



## **Evaluación histológica de tejido hepático porcino conservado en miel de abeja**

Ortiz Yépez, Carlos Eduardo

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Proaño Pérez, Freddy Wellington, Ph.D.

16 de agosto de 2023

## Análisis de similitud de contenido



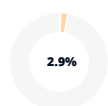
Plagiarism report

Proyecto de Titulación\_Ortiz\_Carlos\_C...

### Scan details

Scan time: August 17th, 2023 at 16:24 UTC      Total Pages: 72      Total Words: 17908

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.4%	65
Minor Changes	0.2%	44
Paraphrased	2%	358
Omitted Words	9.4%	1679

### AI Content Detection



Text coverage  
 ● AI text  
 ○ Human text

### 🔍 Plagiarism Results: (32)

🔗 **Aparato digestivo (Cuarta parte) - ppt descargar** 0.7%

<https://slideplayer.es/slide/125203/>

Descargar ...

🔗 **PPT - Aparato digestivo (Cuarta parte) PowerPoint P...** 0.7%

<https://www.slideserve.com/jola/aparato-digestivo-cuarta-pa...>

Browse Recent Presentations Content Topics ...

🔗 **11810.pdf** 0.5%

<https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/5469/1/11810...>

Cayetana Morales Vázquez

UNIVERSIDAD DEL AZUAY DEPARTAMENTO DE POSGRADOS MAESTRIA EN  
 GESTION DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA SEGUNDA VERSION...

Certified by

About this report  
[help.copleaks.com](https://help.copleaks.com)

[copleaks.com](https://copleaks.com)

Firma:

.....

**Proaño Pérez, Freddy Wellington, Ph.D.**

**Director**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación: **“Evaluación histológica de tejido hepático porcino conservado en miel de abeja”** fue realizado por el señor **Ortiz Yépez, Carlos Eduardo**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 16 de agosto de 2023**

Firma:

.....

**Proaño Pérez, Freddy Wellington, Ph.D.**

**C. C. 1002081162**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Ortiz Yépez, Carlos Eduardo**, con cédula de ciudadanía n° **1722631957**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación histológica de tejido hepático porcino conservado en miel de abeja”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 16 de agosto de 2023**

Firma:

**Ortiz Yépez, Carlos Eduardo**

**C. C.: 1722631957**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Ortiz Yépez, Carlos Eduardo**, con cédula de ciudadanía número: **1722631957**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación histológica de tejido hepático porcino conservado en miel de abeja”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 16 de agosto de 2023**

Firma:

**Ortiz Yépez, Carlos Eduardo**

**C. C.: 1722631957**

## **Dedicatoria**

A todos los trabajadores de la salud que arriesgan su vida por salvar la de otros.

## Agradecimientos

A Wiracocha que nos da la luz de vida.

A la Pandemona, sin ti, esto no existiría.

A mi familia, por su apoyo inconmensurable.

A mis maestros, Freddy y Pedrito por su sabiduría y ayuda incondicional.

Al equipo de trabajo del laboratorio Hdx – Vet, por su dinamismo.

Al Doc Aponte que me enseñó histotecnología.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE por todas las vivencias y enseñanzas.

Y a todos quienes creyeron en este austero *Homo sapiens*.

Muchas gracias...

**Tabla de contenidos**

<b>Análisis de similitud de contenido.....</b>	<b>2</b>
<b>Certificación.....</b>	<b>3</b>
<b>Responsabilidad de Autoría .....</b>	<b>4</b>
<b>Autorización de Publicación .....</b>	<b>5</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>6</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>13</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>14</b>
<b>Listado de Abreviaturas .....</b>	<b>15</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>17</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo I: Introducción.....</b>	<b>19</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>19</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>25</b>
Objetivo General .....	25
Objetivos Específicos .....	25
<b>Hipótesis de Investigación.....</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo II: Marco teórico .....</b>	<b>26</b>
<b>Histología .....</b>	<b>26</b>



<b>Pasos de un procesamiento histológico.....</b>	<b>27</b>
Colección de especímenes .....	27
Medios de transporte.....	28
Fijación .....	29
Mecanismos de fijación.....	29
Factores de calidad de fijación. ....	29
Funciones de un fijador. ....	30
Formaldehído. ....	31
Fijación con formaldehído.....	32
Riesgos del formaldehído .....	34
Inclusión en parafina .....	35
Deshidratación. ....	35
Aclaramiento o clarificado.....	35
Infiltración. ....	35
Inclusión, incrustación o bloqueo.....	36
Corte en microtomo .....	36
Seccionamiento.....	36
Tipos de microtomo. ....	36
Microtomo rotativo.....	36
Tinción .....	37
Montaje y desparafinado. ....	37
Tinción de hematoxilina y eosina. ....	38
Cubrimiento.....	39
Microscopía .....	39

	10
<b>Tejido hepático porcino .....</b>	<b>40</b>
Anatomía del hígado porcino .....	40
Histología del hígado porcino.....	41
<b>La miel de abeja .....</b>	<b>45</b>
Composición de la miel de abeja.....	46
Aplicaciones de la miel de abeja.....	47
<b>Capítulo III: Materiales y métodos .....</b>	<b>48</b>
<b>Localización Geográfica.....</b>	<b>48</b>
<b>Condiciones ambientales del laboratorio .....</b>	<b>48</b>
<b>Revisión bibliográfica.....</b>	<b>48</b>
<b>Toma de muestras .....</b>	<b>48</b>
<b>Preparación de soluciones .....</b>	<b>49</b>
Solución de miel de abeja al 10% y 20%.....	49
Solución de formaldehído al 4% (control +) .....	49
Solución de cloruro de sodio al 0.9% (control -).....	49
<b>Procesamiento de tejidos.....</b>	<b>49</b>
Disección primaria.....	50
Conservación .....	50
Fijación inicial .....	50
Disección secundaria .....	51
Fijación intermedia.....	51
Incrustación en parafina.....	51

