

Experiencia en la fijación no formólica durante más de 10 años en Anatomía Patológica de un Hospital General

Miguel Ángel Carrasco García¹, Sara Simonetti¹, Noelia Teruel¹

¹Servicio de Anatomía Patológica. Cipro Hospital General de Catalunya. Sant Cugat del Vallès. Barcelona.

Enlazando con el capítulo presentado en el Suplemento del 2011 del Libro Blanco de Anatomía Patológica presentado por el Dr. Giménez Mas y cols. sobre “Alternativas al formol como fijador de piezas y tejidos anatómicos”, se nos encomendó dar a conocer nuestra experiencia en el trabajo cotidiano en un Servicio de Anatomía Patológica que no tiene el formol como fijador de rutina desde hace más de diez años y como nuestra experiencia puede ayudar a otros centros a realizar el salto a la fijación no formólica.

El formaldehído, constituido por un solo átomo de carbono y fórmula HCHO, es el aldehído más simple denominado metanal por la IUPAC. Este aldehído es un gas incoloro muy soluble en agua; esta dilución, juntamente con metanol como estabilizante, recibe el nombre de formol.

El formol es una sustancia con efectos sobre la salud, variando éstos su gravedad en función de la concentración. A pesar de conocerse sus riesgos, el formol sigue siendo el fijador más utilizado en los servicios de Anatomía Patológica.

El formol tiene un fuerte carácter irritante y está clasificado como sustancia cancerígena. A bajas concentraciones, el formol provoca irritación ocular y del tracto respiratorio; a altas concentraciones produce una severa irritación de las vías respiratorias, y en el peor de los casos puede llegar a producir la muerte. En referencia al poder cancerígeno, fue reclasificado en el año 2011 por la IARC (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer) del grupo 2A al 1, considerando así su potencial cancerígeno para humanos.

El año 1987, con la aprobación de la ley del Estándar de Formaldehído en EEUU, se cambiaron los hábitos de trabajo en los laboratorios de Anatomía Patológica y se empezó a plantear la idea de sustituir el formol por otro fijador menos nocivo.

Se han realizado numerosos estudios acerca del potencial tumorigénico del formaldehído y se ha demostrado la relación de los tumores malignos de nasofaringe con la exposición al formol. Un estudio reciente mostró la presencia de aberraciones cromosómicas en las células progenitoras mieloides

como las que se observan en la leucemia mieloide. Este hallazgo ha hecho que la IARC incluya, en su próxima publicación, la leucemia mieloide como tumor maligno asociado al formaldehído. Existen evidencias fuertes de riesgo, pendientes de más estudios, sobre el cáncer nasosinusal y encefálico. Finalmente, se ha observado la generación de aberraciones cromosómicas y génicas en trabajadores expuestos al formaldehído.

Actualmente, el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) fija como valor límite ambiental para exposiciones profesionales de corta duración al formaldehído un VLA-EC de 0,37mg/m³.

La sustitución de un agente químico cancerígeno y mutágeno como el formaldehído es la medida preventiva de mayor prioridad según el R.D. 665/1997 “siempre que sea técnicamente posible”. Diversos modelos permiten realizar una comparación de los riesgos entre sustancias y permite valorar la conveniencia de la sustitución.

Se han propuesto muchos fijadores con un riesgo para la salud menor que el del formaldehído y se han realizado comparaciones en el uso práctico en Histología y Anatomía Patológica. Es importante mencionar que no existe, o no se conoce todavía, un sustituto que permita eliminar el uso del formol al 100%, es decir, no se ha encontrado el sustituto perfecto. Esto se debe básicamente a que todos los protocolos de trabajo en nuestra especialidad están optimizados para el formol y se ha trabajado poco o muy poco en los sustitutos y muy especialmente en el campo de la biología molecular.

