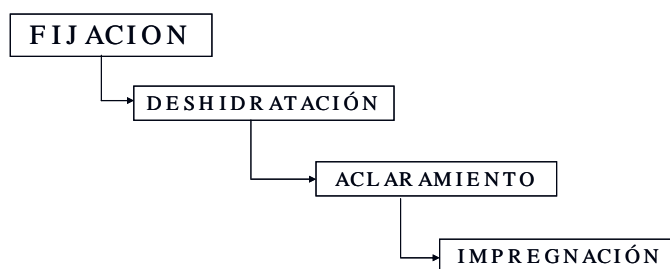
Durante las primeras tres décadas del siglo XX, aparecen múltiples técnicas diferentes como la reacción Ehrlich para células cebadas o la tinción de Gram entre muchas otras. Reconocidos autores como Ramón y Cajal desarrollaron otras técnicas durante sus experimentos.²

A medida que aparecieron las técnicas de inmunopatología se estancó el desarrollo de nuevas técnicas histoquímicas, sin desconocer que en la práctica diaria se utilizan gran cantidad de coloraciones como ayuda a la Hematoxilina & eosina. Sin embargo a pesar de las revisiones que existen sobre la historia de la histoquímica, es poca la literatura que existe sobre la historia de los métodos del procesamiento histológico.

4.2 Procesamiento histotecnológico de tejidos convencional

Para poder hacer una observación microscópica se requiere realizar una adecuada preparación histológica en la que se toman muestras de muy escaso espesor de un bloque de tejido incluido en parafina. La serie de pasos que permiten la inclusión de los tejidos en parafina se denomina procesamiento histotecnológico de tejidos y tiene como objetivo el mantenimiento de la estructura tisular y la dureza del tejido para permitir la inclusión del tejido en un medio sólido para el corte (Ilustración 4-1).

Ilustración 4-1: Pasos del Procesamiento Histológico de Tejidos.



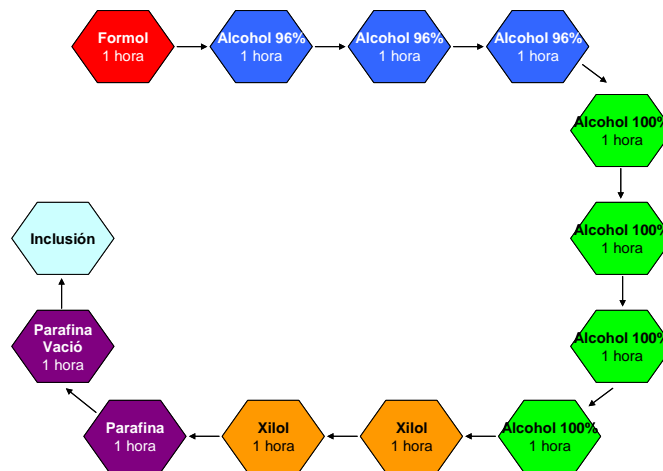
Son diversos los factores que afectan el procesamiento histológico de tejidos:

² Pearse A. "Histoquímica Teórica y Aplicada" 1960. p 9.

- El espesor de los cortes entre 2 y 5 mm es fundamental para asegurar la fijación completa y la adecuada impregnación.
- La temperatura es fundamental para la difusión de los reactivos en los tejidos; una temperatura de 37° a 45° durante el proceso de deshidratación y aclaramiento hace más rápido el procesamiento.
- La utilización del vacío y la presión durante el proceso de impregnación agiliza y optimiza significativamente la difusión de la parafina en el tejido
- La agitación de los casetes permite la circulación de los reactivos y el contacto de los mismos con la mayor área de superficie tisular.³

La utilización de los nuevos procesadores automatizados de tejidos, permite la modificación de estas variables para que el proceso se optimice y a su vez pueda ser agilizado. Además permite que se puedan programar múltiples esquemas de procesamiento en los que cambian el número de baños consecutivos en los reactivos o el tiempo de duración de los mismos. En la ilustración 4-2 se muestra el esquema utilizado actualmente en el procesador automatizado del Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional de Colombia.

Ilustración 4-2: Técnica de Procesamiento Convencional UNAL



³ Crocker J. "The science of the laboratory diagnosis" Jhon Wiley & sons. p.7

4.2.1 Fijación

Cuando los tejidos pierden la capacidad de completar el ciclo biológico, aparece la muerte como la incapacidad celular de recuperar ciertas funciones vitales que le son inherentes, entrando en un proceso denominado autolisis, que no es otra cosa diferente a la autodigestión celular.

Para poder preservar los tejidos se debe evitar que el proceso de autolisis se inicie o se interrumpa lo más pronto posible, utilizando los fijadores tisulares; estas sustancias buscan conservar la arquitectura y la composición tisular lo más cercano posible a cuando el tejido se encontraba vivo, es decir una imagen equivalente. De una adecuada fijación dependerá un satisfactorio diagnóstico; nunca un error de fijación se podrá corregir.

Los procesos de fijación también permiten preservar la composición molecular y la bioquímica de los tejidos de manera que puedan ser teñidas por coloraciones especiales gracias a las reacciones histoquímicas o la identificación de antígenos específicos con métodos de inmunopatología.

Aunque no existe un fijador ideal, se existen ciertas características que permitirán comparar una sustancia de la otra y acercarse al fijador óptimo (Tabla 4-1).

Tabla 4-1: Características del fijador ideal

Características del Fijador Ideal
<ul style="list-style-type: none">• Bloqueo Inmediato de la Autolisis• Efecto microbicida Inmediato• No Inducir retracciones o distorsiones• Inducir cambios de consistencia y textura• para completar el resto del proceso.

La velocidad de penetración del fijador en los tejidos y la velocidad a la cual los tejidos se fijan, son fundamentales para poder bloquear el proceso de autolisis. El proceso de penetración depende de cada agente fijador y del tejido; se puede facilitar el acceso de la sustancia fijadora haciendo cortes en el espécimen, de manera que dicha sustancia ingrese más rápido hasta las zonas profundas de los tejidos.

Además de las características histoquímicas, debe recordarse que existen variables económicas que hacen parte de la escogencia de los productos que se van a utilizar en el laboratorio; por tal razón hay que tener en cuenta que los volúmenes a utilizar y el costo de cada fijador son finalmente parte de las características del fijador ideal.

Los fijadores simples son agrupados en cuatro clases dependiendo del mecanismo por medio del cual actúan sobre los tejidos (Tabla 4-2). Existen algunas sustancias que son utilizadas rutinariamente en el Laboratorio de Patología como fijadores. A continuación se hace una breve descripción de cada uno, enfatizando en el formaldehído que es el fijador de uso más frecuente.

Tabla 4-2: Mecanismos de Fijación

Mecanismos de Fijación			
Deshidratación Tisular		Eliminación de la mayor cantidad de agua del tejido	Alcohol etílico
		Precipitación de las proteínas y pérdida de su actividad	
		Conservación de los determinantes antigénicos	Acetona
		Producción de alteraciones Morfológicas	
Cambios Coloides de las proteínas		Cambio Coloidal por Descenso PH	Ácido acético
		Fijadores Ácidos	Acido Crómico
		Gran Velocidad de Penetración	Ácido
		Capacidad decalcificante	Tricloroacético
Formación de Sales		Formación de sales con Proteínas	Cloruro mercúrico
		Bloqueo de lisis	Dicromato Potásico
Reticularización de las Proteínas		Inducción retículo	<u>Formol</u>
		Rompimiento de puentes de Hidrógeno	Glutaraldehído
		Perdida estructura y función Proteínas	Tetróxido Osmio

▪ **Formaldehído**

El formaldehído (C-H₂-O) hace parte de la familia de los aldehídos, físicamente a temperatura y presión normal se encuentra como gas incoloro, con fuerte olor picante. En las soluciones acuosas el grupo aldehído se hidrata a radical metilenglicol, compuesto

altamente reactivo que forma puentes metálicos con los grupos amino, imino, imido y guanidil entre otros, lo que explica su acción sobre las proteínas tisulares.

El formaldehído tiene la ventaja de ser una molécula pequeña altamente soluble en agua, que penetra fácilmente a los tejidos y provoca un cambio severo en las moléculas proteicas y lipídicas lo que a la postre induce pérdida funcional de las mismas, bloqueando el proceso lítico de los tejidos. Estas propiedades del formol permiten la conservación de los tejidos que van a ser utilizados en las preparaciones histológicas, las cuales posteriormente son sometidas al resto del proceso histotecnológico.⁴

Comercialmente se consigue como una solución saturada de gas formaldehído en agua en una concentración del 37-40% la cual se denomina formalina. Para ser utilizada como solución fijadora debe ser diluida a una concentración del 4% con agua destilada. Adicionalmente, para evitar alteraciones en la morfología por cambios severos en la osmolaridad se puede agregar cloruro de sodio (8,5g/L), sin embargo lo ideal es tamponar la solución con fosfato monobásico (3.5g/L) más fosfato dibásico (6.5g/L). La utilización de formol tamponado evita el ingreso de grandes cantidades de agua a los espacios intercelulares, lo que evita la producción de artificios.

Sin duda es el fijador más utilizado a nivel mundial por ser económico, fácil de preparar, estable, además de ser desinfectante y no endurecer los tejidos excesivamente; a diferencia de los alcoholes, produce escasa retracción tisular y penetra los tejidos a una velocidad de 1 mm/h. En términos generales todos los tejidos se fijan fácilmente en formol por lo que es el fijador de elección.

La exposición al formaldehído del personal que trabaja en los laboratorios de patología (patólogos, histotecnólogos, auxiliares) se encuentra en niveles elevados (> a 3 ppm) suficientes para desarrollar síntomas secundarios.⁵

⁴ García R. "Laboratorio de Anatomía Patológica" Interamericana McGraw Hill. 1993, p 42

⁵ Bingham, E. Patty's Toxicology. John Wiley & Sons, 2001, p. 5

En la Universidad Nacional de Colombia se han realizado estudios^{6,7} para evaluar las concentraciones de formaldehído en los laboratorios y sus efectos sobre la salud del personal expuesto. Por tal razón desde el 2004 se ha desarrollado el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Ocupacional para la Prevención y Detección de Efectos en la Salud, Relacionados con la Exposición al Formaldehído, gracias al cual se han venido dando la pautas para implantar una metodología que permita identificar a tiempo las alteraciones de la salud relacionadas con la exposición al formaldehído y así poder decidir sobre las medidas técnicas y administrativas a que haya lugar.

En el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia se encontró que la concentración del formol, alcanza 2.49 ppm, lo que se considera como riesgo relativo alto puede desencadenar los efectos mencionados en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Efectos Tóxicos del Formaldehído

Efectos Tóxicos del Formaldehído	
Agudos	Crónicos
Escozor nasal	Asma de origen laboral
Lagoftalmos	Dermatitis alérgica
Irritación y “agrietamiento” dérmico	Somnolencia
Ulceración y opacidad cornea	Perdida de la Memoria
Broncoespasmo	Carcinoma Nasofaríngeo y sinusal

La irritación ocular es uno de los primeros síntomas en aparecer en las personas que no están expuestas rutinariamente a concentraciones de 0.5 ppm. Es especialmente grave la exposición en pacientes con hipersensibilidad bronquial como los asmáticos o pacientes con EPOC por el alto riesgo de broncoespasmo. La exposición crónica puede inducir cambios en la espirometría, presentando reducción severa del volumen espiratorio forzado en el primer segundo VEF-1.

Recientemente la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), ha ubicado al Formaldehído en el grupo 1, como agente carcinogénico por la fuerte evidencia encontrada tanto en humanos como en modelos animales, principalmente en el

⁶ Rojas G. “Evaluación de concentración del Formaldehído – UNAL”. UNAL – ARS Seguro Social, 2006, p9

⁷ UNAL – ARS. Seguro Social. “Evaluación de la exposición ocupacional a contaminantes químicos: Formaldehído y Monóxido de Carbono UNAL” 2007, p16

desarrollo de carcinoma nasofaríngeo, carcinoma sinusal, y el aumento en el riesgo relativo de desarrollar leucemia de tipo mieloide.⁸

▪ **Glutaraldehído**

Sintetizado en 1908 el glutaraldehído (C5-H8-O2) es un dialdehído líquido de características oleosas que actúa de manera muy similar al formaldehído, siendo utilizado mucho tiempo después de su invención en los procesos de fijación para microscopía electrónica y de luz. Es más estable al encontrarse en soluciones ácidas y a temperaturas entre 0 y 4 °C.

Comercialmente el glutaraldehído se consigue como una solución al 25% que debe ser diluida a una concentración del 1, 2.5 ó 4% utilizando el amortiguador de fosfato de Sorensen, 0.1 M, de PH 7.4; esta dilución mantiene su potencia aproximadamente durante tres meses entre 0 y 4°C o dos semanas a temperatura ambiente.

Las biopsias pueden ser fijadas con solución al 2.5% requiriendo de 2 a 4 horas para la fijación completa. Los especímenes de mayor tamaño, requieren mínimo de 24 horas para su completa fijación y un volumen 20 veces mayor al del espécimen, lo que aumenta sus costos en el laboratorio. Posterior a la fijación, los tejidos deben ser deshidratados en alcohol etílico y luego ser incluidos de manera habitual.