	11
Fijación final .....	51
Deshidratación .....	51
Aclaramiento o Clarificado .....	52
Infiltración .....	52
Incrustación o bloqueo .....	52
Corte en micrótomos .....	52
Tinción .....	52
Cubrimiento.....	53
Evaluación microscópica .....	54
Observación.....	54
Fotografía .....	54
Morfometría .....	54
Análisis estadístico .....	54
<b>Capítulo IV: Resultados .....</b>	<b>58</b>
<b>Arquitectura celular .....</b>	<b>58</b>
Detalle celular.....	58
Detalle nuclear .....	60
<b>Autólisis.....</b>	<b>61</b>
<b>Calidad de la tinción hematoxilina y eosina.....</b>	<b>65</b>
Tinción del citoplasma.....	65
Tinción del núcleo .....	67
<b>Morfometría celular.....</b>	<b>68</b>
Perímetro y área celular .....	69

Perímetro y área nuclear.....	72
<b>Fotografías.....</b>	<b>76</b>
<b>Capítulo V: Discusión .....</b>	<b>82</b>
<b>Capítulo VI: Conclusiones.....</b>	<b>95</b>
<b>Capítulo VII: Recomendaciones.....</b>	<b>96</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>97</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Métodos de fijación para muestras de tejido</i> .....	29
<b>Tabla 2</b> <i>Características de un fijador histológico</i> .....	31
<b>Tabla 3</b> <i>Tratamientos para la conservación de tejido hepático porcino</i> .....	50
<b>Tabla 4</b> <i>Protocolo de tinción regresiva con hematoxilina/eosina</i> .....	53
<b>Tabla 5</b> <i>Operacionalización de variables de criterios histomorfológicos de arquitectura celular</i> .....	55
<b>Tabla 6</b> <i>Operacionalización de variables de criterios histomorfológicos de la calidad de tinción H/E</i> .....	55
<b>Tabla 7</b> <i>Operacionalización de variables de criterios histomorfológicos de autólisis</i> .....	56
<b>Tabla 8</b> <i>Operacionalización de variables de criterios morfométricos de perímetro y área celular</i> .....	57
<b>Tabla 9</b> <i>Porcentaje de contracción del área celular</i> .....	71
<b>Tabla 10</b> <i>Porcentaje de contracción del área nuclear</i> .....	74

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> <i>Procesamiento de una muestra de tejido para observación histológica.</i> .....	27
<b>Figura 2</b> <i>Mecanismo de fijación del formaldehído: formación de enlaces cruzados</i> .....	33
<b>Figura 3</b> <i>Modelos teóricos de la organización de los lobulillos hepáticos</i> .....	42
<b>Figura 4</b> <i>Morfología del lobulillo hepático</i> .....	44
<b>Figura 5</b> <i>Detalle celular de los hepatocitos</i> .....	59
<b>Figura 6</b> <i>Detalle nuclear de hepatocitos</i> .....	61
<b>Figura 7</b> <i>Autólisis de los lobulillos hepáticos</i> .....	62
<b>Figura 8</b> <i>Autólisis de los sinusoides hepáticos</i> .....	63
<b>Figura 9</b> <i>Autólisis de las triadas portales hepáticos</i> .....	64
<b>Figura 10</b> <i>Tinción del citoplasma de los hepatocitos</i> .....	66
<b>Figura 11</b> <i>Tinción de los núcleos de los hepatocitos</i> .....	68
<b>Figura 12</b> <i>Morfometría de los perímetros y áreas celulares</i> .....	69
<b>Figura 13</b> <i>Morfometría comparada del área celular por días</i> .....	70
<b>Figura 14</b> <i>Morfometría de los perímetros y áreas nucleares</i> .....	73
<b>Figura 15</b> <i>Morfometría comparada del área nuclear por días</i> .....	75
<b>Figura 16</b> <i>Histología del tejido hepático porcino (4X)</i> .....	77
<b>Figura 17</b> <i>Histología del tejido hepático porcino: lobulillos (10X)</i> .....	78
<b>Figura 18</b> <i>Histología del tejido hepático porcino: sinusoides (40X)</i> .....	79
<b>Figura 19</b> <i>Histología del tejido hepático porcino: triada portal (40X)</i> .....	80
<b>Figura 20</b> <i>Histología del tejido hepático porcino: hepatocitos (100X)</i> .....	81

### Listado de Abreviaturas

**°C:** Grados centígrados.

**100X:** Aumento 100X del objetivo del lente del microscopio.

**10X:** Aumento 10X del objetivo del lente del microscopio.

**2D:** Dos dimensiones.

**3D:** Tres dimensiones.

**40X:** Aumento 40X del objetivo del lente del microscopio.

**4X:** Aumento 4X del objetivo del lente del microscopio.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ANOVA:** Análisis de la varianza.

**ARCSA:** Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ATSDR:** Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de EE. UU.