Por recomendación explícita del Comité de Seguridad y Salud Laboral de Capiro Hospital General de Catalunya el año 2002 se sustituyó el uso del formol como fijador de rutina por el de Glyo-Fixx con la finalidad de reducir la toxicidad a la que se exponían los trabajadores del Servicio de Anatomía Patológica del centro. Glyo-Fixx marca comercial de la casa Thermo Fisher Scientific es un fijador basado en el glioxal (ethandial), un dialdehído no formólico que su manipulación presenta muy baja toxicidad o peligrosidad para las personas o el medio ambiente. Existen en comercio también otros fijadores basados en glioxal, como el Greenfix, el Prefer o el Histofix. En nuestro servicio hemos probado algunos y hemos elegido trabajar con el Glyo-Fixx. El volumen de trabajo en nuestro centro ha ido aumentando progresivamente hasta alcanzar los más de 12000 casos (no envases o muestras) el año 2012 y debido a las ampliaciones realizadas recientemente, este año 2013 esperamos alcanzar los 25000 casos.

En nuestro centro decidimos optar por lo que llamamos fijación mixta. Es decir emplear el Glyo-fixx como fijador universal de rutina y reservar el formol únicamente para aquellas muestras que por razones científicas considerásemos que se debían fijar con formol. Con nuestra metodología hemos reducido el uso del formol de una forma notable, hasta alcanzar cifras de menos de un 5% de fijación tisular con formol frente al 95% de muestras fijadas con Glyo-fixx.

Trabajamos con Glyo-Fixx diluido a partir de garrafas de concentrado (3.8 lts) de tal forma que obtenemos 18.9 lts de fijador diluido con unas concentraciones aproximadas de:

Agua	76%
Etanol (100%)	20%
Glioxal	3%
Ácido acético	1%

Se recomienda trabajar con una relación fijador/tejido similar a la del formol, o sea 4:1. El transporte de las muestras es idéntico al del formol empleando botes con tapa. El tiempo de fijación para

muestras pequeñas es de unas pocas horas y las piezas quirúrgicas 24 horas. La fijación tiene lugar a temperatura ambiente.

El aspecto macroscópico de las piezas fijadas en Glyo-Fixx es parecido al formol, aunque con una menor consistencia, ya que los tejidos no se endurecen tanto. La disección ganglionar en las piezas quirúrgicas se facilita ya que los ganglios suelen adoptar una coloración más blanquecina que los hace de fácil identificación visual, pero no son tan fáciles de identificar por tacto. Debido a que el Glyo-Fixx no es un buen conservante no se aconseja guardar durante muchas semanas los tejidos en dicho fijador y aquellas muestras que se decidiesen pasar a un banco de tejidos interesantes deberán guardarse posteriormente en formol. La fijación formólica a posterior de la del Glyo-Fixx no modifica las características iniciales de la fijación no formólica, de igual modo que cualquier muestra fijada en formol aunque pase posteriormente por el Glyo-Fixx no verá modificadas sus propiedades adquiridas con el formol.

El procesamiento de los tejidos utilizado es el estándar del formol con baños alcohólicos: etanol al 100%, etanol al 96%, xilol y parafina, iniciándose siempre el proceso con baño en Glyo-Fixx ya que no empleamos formol en los procesadores. Con los bloques obtenidos se realizan las tinciones habituales en Anatomía Patológica: hematoxilina-eosina, tinciones de histoquímica (tricrómico, PAS,...) y de inmunohistoquímica. El detalle celular es excelente con la tinción rutinaria de hematoxilina y eosina sin observarse diferencias significativas con las muestras fijadas en formol, excepto con la granularidad citoplasmática de los eosinófilos que se pierde. Todas las tinciones histoquímicas funcionan perfectamente. En inmunohistoquímica fue necesario modificar algunos de los protocolos clásicos de inmunohistoquímica con tejidos fijados en formol para adaptarlos al nuevo fijador para obtener finalmente unos resultados equivalentes con los dos fijadores.

