

Original

Aplicación de Complucad® como fijador en histopatología humana: estudio comparativo con formaldehído

M. Álvarez, J. Rubio, J. Jiménez, A. Márquez y A. Matilla

Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina: Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario, Universidad de Málaga, Málaga.

SUMMARY

Background: In order to observe tissues microscopically, it is essential to use a proper fixation process. In this paper, we report on a preliminary study about the application of Complucad® in routine pathology practice compared with standard fixation in formol 10% (buffered). Material and methods: Simultaneously, samples from various human organs (1 cm in size) were fixed in 10% neutral-buffered formalin and Complucad®. Results: In general, we found that the microscopic images of the slides stained by hematoxylin-eosin after being fixed by Complucad® had the same quality as those fixed by formol, in short periods of time (2 hours), intermediate (24 hours) or longer/storage (1 week and 1 month). Moreover, we observed that in tissues fixed by Complucad® there is the possibility of carrying out special techniques that are now of relevance to pathology, such as immunohistochemistry, DNA analytical and biomolecular methods (PCR), with similar results (even better for defining some immunohistochemical epitopes) to those achieved with formaldehyde fixation. Conclusion: Further to our preliminary studies, Complucad® has shown that it is a very useful fixative product in human histopathology as it does not have the toxic effects of formaldehyde. Rev Esp Patol 1999; 32(4): 535-541.

Key words: Fixation - Formalin - Complucad®

RESUMEN

Planteamiento: En el procesamiento de los tejidos y para hacer posible su visualización microscópica es esencial una correcta fijación de los mismos. En este trabajo comunicamos las primeras observaciones sobre la capacidad fijadora de Complucad® en los estudios anatomopatológicos rutinarios, comparándola con la fijación en formol tamponado al 10%. Material y métodos: Se procesaron simultáneamente muestras, de aproximadamente 1 cm, en formol tamponado al 10% y Complucad®. Resultados: Observamos que las imágenes microscópicas de las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, después de una fijación con Complucad®, tienen, en general, la misma calidad que las fijadas en formol, bien sea en tiempos cortos (dos horas), intermedios (24 horas) o largos (una semana y un mes). Además, hemos comprobado que en los tejidos fijados con Complucad® se pueden llevar a cabo las técnicas especiales de mayor relevancia en la patología actual (inmunohistoquímica, citometría de ADN y PCR) con resultados muy similares (a veces mejores, en inmunohistoquímica) que cuando se efectúa fijación en formol. Conclusiones: Nuestros estudios preliminares demuestran que Complucad® es un producto fijador útil en el campo de la histopatología humana sin los efectos tóxicos del formol. Rev Esp Patol 1999; 32(4): 535-541.

Palabras clave: Fijación - Formol - Complucad®

INTRODUCCIÓN

En el procesamiento de los tejidos y para hacer posible su visualización microscópica es esencial una correcta fijación de los mismos. Ésta consiste básicamente en la interrupción de los procesos de degradación tisular que aparecen tras la muerte celular. Para que sea eficaz debe cumplir –por lo menos– dos requisitos: que se conserve la arquitectura tisular de manera tal que las imágenes equivalentes resultantes se observen de forma idéntica, independientemente del individuo y del proceso empleado, y que se conserve la composición tisular para que puedan efectuarse, además de la interpretación de las imágenes convencionales teñidas con hematoxilina-eosina, técnicas especiales (histoquímicas, microscopia electrónica, inmunohistoquímicas, biomoleculares, etc.) (1-5).

En la actualidad el fijador más utilizado es, con diferencia, el formol tamponado al 10%, pues además de cumplir los requisitos previamente expuestos constituye un elemento sencillo y barato (5, 6). Sin embargo, se han atribuido una serie de inconvenientes para el usuario, como alta toxicidad, efectos nocivos para el sistema nervioso y mutagénicos y, sobre todo, acción irritativa sobre la piel y mucosas: conjuntiva, orofaringe y tracto respiratorio. Además, su eficacia precedera en el tiempo (porque se consume durante el proceso y porque el efecto de la luz y del oxígeno lo transforman en ácido fórmico) crea problemas de almacenamiento de los tejidos fijados en formol (7-9).