**C-:** Control negativo.

**C+:** Control positivo.

**cc:** Centímetros cúbicos.

**cm:** Centímetros.

**-COOH:** Grupo carboxilo.

**d:** Profundidad de difusión.

**DBO:** Demanda bioquímica de oxígeno.

**DQO:** demanda química de oxígeno.

**F:** Formaldehído.

**g:** Gramos.

**H/E:** Tinción de hematoxilina/eosina.

**H:** Hígado.

**H<sub>2</sub>CO:** Fórmula química del formaldehído.

**HMF:** 5-hidroximetil-2-furfural.

**k:** Coeficiente de penetración específico de cada fijador.

**kg:** Kilogramos.

**M:** Miel de abeja.

**m<sup>3</sup>:** Metro cúbico.

**MA:** Tratamiento con miel de abeja al 10%.

**MB:** Tratamiento con miel de abeja al 20%.

**mg:** Miligramos.

**mL:** Mililitros.

**mm:** Milímetros.

**mol:** Moles.

**-NH<sub>2</sub>:** Grupo amino.

**PAS:** Tinción ácida de Schiff.

**S:** Suero fisiológico.

**t:** Tiempo de exposición al fijador.

**THP:** Tejido hepático porcino.

**μm:** Micrómetro.



## Resumen

La histología es una disciplina esencial en la investigación científica y el diagnóstico médico. La fijación de tejidos humanos y animales con formaldehído es el método convencional y ampliamente utilizado desde hace más de un siglo, en esta ciencia. Sin embargo, el formaldehído, es un compuesto tóxico, con efectos carcinogénicos y genotóxicos ante su exposición por tiempos prolongados. De esta manera, el uso de este compuesto afecta la salud de médicos, profesores, estudiantes, laboratoristas, y otros. Debido a esto, diversos investigadores han buscado sustancias alternativas que puedan disminuir o reemplazar el uso del formaldehído, siendo una opción biotecnológica, la miel de abeja. La miel de abeja es una sustancia natural, generalmente producida por la especie *Apis mellifera*, es de fácil obtención, económica y no es tóxica. En la actualidad, el uso de miel de abeja ha destacado en varios campos de la medicina, y en la histología, dado que ha demostrado ser capaz de conservar diversos tipos de tejidos sin alterar su morfología celular. En este estudio, se evaluó mediante técnicas histológicas la capacidad de la miel de abeja para conservar tejido hepático porcino, durante diez días de experimentación. Para ello, se conservó fragmentos de este tejido en solución de miel de abeja al 10% y 20%, formaldehído (control positivo) y suero fisiológico (control negativo). Se valoraron criterios histomorfológicos y la morfometría de los hepatocitos, mediante microscopía de luz. Se evidenció que las soluciones de miel al 10% y 20% conservan la arquitectura celular con alto detalle, los procesos de autólisis son más lentos y que la calidad de la tinción hematoxilina/eosina fue alta. Por su parte la morfometría celular evidenció una moderada contracción celular y leve contracción nuclear a través de todos los días. En conclusión, este estudio permitió conservar el tejido hepático porcino manteniendo su morfología celular, deteniendo la autólisis y manteniendo una buena calidad en la tinción hasta por seis días, con resultados comparables al formaldehído. Sin embargo, tomando en cuenta la contracción celular, el uso de tiempos menores a seis días son mejores para esta aplicación.

*Palabras clave:* histología, conservación, miel de abeja, formaldehído.

### Abstract

Histology is an essential discipline in scientific research and medical diagnosis. The fixation of human and animal tissues with formaldehyde is the conventional and widely used method in this science for more than a century. However, formaldehyde is a toxic compound, with carcinogenic and genotoxic effects when exposed for prolonged periods of time. Thus, the use of this compound affects the health of physicians, teachers, students, laboratorians, and others. Due to this, several researchers have searched for alternative substances that can reduce or replace the use of formaldehyde, one biotechnological option being bee honey. Bee honey is a natural substance, generally produced by the *Apis mellifera* species; it is easy to obtain, inexpensive and non-toxic. Currently, the use of bee honey has been highlighted in several fields of medicine and histology since it has shown to be able to preserve various types of tissues without altering their cellular morphology. In this study, the ability of bee honey to preserve porcine liver tissue was evaluated by histological techniques during ten days of experimentation. Fragments of this tissue were preserved in 10% and 20% honey solution, formaldehyde (positive control) and saline (negative control). Histomorphological criteria and hepatocyte morphometry were evaluated by light microscopy. It was evidenced that the 10% and 20% honey solutions preserved the cellular architecture with high detail, the autolysis processes were slower, and the quality of the hematoxylin/eosin staining was high. Cell morphometry showed moderate cell shrinkage and slight nuclear shrinkage throughout all days. In conclusion, this study allowed preserving porcine liver tissue maintaining its cellular morphology, stopping autolysis, and maintaining a good staining quality for up to six days, with results comparable to formaldehyde. However, considering cell shrinkage, the use of times shorter than six days are better for this application.

*Key words:* histology, preservation, bee honey, formaldehyde.

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

La histología es el estudio de la estructura, función y anatomía de los órganos y tejidos sanos (NLM, 2019). En contraste, la histopatología realiza el estudio diagnóstico de órganos y tejidos anormales o enfermos (Suvarna et al., 2019). Estas ciencias se apoyan inseparablemente en la histotecnología, misma que se define como el conjunto de técnicas relacionadas al procesamiento de estos órganos y tejidos (NYSHS, 2022).

La conservación y fijación de las muestras, es la actividad más importante de cualquier estudio histológico (Carson & Hladik, 2009). El reactivo estándar utilizado para la conservación y fijación, es la solución de formaldehído al 4% (Grizzle et al., 2001). En 1859 Alexander Butlerov descubrió por primera vez el formaldehído, el cual pasaría a ser sintetizado en forma pura por Van Hoffman en 1868 mediante la oxidación catalítica del metanol (Walker, 1964).

El formaldehído tuvo muchos usos, pero fue el médico Ferdinand Blum, quien en 1896 probó que este agente era ampliamente bactericida, y además que mediante técnicas histológicas el compuesto servía para fijar y conservar tejidos como lo hace el alcohol (Fox et al., 1985; Musiał et al., 2016). El formaldehído previene la autólisis, es antimicrobiano, endurece el tejido y facilita la aplicación de diversas tinciones (Suvarna et al., 2019). Desde aquella época en adelante, el formaldehído se convirtió en el método estándar para la fijación y conservación de tejidos (Carson & Hladik, 2009).