Son conocidas las características del glutaraldehído como guardián de la morfología celular ya que forma enlaces más estables con las proteínas, aumentando su estabilidad y evitando la hidrólisis ácida, razón por la cual es el fijador de elección para la microscopía electrónica. Tiene una velocidad de fijación muy baja, por lo cual no es muy utilizado con especímenes de mayor tamaño; de otra parte genera importantes retracciones y endurecimiento tisular, por lo que requiere que el tiempo de fijación sea estrictamente vigilado y en la preparación de la técnica de PAS induce un importante fondo positivo, lo cual tiende a disminuir significativamente su utilidad.

⁸ IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. "Formaldehyde". 2006. p. 2

El glutaraldehído es considerado un irritante de las mucosas y de las vías respiratorias altas, a bajas concentraciones y por periodos cortos, teniendo presente que por la baja presión de vapor, la exposición a gases irritantes es relativamente baja. En ojos y piel se observan reacciones adversas después de 0.3 ppm., pero las reacciones dérmicas no son frecuentes. No han sido descritos efectos carcinogénicos en animales y humanos.⁹

▪ **Alcohol etílico**

El alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es un líquido transparente, inflamable, muy volátil y de olor agradable. En el laboratorio de patología se usa principalmente en el proceso de deshidratación tisular, pero también puede ser utilizado como fijador.

El etanol se consigue comercialmente como alcohol absoluto siendo muy costoso para evitar su adquisición clandestina para la elaboración de bebidas alcohólicas de contrabando. Como fijador se puede utilizar en una concentración entre el 70 y el 90%, tomando 70 a 90 ml de alcohol absoluto y completando 100 ml con agua destilada.

Tiene las ventajas de preservar el glucógeno, los antígenos y ciertas enzimas por lo que es el de preferencia como fijador en los métodos inmunohistoquímicos. Por otra parte penetra rápidamente los tejidos y los deshidrata al mismo tiempo de fijarlos, lo que disminuye a la postre el tiempo de procesamiento.

Durante el proceso endurece y contrae excesivamente los tejidos, además disminuye progresivamente su concentración por diluirse con el agua que extrae de los tejidos, perdiendo de esa forma su actividad. En la práctica se utiliza solo como fijador de láminas de citología.¹⁰

Son conocidos los efectos del etanol sobre el Sistema Nervioso Central cuando es ingerido como componente de una bebida alcohólica. A nivel laboral, concentraciones elevadas de vapor del etanol puede producir síntomas irritativos oculares pero no se han

⁹ American Conference of Governmental Industrial Hygienists. "Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices" 2005, p. 31

¹⁰ Op Cit. P. 34

documentado lesiones oculares permanentes. El contacto directo del etanol con las conjuntivas, puede producir quemadura química leve a severa dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición. La manipulación del alcohol etílico debe ser cuidadosa por su carácter inflamable. La adecuada señalización y precauciones para la manipulación son fundamentales para evitar accidentes fatales en el laboratorio. No han sido descritos efectos carcinogénicos en animales ni en humanos.¹¹

▪ Otros fijadores

Existen otros fijadores que preservan ciertas características tisulares que les permiten ser escogidos por el patólogo para casos especiales (Tabla 4-4).

Los fosfolípidos por ejemplo, son muy bien preservados con la solución fijadora de Baker que utilizaba la formalina con cloruro de calcio y de cadmio. Posteriormente, McManus modificó el cloruro de cadmio por nitrato de cobalto que era más económico y mantenía la eficiencia.

La solución de Bouin (ácido pícrico más formalina concentrada), es muy utilizada como alternativa a la formalina en tejidos muy quebradizos como la piel, los órganos endocrinos, testículo y tejidos embrionarios o cuando el histotecnólogo no es muy experimentado.

▪ Nuevos fijadores - UMFIX¹²

Durante los últimos años se ha utilizado un nuevo fijador molecular desarrollado por **Sakura Finetek USA, Inc.** denominado UMFÍX, el cual es una mezcla de polietilenglicol y metanol que preserva las macromoléculas de los tejidos, moléculas que normalmente se alteran durante la fijación con formol.

¹¹ American Conference of Governmental Industrial Hygienists. "Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices" 2008, p. 28

¹² Vincek V. "A Tissue Fixative that Protects Macromolecules (DNA, RNA, and Protein) and Histomorphology in Clinical Samples". *Lab Invest* 2003; 83: 1427.

Los avances en biología molecular exigen actualmente que las macromoléculas sean conservadas y hasta ahora solamente los tejidos en fresco son capaces de dar el mejor rendimiento para técnicas como PCR, CISH, FISH, Western blot o inmunohistoquímica.

En el Hospital Jackson Memorial el Dr. Nadji y colaboradores de la Universidad de Miami, han probado con éxito el UMFIX como fijador tisular obteniendo resultados histológicos similares a los que se obtienen con el formol. De otra parte no se han encontrado diferencias significativas entre los tejidos frescos y fijados con UMFIX al realizar PCR, microarreglos y otras técnicas moleculares, lo que demuestra que la preservación y recuperación antigénica es muy similar entre los dos métodos. El UMFIX también parece tener excelente actividad microbicida gracias al metanol.

Tabla 4-4: Otros Fijadores

Otros Fijadores	
Simples	Tetróxido Osmio
	Cloruro mercúrico
	Dicromato Potásico
	Ácido acético
Compuestos	Bouin
	B5
	Zenker
	Bouin Hollander

La cercanía que parece tener el UMFIX con el método de fijación ideal, dista solamente por el elevado costo que lo hace una alternativa aún lejana para ser utilizado como método de rutina en el laboratorio.

4.2.2 Deshidratación tisular

Los tejidos contienen gran cantidad de agua intra y extracelular que debe ser extraída y reemplazada por un medio que llene las cavidades y le confiera consistencia firme para realizar los cortes. Este proceso recibe el nombre de deshidratación.

Para realizar este proceso se pueden utilizar diferentes sustancias que tengan afinidad con el agua, que se mezclen con ella y puedan penetrar fácilmente en los tejidos y cumplir su función sin alterar las estructuras tisulares para posteriormente ser removida sin inconvenientes por el agente aclarante (Tabla 4-5).

Tabla 4-5: Agentes Deshidratantes

Agentes Deshidratantes
Alcohol Etilico
Alcohol Metílico
Dioxano
Butanol

Existen otros procesos físico-químicos capaces de cumplir este paso como la crioprecipitación y la criosustitución, los cuales no son el objeto de la presente revisión.

Dentro de las características que deben tener los agentes deshidratantes está la rapidez con la que debe concluirse el proceso de deshidratación, disminuir el endurecimiento tisular, producir escasos niveles de toxicidad por contacto e inhalación de vapores tóxicos y mínimos riesgos de incendio o explosión. A continuación se describen los más importantes agentes deshidratantes.

- **Alcohol etílico**

El agente deshidratante más utilizado en los laboratorios de patología es el alcohol etílico. Por sus características permite que se termine el proceso de fijación mientras se realiza la deshidratación tisular.

Para realizar el proceso de deshidratación con etanol se utilizan múltiples baños con alcoholes de concentraciones ascendentes para evitar retracciones severas de los tejidos. El volumen del baño de alcohol debe ser 10 veces mayor al volumen de las muestras que se van a deshidratar para obtener un proceso de deshidratación rápido.

Los baños ascendentes en alcohol permiten que el índice de saturación del agua en el alcohol sea menor, por lo que los alcoholes pueden ser reutilizados y por lo tanto se disminuyen costos en el laboratorio de patología.

Recientemente en el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia se están realizando mediciones diarias de las concentraciones de los alcoholes del procesador automatizado de tejidos, utilizando el alcoholímetro de Gay-Lussac. Aunque no se han publicado los resultados, la utilización de esta simple

metodología garantiza que los alcoholes de los baños de deshidratación estén siempre en concentraciones ascendentes. Por otra parte, permite establecer el comportamiento de cada uno de los alcoholes a medida que es utilizado, dando criterios objetivos y cuantitativos para el recambio de los alcoholes.

▪ **Alcohol Metílico**

El alcohol metílico o metanol (C-H4-O), es un líquido incoloro de olor picante miscible en etanol, éter, benceno y en la mayoría de solventes orgánico.¹³

En el laboratorio de patología su uso es limitado por ser muy inflamable y su alta toxicidad. Su uso más importante está relacionado con la fijación de las láminas de citología, pero por su bajo costo, en ocasiones se utiliza como alternativa del alcohol etílico en el proceso de deshidratación o como componente del alcohol etílico industrial, el cual es más económico que el alcohol absoluto.

El metanol puede ser fácilmente absorbido vía percutánea, inhalatoria o por vía oral produciendo acidosis metabólica, toxicidad ocular, alteraciones severas del Sistema Nervioso Central, ceguera y en casos severos la muerte. La exposición crónica al metanol se ha relacionado con alteraciones oculares progresivas. En animales se ha comprobado efecto teratogénico viéndose relacionado con paladar hendido y efectos embrietales en ratones. No se han descrito efectos carcinogénicos¹³.

4.2.3 Aclaramiento

Es el proceso mediante el cual el alcohol depositado en los tejidos durante el proceso de deshidratación es reemplazado por una sustancia capaz de mezclarse con el medio de inclusión. El agente ideal debe tener la capacidad de eliminar el alcohol rápidamente sin inducir lesiones en la morfología tisular como excesivo endurecimiento y retracciones. Las sustancias más utilizadas en este proceso han sido los hidrocarburos entre los que

¹³ <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+93>

se destacan el tolueno, el benceno y el xilol, siendo este último el más utilizado en los laboratorios de patología por lo cual se revisaran sus características más detenidamente a continuación (Tabla 4-6).¹⁴

Tabla 4-6: Agentes aclarantes¹⁵

Agentes Aclarantes		
Agente	Ventajas	Desventajas
Xilol	Acción rápida Endurece poco el tejido Se elimina fácil del medio de inclusión	Muy tóxico Aclara solo desde alcohol absoluto Vuelve quebradizo el tejido
Tolueno	Acción rápida Endurece poco los tejidos Conserva en el tiempo la muestra sin alteraciones	Muy tóxico y Carcinogénico Aclara solo desde alcohol absoluto
Benceno	Acción rápida Eliminación del tejido fácil Produce mínima retracción tisular	Muy tóxico Altamente inflamable
Cloroformo	Poca alteración tisular Muy útil en tejidos fibrosos	Difícil eliminación de la parafina Efectos narcóticos
Tetracloruro de Carbono	No es inflamable Más económico	Muy tóxico y Carcinogénico Difícil eliminación de la parafina.

- **Xilol**

Es el agente aclarante por excelencia. Es un líquido transparente de olor dulce que comercialmente está compuesto por la mezcla de tres isómeros: orto, meta y para-xileno. Industrialmente es utilizado como componente de la gasolina de los aviones y en la producción de pinturas como solvente.

En el laboratorio de patología es ampliamente utilizado como aclarante durante el procesamiento de tejidos gracias a que actúa rápidamente y produce pocos efectos sobre la consistencia y la morfología tisular; además es miscible en múltiples medios de

¹⁴ Crocker J. "The science of the laboratory diagnosis" Jhon Wiley & sons. Pág 9.

¹⁵ García R. "Laboratorio de anatomía Patológica" Interamericana McGraw Hill. P. 70.

inclusión como la parafina y la celoidina, siendo eliminado muy fácilmente del tejido durante el proceso de impregnación.

Idealmente se realizan dos o tres baños sucesivos de una hora cada uno. Cuando este tiempo se prolonga, se produce un endurecimiento excesivo del tejido y lo hace muy quebradizo principalmente cuando los tejidos son ganglios linfáticos o el Sistema Nervioso central.

Los efectos adversos producidos por la exposición al xileno han sido una razón poderosa para la búsqueda de nuevos métodos que no requieran la utilización de aclarantes rutinarios durante el procesamiento histológico¹⁶.

La inhalación del vapor del xileno produce cefalea, irritabilidad y náuseas; además en pacientes expuestos crónicamente a concentraciones por encima de 200 ppm, se han observado redistribución del xilol en el tejido adiposo, alteraciones en el patrón del sueño, toxidermia, y pancitopenia. A pesar de que los estudios realizados en animales expuestos crónicamente han mostrado una baja toxicidad, existen evidencias sugestivas de toxicidad del sistema nervioso central, el hígado y los riñones cuando se incrementa la concentración ambiental del xileno¹⁷. Por otra parte, no se han comprobado efectos carcinogénicos o teratogénicos por la exposición crónica al xileno.