El fijador *Complucad*[®], combinación de peróxidos y alcoholes diluidos en alcohol al 70% (patente P9500471, Universidad Complutense de Madrid), carece de los efectos secundarios antes mencionados con el formol (10), habiéndose probado su utilidad como método de preservación de estructuras orgánicas, por su poder bactericida, trombolítico y lipolítico, con aplicaciones directas en el campo de la anatomía humana (por ejemplo, preservación de cadáveres) y la medicina legal (11-13).

Como estudio preliminar para conocer si es posible aplicar este producto como fijador general en patología humana, nos hemos propuesto efectuar una valoración comparativa de la habitual fijación con formol tamponado al 10% con *Complucad*[®] en los siguientes aspectos:

– Evaluación comparativa (formol tamponado frente a *Complucad*[®]) de la calidad de la imagen citohistológica convencional en distintos tipos de tejido.

- Valoración comparativa (formol tamponado frente a *Complucad*[®]) de las muestras tisulares después de diferentes tiempos de fijación: cortos (dos horas), más habituales (24 horas) y en condiciones de reserva/almacenamiento (durante una semana y un mes).
- Conocer la posibilidad de realizar técnicas especiales (inmunohistoquímica, microscopia electrónica, citometría del ADN y técnicas biomoleculares) tras la fijación de los tejidos en *Complucad*[®] y, en su caso, saber si puede beneficiar alguna de estas metodologías (en concreto valorar la posibilidad de eliminar en las técnicas inmunohistoquímicas el proceso de recuperación antigénica, indispensable con la fijación en formol).

MATERIAL Y MÉTODOS

El material utilizado se obtuvo de diez muestras de tejido en fresco (no fijado) de piezas quirúrgicas y tres autopsias llegadas rutinariamente al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Málaga. Para evaluar comparativamente los efectos de la fijación con *Complucad*[®] (*Complucad* Muñiz, *Complucad* Internacional, S.A., España) respecto al formol tamponado, se procesaron muestras diferentes –con ambos fijadores– de tamaño semejante (en torno a 1 cm), en tejidos de distinta consistencia y localización: aorta, bazo, corazón, estómago, hígado, mama, páncreas, próstata, pulmón, riñón y tiroides.

Fijación e inclusión en parafina

También se procedió a la fijación en paralelo de las muestras en *Complucad*[®] y formol tamponado al 10% durante dos horas, un día, una semana y un mes. Tras este periodo todas fueron procesadas para su inclusión en parafina según el protocolo automatizado convencional.

Estudio histológico convencional

Para el estudio histológico convencional se realizaron secciones de 4 µm de grosor, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. En todas las preparaciones, dos patólogos, de forma independiente, valoraron de una a tres cruces los efectos de cada fijador en los diferentes tiem-

pos de fijación respecto a la arquitectura tisular, los detalles celulares y el grado de retracción.

Estudio inmunohistoquímico

Las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron, en este estudio preliminar, en las secciones de material fijado con fijación corta de dos horas (en *Complucad*® y formol al 10%, tamponado), con equipo automático Techmate (proporcionado por Dako Diagnósticos, S.A.). Los anticuerpos primarios probados fueron: vimentina/IM (Dako, prediluido), actina (Dako, prediluido), desmina (Dako, prediluido), antígeno epitelial de membrana/EMA (Dako, prediluido), panqueratina/QT (Dako, prediluido), 34βE-12/QT-AP (Dako, prediluido), antígeno carcinoembrionario/CEA (Dako, prediluido), CD31 (Dako, prediluido), cromogranina/CR (Dako, prediluido), enolasa/ENO (Dako, prediluido), sinaptofisina (Dako, prediluido), antígeno leucocitario común/LEU-CD45 (Dako, prediluido), antígeno prostático específico/PSA (Dako, prediluido), tiroglobulina/TG (Dako, prediluido). Las preparaciones fueron sometidas a desenmascaramiento de epitopos (antigénico) en olla a presión, en una solución de citrato a 1 mM y pH 6. Anticuerpos como la tiroglobulina se utilizaron con y sin tratamiento antigénico previo. El sistema de revelado empleado fue un método de estreptavidina peroxidasa que utiliza como cromógeno la diaminobencidina (LSAB, Dako).