A pesar de los buenos resultados que proporciona el formaldehído, este compuesto es peligroso para la salud (Zhang, 2018). En los laboratorios que utilizan formaldehído, el personal médico y laboratorista está expuesto permanentemente a su inhalación y contacto (Guaico et al., 2013). La exposición cercana o prolongada a este compuesto puede causar efectos nocivos inmediatos en la salud, como irritación de la piel y mucosas, y efectos a largo plazo posee alto potencial cancerígeno y genotóxico como evaluó la International Agency for Research on Cancer (IARC, 2006).

Se han reportado casos de trabajadores de la salud expuestos al formaldehído, con predisposición al cáncer de cavidad oral, nasal, faringe, leucemia, cerebro, pulmón y páncreas (IARC, 2012). La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) de EEUU y la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) en Ecuador, en sus criterios categóricos para la evaluación del riesgo sanitario de productos de higiene doméstica e industrial, establecen que, el formaldehído es un sensibilizante con un nivel de riesgo medio (ARCSA, 2020; ATSDR, 2022).

En vista de las características nocivas del formaldehído, se ha realizado una investigación de diversos fijadores y conservantes para suplir las necesidades a través del tiempo. Con una lista de aproximadamente 600 fórmulas diferentes que incluyen además del formaldehído, el glutaraldehído, tetraóxido de osmio, alcoholes, cloruro de mercurio, ácido crómico, entre otros (Carson & Hladik, 2009; Suvarna et al., 2019); compuestos que son producidos por diversas marcas comerciales como Histofix, Histochoice o Glyo – Fixx (Titford & Horenstein, 2005).

De entre las diferentes fórmulas, el compuesto natural de mayor aplicación como sustituto de fijador o conservante es la miel de abeja (Thamilselvan et al., 2021). La aplicación de miel de abeja como técnica histotecnológica de conservación, ha sido estudiada y aplicada en la medicina humana y veterinaria en países como Oman y Reino Unido en tejidos de hígado, riñón y estómago de rata (Al-Maaini & Bryant, 2008; Alwahaibi et al., 2022), en Turquía, la India y Nepal con tejidos humanos como endometrio, seno, placenta, útero, omento, suprarrenal, estómago, pulmón, mucosa oral, encía, linfóide, lipídico, muscular y piel (Lalwani et al., 2015a; Muddana et al., 2017; Özkan et al., 2012; Pandiar et al., 2017; Patil, Rao, Ganavi, et al., 2015; Sabarinath et al., 2014; A. Singh et al., 2015; Srii et al., 2017). En Polonia en tejido cardíaco de cerdo (Piątek-Koziej et al., 2019), la India y Nigeria en diversos tejidos de cabra (Bhattacharyya et al., 2018; Patil et al., 2013; Udonkang et al., 2018). No obstante, este experimento no ha sido evaluado en América.

Se ha demostrado que la miel de abeja es capaz de actuar como un buen conservante y/o fijador de tejidos, sustituto o alternativo al formaldehído (Al-Maaini & Bryant, 2008). Esta información ha sido corroborada por varios autores quienes han evaluado las propiedades de conservación de la miel, utilizando varias concentraciones y tiempos de fijación (Udonkang et al., 2018); diferentes tinciones como hematoxilina/eosina, ácida de Schiff (PAS), Van Gieson (Muddana et al., 2017); tinción tricromo de Masson e inmunohistoquímica (Özkan et al., 2012; Srii et al., 2017). También se ha experimentado con diferentes tipos de mieles (Lalwani et al., 2015a; Patil, Rao, Ganavi, et al., 2015).

En retrospectiva, en Ecuador se han realizado estudios relacionados al análisis fisicoquímico y microbiológico de miel de abeja de *Apis mellifera* (Álvarez, 2016; Velásquez & Goetschel, 2019) y abejas meliponas (Ruiz, 2019; Toaquiza, 2020). Se ha reportado información sobre el buen manejo de las abejas y la producción de la miel (Melgar, 2021; Paredes, 2018), la evaluación de la propiedad antimicrobiana de la miel sobre diversos cultivos microbiológicos (Proaño, 2020) y la determinación de la demanda insatisfecha de miel en el cantón Morona, lugar que posee potencial como zona productora de miel (Carrillo Parra et al., 2021). También se ha analizado el mercado de producción agroindustrial de miel de abeja en la provincia del Guayas y como puede mejorar la calidad de vida de la población rural (Choca & Menoscal, 2020; Vivanco et al., 2020), y se ha realizado una revisión bibliográfica sobre la miel de *Apis mellifera* y sus diversas adulteraciones (Remache, 2022).

### **Justificación**

La histotecnología tiene aplicaciones directas en la medicina de humanos y animales (NSH, 2019), es así como los establecimientos privados y públicos, como universidades, museos, laboratorios, clínicas y hospitales; realizan rutinariamente estudios de carácter histológico e histopatológico para el diagnóstico de enfermedades e investigación (Altamirano & Montero, 2015; Beltrán et al., 2017; Guaico et al., 2013; Torres, 2016; UMMS, 2022). De los protocolos que se realizan en la histotecnología, la fijación de tejidos es la técnica primaria y fundamental de cualquier estudio (Suvarna et al., 2019).