En referencia al tratamiento de residuos, el sobrante líquido de la fijación se debe eliminar como producto químico peligroso especialmente por su contenido en etanol. En cuanto a los botes con restos tisulares, se eliminan a través de la empresa de gestión de residuos biológicos del centro una vez separado el fijador de los restos tisulares.

Las medidas de seguridad personal requeridas por el Glyo-Fixx como fijador, según la hoja de seguridad de materiales proporcionada por el distribuidor del fijador, son guantes y gafas de protección, sin necesidad de mascarillas ni vitrinas con aspiración forzada como en formol. Debido a la baja concentración de etanol no se considera inflamable. Únicamente se precisa protección respiratoria en caso de sobreexposición o niveles altos de exposición que según ACGIH son:

Alcohol etílico: TLV TWA:	1000 ppm
Glioxal: TLV TWA:	0.1 mg/m ³

El trabajo rutinario de macros lo realizamos sin campanas de extracción ni mascarillas respiratorias. Nuestros técnicos emplean mascarillas protectoras cuando realizan los trabajos de eliminación de residuos del Glyo-fixx al separar los restos tisulares del fijador debido a que consideramos que durante esos procedimientos podrían alcanzarse niveles altos de exposición.

Debido a que ciertos protocolos de trabajo sólo están aceptados científicamente con tejidos fijados en formol, en nuestro centro decidimos que todas las biopsias y piezas quirúrgicas se fijarían en Glyo-Fixx excepto en los siguientes casos:

- 1. Biopsias por aguja de lesiones mamarias.** Se decidió así ya que en mama los únicos protocolos aceptados para determinación de HER2 mediante inmunohistoquímica, FISH o CISH son en tejidos fijados en formol. Los resultados que hemos obtenido de la determinación del HER2

mediante inmunohistoquímica realizados en tejidos fijados con Glyo-Fixx siempre han sido similares al formol. No existe ningún problema con los estudios inmunohistoquímicos de receptores hormonales en las muestras fijadas en Glyo-Fixx.

2. **Biopsias endoscópicas y por aguja de lesiones pulmonares.** Debido a que algunos casos serán susceptibles de la determinación del EGFR también las fijamos de forma rutinaria en formol.
3. **Biopsias endoscópicas de tumores digestivos.** A pesar de que no existe ningún tipo de problema con las muestras fijadas en Glyo-Fixx para el estudio de mutaciones de KRAS decidimos fijar estas biopsias en formol.
4. **Una muestra para fijación formólica y el resto con Glyo-Fixx en las piezas quirúrgicas tumorales.** Siempre que se recibiesen en fresco. El hecho de fijar al menos un bloque de tejido tumoral en formol es debido a que a veces estos casos se trasladan a otros centros y al no tener optimizados sus protocolos de inmunohistoquímica para el Glyo-Fixx podrían tener resultados dispares. Otra razón para tener bloques tumorales en formol es para la realización de técnicas de biología molecular en otros centros, ya que en el nuestro no las tenemos y por tanto no hemos protocolizado las metodologías al Glyo-Fixx.
5. **Tumores del sistema nervioso.** El estudio de deleciones en oligodendrogliomas de cromosomas 1p y 19q se realizan en un centro de referencia donde las enviamos. A pesar que en nuestro centro de referencia han obtenido resultados positivos con las muestras fijadas en Glyo-Fixx, siempre que es posible les enviamos las muestras fijadas en formol.
6. **Fijación en formol de biopsia realizada para descartar eosinofilia.** El Glyo-Fixx hace desaparecer las granulaciones citoplasmáticas de los eosinófilos y su reconocimiento es solo posible a partir de la identificación de la célula con el núcleo bilobado.
7. **Biopsias de piel por enfermedades inflamatorias.** Recomendamos fijación con formol para la identificación de los eosinófilos.

