

Análisis de los efectos de la preservación en PBS y la fijación en formol en la conducción de calor de tejido hepático

A. De León Hernández¹, C. García Cadena¹, N. Alemán García¹, A. Pérez García³, E. Gutiérrez Herrera^{1,2}, J. Hernández Ruiz³ y C. Sánchez Pérez¹.

¹Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-186, Distrito Federal 04510, México.

²Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico-Hospital General de México Eduardo Liceaga, Dr. Balmis 148, México D.F. 06720, México.

³Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México Eduardo Liceaga, Dr. Balmis 148, México D.F. 06720, México.

Resumen— En trabajos previos se empleó un sensor óptico de flujo de calor para diferenciar la conducción de calor de tejidos biológicos fijados en una solución de formol. Dada esta aplicación, en este trabajo se realiza un análisis del efecto de la solución empleada para la preservación o fijación en el tejido y su consecuencia sobre la conducción de calor. Se realizan mediciones de conducción de calor para muestras de tejido hepático preservado en PBS y fijado en formol. En el estudio estadístico de los resultados se encontró que la respuesta del sensor a la conducción térmica de las muestras fijadas con solución de formol es estadísticamente diferente a la respuesta para muestras preservadas en PBS.

Palabras clave— Sensor termo óptico, flujo de calor en tejidos, fijación de tejido en formol, tejido preservado en PBS.

I. INTRODUCCIÓN

El empleo de tejido biológico para el análisis de sus propiedades o para la evaluación de alguna enfermedad, requiere de soluciones de preservación para evitar que el tejido llegue a la descomposición. Ha sido demostrado que el mantenimiento del tejido en soluciones salinas como el amortiguador fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) permite la conservación durante algunas horas, mientras que el uso de soluciones como el formol (formaldehído) permite la fijación del tejido, mediante la remoción de las moléculas de agua y el establecimiento de puentes moleculares, pudiendo mantenerlo sin descomposición por varios años. El uso de estas sustancias resulta un buen método para la preservación de tejido para estudios *ex vivo* [1, 2]; sin embargo existen pocos estudios del efecto de estas sustancias en los tejidos post fijación [3, 4, 5].

En nuestro grupo de trabajo hemos desarrollado un sensor de flujo de calor con sensibilidad para distinguir tejidos biológicos [6], como trabajo futuro se plantea su aplicación en la evaluación de alteraciones por fármacos o enfermedades en el tejido. Una aplicación específica es la evaluación del estado de fibrosis de tejido hepático, la cual requiere el uso de soluciones de formol para fijar y poder conservar el tejido a lo largo del tiempo. En este trabajo presentamos un análisis de la influencia en la respuesta del

sensor a la conducción de calor dado el estadio de muestras de tejido hepático en las soluciones convencionales de preservación.

Presentamos la respuesta del sensor de flujo de calor a mediciones de muestras de hígado de rata de individuos jóvenes y adultos. Las mediciones se realizan con el tejido preservado en PBS y fijado en formol. Encontramos que la respuesta del sensor a la conducción térmica de muestras en una solución de formol es distinta a la de muestras preservadas en PBS y que estas últimas tienen una respuesta similar a la del agua tridestilada.

II. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Muestras. Utilizamos siete ratas de la cepa Wistar: tres ratas jóvenes sanas (R1, R2 y R3), con una edad aproximada de 9 semanas y con un peso respectivo de 275 g, 290 g y 270 g; tres ratas adultas sanas (R4, R5 y R6), con una edad aproximada de 17 semanas y con un peso respectivo de 480 g, 492 g y 470 g y finalmente una rata adulta enferma (RE) con una edad de 44 semanas y fibrosis F2 en escala Metavir inducida con CCl₄ (Fig. 1). Las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de pentobarbital sódico (anestésico) administrado por vía intraperitoneal. Los hígados fueron extraídos y enjuagados con PBS a fin de evitar el rompimiento de los eritrocitos. Cada hígado fue dividido en dos muestras de aproximadamente 17 x 7 x 2 mm. Las primeras muestras fueron colocadas en una solución de PBS y medidas cuatro horas después (muestras R1P, R2P, R3P, R4P, R5P y R6P). Las segundas muestras fueron colocadas en una solución fijadora de formol amortiguado al 3.8% y medidas después de 72 horas (muestras R1F, R2F, R3F, R4F, R5F, R6F y REF). Muestras adicionales fueron colocadas en la solución de formol para el análisis histopatológico de un corte con tinción tricrómica de Masson.