La fijación de tejidos es óptima cuando la muestra estudiada es colocada inmediatamente en una solución fijadora (Zachary, 2022), pues esto permite prevenir la autólisis y la descomposición microbiana (McMillan & Harris, 2018). El reactivo estándar para la fijación de tejidos es el formaldehído (Dapson, 1993; O'Dowd et al., 2020), sin embargo este compuesto es muy peligroso por su naturaleza irritante y su potencial genotóxico y cancerígeno (ARCSA, 2020; ATSDR, 2022; IARC, 2019). Las personas que trabajan con formaldehído, como médicos, profesores, estudiantes, técnicos laboratoristas, mensajeros, choferes, recepcionistas, y civiles, están en alto riesgo de exposición al contacto o inhalación accidental de este compuesto (IARC, 2012).

Los errores durante el proceso de fijación son recurrentes y no pueden ser rectificadas en ninguna etapa del procesamiento posterior (Singhal et al., 2017). Los más comunes se deben a retrasos en la fijación, uso de fijador inapropiado, cantidad y concentración de fijador excesiva o insuficiente (Carson & Hladik, 2009). Cualquier déficit en la fijación se verá reflejado en el producto final, y resultará en una evaluación deficiente o desconfiable (Suvarna et al., 2019).

Los reactivos fijadores y conservantes alternativos, aunque mantienen la mayoría de propiedades de fijación, no evitan los riesgos a la salud, no mejoran los costos, son específicos para determinados estudios y su acceso es limitado (Suvarna et al., 2019). En vista del riesgo, desconocimiento o ausencia de formaldehído, es necesario una alternativa segura que permita conservar y proteger el tejido hasta que pueda ser fijado convencionalmente en un laboratorio (Patil, Rao, Agarwal, et al., 2015; Singhal et al., 2017).

Para ello se recomienda utilizar un medio de transporte provisional, en este sentido se han utilizado sustancias como suero fisiológico, leche, miel, anestesia local y hielo que conservan el tejido temporalmente hasta que este pueda ser fijado convencionalmente (Patil, Rao, Agarwal, et al., 2015; Singhal et al., 2016).

La opción biotecnológica de conservante natural es la miel de abeja (Alwahaibi et al., 2022; Bhattacharyya et al., 2018), destacándose por ser de fácil obtención, económica, no inflamable y no tóxica (Thamilselvan et al., 2021). Algunos estudios han propuesto que la miel de abeja puede ser utilizada en procesos de conservación histológica, puesto que han demostrado su potencial como una alternativa al formaldehído (Al-Maaini & Bryant, 2008; Özkan et al., 2012; Sabarinath et al., 2020; Srii & Marla, 2016). Obteniendo resultados exitosos en varios tipos de tejido, con buena calidad en diversas tinciones y sin compromiso del diagnóstico (Lalwani et al., 2015).

La miel de abeja puede actuar como una opción de conservante o fijador, viable, rentable y práctico en diversos tipos de tejidos (Muddana et al., 2017; Özkan et al., 2012; Srii et al., 2017; Thamilselvan et al., 2021; Udonkang et al., 2018). Por estas razones, la miel de abeja utilizada como medio de transporte o conservante provisional de tejidos, puede constituir una alternativa natural de elección inmediata ante la ausencia de formaldehído (Udonkang et al., 2018).

Para este estudio, se escogió al porcino por ser conocido como un animal cuya fisiología y anatomía de los órganos es muy similar al humano (Aspinall et al., 2020). Además, es una especie de consumo; su gran demanda ocasiona un faenamiento frecuente en establecimientos de rastro y esto facilita la disponibilidad de un órgano fresco.

Se seleccionó el hígado porque no existen registros de estudios que utilicen miel de abeja para conservar tejido hepático porcino, pero además porque es un órgano de gran tamaño lo cual facilita su corte, manipulación y muestreo. El hígado es un órgano importante porque cumple funciones fisiológicas como el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, la desintoxicación de fármacos, producción y excreción de bilis, entre otros (Godoy et al., 2013). Debido a ello, una disfunción o patología en el hígado repercute a nivel de todo el organismo generando otras complicaciones (Ferrell, 2000).

En tal sentido, el estudio de la histología hepática es requerido en aplicaciones como el diagnóstico médico (O'Dowd et al., 2020), la investigación (McMillan & Harris, 2018) y la ingeniería de implantes de tejidos (Heydari et al., 2020). Este experimento servirá como punto de partida para el estudio de otros tejidos porcino y permitirá conocer si es factible su aplicación. No obstante, el método podría ser empleado con cualquier especie animal, órgano o tejido, con sus respectivas consideraciones.

Hasta la fecha actual en Ecuador, no se han registrado estudios relacionados al uso de la miel de abeja para los análisis histológicos. Consecuentemente, el objetivo de esta investigación es evaluar histológicamente un tejido hepático porcino, conservado en miel de abeja durante el transcurso de 10 días. Se propone utilizar la miel de abeja como un medio de transporte y conservante provisional de tejidos, mas no se pretende sustituir al formaldehído dado que es un fijador imbatible, pese a su toxicidad. Esta opción representaría una alternativa ante la ausencia o riesgo de uso del formaldehído, hasta que la muestra llegue a un laboratorio donde pueda ser fijada convencionalmente.

Se espera que los resultados de este estudio sustenten una opción biotecnológica, segura, económica y eco-amigable, que tenga aplicación directa en el campo de la medicina veterinaria de clínicas, hospitales, museos, laboratorios de histología e histopatología y zonas de muestreo remotas del Ecuador. De este modo, contribuir con la disminución del uso de formaldehído y minimizar los riesgos en la salud del personal clínico, médico, laboratorista, administrativo, transportista y civil.



## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Evaluar histológicamente tejido hepático porcino conservado en miel de abeja.

### ***Objetivos Específicos***

Valorar mediante criterios histomorfológicos, la arquitectura celular, autólisis, y calidad de la tinción hematoxilina/eosina en muestras de tejido hepático porcino conservadas con solución de miel de abeja al 10% y 20%, solución de formaldehído al 4% y solución de suero fisiológico al 0.9%, durante 10 días.