Durante el 2011 procesamos 16.000 bloques y aproximadamente 600 fueron en formol (3,75%). Esto supuso un consumo hospitalario de unos 1200 litros de Glyo-Fixx frente a unos 80 litros de formol al 4%. El hecho de trabajar con formol a tan pequeña escala no hace necesarias tomar medidas protectoras contra ese fijador, ya que se trata siempre de botes pequeños con escasa cantidad de formol y que al manipular esas muestras no empapamos las superficies de trabajo con el consiguiente riesgo de los vapores del formol por su volatilidad. Las mediciones ambientales realizadas en nuestro laboratorio han sido negativas hasta la actualidad.

Nuestra experiencia con la inmunohistoquímica y las muestras fijadas en Glyo-Fixx es completamente satisfactoria. Inicialmente necesitamos adaptar ciertos anticuerpos, ya que en general los tejidos fijados en Glyo-Fixx precisan menor recuperación antigénica. En los pretratamientos se evita el empleo de proteasas debido a la agresividad que ejerce sobre los tejidos fijados con glioxal. Actualmente trabajamos con dos proveedores de inmunohistoquímica: Menarini a través del inmunoteñidor Bond 3 de Leyca y con Dako Autostainer Link 48 y los resultados son superponibles, aunque tal vez conseguimos unas mejores definiciones tintoriales con Dako. Algunos marcadores nucleares presentan tinciones algo menos intensas que el formol (TTF-1, p53, p63 y Ki 67). No hemos observado ningún otro problema con los tejidos fijados en Glyo-Fixx. Entre los muchos substitutos que a lo largo de los años han aparecido, el glioxal es el que mejores resultados ha tenido frente al formol. Algunos autores han analizado los resultados de la inmunohistoquímica en tejidos fijados con glioxal con buenos resultados en general.

Las técnicas de biología molecular no han sido todavía protocolizadas para tejidos fijados en Glyo-Fixx y por tanto es necesario ampliar este campo. Las pruebas que hemos realizado hasta el momen-

to son alentadoras en cuanto a preservación y calidad del DNA, pero requieren de más estudios hasta poder dar unas guías definitivas al respecto. No hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio realizado con tejidos fijados con glioxal.

Uno de los mitos del formol es su bajo coste. En el pasado cuando en los laboratorios de Anatomía Patológica se preparaba el formol al 4% a partir del concentrado y sin ningún tipo de medida protectora para los trabajadores, ni ningún tipo de control en la eliminación de los residuos, era cierto que el coste de ese producto era muy bajo. Pero actualmente el empleo del formol como fijador de rutina supone unas medidas preventivas que lo hacen mucho más caro que los substitutos:

1. Compra de formol diluido en garrafas con grifo para evitar al máximo su manipulación. El coste de estas garrafas es superior al de los fijadores no formólicos que empleamos en nuestros centros (Glyo-fixx y Greenfix).
2. La manipulación de tejidos fijados con formol obliga a trabajar con mascarillas con filtros específicos, gafas protectoras, guantes, vitrinas de extracción y mesas de tallado con extracción localizada que precisan un mantenimiento y recambio de filtros continuo.
3. La eliminación de los residuos del formol implica la separación del líquido de los restos tisulares y su eliminación posterior como producto químico en contenedores especiales.

Actualmente también estamos empezando a trabajar con otro fijador no formólico el Greenfix de la casa Diapath también basado en el ethandial (glioxal) con un formato de fijador listo para su empleo que tiene unas concentraciones de sus principios activos muy similares al Glyo-fixx. Hasta la fecha no hemos encontrado ninguna diferencia con las muestras fijadas con Glyo-fixx, sino que al contrario de lo que sucede con el Glyo-fixx, las granulaciones de los eosinófilos no desaparecen con Greenfix. De la misma casa Diapath estamos en periodo de pruebas con el Greenfix plus recomendado por el fabricante para la fijación de piezas quirúrgicas grandes. El Greenfix plus, aunque sea un fijador basado en el glioxal, incorpora un 70-80% de etanol absoluto. Las pruebas realizadas hasta el momento en las piezas quirúrgicas han sido satisfactorias incluso en inmunohistoquímica, pero llevamos pocos casos estudiados para dar resultados definitivos.