También fue registrada, con fines de comparación, una medición de agua tridestilada. En todas las mediciones las muestras se mantuvieron a una temperatura de 23.5°C en un baño de temperatura controlada.

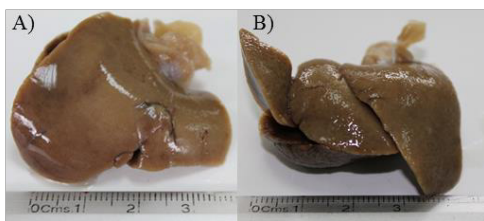


Fig. 1. Muestras de hígado de rata de la cepa Wistar A) de 9 semanas de vida (rata joven R1) y B) de 44 semanas de vida (rata adulta enferma RE).

Medición de conducción de calor. Las mediciones se realizaron con un sensor de flujo de calor basado en el efecto de la deflexión termo óptica. La deflexión es monitoreada a través de una medición fotométrica con un sensor de ángulo utilizando fibra óptica [6,7]. La configuración experimental para el sensor consiste en un sistema de 3 medios, donde en el medio 1 se encuentra una fuente de calor, en el medio 2 un bloque de material termo-óptico (acrílico), en donde se propaga un haz láser en la dirección perpendicular al sentido de la conducción del calor. Finalmente en el medio 3 se encuentra la muestra que se desea caracterizar en contacto con el bloque. En esta configuración se genera un gradiente de temperatura ($T(x)$), el cual provoca un gradiente de índice de refracción ($n(x)$) perpendicular al eje óptico de propagación, que genera la deflexión del haz láser que pasa a través del bloque (Fig. 2A). La deflexión del haz láser provoca una disminución de la potencia detectada. La fuente de calor se enciende a los 20 s (t_1) de iniciar la toma de datos y se apaga a los 440 s (t_2).

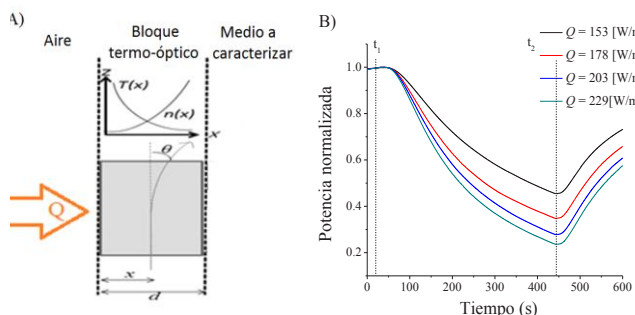


Fig. 2. Sensor de flujo de calor: A) Esquema utilizado para las mediciones. B) Respuesta a distintos valores de calor aplicado Q .

Se observa en la Fig 2B la respuesta del sensor, en donde la disminución de potencia óptica detectada, está dada por la deflexión del haz láser debido a diferentes valores de Q aplicados a partir del tiempo t_1 , en donde el medio a caracterizar es aire. Al apagar la fuente de calor al tiempo t_2 , la potencia se recupera hacia su valor inicial. La prueba termina en los 600 s.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan las curvas experimentales de la respuesta del sensor de flujo de calor para determinar el efecto ocasionado en la conducción de calor del tejido, por la solución empleada para su preservación o fijación. Se muestra en la Fig. 3 con líneas punteadas la respuesta del sensor a la conducción de calor para las muestras preservadas en PBS (R1P, R2P, R3P, R4P, R5P y R6P) y se comparan con la respuesta del sistema cuando se mide agua tridestilada.

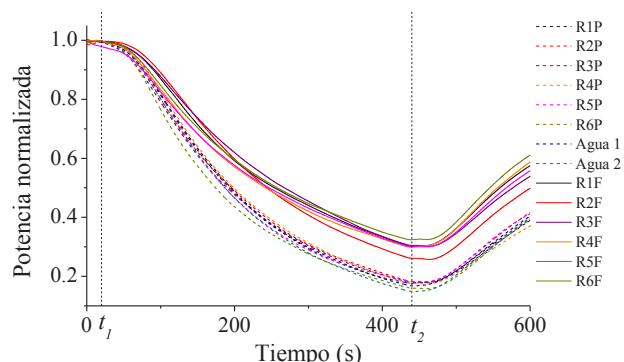


Fig. 3. Respuesta del sensor a la conducción de calor de las muestras de hígado preservadas en PBS y fijadas con formol así como mediciones de agua tridestilada (Agua).