Determinar los efectos de la contracción celular mediante morfometría de los perímetros y áreas celular y nuclear de hepatocitos de muestras de tejido hepático porcino conservadas con solución de miel de abeja al 10% y 20%, solución de formaldehído al 4% y solución de suero fisiológico al 0.9% con tinción hematoxilina/eosina, durante 10 días.

### **Hipótesis de Investigación**

Existen diferencias estadísticas significativas en la histología de tejido hepático porcino conservado con miel de abeja.

## Capítulo II: Marco teórico

### Histología

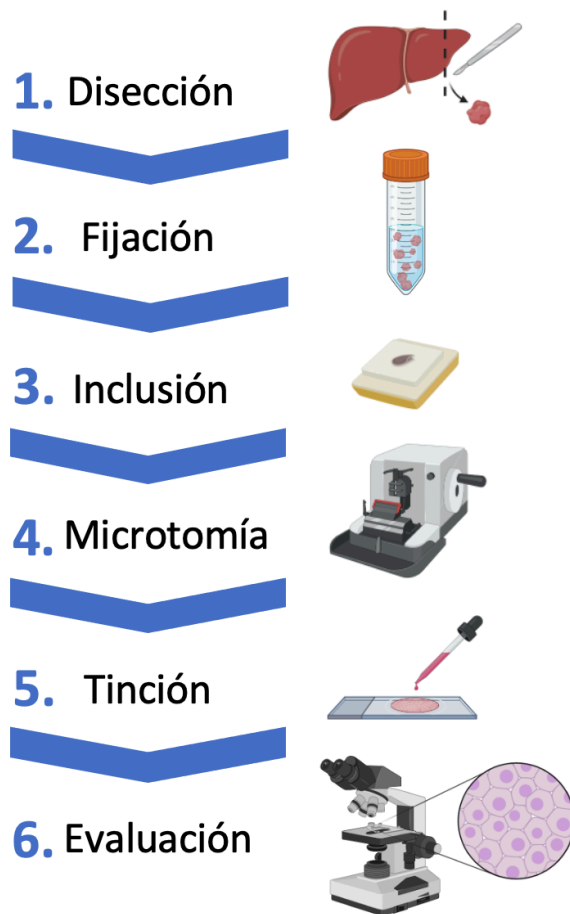
La histología médica es el estudio de la estructura, composición y función de órganos y tejidos normales o sanos a nivel microscópico (Gurina & Simms, 2022; NLM, 2019). Las muestras que se examinan en histología corresponden a fragmentos de tejido muy bien conservados, que pueden ser visualizados en un microscopio, como fotografías de las células y tejidos en el momento específico de su muerte (McMillan & Harris, 2018).

Los protocolos para la conservación y procesamiento de estas muestras son abarcados por la histotecnología (NYSHS, 2022). Existen diversos protocolos que se aplican en concordancia con los estudios que se deseen realizar, sin embargo, la metodología convencional esta estandarizada, como se enumera en la Figura 1. El producto final del procesamiento es un conjunto de laminillas histológicas, con cortes específicos de un fragmento de tejido coloreado con una tinción específica, que pueden ser evaluados en diferentes estudios (Suvarna et al., 2019).

Es esencial que el tratamiento del tejido sea de la más alta calidad para obtener un diagnóstico efectivo (O'Dowd et al., 2020). Aunque toda la metodología puede ser realizada manualmente; la fijación, deshidratación, aclaramiento e infiltración son procesos que se realizan normalmente en un procesador automático, mientras que la disección, inclusión en bloques de parafina, corte en micrótopo, tinción y evaluación se realizan exclusivamente de forma manual (Carson & Hladik, 2009; McMillan & Harris, 2018).

Figura 1

*Procesamiento de una muestra de tejido para observación histológica.*



*Nota.* Basado de *Bancroft's Theory and practice of Histological techniques* (p. 73), por Suvarna et al., 2019, Elsevier. Copyright© 2019 por Elsevier Ltd.

### **Pasos de un procesamiento histológico**

#### ***Colección de especímenes***

El proceso inicia en el quirófano, sala de autopsia o laboratorio de examinación donde se realiza una identificación y análisis macroscópico de los especímenes que se van a recolectar, mismos que pueden ser órganos y tejidos (Carson & Hladik, 2009). Se deben recolectar fragmentos representativos

mediante cuchillas extra afiladas que producen cortes limpios (Suvarna et al., 2019), con las dimensiones de largo y ancho apropiadas.

Los fragmentos deben ser lavados cuidadosamente con solución de suero fisiológico para retirar el exceso de sangre (McMillan & Harris, 2018), e inmediatamente colocados en una solución fijadora para prevenir su descomposición (Suvarna et al., 2019). Los retrasos en la fijación, luego de la muerte pueden provocar graves cambios degenerativos en el tejido debido a las enzimas presentes en las células (Salguero & Pallarés, 2023)

La descomposición es un proceso natural, complejo, continuo y gradual de desorganización de los tejidos luego de la muerte de un organismo (Lerner & Lerner, 2006). Puede producirse por efecto de la autólisis y/o la putrefacción, viéndose influenciada por varios factores, fundamentalmente la temperatura (Ceciliason et al., 2021).

La autólisis es el proceso de digestión enzimática natural, espontánea y rápida de células y tejidos por la acción de sus propias enzimas al ser liberadas durante la muerte celular (Hyun et al., 2012). La putrefacción es un proceso de destrucción celular debido a la presencia de microorganismos (bacterias, hongos, virus, entre otros), usualmente es consecutiva a la autólisis, pero puede tener diversos orígenes (Lerner & Lerner, 2006).