En Estados Unidos es utilizado como agente aclarante hasta en el 59% de los laboratorios. Más del 30% de dichos laboratorios tienen el proceso de tinción y de montaje aún manual, aumentando la exposición del tecnólogo al xilol, especialmente al realizar las tinciones especiales (87%), reciclaje (57%), montaje (38%) entre otras. En Colombia no existen estadísticas de cuantos laboratorios tienen completamente automatizados todos sus procesos, sin embargo es claro que la tinción, montaje y

¹⁶ Falkeholm L . "Xylene-Free Method for Histological Preparation: A Multicentre Evaluation". Lab Invest. 2001. Vol. 81, No. 9, p. 1213

¹⁷ International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria. "Xylenes" 1997. p. 1

realización de coloraciones especiales es manual en más del 95% de los laboratorios, situación que aumenta la exposición de los técnicos al xilol.¹⁸

La Conferencia Americana de Higienistas industriales de Estados Unidos recomienda 434mg/m³ como valor límite para la exposición ocupacional al xilol en el aire del lugar de trabajo¹⁹. Desafortunadamente en el Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional de Colombia, no se han realizado mediciones de la concentración ambiental del xilol.

4.2.4 Impregnación

Es el proceso que tiene por objeto “rellenar” completamente la muestra histológica con el medio que se va a utilizar para la imbibición del tejido²⁰. La técnica se fundamenta en reemplazar el agua tisular por un medio que penetre los espacios intersticiales e intracelulares y le dé al tejido homogeneidad y la dureza suficiente para obtener cortes finos y de calidad.

Se han utilizado diferentes medios de inclusión pero son la parafinas las que se emplean actualmente por ser económicas, fáciles de usar y compatibles con los reactivos utilizados en los procesos previos a la impregnación. Otros medios de inclusión como la celoidina causan menos distorsión y encogimiento tisular comparado con la parafina, pero requieren de un procedimiento lento y tedioso por lo cual no es práctico en el laboratorio de patología. En raras ocasiones se utiliza la inclusión en gelatina, siendo está reservada para técnicas histoquímicas que requieren mantener ciertas características químicas tisulares especiales.

La parafina es una sustancia conformada por hidrocarburos saturados de cadenas largas. El punto de fusión permite la categorización de las mismas estando estas en un rango entre los 39° y los 68°C. En los laboratorios de patología se utilizan rutinariamente

¹⁸ Buesa R J. "Histology safety: now and then." Ann Diag Pathol, 2007: 334-9.

¹⁹ IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Xylene. 1989

²⁰ Op Cit. P. 71

temperaturas de fusión entre 56° a 58°C, siendo este rango el óptimo para la impregnación e inclusión posterior de la gran mayoría de los tejidos (Tabla 4-7).

Existe una característica fundamental de la parafina denominada punto de plasticidad que es “la temperatura más baja a la que puede ocurrir una deformación permanente sin sufrir fracturas”²⁰. La dureza de la parafina gira alrededor de esta característica siendo incluso más importante que el mismo punto de fusión.

Tabla 4-7: Tipos de Parafina²¹

Tipos de Parafina			
Tipo de Parafina	Punto de Fusión	Grosor del Corte	Temperatura del Bloque
Blanda	50-52°C	Grueso	Frío (4°C)
Blanda	53-55°C	Grueso	Frío (4°C)
Dura*	56-58°C	Fino	Frío (4°C)
Dura	60-68°C	Fino	Templada

*Parafina de uso de rutina en Laboratorio de Patología

Para evitar la oxidación (coloración amarillenta y consistencia blanda) de la parafina clásica se desarrollaron nuevos compuestos como el Paraplast que es una mezcla de parafina con polímeros plásticos y dimetil sulfóxido dándole mayor dureza y homogeneidad al bloque, disminuye la fragilidad y lo más importante, permite obtener cortes más uniformes y de mejor calidad. Para realizar el proceso de infiltración se realizan dos o tres baños de una a dos horas en parafina en estado líquido.

Actualmente los procesadores automatizados de tejidos (Ilustración 4-3) tienen la ventaja de tener adosado al último recipiente una cámara al vacío permitiendo que este baño en parafina sea más rápido, elimine eficientemente el aclarante y el aire restante en los tejidos, lo que mejora ostensiblemente la impregnación tisular.

4.2.5 Inclusión

Es el último proceso antes de realizar el corte. Consiste en colocar el tejido dentro de un bloque de parafina de dureza y plasticidad homogénea que faciliten el corte del tejido en

²¹ Op. Cit. P. 72

el micrótopo. Aunque se puede realizar el proceso de inclusión en otros medios como gelatina o celoidina, la parafina es el medio de inclusión utilizado con más frecuencia en los laboratorios de patología. (Tabla 4-7)

Para realizar el proceso de inclusión, el histotecnólogo debe inicialmente colocar el tejido en una posición adecuada teniendo en cuenta que la cara inferior es la superficie de corte y por lo tanto el segmento que será observado en el microscopio; la orientación se hace sobre un molde metálico donde se depositará la parafina líquida y la base plástica sobre la cual reposará el bloque. Finalmente se traslada el molde a una placa fría de manera que la parafina se enfriará lentamente evitando artificios de contracción por el enfriamiento brusco.

Ilustración 4-3: Procesador Automatizado de Tejidos Cytadell®



Para facilitar la inclusión y la confección de los bloques se han diseñado estaciones que dispensan la parafina líquida sobre una placa caliente donde se realiza la orientación del tejido, además tienen incluida la placa fría para el enfriamiento del bloque (Figura 4-4).

Ilustración 4-4: Estación de Inclusión



4.3 Alcohol isopropílico y procesamiento histotecnológico de tejidos libre de xilol

4.3.1 Alcohol isopropílico y el laboratorio de patología

El alcohol isopropílico (C_3H_8O) es un líquido transparente de olor agradable utilizado en la industria como disolvente de pinturas, componente de agentes químicos y de la industria cosmética.²²

Desde mediados del siglo XX el alcohol isopropílico fue utilizado en el laboratorio de patología como sustituto del alcohol etílico en el procesamiento de tejidos gracias a su bajo costo y a sus escasos efectos tóxicos; posteriormente, por ser miscible en parafina fundida, se empezó a utilizar como agente aclarante eliminando el uso de reactivos como el xilol, el benceno y el cloroformo. Este detalle permitió acelerar y simplificar el procesamiento de tejidos, evitando la condensación tisular que producían los agentes aclarantes y dándole mayor plasticidad a los bloques embebidos en parafina para el corte.²³

A pesar de ser un excelente fijador de los ácidos nucleicos y de otras macromoléculas, el alcohol isopropílico no es recomendado como fijador de rutina por su lenta difusión tisular, sin embargo el isopropanol ha sido utilizado como componente de múltiples fijadores compuestos como el fijador de Tellesnitski, fijador de Brasil y el fijador de Carnoy (Tabla 4-8).

Existe escasa literatura contundente que soporte el uso del alcohol isopropílico como reactivo de utilización rutinaria en el laboratorio de patología. Viktorov y colaboradores reportaron que en sus ensayos han encontrado excelentes resultados y disminución de

²² IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Isopropanol. Vol.71 1987. p. 1027

²³ I. V. Viktorov. "Use of Isopropyl Alcohol in Histological Assays: Dehydration of Tissue, Enbessing into paraffin, and Processing of Paraffin Sections" *Bullet of Exper Biol and Med.* 2003 No. 1, p.105

los costos al ser reemplazado el alcohol etílico y el xilol durante el procesamiento por isopropanol.²⁴

Tabla 4-8: Soluciones Fijadoras que Utilizan Alcohol Isopropílico

Soluciones Fijadoras que utilizan Alcohol Isopropílico	
Solución Fijadora	Componentes
Tellesnitski	700 ml Isopropanol 200 ml Formol tamponado 100 ml Ácido acético Glacial
Carnoy	600 ml Isopropanol ó Etanol 300 ml Cloroformo 100 ml Ácido Acético Glacial
Brasil	2040 ml Formalina al 30% 6000 ml Alcohol isopropílico 80 g Ácido Pícrico 65g Ácido Tricloracético

4.3.2 Procesamiento histológico libre de xilol

En Suecia en el Hospital Vrinnevi, Fakelholm y colaboradores desarrollaron en 1995 un nuevo método de procesamiento de tejidos libre de xilol encaminado a afrontar los problemas actuales de los laboratorios de patología: disminución de costos, disminuir el tiempo de procesamiento y mejorar el ambiente laboral.²⁵

El método consiste en utilizar tejidos fijados en formol y procesarlos realizando un paso de 30 minutos en agua y posteriormente seis baños sucesivos en alcohol isopropílico terminando en cuatro pasos por parafina. (Ilustración 4-5)

Falkelhom comparó el procesamiento de tejidos rutinario con el procesamiento libre de xilol utilizando cortes de piel, intestino y mama los cuales fueron tratados con cada uno de los métodos y posteriormente teñidos con las coloraciones de H&E, Van Gieson y PAS. (Ilustración 4-6)

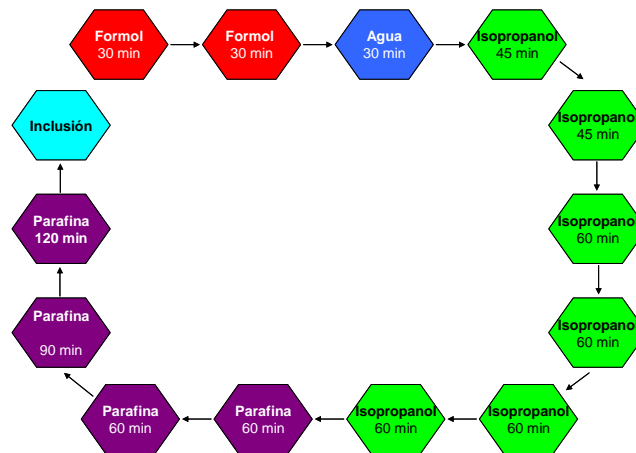
Para realizar el proceso de desparafinización de las láminas antes de la coloración, utilizó calor y agua mezclada con detergente para platos, el cual agiliza el proceso comparado

²⁴ Ibid p.106

²⁵ L Falkeholm, "Xylene-Free Method for Histological Preparation: A Multicentre Evaluation". Lab Invest. 2001. Vol. 81, No. 9, p. 1213.

con el método convencional que utiliza incubadora y posteriormente xilol y rehidratación con alcohol etílico. Buesa y colaboradores estandarizan el proceso, optimizando los resultados de la desparafinización y haciéndolos equivalentes a los resultados obtenidos con el proceso convencional con xilol (Ilustración 4-7).²⁶

Ilustración 4-5: Procesamiento libre de xilol



En su estudio se encontró que los preparados histológicos tratados sin xilol presentaban calidad similar a las láminas procesadas con el método de rutina encontrando buena aceptación de los patólogos participantes en el estudio (Ilustración 4-8).

Los patólogos mostraron como inconveniente la pobre diferenciación entre el citoplasma y el colágeno con la tinción de Van Gieson; el autor atribuye dicha dificultad a problemas con reactivos de la tinción y no al método de procesamiento como tal.

Según el autor, el método libre de xilol es equivalente al procesamiento rutinario de tejidos con la ventaja que permite mejorar las condiciones ambientales del laboratorio; por otra parte la utilización del alcohol isopropílico disminuye los costos eliminando la necesidad del xilol para el procesamiento.

Los resultados sugieren que el método de procesamiento libre de xilol puede ser utilizado como método de rutina en cualquier laboratorio de patología.

²⁶ Ibid. Pág 1213.

Ilustración 4-6: Comparación Métodos de Procesamiento de Tejidos

Procesamiento de Tejidos					
Rutina UNAL			Libre de Xileno		
Horas		Minutos		Minutos	Horas
5	Formol	60	30	Formol	5
	Etanol 96%	60	30	Formol	
	Etanol 96%	60	30	Agua	
	Etanol 96%	60	45	Isopropanol	
	Etanol 99%	60	45	Isopropanol	
	Etanol 99%	60	60	Isopropanol	
	Etanol 99%	60	60	Isopropanol	
	Etanol 99%	60	60	Isopropanol	
	Etanol 99%	60	60	Isopropanol	
	Xileno	60	60	Parafina	
10	Xileno	60	60	Parafina	10
	Parafina	60	90	Parafina	
	Parafina	60	120	Parafina	
	Parafina	60			
		720			750

4.3.3 Efectos tóxicos del alcohol isopropílico

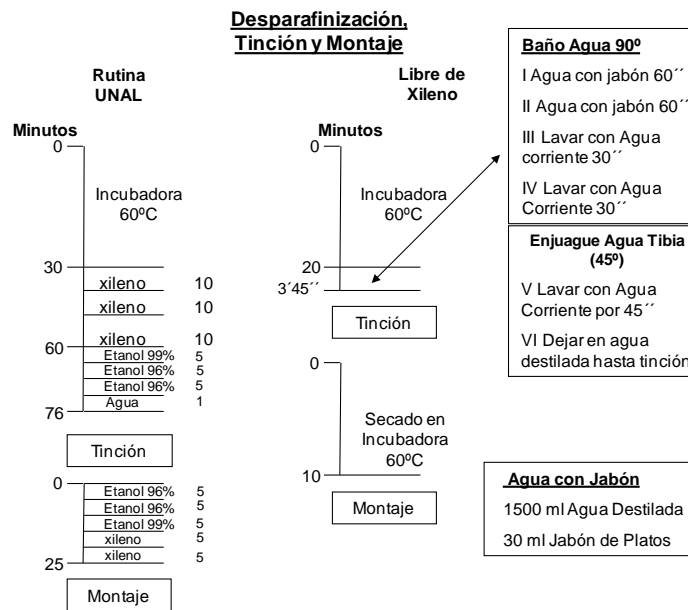
Son pocos los efectos tóxicos que se conocen del alcohol isopropílico. Agudamente, se ha observado irritación ocular y nasal al ser expuesta la persona por varios minutos a concentraciones mayores a 400 ppm²⁷. La ingesta de pequeñas cantidades de alcohol isopropílico (2.6–6.4 mg/kg) no se ha relacionado con ningún efecto tóxico. Mayores cantidades pueden inducir depresión del sistema nervioso central e incluso la muerte; personas fallecidas por alcohol isopropílico, principalmente alcohólicos, desarrollan edema pulmonar severo²⁸.