Durante estos años hemos tenido la oportunidad de probar otros fijadores basados en el glioxal como principio activo de fijación con resultados excelentes como el Histofix® Sustituto de Formaldehído DC de la casa Panreac.

CONCLUSIONES

Ventajas del Glyo-fixx y Greenfix:

1. Adecuada fijación de las piezas y biopsias
2. Fijadores con resultados similares al formol en cuanto a tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas
3. Fijadores con muy baja toxicidad que no provocan irritaciones oculares ni de mucosas al ser manipulados y que no precisan de sofisticados sistemas de aspiración ni empleo de mascarillas protectoras
4. Fácil eliminación de los residuos. Aunque siguiendo los procedimientos que tienen como productos químicos. Actualmente estamos en consulta para poder realizar su eliminación a través del alcantarillado común.
5. Con la fijación de más del 95% de nuestras muestras con glioxal, el empleo del formol en el resto de tejidos queda reducido a una mínima cantidad por lo que no supone ningún ries-

go para la salud. De hecho no empleamos sistemas de aspiración ni mascarillas en su manipulación.

6. El coste en nuestro centro del Glyo-Fixx a partir del concentrado o bien del Greenfix listo para su uso es menor que la compra del formol en garrafas de 10 lts con grifo.

Desventajas del Glyo-fixx y Greenfix:

1. Pérdida de las granulaciones citoplasmáticas de los eosinófilos con Glyo-Fixx.
2. No conserva los tejidos durante largos periodos de tiempo. Recomendamos conservar esos tejidos en formol una vez han sido fijados con Glyo-Fixx.
3. En inmunohistoquímica leve disminución en la intensidad de algunos marcadores nucleares.
4. Técnicas de biología molecular no estandarizadas, pero con resultados positivos en muchas de ellas (KRAS, Deleciones cromosómicas en tumores cerebrales).
5. Dificultad para realizar interconsultas con otros centros si no enviamos material fijado en formol.

La principal conclusión de nuestra experiencia es que, como nosotros, cualquier servicio de Anatomía Patológica puede trabajar sin formol como fijador de rutina y limitar su uso a aquellas muestras que por razones científicas sólo puedan emplearse con formol. Nuestra calidad diagnóstica no se verá mermada y en cambio dispondremos de espacios de trabajo mucho más saludables.

BIBLIOGRAFÍA

1. JA Giménez Mas y cols: Alternativas al formol como fijador de piezas y tejidos anatómicos. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España, Suplemento 2011: 101-140.
2. Humans IMotEoCRt: A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations In Formaldehyde., 2012, Volume 100F: (<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-129.pdf>)
3. Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, Butori C, Selva E, Santini J, Mograbi B, Hofman P: Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid* 2009, 19:1239-1248
4. Titford ME, Horenstein MG: Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology, *Archives of pathology & laboratory medicine* 2005, 129:502-506
5. Umlas J, Tulecke M: The effects of glyoxal fixation on the histological evaluation of breast specimens, *Human Pathology* 2004, 35:1058-1062
6. Tubbs RR, Hsi ED, Hicks D, Goldblum J: Molecular pathology testing of tissues fixed in prefer solution, *The American Journal of Surgical Pathology* 2004, 28:417-419
7. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S: Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections, *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2004, 52:893-901
8. Dapson RW: Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval, *Biotechnic & Histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 2007, 82:161-166
9. Zanini et al.: Evaluation of two commercial and three home-made fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible. *Environmental Health* 2012 11:59. (<http://www.ehjournal.net/content/11/1/59>)
10. Kothmaier H, Rohrer D, Stacher E, Quehenberger F, Becker KF, Popper HH. Comparison of formalin-free tissue fixatives: a proteomic study testing their application for routine pathology and research. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 Jun;135(6):744-52. doi: 10.1043/2009-0676-OA.1.