Cuantificación del ADN mediante citometría de imagen

La cuantificación del ADN se hizo en cortes de tejidos de 4-5 µm de grosor teñidos con Feulgen, utilizando el protocolo de Becton Dickinson (CAS DNA staining) para la cuantificación del ADN con el sistema de análisis de imagen CAS-200 (Becton Dickinson).

Extracción del ADN para PCR

Se realizó simultáneamente la extracción del ADN a partir de dos a cuatro secciones, de 10 µm de grosor, del tejido fijado en *Complucad*® e incluido en parafina. Se procedió siguiendo el protocolo de extracción y amplificación propuesto por Master Diagnóstica, S.A. (Vitro).

RESULTADOS

La imagen histológica obtenida en diferentes tejidos es buena (Figs. 1 a 4), tanto en los aspectos arquitecturales como en los detalles celulares y el grado de retracción (Tabla 1). A partir de las 24 horas *Complucad*®, al igual que el formol tamponado, mantiene la arquitectura tisular y los detalles celulares, mejorando las características nucleares aunque produciendo ciertos fenómenos de retracción celular (Tabla 2).

Con las técnicas inmunohistoquímicas, utilizando distintos anticuerpos primarios se advierte que la fijación con *Complucad*® mejora de manera evidente la inmunorreactividad tisular (Figs. 5 a 8 y Tabla 3), aunque también en el material fijado en *Complucad*® se precisa realizar el desenmascaramiento antigénico previo a la inmunotinción para mejorar la calidad.

Las técnicas biomoleculares (extracción de ADN para PCR y cuantificación del ADN mediante citometría de imagen) realizadas con tejidos fijados en *Complucad*® muestran resultados satisfactorios, similares a los obtenidos con fijación formólica.

DISCUSIÓN

Tras diferentes experiencias se ha comprobado que *Complucad*® es un producto fijador de estructuras tisulares, muy útil en el campo de la anatomía y medicina legal (por ejemplo, preservación de cadáveres), con poder bactericida, trombolítico y lipolítico legal (10-13). Una variante del mismo (*Complucad* Muñoz), diluido en alcohol al 70%, se comporta como un fijador rápido y homogéneo de las muestras tisulares obtenidas en animales de experimentación, y no tiene los efectos tóxicos/irritativos (en la conjuntiva ocular, piel, tracto respiratorio...) del fijador universal: el formaldehído. En este trabajo comunicamos las primeras observaciones sobre la capacidad fijadora del *Complucad*® en los estudios anatomopatológicos rutinarios, comparándolo con la fijación en formol tamponado al 10%.

En las muestras tisulares pequeñas (en torno a 1 cm) estudiadas advertimos que las imágenes microscópicas de las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina después de una fijación con *Complucad*® tienen, en general, idéntica calidad que las de los mismos tejidos fijados en formol, bien sea en tiempos cortos (dos horas),