²⁷ Clayton, G.D. Toxicology. 4th ed. John Wiley & Sons Inc. 1994, p. 2634

²⁸ IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Isopropanol. Vol.71 1987. p.1031

Según la IARC, no se ha encontrado evidencia de carcinogenicidad inducida por el alcohol isopropílico (grupo3). Tampoco se ha encontrado efectos teratogénicos en modelos animales expuestos a alcohol isopropílico²⁹.

Ilustración 4-7: Desparafinización, tinción y Montaje



4.4 Estrategias para la disminución de costos en el laboratorio de patología

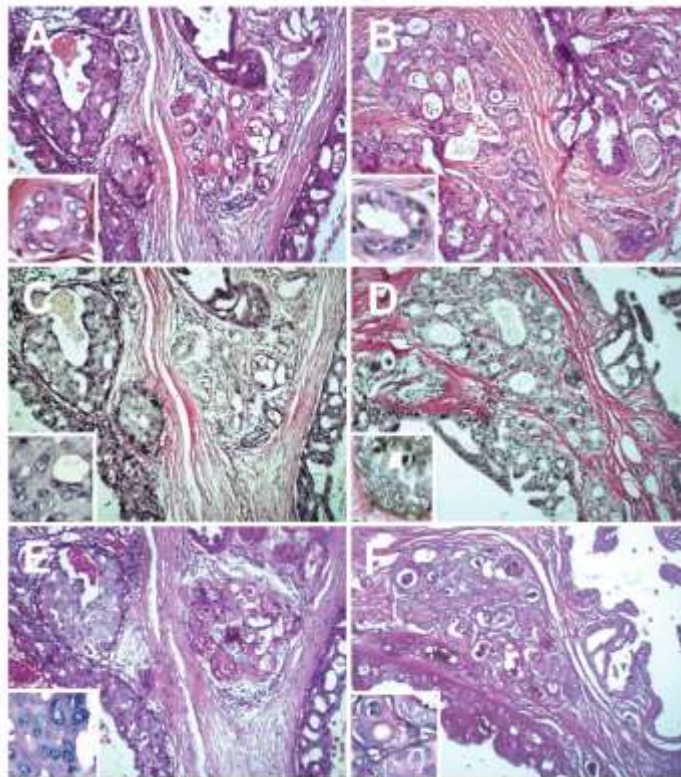
Los cambios mundiales en la prestación de servicios de salud han obligado a la búsqueda de estrategias que permitan la contención de costos en cada una de las dependencias. Departamentos como el laboratorio clínico han desarrollado extensos protocolos de control de calidad, estandarización de procesos y proyectos de automatización de sus instalaciones con el objetivo de volver más eficientes la prestación de los servicios (Tabla 4-9).

A pesar del boom mundial de los procesos automatizados, muchos de los procesos en los laboratorios de patología continúan siendo manuales, obligando a los patólogos a

²⁹ Ibid. P. 1032

contratar mano de obra que realice cada uno de los procesos, generando costos fijos elevados que consumen una gran parte de sus recursos.

Ilustración 4-8: Mama. Comparación de los métodos de Procesamiento. A y B. H&E; C y D. Van Gieson; E y F. PAS. Cortes libres de xilol a la izquierda, Cortes convencionales a la Derecha.²⁵



Laboratorios de patología australianos han enfocado su búsqueda hacia estrategias que permitan organizar redes de trabajo eficientes, métodos de procesamiento rápidos de especímenes y la entrega pronta de resultados³⁰. De esta forma han desarrollado grandes laboratorios centralizados con sistemas de información computarizados que agilizan la recepción de muestras y el inicio del procesamiento; igualmente han automatizado los métodos histotecnológicos y de inmunohistoquímica, con grandes

³⁰ Leong A. "Strategies for laboratory cost containment and for pathologist Shortage: centralised pathology laboratories with microwavestimulated Histoprocessing and telepathology". Pathology, 2005, p 2.

maquinas que estandarizan y agilizan los procesos, disminuyen la mano de obra y hacen eficientes el procesamiento de altos volúmenes de trabajo.

Además la utilización de métodos de procesamiento rápido con horno microondas es fundamental para el concepto de laboratorios centralizados. Se han elaborado hornos microondas y protocolos de procesamiento que permiten el tratamiento de hasta 120 bloques de especímenes pequeños en una hora aproximadamente con excelentes rendimientos histomorfológicos, histoquímicas e inmunohistoquímicos.³¹

Tabla 4-9: Estrategias para disminución de Costos en los laboratorios de patología

Estrategias para Disminución de Costos	
Grandes Laboratorios	Pequeños Laboratorios ³²
Centralización de Laboratorios	Recuperación de Formaldehído
Procesamiento rápido de Tejidos	Procesamiento de tejidos libre de xilol
Automatización de Procesos	Modificación de coloraciones Recuperación de
Telepatología	Parafina
	Monitorización de la concentración de los
	Alcoholes del Procesador de Tejidos

Gracias a la innovación de microscopios y cámaras digitales se pueden conseguir imágenes de calidad que se pueden visualizar en monitores de alta definición. Aprovechando este recurso, se ha desarrollado la telepatología, la cual aprovecha la transmisión de datos por la red a laboratorios retirados del lugar de procesamiento, facilitando las interconsultas a laboratorios especializados o de mayor complejidad agilizando los diagnósticos y la entrega de resultados.

Observando la situación desde otro punto de vista, laboratorios de patología cubanos han desarrollado diferentes métodos encaminados a la solución de problemas específicos generados por las precarias condiciones económicas del país.

³¹ Morales A. "Continuous-Specimen-Flow, High-Throughput, 1-Hour Tissue Processing" Arch Pathol Lab Med. 2002, Vol 126.pág 589.

³² Martínez W. "Manual de Procedimientos Técnicos para Tiempos Díficiles en Anatomía Patológica". 2005, p. 39.

Para dicho fin han desarrollado un “Manual de procedimientos técnicos en tiempo difíciles” con el que dan soluciones a muchos problemas aplicados al Departamento de Patología. Entre muchos procedimientos técnicos descritos, aparece la reutilización del formol tamponado al 10% después de ser decantado, filtrado y pasar por pruebas de control de calidad³². Otro método hace referencia a la recuperación de parafina cortando el exceso de los bloques y recojiéndola para ser fundida, filtrada y finalmente reutilizada³³.

Es necesario continuar investigando nuevas metodologías dentro del laboratorio de patología que permitan a los laboratorios pequeños y medianos, rendimientos superiores o al menos similares para mantenerse competitivos en el sistema de salud actual y competir con las fuertes estrategias de los grandes laboratorios de la patología.

4.5 Control de calidad en el laboratorio de patología

El concepto de calidad comprende la totalidad de las características de un producto o servicio, que le confieren aptitud para satisfacer las necesidades establecidas en un contrato con un usuario ó cliente³⁴.

Bajo estos lineamientos los laboratorios clínicos y de patología deben prestar un servicio de calidad que permita ofrecer información sobre el estado de salud al médico solicitante, utilizando un informe analítico para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento del paciente que se encuentre dentro de los requisitos legales establecidos³⁵.

Para dicho fin se han incorporado en los laboratorios los sistemas de gestión de calidad que permiten estructurar los procesos y de esta manera ponen de manifiesto la calidad de un producto o un servicio; un sistema de gestión de calidad es un conjunto de

³³ Ibid. 18.

³⁴ Gallego J. “Manual de Calidad, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia,” 2005, p 1.

³⁵ de la Fuente Capdevila B. “El laboratorio clínico y la gestión de la calidad por procesos”. Quím. Clín 2003; 22 (2) 44-47

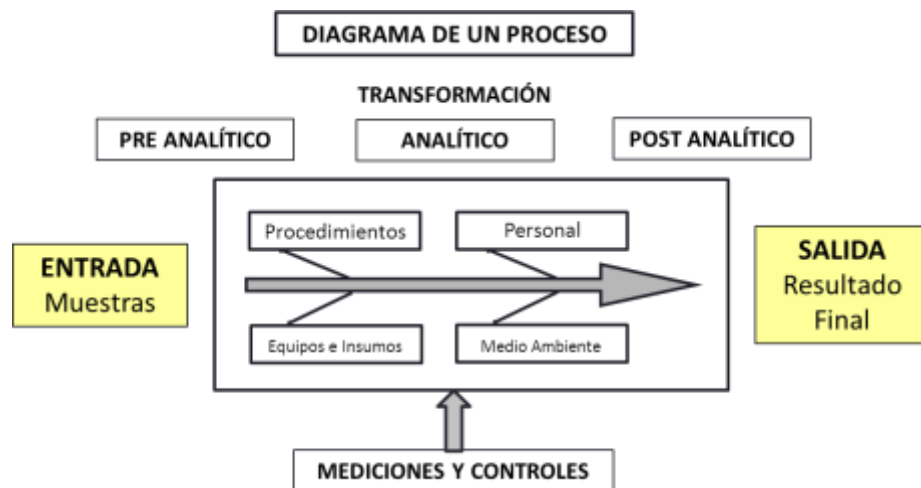
elementos relacionados que interactúan estableciendo una política y objetivos para dirigir y controlar una organización con respecto a la calidad³⁶.

El aseguramiento de la calidad exige que todas las actividades y procedimientos sean planificados y sistemáticos de manera que se pueda demostrar confianza que el producto final cumplirá con los requisitos establecidos previamente. Los resultados se ven reflejados en la mejora continua de la prestación de los servicios.

La gestión de procesos permite estructurar adecuadamente un sistema de gestión de calidad; “un proceso es una secuencia de actividades que transforman los insumos en un resultado o servicio que generen una información de salida que generalmente crea un valor agregado para el usuario”³⁷

En el proceso de estudio histopatológico se distinguen tres etapas claves: Etapa pre analítica, etapa analítica y la etapa postanalítica. (Ilustración 4-9).

Ilustración 4-9: Elementos de un proceso



En el laboratorio de patología las etapas preanalítica está relacionada con la recepción de las muestras, confirmación de datos, ingreso de la información al sistema y asignación de un número de registro; la fase postanalítica está relacionada con la digitación y

³⁶ Op. Cit. p. 1

³⁷ Ramirez E. “Documentación del Sistema de Calidad”. 2005 p 14-15

entrega del resultado final al paciente. La calidad de las dos etapas está claramente percibida por el cliente (médico y paciente) porque su carencia produce insatisfacción como retraso en la disponibilidad del informe o la necesidad de toma de una nueva muestra.

La calidad de la fase analítica determina la utilidad clínica del informe producido y el resultado de los procedimientos ejecutados están implicados directamente con el patólogo responsable y la calidad de su diagnóstico³⁸. Para tal fin se han desarrollado documentos que proporcionan instrucciones necesarias para la ejecución correcta de los procedimientos técnicos³⁹.

En los laboratorios de patología la automatización ha sido un proceso lento que actualmente compromete a las grandes redes de laboratorios o a los laboratorios de referencia; los laboratorios medianos y pequeños siguen utilizando procedimientos manuales que han llevado a un retraso en la implementación de los sistemas de gestión de calidad comparado con los laboratorios clínicos. El Colegio Americano de Patólogos (CAP), the Royal College of Pathologists (RCPath) y Real Colegio de Patólogos de Australasia (RCPA), son algunas de las organizaciones que por más de 30 años se han encargado de desarrollar los diferentes lineamientos para la acreditación de los laboratorios de patología, desarrollando múltiples documentos y listas de chequeo para tener en cuenta dentro del proceso de acreditación y de implementación de los sistemas de gestión de calidad.⁴⁰

Sin embargo la determinación de la calidad exige la valoración del rendimiento de los procedimientos realizados en el laboratorio, convirtiéndose en un mecanismo objetivo de evaluación⁴¹. En nuestro caso se debe medir la calidad del procesamiento

³⁸ Op. Cit. p. 44

³⁹ Op. Cit. p. 16

⁴⁰ R. L. Robertson. "Pathology laboratory accreditation: the Australian experience" *Accred Qual Assur* 1996 (1); p 213

⁴¹ Furness P. "Developing and running an EQA scheme in diagnostic histopathology" *Cur Diag Path* (2004) 10; p 435-43

histotecnológico de tejidos utilizando la técnica “libre de xilol” y la técnica convencional para realizar una comparación objetiva de las mismas.