De los resultados obtenidos se observa que la respuesta del sensor a la conducción de calor de las muestras de los individuos jóvenes y adultos es similar. Además se observa que la conducción de calor de las muestras colocadas en PBS se asemeja a la conducción de calor del agua, esto se podría asociar al alto contenido de agua en el hígado (Fig. 3, líneas punteadas). Se ha reportado que el hígado está compuesto en promedio de 75% de agua [8], por lo que su comportamiento térmico puede ser muy parecido al registrado para el agua tridestilada.

Se realizaron pruebas estadísticas para determinar si existe diferencia entre las curvas de conducción de calor de las muestras de las ratas jóvenes y adultas. Las pruebas se realizaron para los cortes correspondientes a los individuos jóvenes y adultos sumergidos en PBS (Fig. 3, líneas punteadas). El primer análisis fue una prueba t-student para medias independientes, en la cual, el criterio para que dos grupos sean estadísticamente diferentes es que el valor de la probabilidad (p) sea menor a 0.05.

Se aplicó la prueba t (no pareada) a los tiempos 200 s, 300 s, y 420 s de las curvas, resultando un valor de $p=0.4376$, $p=0.5163$ y $p=0.4555$, respectivamente, por lo tanto la respuesta del sensor a la conducción de calor para las muestras de las ratas de diferentes edades preservadas en PBS no son estadísticamente diferentes.

El segundo análisis fue un diagrama de caja, en la Fig. 4 se muestra el resultado de la prueba hecha en el tiempo 300 s, se observa, al igual que en la prueba anterior, que para ese tiempo las muestras de los individuos jóvenes (R1P, R2P y R3P) y adultos (R4P, R5P y R6P) no son estadísticamente diferentes para cortes preservados en PBS.

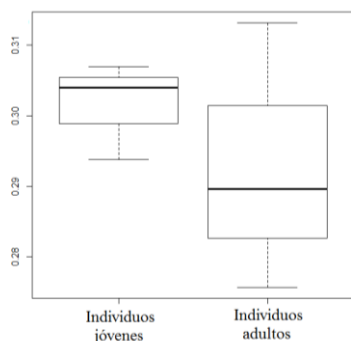


Fig. 4. Comparación estadística de las curvas de conducción de calor, en el tiempo 300 s, para muestras de los individuos jóvenes (R1P, R2P y R3P) y adultos (R4P, R5P y R6P) preservadas en PBS.

Se muestra en la Fig. 3 con líneas sólidas la respuesta del sensor a la conducción de calor para las muestras fijadas con formol durante 72 horas (R1F, R2F, R3F, R4F, R5F y R6F) y se puede observar que la respuesta es similar para todas las muestras excepto para la R2F a partir de los 300 s. Además la respuesta del sensor a las muestras fijadas con formol es significativamente diferente a la respuesta del agua.

Para las muestras de los individuos jóvenes y adultos fijadas con la solución de formol se aplicaron las dos pruebas estadísticas antes mencionadas. Se aplicó la prueba t (no pareada) a los tiempos 200 s, 300 s y 420 s de las curvas, resultando un valor de $p=0.1206$, $p=0.9474$ y $p=0.3667$, respectivamente, por lo tanto la respuesta del sensor a la conducción de calor para las muestras de las ratas de diferentes edades fijadas con la solución de formol, no son estadísticamente diferentes.

En la Fig. 5 se muestra el diagrama de caja hecho para el tiempo 300 s, se observa, al igual que en la prueba anterior, que para ese tiempo las muestras de los individuos jóvenes (R1F, R2F y R3F) y adultos (R4F, R5F y R6F) no son estadísticamente diferentes para cortes fijados con la solución de formol.

Dado que la edad de las ratas no influye en la respuesta del sensor a la conducción de calor, se realizó la comparación entre las muestras preservadas en PBS y las muestras puestas en la solución fijadora de formol. Se puede observar en la Fig. 3 que la respuesta del sensor a la conducción de calor es significativamente diferente entre las

muestras preservadas en PBS y las fijadas con formol. Se aplicó la prueba t (no pareada) a los tiempos 200 s, 300 s y 420 s de las curvas, resultando para los tres casos un valor $p \ll 0.05$, por lo tanto la respuesta del sensor a la conducción de calor para las muestras preservadas en PBS y para las muestras fijadas con la solución de formol son estadísticamente diferentes.

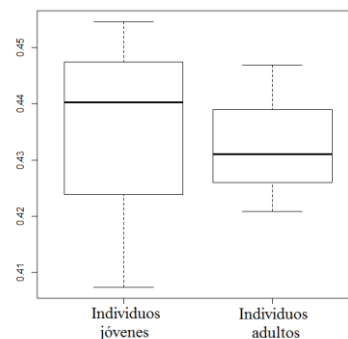


Fig.5. Comparación estadística de las curvas de conducción de calor, en el tiempo 300 s, para cortes de los individuos jóvenes (R1F, R2F y R3F) y adultos (R4F, R5F y R6F) fijados con una solución de formol.