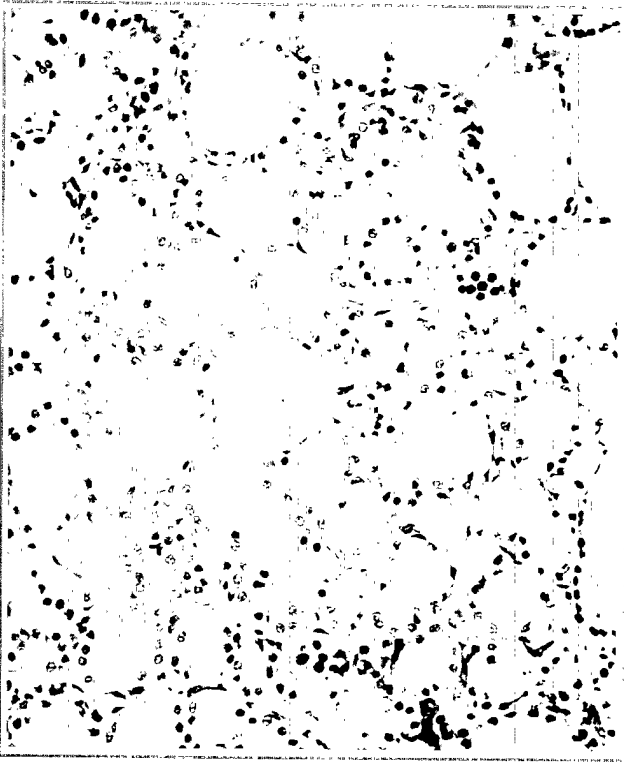


Figura 1. Tejido: tiroides; fijación: formol tamponado; tiempo de fijación: dos horas; tinción con HE (original $\times 20$).

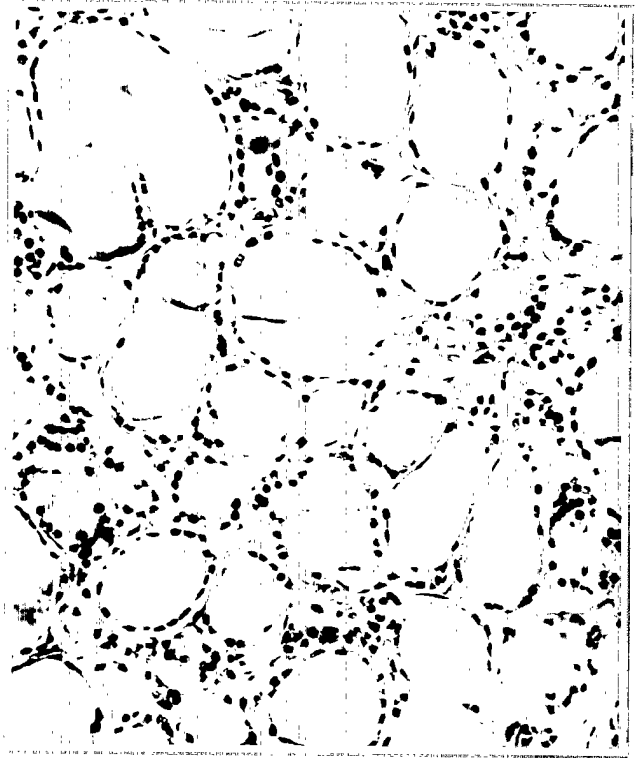


Figura 2. Tejido: tiroides; fijación: *Complucad*[®]; tiempo de fijación: dos horas; tinción con HE (original $\times 20$).



Figura 3. Tejido: riñón; fijación: formol tamponado; tiempo de fijación: un mes; tinción con HE (original $\times 20$).

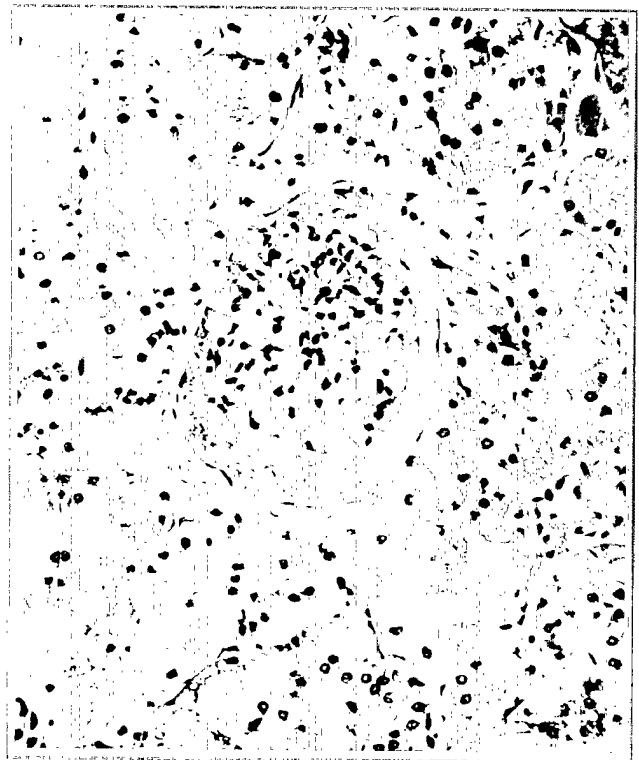


Figura 4. Tejido: riñón; fijación: *Complucad*[®]. Tiempo de fijación: un mes; tinción con HE (original $\times 20$).