Aunque no se tienen escalas de evaluación estándar validadas, estudios en los que se realizan comparación de técnicas de procesamiento han utilizado criterios de evaluación objetivos clasificando los preparados histológicos como satisfactorios, insatisfactorios pero aceptables para el diagnóstico, e insatisfactorios.⁴²

El CAP dentro de su lista de chequeo para el programa de acreditación de laboratorios de patología recomienda tener en cuenta algunos items como lo son la adecuada identificación de la muestra durante el procesamiento de la misma y la correcta marcación de los bloques; para evaluar el procesamiento de los tejidos y la calidad de los procesados histológicos, recomienda tener en cuenta los criterios descritos en la Tabla 4-10⁴³.

Tabla 4-10: Criterios para evaluar la calidad de las láminas de histología

Criterios para Evaluar la Calidad de Láminas Histológicas
Fijación Adecuada
Grosor del corte
Ausencia de pliegues y artificios de corte
Calidad de la Coloración
Plano de corte completo

En el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad se desarrolló un formato con los criterios propuestos por el CAP, el cual se utiliza de rutina para la evaluación de la calidad de los preparados histológicos, asignándosele un valor óptimo y un punto de corte para clasificar el preparado como aceptado o insuficiente; aunque no es una escala validada, ha servido como método de control de calidad interno del procesamiento histológico de las muestras. Desafortunadamente en Colombia no se tienen organizaciones que tengan establecidos métodos de control de calidad externo para los laboratorios de patología.

⁴² Ralph L. “A Comparison of Routine and Rapid Microwave Tissue Processing in a Surgical Pathology laboratory Quality of Histologic Sections and Advantages of Microwave Processing” Am J Clin Pathol 2001;115:705

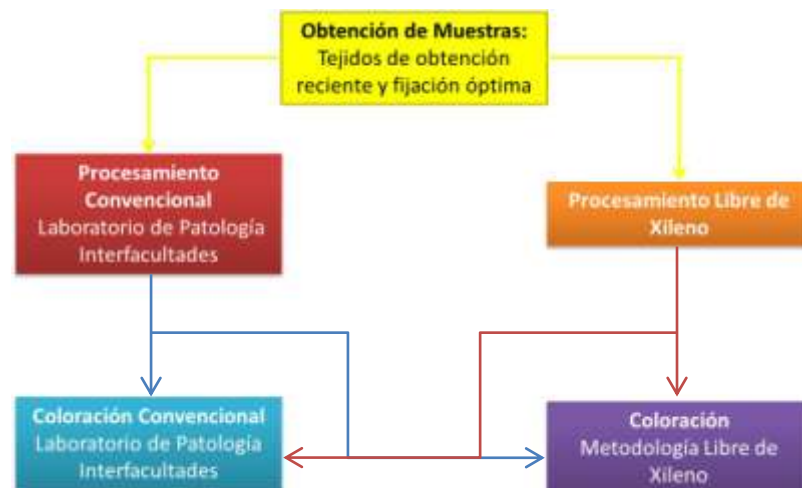
⁴³ CAP, Commission on Laboratory Accreditation. “Anatomic Pathology Checklist” 2006; p 36

5. Estandarización de la técnica libre de xilol

5.1 Obtención de muestras y procesamiento del tejido

Para realizar el proceso de estandarización se tomaron cortes de tejido (dos por cada órgano) obtenidos del material sobrante de una autopsia y fijados en formol tamponado por menos de 15 días después de su recolección. Los tejidos fueron sometidos al procesamiento de tejidos libre de xilol y al procesamiento de tejidos convencional del Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia (Ilustración 5-1).

Ilustración 5-1: Proceso de estandarización de la técnica libre de xileno

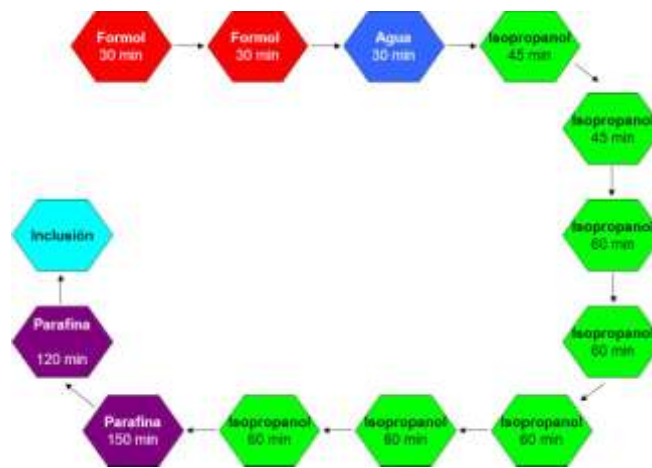


El procesamiento de tejidos libre de xilol fue modificado para desarrollarse en el procesador automatizado de tejidos Cytadell® 2000 del Laboratorio de Patología Interfacultades. Dichas modificaciones incluyen dos pasos iniciales de los tejidos por formol tras los cuales se rehidratan por 30 minutos en Agua. Posteriormente los tejidos

pasan por siete baños de alcohol isopropílico para terminar impregnados en dos pasos finales por parafina (Ilustración 5-2)⁴⁴

Los tejidos procesados por las dos técnicas fueron incluidos en parafina dura con punto de fusión entre 56 – 58°C, tras lo cual se realizaron dos cortes de 5 micrómetros en cada uno de los bloques para ser “pescadas” en un baño de flotación a 37°C con gelatina (0,025% P/V).

Ilustración 5-2: Esquema de procesamiento libre de xilol implementado



5.2 Proceso de coloración

Las láminas obtenidas de cada bloque fueron teñidas utilizando la coloración convencional del Laboratorio de Patología y la técnica “libre de Xilol” propuesta por Buesa y colaboradores (Ilustración 5-3)⁴⁵.

Para realizar este protocolo se preparó el jabón para la desparafinización de las láminas de acuerdo a las características suministradas por el autor, contando con el apoyo de la facultad de química de la Universidad Nacional de Colombia. (Tabla 5-1).

⁴⁴ Falkeholm L. Xylene-Free Method for Histological Preparation: A Multicentre Evaluation. Lab Invest, 2001: 1213-21.

⁴⁵ Buesa R J. "Histology without xylene." Ann Diag Patho, 2009: 246-56.

Ilustración 5-3: Proceso de desparafinización y coloración implementado



5.3 Resultados Obtenidos

Los preparados obtenidos con ambas técnicas fueron evaluados cualitativa y semicuantitativamente usando los criterios del Colegio Americano de Patólogos (CAP) con los que se obtuvieron los siguientes resultados:

- Los preparados histológicos “libres de xilol” coloreados con la técnica de rutina mostraron características similares e incluso mejores a las obtenidas con los preparados convencionales con las siguientes características (Ilustración 5-4):
 - a. Adecuado contraste de la coloración
 - b. Ausencia de retracciones tisulares
 - c. Ausencia de zonas de desprendimiento
 - d. Ausencia de zonas de fragmentación tisular
 - e. Excelente detalle nuclear
 - f. Excelente conservación de los tejidos ricos en grasas (tejido adiposo, cerebro)

- Las láminas histológicas procesadas “libres de xilol” teñidos con la técnica “libre de xilol” presentaron condiciones histológicas de calidad similares a los resultados obtenidos con la coloración convencional.

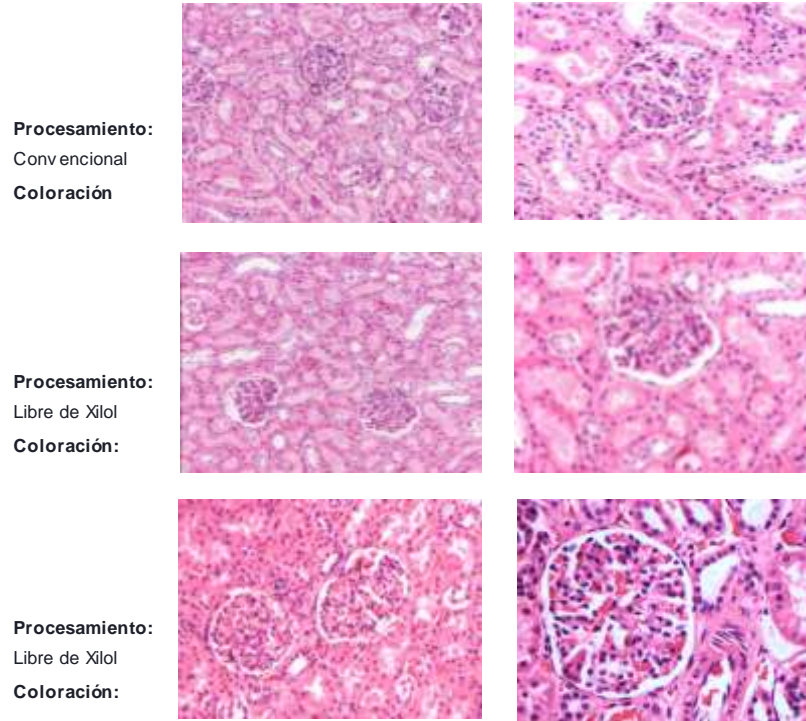
Tabla 5-11: Componentes del Jabón para platos utilizado en el proceso de desparafinización

Componentes del jabón de platos utilizado en el proceso de desparafinización
Agua > 30%
Tenso-activos aniónicos 15 – 30%
No iónicos 5-15%
Tenso-activos anfóteros <5%
Monopropilenglicol <5%
Etanol <5%
Conservantes: (metilparabén etilparabeno, propilparabén, 2-fenoxietanol) <5%
Perfume <5%
Apariencia: transparente, morado líquido
Densidad: aprox 1030 kg/m ³
ph concentrado: 7,5 + / -0,5
ph de 5%
utilizar la solución aproximadamente 7,0
Punto de inflamación:> 100 °c
Punto de solidificación aproximado: 0 °c
Fósforo: 0%
Solubilidad: completamente en el agua

5.4 Conclusiones y recomendaciones

- Los preparados obtenidos con ambas técnicas fueron evaluados cualitativa y semicuantitativamente usando los criterios del CAP, demostrando que existe equivalencia en los resultados obtenidos con las dos técnicas de procesamiento.
- La técnica de coloración “Libre de xilol” se estandarizó teniendo en cuenta las especificaciones técnicas facilitadas por el autor original de la técnica y las modificaciones propuestas por Buesa y colaboradores. Los resultados obtenidos son comparables entre la técnica de coloración convencional y la coloración libre de xilol.
- Los resultados fueron puestos a consideración de los organizadores del USCAP 2011. Lastimosamente no fue aceptado para participar en tan prestigioso evento.

Ilustración 5-10: Riñón 10X y 20X. Comparación de las técnicas de Procesamiento



6. Metodología

6.1 Diseño metodológico

Para evaluar la hipótesis propuesta se realizó un estudio experimental usando muestras de especímenes quirúrgicos que fueron procesados por la técnica libre de xilol versus la técnica o procesamiento convencional.

6.1.1 Criterios de inclusión

- Material sobrante de especímenes quirúrgicos procesados y diagnosticados.

6.1.2 Criterios de exclusión

- Material proveniente de biopsias.
- Material quirúrgico insuficiente para la realización de los dos protocolos de procesamiento.

6.1.3 Realización de la prueba

Se recolectaron 79 (setenta y nueve) muestras de especímenes quirúrgicos. De cada espécimen se tomaron dos cortes, uno para el método de procesamiento convencional y el segundo para el método de procesamiento "Libre de Xilol". Cada muestra fue procesada de acuerdo a los protocolos establecidos para cada técnica.

Después de obtener los bloques, se cortaron tres preparados histológicos de 5 μm , cada uno para realizar la coloración de Hematoxilina & Eosina, la coloración del ácido peryódico de Schiff (PAS) y para la coloración de tricrómico de Masson (TM).

Los preparados obtenidos con la técnica convencional fueron desparafinizados y montados con la técnica de rutina del laboratorio. Las láminas obtenidas por el procesamiento “Libre de Xilol” fueron desparafinizadas y montadas con el protocolo propuesto por Buesa y colaboradores.

Los preparados histológicos fueron rotulados y codificados de forma confidencial por los autores, se agruparon en cuatro cajas diferentes que fueron entregadas a cuatro patólogos experimentados del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia junto con la planilla de control de calidad de preparados histotecnológicos y la guía para el diligenciamiento de la misma. Los patólogos desconocían la técnica por la cual fueron procesadas las láminas que estaban valorando.

6.1.4 Planilla para el control de calidad del proceso histotecnológico

La evaluación de la calidad de los preparados histológicos obtenidos durante el estudio se realizó utilizando la planilla de Control de Calidad del Procesamiento Histotecnológico (Anexo A) diseñada por los autores y modificada para el estudio actual.

La planilla fue creada utilizando los criterios para evaluar la calidad de las láminas histológicas del Colegio Americano de Patólogos para lo que se tiene en cuenta las características del procesamiento automatizado de tejidos (Deshidratación y aclaramiento/imbibición), La extensión del corte y la presencia de desprendimientos, y la coloración (hematoxilina, eosina y desparafinización). La calificación de la fijación no fue tomada en cuenta ya que es una variable no controlada dentro del estudio actual.