En la Fig. 6 se muestra el diagrama de caja hecho para el tiempo 300 s, se observa, al igual que en la prueba anterior, que para ese tiempo las muestras preservadas en PBS (R1P, R2P, R3P, R4P, R5P y R6P) y fijadas con la solución de formol (R1F, R2F, R3F, R4F, R5F y R6F) son estadísticamente diferentes.

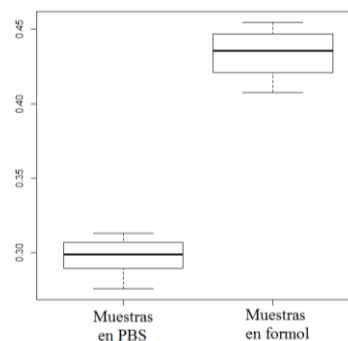


Fig.6. Comparación estadística de las curvas de conducción de calor, en el tiempo 300 s, para cortes sumergidos en PBS (R1P, R2P, R3P, R4P, R5P y R6P) y cortes fijados con la solución de formol (R1F, R2F, R3F, R4F, R5F y R6F).

De los resultados anteriores se puede observar que la respuesta del sensor es reproducible según la sustancia usada para preservar o fijar el tejido. En estudios previos de medición de conductividad térmica en tejidos fijados en formol [5], se determina que diferentes tejidos conservan esta propiedad térmica en *ex vivo* y fijados en una solución de formol, sin embargo, las condiciones y el sistema de medición es distinto al empleado en este trabajo, en el cual,

según la respuesta del sensor óptico de flujo de calor a la conducción de calor, se encuentra una diferencia entre tejido preservado en PBS y tejido fijado con formol, teniendo reproducibilidad entre diferentes muestras.

Dado que la Rata 7 fue sometida a un tratamiento con CCl_4 se realizó un estudio histopatológico de la muestra REF (Fig. 7). De las imágenes al microscopio (4x) se observó fibrosis F2 en escala Metavir periportal, aunque sin cambios en la morfología celular de los hepatocitos.

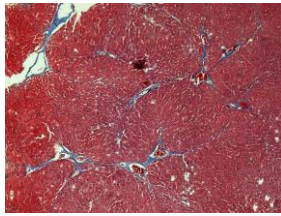


Fig. 7. Imagen al microscopio óptico a 4x del corte de hígado con tinción tricrómica de Masson para la rata RE.

Por último se realizó una comparación de la respuesta del sensor a la conducción de calor entre las muestras sanas y la muestra enferma con fibrosis, todas fijadas con la solución de formol. Las mediciones de las muestras sanas se realizaron después de estar 8 días en la solución de formol. Se obtuvo la curva promedio de la respuesta del sensor para las seis muestras con su valor de incertidumbre. La medición de la muestra enferma se realizó después de estar 7 semanas en la solución de formol. En la Fig. 10 se presentan estos resultados y se observa un cambio significativo entre la curva promedio de muestras sanas y la curva de la muestra que presenta fibrosis (R7F- fibrosis F2). Dado que es posible distinguir tejido enfermo de tejido sano, se puede plantear la aplicación del sensor de flujo de calor para evaluar alteraciones en tejido hepático.

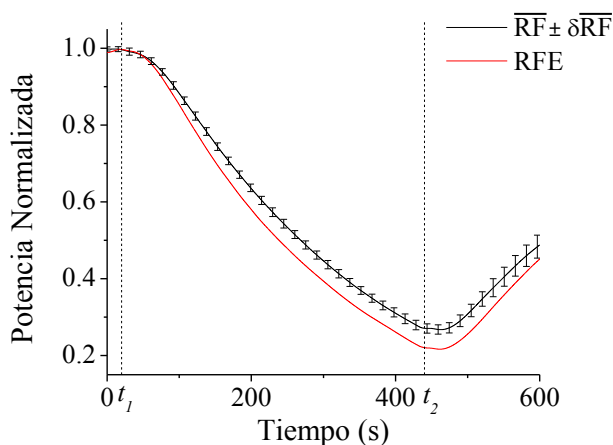


Fig. 10. Respuesta promedio del sensor de flujo de calor para los seis cortes de tejido hepático sanos (R1F, R2F, R3F, R4F, R5F y R6F) después de 8 días de estar en la solución de formol, con su valor incertidumbre. Respuesta del tejido que presenta fibrosis F2 (REF) después de 7 semanas de estar en la solución de formol.