Tabla 1. Valoración comparativa en preparaciones con hematoxilina-eosina de la fijación corta (dos horas) con formol tamponado al 10% y Complucad®.

	Arquitectura	Detalle celular	Retracción celular
Formol tamponado	+++	++	-
Complucad®	++/+++	+/++	-/+

Tabla 2. Valoración comparativa en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina de la fijación intermedia y larga o almacenamiento (24 horas a un mes) con formol y Complucad®.

	Arquitectura	Retracción celular	Detalle celular
Formol tamponado			
24 horas	+++	-	Mejores características y contornos citoplasmáticos
1 semana	+++	-	
1 mes	+++	-	
Complucad®			
24 horas	+++	-	Mejores características nucleares
1 semana	+++	-	
1 mes	+++	-	

**Figura 5.** Tejido: corazón; fijación: formol tamponado; tiempo de fijación: dos horas; tinción inmunohistoquímica con desmina (original x20).**Figura 6.** Tejido: corazón; fijación: Complucad®; tiempo de fijación: dos horas; tinción inmunohistoquímica con desmina (original x20).



Figura 7. Tejido: próstata; fijación: formol tamponado; tiempo de fijación: dos horas; tinción inmunohistoquímica con PSA (original $\times 20$).



Figura 8. Tejido: próstata; fijación: *Complucad*[®]; tiempo de fijación: dos horas; tinción inmunohistoquímica con PSA (original $\times 20$).

intermedios (24 horas) o largos (una semana y un mes). No obstante, quizás existen algunos matices diferenciales entre ambos tipos de fijadores:

- Los tejidos fijados en formol tienden a presentar en las preparaciones de hematoxilina-eosina mejores características citoplásmicas (dibujándose de forma más nítida los contornos celulares), mientras que en las preparaciones de tejidos fijados en *Complucad*[®] se resaltan mejor las características nucleares, siendo más apreciada tanto la envoltura nuclear como el nucléolo.
- Cuando los tiempos de fijación quedan acortados a un periodo de dos horas, los tejidos fijados en *Complucad*[®] se distorsionan ligeramente y algunos de ellos (tiroides y riñón, especialmente) tienden a presentar problemas de retracción celular.

Otro punto objeto de estudio ha sido la conservación de la composición tisular y celular, lo cual ha sido llevado a cabo mediante la realización, también en tejidos fijados en formol tamponado y *Complucad*[®], de distintas técnicas especiales que requieren que los tejidos y células analizados conserven su composición natural en proteínas y ADN. En lo referente a las pruebas inmunohis-

toquímicas, los casos procedentes de tejidos fijados con *Complucad*[®] arrojaron resultados no inferiores (e incluso mejores, véase la Tabla 3) a los fijados en formol, por lo que se puede concluir que la fijación en *Complucad*[®] no altera la composición proteica antigénica (epitopos) de los tejidos. Por otro lado, la realización de técnicas de citometría analítica y biomoleculares (PCR) también demostró la viabilidad de las mismas en tejidos fijados en *Complucad*[®], indicando que esta fijación conserva las propiedades naturales del ADN.

En conclusión, el método de fijación en *Complucad*[®] cumple en lo esencial los requisitos universalmente establecidos para los fijadores tisulares en patología, ofreciendo una buena calidad respecto a las imágenes histopatológicas convencionales de hematoxilina-eosina, tanto en muestras de procesamiento habitual (fijación en torno a 24 horas o menos) como en las que requieren fijaciones más largas, o que corresponden a material de reserva o almacenado (durante semanas o meses). Así, en los tejidos fijados con *Complucad*[®] se pueden efectuar las técnicas especiales de mayor relevancia en la patología actual, tales como inmunohistoquímica, citometría analítica del ADN y biomoleculares (PCR), con

Tabla 3. Valoración comparativa en preparaciones inmunohistoquímicas (con diferentes anticuerpos y tejidos) de la fijación corta (dos horas) con formol tamponado y Complucad®.