Para una evaluación objetiva y uniforme de los preparados histológicos, se creó una guía para el diligenciamiento de la planilla de control de calidad del procesamiento histotecnológico (Anexo B). Para este fin se tuvieron en cuenta los posibles artificios que se pueden presentar durante el proceso automatizado de tejidos y la coloración de los

preparados histológicos. La guía se explicó y entregó a los patólogos evaluadores junto con la planilla de Control de Calidad del procesamiento histotecnológico.

Para establecer si un preparado histológico era apto o no para diagnóstico, el patólogo evaluador examinó el material entregado y determinó la presencia de artificios por el procesamiento histotecnológico existentes y los calificó como Ausentes (-), Leve (+), Moderado (++) y Severo (+++).

Cuando la calificación del artificio fue Ausente o leve, el patólogo marcó en la casilla respectiva con el No.1. Por el contrario, si la calificación era de moderada o severa, la marcación en la casilla respectiva fue de 0. Al completar las siete casillas, si el puntaje obtenido por el preparado sumó 6 ó 7, se consideró un preparado aceptado para el diagnóstico; por el contrario, si el preparado obtenía una calificación igual o menor a 5, se consideró un preparado no aceptado para el diagnóstico.

6.1.5 Consideraciones éticas

Esta investigación puede considerarse sin riesgo ya que es inexistente la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio pues el presente proyecto no incluye el trabajo con pacientes.

Lo anterior se sustenta en la resolución No. 008430 de 1993 de la República de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, consignándose lo mencionado en el título II, artículo 11, literal A: “La investigación planteada en este proyecto se consideraría como una investigación sin riesgo ya que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, ni se tratan aspectos sensitivos de su conducta”.

6.2 Procesamiento de la información

6.2.1 Descripción del conjunto de datos

Se obtuvo una base de datos que cuenta con 9 variables, 7 de las cuales son dicotómicas etiquetadas con 1 y 0 que representan si el material fue aceptado o no aceptado. La 8ª variable es una variable cualitativa de tipo categórico que puede asumir un valor entre 0 y 7. La última variable, también dicotómica que nos permite filtrar si la lámina es aceptada o rechazada para diagnóstico.

6.2.2 Análisis de la información

Para el proceso de la información, se usó el paquete estadístico SPSS 20 (IBM), se ejecutó el procedimiento de tablas de contingencia, obteniendo la proporción de láminas cuya calidad es evaluada con la técnica propuesta y la técnica convencional, como se ilustra en el capítulo de resultados.

Para el estudio se planteó el siguiente sistema de hipótesis:

$$H_0: P_1 - P_2 = 0$$

$$H_a: P_1 - P_2 \neq 0$$

Esto para corroborar que tenemos evidencia de una similitud entre las dos técnicas.

$$\text{Valor del estadístico de prueba: } z = \frac{+P_1 - P_2}{\sqrt{pq\left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n}\right)}}$$

Sí $H_a: P \neq P_0$ y $RR z \geq z_\alpha$ entonces $P(z \geq z_\alpha \text{ cuando } z \sim N(0,1) = \alpha)$ igual a 0,05

Adicionalmente, se generó una tabla empleando el procedimiento de pruebas no paramétricas para las variables, obteniendo los valores correspondientes para el juzgamiento de la hipótesis nula.

7. Resultados

7.1 Hematoxilina & eosina

Se procesaron un total de 79 casos fijados en formol y compuestos por tejidos normales o con patología de característica tumoral. Para cada caso se obtuvieron láminas de Hematoxilina & Eosina utilizando el procesamiento convencional y el procesamiento Libre de Xilol.

La tabla 7-1 muestra los procesos (variables) evaluados en las dos técnicas en estudio. Merece destacar que no se aprecian diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos técnicas de procesamiento tanto en el consolidado como en forma independiente en cada una de las variables consideradas.

Tabla 7-12: Comparativo de los criterios de evaluación para la coloración H & E

Variable	Convencional				Libre de Xilol				p
	Aceptable	%	No aceptable	%	Aceptable	%	No aceptable	%	
Deshid/Aclaram	79	100	0	0	78	99	1	1	-
Imbibición	73	92	6	8	76	96	3	4	0,613
Extensión	75	95	4	5	71	90	8	10	0,491
Desprendimiento	76	96	3	4	70	89	9	11	0,527
Desparafinización	70	89	9	11	72	91	7	9	0,320
Hematoxilina	77	97	2	3	78	99	1	1	0,871
Eosina	73	92	6	8	78	99	1	1	0,773
Consolidado	73	92	6	8	75	95	4	5	0,556

En el proceso de deshidratación, el 99%(78) de las láminas procesadas libres de xilol fueron calificadas como aceptables. Solo uno de los preparados histológicos “libre de xilol” fue rechazado por los patólogos por este criterio.

Para la imbibición de los tejidos, el 96%(76) de los preparados libres de xilol fueron considerados como aceptados, en contraste con el 92%(73) de los procesados convencionalmente.

Para evaluar las características del corte y la “pesca”, se evaluaron el desprendimiento y la extensión del tejido sobre la lámina; estos criterios son también marcadores indirectos de la calidad del procesamiento del tejido. El 89% y el 90% de las láminas procesadas sin xilol fueron aceptadas porque no tenían artificios por extensión inadecuada o desprendimientos respectivamente.

El proceso de desparafinización y coloración fueron evaluados teniendo en cuenta como criterios, la desparafinización, la hematoxilina y la eosina. Durante el proceso de estandarización de la prueba, se demostró, que las características de la coloración son dependientes del proceso de desparafinización de las láminas, razón por la cual estos criterios fueron tenidos en cuenta durante el proceso de evaluación.

El 91%(72) de los preparados libres de Xilol, no tuvieron problemas de desparafinización comparado con el 89% los preparados convencionales.

El 98%(78) de las láminas libres de xilol fueron catalogadas como aceptadas para la hematoxilina, comparado con el 97%(77) de los preparados convencionales. Respecto a la eosina, el 99% de las láminas libres de xilol fueron aceptables contrastados con el 92% de las láminas convencionales.

Al evaluar la clasificación global de los preparados histológicos (Tabla 7-2), el 95%(75) de las láminas libres de xilol obtuvieron un puntaje total de 6 ó 7. Para el método convencional esta cifra fue del 92%(72) (Gráfico 7-1). Es de resaltar que solo el 5%(4) de las láminas procesadas por el método libre de xilol fue calificada como no aceptada para hacer diagnóstico.

Tanto la técnica convencional como la técnica libre de xilol, mostraron un rendimiento similar al ser comparados durante el experimento; estadísticamente los datos

recolectados no muestran diferencias significativas entre ambas lo que traduce que las dos técnicas son equivalentes. (Gráfico 7-2)

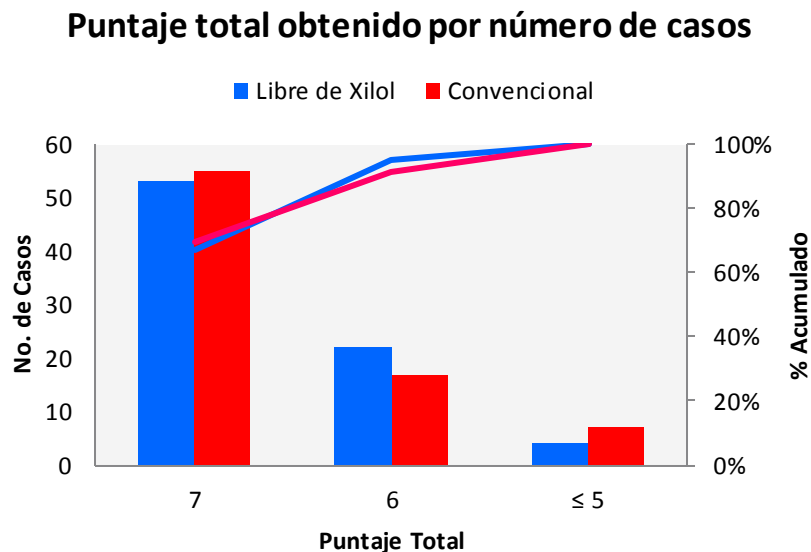
Tabla 7-13: Comparación del puntaje total obtenido por las dos técnicas de Procesamiento

		Convencional			
	Calificación	7(%)	6(%)	≤5(%)	Total
Libre de Xileno	7(%)	33(42)	14(18)	6(8)	53(67)
	6(%)	19(24)	3(4)	0(0)	22(28)
	≤5(%)	3(4)	0(0)	1(1)	4(5)
	Total	55(70)	17(22)	7(9)	79(100)

7.2 Coloraciones de pas y tricrómico

Para la evaluación de las coloraciones de histoquímica se tuvieron en cuenta solamente la extensión, el desprendimiento y la coloración (Ilustración 7-1). Los demás criterios no se tuvieron en cuenta ya que estos criterios fueron evaluados previamente en la coloración de Hematoxilina y Eosina. (Tabla 7-3)

Gráfico 7-1: Puntaje total obtenido por número de casos



El 89%(74) de los PAS procesados libres de xilol fueron catalogados como aceptados para la extensión, comparado con el 94%(77) de los preparados convencionales.

Respecto al desprendimiento, el 90%(71) de los PAS libres de xilol fueron aceptables en contraste con el 96%(76) de las láminas convencionales.

Gráfico 7-2: Puntaje total obtenido por técnica de procesamiento



Para la evaluación de la coloración de PAS, el 82%(65) de los preparados libres de xilol fueron considerados como aceptados, en contraste con el 95%(75) de los procesados convencionalmente.

El 92% de los PAS procesados convencionalmente obtuvieron un puntaje total de 2 ó 3 (aceptados) comparado con el 99%(78) de los procesos convencionales.

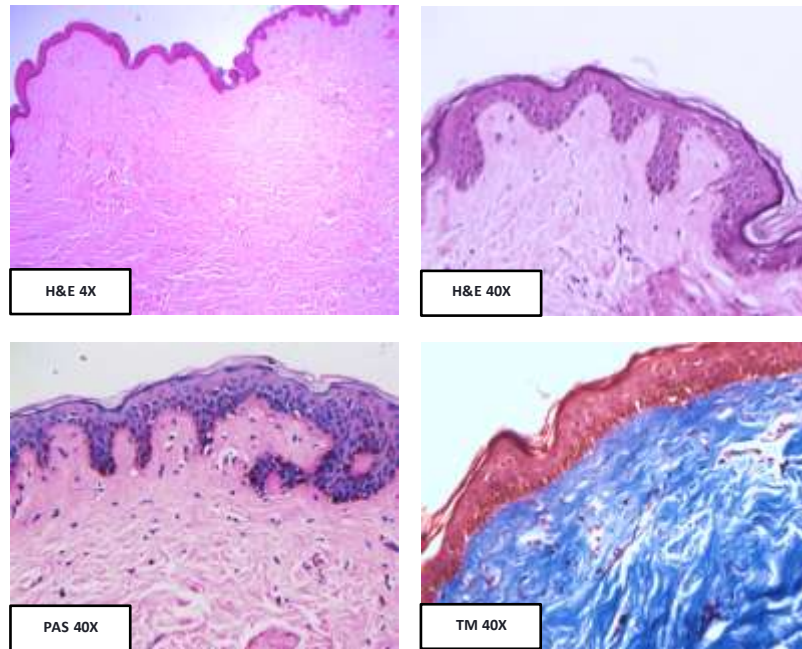
Tabla 14: Comparativo criterios de evaluación coloraciones de PAS y TM

PAS	Convencional				Libre de Xileno				p
	Aceptable	%	No aceptable	%	Aceptable	%	No aceptable	%	
Extensión	74	94	5	6	70	89	9	11	0,407
Desprendimiento	76	96	3	4	71	90	8	10	0,553
Coloración	75	95	4	5	65	82	14	18	0,696
Consolidado	78	99	1	1	73	92	1	1	0,959
TM									
Extensión	76	96	3	4	69	87	10	13	0,501
Desprendimiento	77	97	2	3	65	82	14	18	0,506
Coloración	75	95	4	5	37	47	42	53	0,054
Consolidado	79	100	0	0	65	82	14	18	-

El 87%(69) de los TM procesados libres de xilol fueron catalogados como aceptados para la extensión, comparado con el 96%(76) de los preparados convencionales. Respecto al

desprendimiento, el 82%(65) de los TM libres de xilol fueron aceptables contrastados con el 97%(77) de las láminas convencionales.

Ilustración 7-11: Piel. Procesamiento libre de Xilol



Para la evaluación de la coloración del TM, el 47%(37) de los preparados libres de xilol fueron considerados como aceptados, en contraste con el 100%(79) de los procesados convencionalmente.

El 82%(65) de los TM procesados convencionalmente obtuvieron un puntaje total de 2 ó 3 (aceptados) comparado con el 100%(79) de los procesos convencionales.

7.3 Observaciones y comentarios

En la planilla de evaluación los patólogos tenían un espacio para escribir comentarios adicionales sobre los preparados histológicos que estaban evaluando.