### ***Medios de transporte***

En caso de no disponer de un medio fijador o de percibir inseguridad en su uso, es necesario proteger el tejido del medio ambiente hasta su transporte al laboratorio (Patil, Rao, Agarwal, et al., 2015). Para ello es posible utilizar una solución o medio transportador, que permita proteger al tejido durante cortos periodos de tiempo, en este sentido se han utilizado sustancias como el medio de transporte Michel, solución neutra de fosfato (Carson & Hladik, 2009), agua de coco, leche, suero fisiológico, hielo, anestesia local y miel que conservan el tejido temporalmente hasta que este pueda ser fijado convencionalmente (Olszewski et al., 2004; Singhal et al., 2016; Thomas et al., 2008).

## **Fijación**

La fijación es el proceso que permite conservar las muestras de tejidos para su examinación microscópica (Suvarna et al., 2019). La fijación desnatura las proteínas, bloquea los procesos de descomposición y endurece el tejido lo suficiente para facilitar su corte (Zachary, 2022). Los especímenes deben ser pequeños para que el fijador pueda penetrar completamente en el tejido antes de que empiece el proceso de autólisis celular (Salguero & Pallarés, 2023).

**Mecanismos de fijación.** El proceso de fijación requiere utilizar un fijador, que ha de actuar mediante mecanismos químicos o físicos, como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Métodos de fijación para muestras de tejido*

<b>Tipo de método</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Autor(es)</b>
Físico	Calentamiento	Agua caliente sobre los 65°C	(Suvarna et al., 2019)
	Microondas	Glioxal	(Boon & Kok, 1994)
	Secado en frío	Nitrógeno líquido y bomba de vacío	(Pearse, 1980)
Químico	Adición covalente de grupos reactivos o formación de enlaces cruzados	Formaldehído Glutaraldehído Tetraóxido de osmio	(Suvarna et al., 2019)
	Deshidratación - Coagulación	Etol Metanol Acetona	(Bhakuni, 1998)
	Efectos de ácidos	Ácido crómico	(Grizzle, 1996)

**Factores de calidad de fijación.** El tiempo que requiere una muestra para ser fijada puede calcularse con la ecuación 1. Donde la profundidad de difusión (d) en milímetros, que puede alcanzar un fijador en un tejido es directamente proporcional a la raíz cuadrada del tiempo de exposición al fijador

(t) en horas, con una constante (k) que corresponde al coeficiente de penetración específico de cada fijador (Medawar, 1941). Despejando de la ecuación, el tiempo de fijación es aproximadamente igual al cuadrado de la profundidad de tejido que se desea fijar.

$$d = k\sqrt{t} \quad (1)$$

Para que exista una fijación óptima es recomendable que las muestras sean pequeñas y delgadas, con dimensiones en largo y ancho, no mayores a 2 cm y profundidad no mayor a 7 mm (Zachary, 2022). El volumen de la solución fijadora debe ser al menos, de una proporción 10:1 o 20:1 respecto del tejido y mantener siempre el contacto con la solución fijadora mediante soportes o movimiento. (Carson & Hladik, 2009).

La velocidad de difusión de las moléculas del fijador aumenta conforme lo hace la temperatura, debido a que la tasa de penetración de tejidos es mayor, sin embargo, esto aumenta la emisión de gases y consecuentemente el riesgo a la salud (Grizzle et al., 2001). Por el contrario, a temperaturas bajas disminuye la difusión del fijador en los tejidos, por ello no es recomendable refrigerar las muestras que estén en el fijador (Carson & Hladik, 2009).

**Funciones de un fijador.** El mayor objetivo de un fijador es detener los procesos de autólisis y putrefacción (Zachary, 2022). Durante este proceso, el fijador debe mantener claras las características morfológicas de una amplia variedad de tejidos en un estado similar a cuando estaba vivo (Salguero & Pallarés, 2023) y tener un perfil seguro de inflamabilidad y toxicidad (Grizzle et al., 2001). Debe además evitar el hinchamiento o el encogimiento celular excesivo, endurecer los tejidos para facilitar el corte, y facilitar la tinción, así como el uso de otras técnicas (Carson & Hladik, 2009; Titford & Horenstein, 2005).

No existe un método de fijación universal o ideal, casi todos los fijadores inducen expansión, contracción, endurecimiento, deterioro y variaciones en la tinción (Kiernan, 2015). Las cualidades que debería tener un fijador según diferentes autores se enumeran en la Tabla 2.

Dependiendo el estudio que se desea realizar, es necesario hacer un balance entre las ventajas y desventajas que cada fijador posee (Eltoum et al., 2001). El reactivo fijador de mayor uso es la formalina tamponada neutra al 10% (solución neutra de formaldehído al 3.7 – 4%) (Salguero & Pallarés, 2023; Suvarna et al., 2019).

**Tabla 2**

*Características de un fijador histológico*

<b>Cualidades de un fijador histológico</b>		
<b>(Dapson, 1993)</b>	<b>(Grizzle et al., 2001)</b>	<b>(O'Dowd et al., 2020)</b>
Penetrar rápidamente los tejidos y fijarlos	Minimizar la autólisis	Conserva o fija el tejido haciéndolo resistente a la autólisis
Vida útil de un año	Mantener la integridad de las estructuras celulares	Estabiliza al tejido manteniendo la estructura celular
Ser compatible con procesadores automáticos y otros reactivos	Soportar otros procedimientos	Resistir otros reactivos utilizados en el procesamiento
Desechable o reciclable	Inactivación de microorganismos	Conservar especímenes pequeños y grandes.
Costo efectivo	Ayuda a tener una tinción consistente, de alta calidad	

**Formaldehído.** El formaldehído con fórmula molecular  $H_2CO$ , también conocido como metanal, formol, formalina o aldehído fórmico es un gas incoloro a temperatura ambiente, tiene un peso molecular de 30.026 g/mol, densidad de 0.815 g/cc, es soluble en agua, etanol y xileno, tiene un punto de ebullición de  $-19.1\text{ }^{\circ}C$  y un pH de entre 2.8 - 4 (NCBI, 2022). El formaldehído es su estado puro es un vapor de olor punzante y sofocante, venenoso e inflamable que cuando se disuelve completamente en agua, forma una solución de formaldehído al 37 - 40% (Suvarna et al., 2019).