Anticuerpo	Formol	Complucad®
VIM (pulmón y riñón)	+ / ++	+++
EMA (pulmón y riñón)	+ / +++	+++
Pan-QT (riñón)	++	+++
CEA (estómago)	++	++
Cromogranina (páncreas/estómago)	++	++
Enolasa (páncreas/estómago)	+ / -	+ / -
Sinaptofisina (páncreas/estómago)	++	+++
Leu-CD45 (bazo)	++	++
Tiroglobulina [tiroides (sin tratamiento antigénico)]	+++	++
PSA (próstata)	++	+++
34bE-12 (próstata)	+ / -	+
Actina (corazón)	+ / -	-
Desmina (corazón)	+	+++

resultados muy similares (a veces mejores, en inmunohistoquímica) que cuando se efectúa la fijación en formol tamponado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen las labores técnicas realizadas por M^a José Lozano, M^a Jesús Martínez e Ingrid Valero.

BIBLIOGRAFÍA

- Gersh I. *Fixation and staining*. En: Bracet J, Mirsky AE (Eds.). The cell. Academic Press, Nueva York 1959; 1-465.
- Underhill BML. *The rate of penetration of fixatives*. JR Microscop Soc 1932; 52: 113-119.
- Wollman M. *Problems of fixation in cytology, histology and histochemistry*. En: Bourne CH, Danielli IF (Eds.). International Review of Cytology. IV. Academic Press, Nueva York 1955.
- Purchtler Melon SN. *On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions*. Histochemistry 1984; 82: 201-209.
- García del Moral R, Aguilar M. *Fundamentos del proceso de fijación tisular*. En: García del Moral R (Ed.). Laboratorio de Anatomía Patológica. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid 1993.
- Walker JF. *Formaldehyde*. 3rd ed. Chem Soc Monograph Series. Reinhold, Nueva York 1964; 1-265.
- Martínez-Rodríguez R. *Histoquímica*. En: Martínez-Rodríguez R, Toledano Gasca A, Martínez Murillo R, García Segura LM (Eds.). Instituto Cajal. CSIC Press, España 1979.
- Prophet EB. *Fijación de tejidos*. En: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH (Eds.). Métodos histotecnológicos. AFIP, Washington, D.C., 1995.
- Prophet EB. *Procesamiento de tejidos: Deshidratación, aclaramiento e infiltración*. En: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH (Eds.). Métodos histotecnológicos. AFIP, Washington, D.C., 1995.
- Tomás Buisán ML. *Los distintos conservantes en el área Médico Legal, ventajas e inconvenientes*. Rev Esp Med Leg 1998; XXII (84-85): 51-57.
- Jiménez Collado J, Arene Roda E, Chávez R, García Gómez S. *A new technique for embalming and preserving corpses*. The tenth European Anatomical Congress. Florencia 1995.
- Arráz Aybar L, Jiménez Collado J. *Exposición a Complucad-Anatomic en una sala de disección*. XVII Congreso Sociedad Anatomía Española, Valencia 1997.
- Gil Pitarch P, Negro Muñoz MC, Feucht Miguel MJ, Polo Cerdá M, Villalain Blanco JD. *Aplicación de Complucad® (para el tratamiento conservador de cuerpos momificados)*. VIII Jornadas de la Sociedad Española de Medicina Legal y Forense, Málaga 1998.
- Muñiz E, Rodríguez-Mateo L, Martínez Rodríguez R, Gragera RR. *Utilización de Complucad en técnicas inmunohistoquímicas a microscopía óptica*. II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 1998.
- Muñiz E, Rodríguez-Mateo L, Martínez Rodríguez R, Gragera RR. *Complucad: Un nuevo fijador para muestras histopatológicas*. II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, 1998.