Con respecto a la H&E, en siete preparados histológicos libres de xilol, los patólogos mencionaron la presencia de burbujas o irregularidades en el montaje del preparados histológicos. En tres láminas convencionales y en dos libres de xilol, describieron la

palidez y la falta de contraste de la misma. En dos láminas preparadas libres de xilol, los patólogos hicieron referencia a la muy buena calidad del tejido y la coloración.

Con respecto a la coloración de PAS y el TM, en seis láminas libres de xilol se describió la palidez de la coloración, especialmente en la coloración de TM. En uno de los TM preparados libres de xilol, se mencionó el desprendimiento de la lesión tumoral de la lámina. En cuatro de las coloraciones de PAS preparados convencionalmente y uno de los preparados libres de xilol se exalta la calidad de la técnica.

8. Discusión

El reconocimiento de los efectos tóxicos de los reactivos utilizados en el laboratorio de patología han obligado a los investigadores a buscar nuevas alternativas al proceso convencional. La decisión de transformar el laboratorio buscando la no utilización de agentes tóxicos, como el formol o el xilol, es responsabilidad de cada uno de los responsables de los procesos, siendo la cabeza del laboratorio el patólogo⁴⁶.

Desde el reconocimiento en los años 70s de la neurotoxicidad del xilol por encima de la del benceno y la del tolueno se ha iniciado en países como Estados Unidos. La monitorización de los vapores de xilol en los sitios de trabajo encaminados a establecer un límite de exposición máximo para ocho horas de trabajo de 100 partes por millón (ppm) y la medición del ácido metilhipúrico en orina, como indicador de exposición de los trabajadores de los laboratorios de patología.⁴⁷

Este proceso ha llevado a la descripción de nuevas técnicas de procesamiento histológico con resultados similares al método convencional en muestras de tejidos que llegan rutinariamente a un laboratorio de patología, una de esas técnicas es la denominada "Libre de Xilol".⁴⁸

Por tal razón se diseñó un estudio experimental para evaluar el rendimiento de la técnica libre de xilol versus el procesamiento histotecnológico convencional tendiente a valorar la viabilidad de implementar una técnica de procesamiento alterna menos lesiva que la actualmente empleada.

⁴⁶ Buesa R J. "Histology safety: now and then." *Ann Diag Pathol*, 2007: 334-9.

⁴⁷ IARC. Xylene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans., World Health Organization, 1989.

⁴⁸ Falkeholm L. Xylene-Free Method for Histological Preparation: A Multicentre Evaluation. *Lab Invest*, 2001: 1213-21.

Los resultados de la estandarización en el Laboratorio de Patología Interfacultades, evidenciaron que el procesamiento de tejidos libre de xilol permitía obtener preparados histológicos equivalentes a los procesados con la técnica convencional, desparafinizados y coloreados tanto con el método de rutina como el método libre de xilol.

Las características principales de los preparados obtenidos fueron la presencia de un adecuado contraste de la coloración, ausencia de retracciones tisulares, ausencia o mínimas zonas de desprendimiento, ausencia de zonas de fragmentación tisular, excelente detalle nuclear y excelente conservación de los tejidos ricos en grasas (tejido adiposo, cerebro).

Después de estandarizar la técnica se realizó el procesamiento de 79 casos utilizando las dos técnicas de procesamiento. La evaluación de los casos se realizó por parte de cuatro patólogos experimentados del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia utilizando la planilla para la evaluación de los preparados histológicos y una guía para su diligenciamiento. La utilidad de esta guía radicó en la disminución de la subjetividad de la evaluación de los preparados histológicos obtenidos.

La evaluación de los patólogos mostró que el 95% de los preparados libres de Xilol coloreados con Hematoxilina & Eosina fueron calificados como aceptados para hacer diagnóstico comparados con el 92% de los preparados convencionales. No se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos técnicas.

El proceso de deshidratación y aclaramiento fue el más aceptado por los evaluadores ya que el 99% de las láminas libres de xilol no tuvieron problemas de este tipo. Estos resultados confirman que el alcohol isopropílico es capaz de cumplir los dos procesos (deshidratación y aclaramiento) sin generar alteraciones en el tejido. No se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos técnicas.

El 90% de las láminas libres de xilol tuvieron una extensión aceptable y el 89% ausencia o mínimas zonas desprendimiento del tejido. Es posible que el desprendimiento esté

relacionado con el requerimiento de temperaturas altas en el proceso de desparafinización. Se considera que el aumento en la concentración de gelatina en el baño de flotación o la utilización de láminas cargadas pueda disminuir este artefacto. No se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos técnicas.

El proceso de desparafinización de la lámina es uno de los puntos fundamentales en la técnica libre de xilol; en el estudio se encontró que el 91% de las láminas libres de xilol tuvieron un proceso de desparafinización adecuado comparado con el 89% de las láminas procesadas convencionalmente. Este resultado se vio reflejado en las características de la coloración, en las que más del 90% de los preparados fueron calificados como aceptados por los patólogos. No se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos técnicas.

Los evaluadores hicieron referencia a algunos problemas del montaje, como la presencia de burbujas sobre el tejido. Se sugiere que estos artefactos pueden estar relacionados con una inadecuada técnica del operador en el momento del montaje y no por artefactos relacionados con el procesamiento de los tejidos.

La coloración de PAS fue calificada como aceptada en el 92% de los casos procesados libres de xilol, resultados similares a la coloración PAS convencional. De manera semejante a los hallazgos que se encontraron en la hematoxilina & eosina, más del 80% de las láminas no tuvieron inconvenientes con la extensión del tejido sobre la lámina. Como ya se mencionó, se considera que aumentando la concentración de gelatina en el baño de flotación se puede optimizar este criterio de evaluación. No se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos técnicas.

El 82% de las coloraciones TM libres de xilol fueron calificadas como aceptadas. Los patólogos mencionaron en múltiples ocasiones la “palidez” de la coloración. Los cortes de los tejidos para todas las coloraciones se realizaron a un espesor de 5 micrómetros. La literatura recomienda que el grosor del corte del tejido para esta coloración sea de 7 a 8 micrómetros para optimizar la calidad de la coloración. No se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos técnicas.

Aunque no se tenía como objetivo del presente trabajo, la evaluación económica de las dos técnicas es favorable hacia el proceso libre de xilol en contraste con la técnica convencional. Cifras internas del laboratorio del año 2009 muestran que para el procesamiento de 203 casos semanales, el costo del procesamiento de un bloque y una lámina de hematoxilina & eosina alcanzaba los \$2470. En el presente estudio se encontró que para este mismo volumen, el costo del procesamiento de un bloque y una lámina de hematoxilina & eosina procesada con la técnica libre de xilol es de \$1808, casi \$650 pesos menos que la técnica convencional. (Tabla 8-1)

Tabla 15: Evaluación económica

Proceso	Cantidad	Unidad	Costo Convencional	Costo Libre Xilol
Procesamiento Histotecnológico	1	Cassete	\$ 1.311	\$ 752
Inclusión	1	Lámina	\$ 302	\$ 302
Corte y Montaje	1	Lámina	\$ 526	\$ 526
Batería de Coloración	1	Lámina	\$ 331	\$ 229
Total	1	Lámina	\$ 2.470	\$ 1.808

Después de estandarizar la técnica y realizar el estudio se demostró que la calidad de los preparados libres de xilol tienen características similares a las obtenidas con la técnica convencional del Laboratorio de Patología Interfacultades con un costo 30% menor que el de la técnica convencional.

9. Conclusiones y recomendaciones

- Se implementó y se estandarizó la técnica Libre de xilol en el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia.
- Se obtuvieron preparados histológicos procesados libres de xilol de calidad similar a la de los preparados procesados convencionalmente.
- El 95% y el 92% de las láminas procesadas libres de xilol y coloreadas con hematoxilina & eosina y PAS respectivamente, fueron categorizadas como aceptadas para realizar diagnóstico histológico.
- El 82% de las láminas procesadas libres de xilol y coloreadas con TM fueron calificadas como aceptadas para realizar diagnóstico histológico. Se recomienda aumentar el grosor del corte del tejido para mejorar las características de la coloración.
- El costo de una lámina procesada por el método libre de Xilol es de \$1650, 30% menos que el procesamiento de una lámina preparada por el método convencional que cuesta \$2470 (Tabla 8-1). Más aún, el costo puede disminuir si aumenta el volumen de casetes procesados semanalmente.
- La técnica libre de xilol pueden ser implementada en el Laboratorio de Patología Interfacultades como método de procesamiento rutinario, con la ventaja de disminuir el riesgo ocupacional del personal del laboratorio y disminuir el costo de procesamiento.

- Se generó una planilla de evaluación de la calidad de los preparados histológicos y una guía para su diligenciamiento, la cual puede ser utilizada por cualquier laboratorio de patología

- Para la implementación de la técnica libre de xilol se recomienda adquirir un baño termostático para mantener la temperatura de la solución de jabón y el agua destilada para el proceso de desparafinización.

Anexo A: Planilla de control de calidad del proceso histotecnológico



Planilla de Control de Calidad del Proceso Histotecnológico
Evaluación Calidad Preparados Histológicos Método "Libre De Xileno" Vs. Técnica Convencional
Laboratorio Interfacultades Patología UNAL

Patólogo: _____

Item	Hematoxilina & Eosina										Histoquímica						
	PAT		Corte		Coloración			Consolidado		Observaciones	Coloración	Corte		Coloración	Consolidado		Observaciones
No. Caso	Imbibición	Deshid/Aclaram	Ext	D	Hem	Eos	Despar	P	Valor			Ext	D		P	Valor	
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	

PAT: Procesamiento Automático de Tejidos
D: Desprendimiento
Ext: Extensión del Tejido
Valor: Valoración
Deshid/Aclaram: Deshidratación y Aclaramiento

Hem: Hematoxilina
Eos: Eosina
Despar: Desparatización

0 Inaceptable
1 Aceptable

Instrucciones de uso: Realice la valoración de cada uno de los ITEMS, calificándolo así:
0: Inaceptable 1: Aceptable. Un caso es aceptado para rutina cuando el puntaje total obtenido es de 6 a 8
En el caso de la histoquímica es aceptado cuando el puntaje obtenido es de 2 a 3

Elaborado por: A. Y. Sánchez - I. L. Mojica

**Anexo B: Guía para el diligenciamiento
de la planilla de control de la calidad**

**Artificios en Preparados
Histológicos.**

Guía para el diligenciamiento de la planilla de
evaluación de la Calidad.

Iván Leonardo Mojica F.
Ángel Yobany Sanchez

2011

Instrucciones

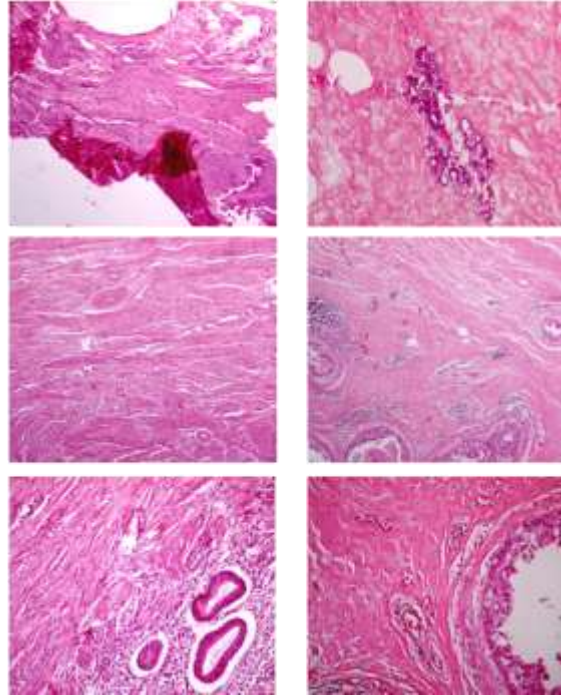
- Muchas gracias por dedicar parte de su tiempo en la evaluación del material de este estudio.
- El material que recibirá fue procesado usando dos protocolos diferentes: procesamiento convencional y procesamiento libre de xilol. Dicho material ha sido rotulado de tal manera que usted desconozca qué tipo de material pertenece a qué grupo de procesamiento.
- Respetuosamente le solicitamos evaluar el material en cuestión como si se tratara del material de un caso de diagnóstico convencional para establecer la idoneidad del mismo: pasa para diagnóstico o es necesario repetir el proceso histotecnológico para lograr el diagnóstico.

Instrucciones

- Para establecer lo anterior determine la severidad de los artificios de procesamiento histotecnológicos existentes y califíquelos como:
 - Ausentes (-)
 - Leve (+)
 - Moderado (++)
 - Severo (+++)
- Si su calificación es Leve o no encuentra artificios, califique en la planilla en la casilla respectiva con No. 1
- Si su calificación es Moderado o Severo, califique en la planilla en la casilla respectiva con No. 0 (cero).