El análisis de curvas de conducción de calor de tejido fijado deberá considerar que no es el mismo comportamiento que el de tejido preservado en PBS, sin embargo, la respuesta de nuestro sensor es reproducible entre diferentes muestras fijadas con formol (Fig. 3, líneas sólidas), por lo tanto, el efecto de la solución de formol es el mismo y no imposibilita encontrar diferencias causadas por enfermedad en mediciones realizadas a lo largo de varias semanas a tejidos fijados.

IV. CONCLUSIÓN

En este trabajo analizamos la conducción de calor con un sensor de flujo de calor basado en el efecto de la deflexión termo óptica, las mediciones se realizaron con muestras de hígado de rata de diferentes edades, preservadas en PBS y fijadas con una solución de formol. De los resultados obtenidos se encontró que estadísticamente la edad de los individuos de los cuales se extrajeron las muestras no influye en la respuesta del sensor a la conducción de calor. Por el contrario, al comparar la respuesta del sensor a la conducción de calor de las muestras preservadas en PBS con la de las muestras fijadas en formol, esta es estadísticamente diferente, es decir, las mediciones térmicas en tejido fijado en formol es diferentes a la de tejido considerado fresco (preservado en PBS). La solución empleada para la conservación del tejido influye en la conducción de calor de las muestras, sin embargo, las muestras de tejido fijado en formol presentan la ventaja de permitir mediciones subsecuentes por tiempos prolongados, mientras que la preservación en una solución de PBS implica la alteración progresiva del tejido en tiempos cortos de hasta algunas horas.

Dado que el efecto de la solución empleada para fijar los tejidos es siempre el mismo, la diferencia en la conducción de calor entre tejidos enfermos seguirá presente sin importar su fijación, por lo tanto es posible emplear el sensor de flujo de calor para evaluar alteraciones en tejido, por ejemplo, grado de fibrosis y cirrosis en tejido hepático.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo económico brindado a través de la DGAPA con el proyecto PAPIIT- IT100515 "Sistema óptico para la caracterización de propiedades térmicas de tejido hepático con alteraciones por enfermedades crónico-degenerativas". Además agradecen al Téc. Ricardo Vargas Orozco, jefe del Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" por las facilidades brindadas y a Fidel Salvador Silva Aguilar por su ayuda en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] X. Feng, X. Xu, S. Zheng. Current status and prespective of liver preservation solutions. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. Vol 5, No. 4, 490-494. 2006.
- [2] C. Simona, B. and M. Taylor. Acid-base buffering in organ preservation solution as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. *Cryobiology*. Vol. 45, 33-48. 2002.
- [3] J. Tucker, A. Chester. Effects of salinity, formalin concentration and buffer on quality of preservation of southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) larvae. *American society of ichthyologists and herpetologists. Copeia*, Vol. 1984, No. 4. 982-988. 1984.
- [4] S. Shortkroff, A. Goodwin, S. Giattina, B. Liu, M. Brezinski. Use of formalin-fixed tissues for ex-vivo imaging with optical coherence tomography. *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues IV. Proc. of SPIE*. Vol. 6088, 60880D.
- [5] N. Kharalkar, S. Bauserman, J. Valvano. *Effect of formalin on thermal conductivity of the biological tissue*. *Journal of biomechanical engineering*. Vol 131. Pp? 2009.
- [6] A. Gutierrez-Arroyo, C Sánchez-Pérez, N. Alemán-García, C. Piña-Barba. Optical characterization of thermal properties of biological tissue. *Proc. of SPIE* Vol. 8785. Pp? 2013.
- [7] G. E. Sandoval-Romero, A. García-Valenzuela, C. Sánchez-Pérez, J. Hernández-Cordero, K. Muratikov. Device for characterization of thermal effusivity of liquids using photothermal beam deflection. *Review of Scientific Instruments*. 78, 104901. 2007.
- [8] Robert L. Mcintosh, Vitas Anderson. *A comprehensive tissue properties database provided for the thermal assessment of a human at rest*. *Biophysical Reviews and Letters*. Vol 5, No. 3, 129-151. 2010.
- [9] Douglas L. Schmucker. *Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease?*. *Experimental Gerontology*. 40, 650-659. 2005.
- [10] J. Zeeh, D. Plattb. *The Aging Liver*. *Gerontology*. 48, 121-127. 2002.