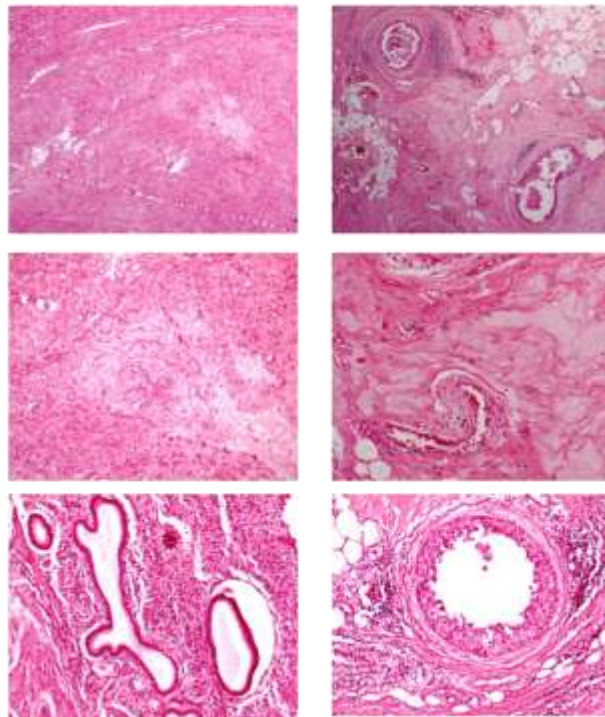
Artificios por Deshidratación Inadecuada

- Bordes celulares mal definidos.
- Pobre definición de estructuras tisulares.
- Fibras Colágenas gruesas (Burdas).
- Espacios intersticiales prominentes.
- Fragmentación del tejido.



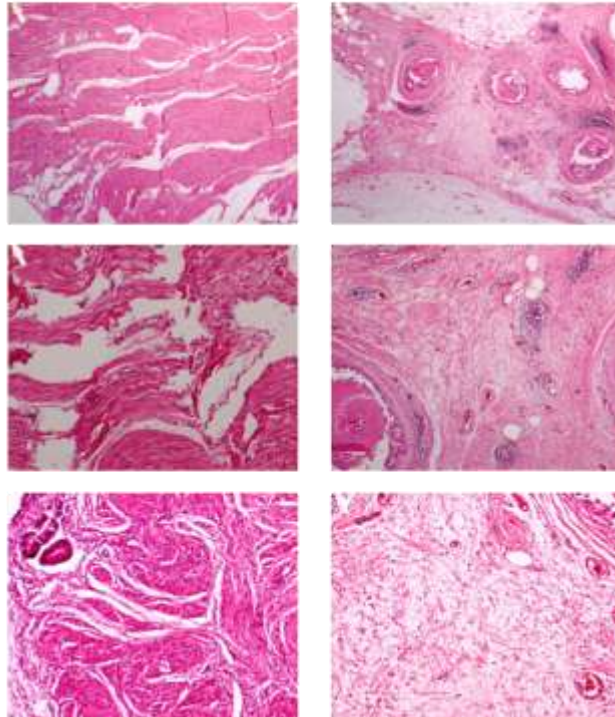
Artificios por Aclaramiento Inadecuado

- Parches Eosinofílicos.
- Bordes celulares engrosados.
- Fragmentación del tejido.
- Retracciones tisulares.



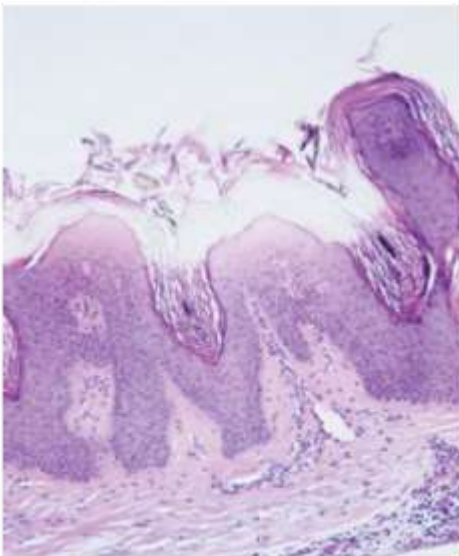
Artificios por Imbibición Inadecuada

- Fragmentación del tejido.
- Disgregación
- Intersticio de aspecto edematoso.
- Fibras colágenas “deshilachadas”.

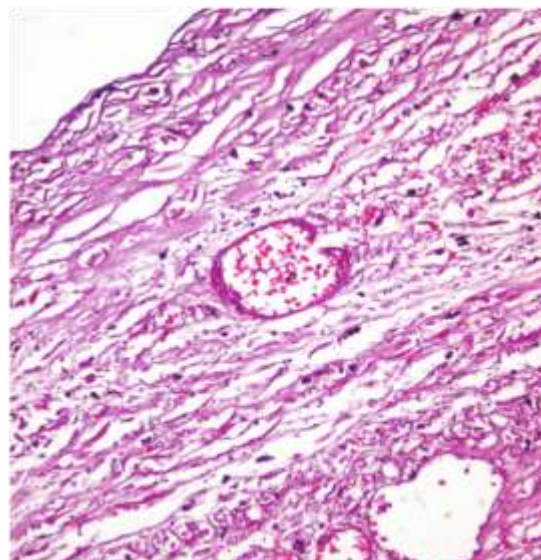


Artificios por Desparafinización Inadecuada

Presencia de Grumos de material blanquecino



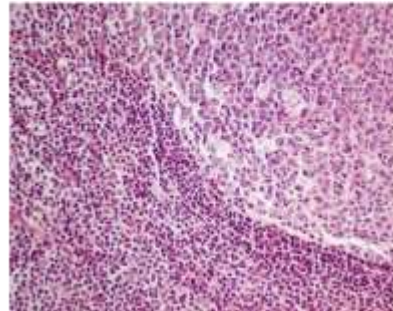
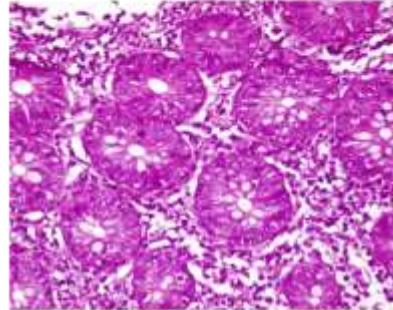
Perdida de tinción del tejido anexo



Artificios por Coloración Inadecuada

Hematoxilina Insatisfactoria

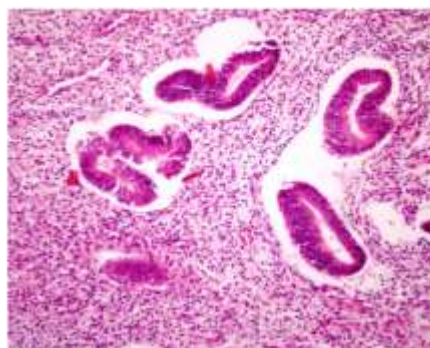
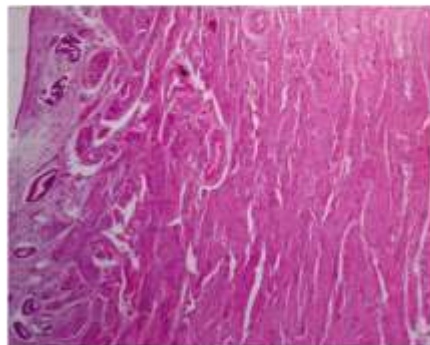
- Núcleos Vesiculosos
- Pérdida de detalle nuclear
- Pobre contraste con la eosina



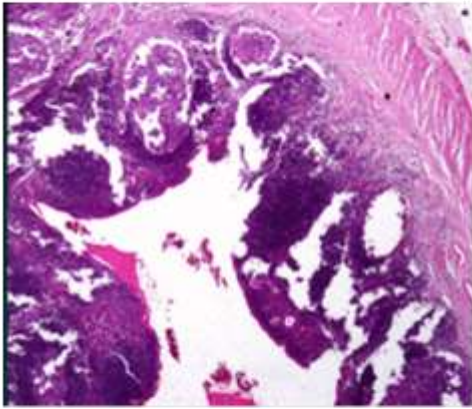
Artificios por Coloración Inadecuada

Eosina Insatisfactoria

- Citoplasmas excesivamente rosados
- Pérdida de detalle nuclear
- Pobre contraste con la hematoxilina



Ejemplo 1



Artificios encontrados

- Fragmentación: Moderada
- Desprendimiento: Moderado
- Retracciones: Leve
- Disgregación: Ausente

Planilla de Evaluación

Item	Hematoxilina & Eosina									
	PAT		Corte		Coloración			Consolidado		Observaciones
	Imbibición	Deshid/Aclaram	Ext	D	Hem	Eos	Despar	P	Valor	
1	1	0	0	0	1	0	1	3	No aceptado	
2								0	No aceptado	

- Ingrese 0 ó 1 en la casilla respectiva
- Un caso es aceptado para H&E cuando el puntaje total obtenido es de 6 a 7
- Un caso es no aceptado cuando el valor es igual o menor a 5

Ejemplo 2



- Artificios: Ausentes
- Eosina: Aceptable
- Hematoxilina: Aceptable
- Desparafinización: – Aceptable

Planilla de Evaluación

Item	Hematoxilina & Eosina										
	No. Caso	PAT		Corte		Coloración			Consolidado		Observaciones
		Imbibición	Deshid/Aclaram	Ext	D	Hem	Eos	Despar	P	Valor	
1	1	0	0	0	1	0	1	3	No aceptado		
2	1	1	1	1	1	1	1	7	Aceptado		

- Ingrese 0 ó 1 en la casilla respectiva
- Un caso es aceptado para H&E cuando el puntaje total obtenido es de 6 a 7
- Un caso es no aceptado cuando el valor es igual o menor a 5

Bibliografía

1. Bingham E. Patty's Toxicology. Chicago: John Wiley & Sons, 2001.
2. Buesa R J. Histology safety: now and then. Ann Diag Pathol, 2007: 334-9.
3. Buesa R J. Histology without xylene. Ann Diag Pathol. 2009: 246-56.
4. Capdevila B F. El laboratorio clínico y la gestión de la calidad por procesos. Quím Clín, 2003: 44-7.
5. Clayton G D. Toxicology. John Wiley & Sons Inc, 1994.
6. Ministerio de Salud de la Republica de Colombia. Resolución No. 008430 de 1993. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Bogotá. 1993.
7. College of American Pathologist. Anatomic Pathology Checklist. Commission on Laboratory Accreditation, 2006: 1-90.
8. Crocker J. The science of the laboratory diagnosis. West sussex: Jhon Wiley & sons, 2005.
9. Falkeholm L. Xylene-Free Method for Histological Preparation: A Multicentre Evaluation. Lab Invest, 2001: 1213-21.
10. Furness P. Developing and running an EQA scheme in diagnostic histopathology. Cur Diag Path, 2004: 435 - 43.
11. Gallego J. Manual de Calidad, Facultad de Medicina, 1-24. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2005.

12. García R. Laboratorio de anatomía Patológica. Madrid: Interamericana McGraw Hill. 1993.
13. Geneser F. Histología. Madrid. Panamericana. 2000.
14. Hygienists, American Conference of Governmental Industrial. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. 2008.
15. IARC. Formaldehyde. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization, 2006.
16. IARC. Isopropanol. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization. 1987.
17. IARC. Xylene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans., World Health Organization, 1989.
18. IPCS. Xylenes. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria. 1997.
19. Leong A. Strategies for laboratory cost containment and for pathologist Shortage: centralised pathology laboratories with microwave stimulated Histoprocessing and telepathology. Pathology, 2005: 5-9.
20. Martínez W. Recuperación de formaldehído al 10% para fijación. En Manual de Procedimientos Técnicos para Tiempos Dificiles en Anatomía Patológica, por W Martínez, 39. La Habana: Forum de Ciencia y Técnica. 2005.
21. Morales A. Continuous-Specimen-Flow, High-Throughput, 1-Hour Tissue Processing. Arch Pathol Lab Med, 2002: 583-90.
22. Ralph L A. Comparison of Routine and Rapid Microwave Tissue Processing in a Surgical Pathology laboratory Quality of Histologic Sections and Advantages of Microwave Processing. Am J Clin Pathol, 2001: 703-08.

23. Robertson R L. Pathology laboratory accreditation: the Australian experience. *Accred Qual Assur.* 1996: 213-7.
24. Rojas G. Evaluación de concentración del Formaldehído – UNAL. Bogotá: UNAL – ARS Seguro Social. 2006.
25. Services U.S Department of Health & Human. *Enviromental Health & Toxicology.* Septiembre 02, 2008.
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+93>
(accessed Octubre 12, 2008).
26. Universidad Nacional de Colombia. Evaluación de la exposición ocupacional a contaminantes químicos: Formaldehído y Monóxido de Carbono UNAL. Bogotá: UNAL – ARS. Seguro Social., 2007.
27. Viktorov V. Use of Isopropyl Alcohol in Histological Assays: Dehydration of Tissue, Embessing into paraffin, and Processing of Paraffin Sections. *Bullet of Exper Biol and Med.* 2003, 2003: 105-6.
28. Vincek V. A Tissue Fixative that Protects Macromolecules (DNA, RNA, and Protein) and Histomorphology in Clinical Samples. *Lab Invest,* 2003: 1427-35.