En el ambiente, comúnmente se encuentra en la atmosfera y proviene del humo de incendios, gases de automóviles o el humo del cigarrillo, puede ser producido en pequeñas cantidades en procesos metabólicos de muchos organismos (IARC, 2006) e industrialmente es sintetizado a partir de la oxidación del metanol (Zhang, 2018). El formaldehído se utiliza como antiséptico, desinfectante, fijador histológico, conservante de alimentos y reactivo de diversas aplicaciones de laboratorio como en la producción de fertilizantes, papel, cosméticos, madera contrachapada y resinas (IARC, 2006).

**Fijación con formaldehído.** Las reacciones que ocurren entre el formaldehído y las macromoléculas del tejido son numerosas y complejas (Suvarna et al., 2019). La solución de formaldehído al 3.7 - 4%, actúa al añadir grupos reactivos covalentes que inducen enlaces cruzados entre proteínas y ácidos nucleicos (Rait et al., 2006). La formación de enlaces cruzados a través del formaldehído ocurre en dos pasos reversibles, como se observa en la Figura 2.

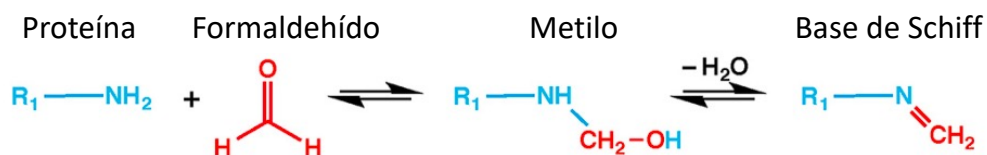
El formaldehído en solución acuosa forma metileno hidratado el cual reacciona con un nucleófilo fuerte, en este caso el grupo amino de una proteína. Esta reacción forma un intermediario metilo que puede perder agua y formar una base de Schiff (una imina). Posteriormente, la base Schiff reacciona con otro nucleófilo que puede ser el grupo amino de una base de ADN o el de una proteína, para dar lugar a un producto con enlaces cruzados (Hoffman et al., 2015).



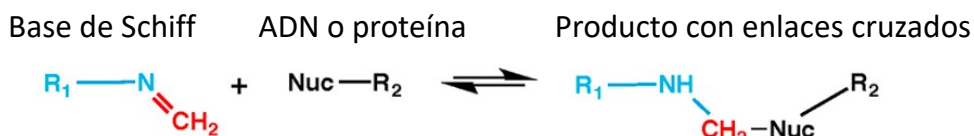
Figura 2

Mecanismo de fijación del formaldehído: formación de enlaces cruzados.

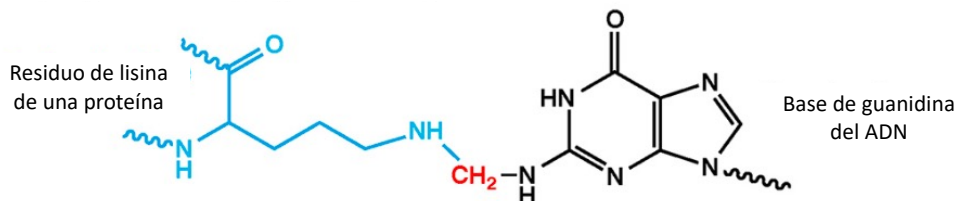
**Paso 1**



**Paso 2**



**Ejemplo de producto entre Proteína-ADN con enlaces cruzados**



*Nota.* En celeste se muestra la proteína, en rojo el formaldehído y en negro el ADN. Adaptado de *Formaldehyde Crosslinking: A Tool for the Study of Chromatin Complexes* (p. 26405), por Hoffman et al., 2015, Journal of Biological Chemistry. Copyright © 2015 por The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Para una fijación óptima se debe tamponar la solución de formaldehído con solución buffer fosfato o bicarbonato, a pH 7.2 - 7.4 (Carson & Hladik, 2009). Cuando el formaldehído comercial se disuelve en una solución acuosa sin tamponar, forma una solución ácida con un pH de 5 - 5.5; el nivel de acidez provoca que las proteínas reaccionen más lento, debido a que los grupos aminos ( $-NH_2$ ) por atracción de un hidrógeno están cargados ( $-NH_3^+$ ) y los grupos carboxilo ( $-COO^-$ ) pierden su carga ( $-COOH$ ) (Means & Feeney, 1995).

Respecto al tiempo de fijación, para la solución de formaldehído al 3.7 - 4% el coeficiente de penetración es de 0.79, de este modo se ha calculado que la solución neutra de formaldehído al 3.7 - 4%

es capaz de penetrar 1 mm/hora en los tejidos (Hopwood, 1969). Y concerniente a la concentración, las soluciones de formaldehído superiores al 4% producen contracción y endurecimiento excesivo de los tejidos, además de la formación de precipitados blanquecinos y posibles artefactos (Fox et al., 1985), mientras que concentraciones menores al 4% no fijan bien los tejidos (Carson & Hladik, 2009).

**Riesgos del formaldehído.** Según el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos del consejo económico y social de las Naciones Unidas (SGA), el formaldehído ha sido clasificado como corrosivo, tóxico, irritante y peligroso para la salud, la exposición cercana o prolongada genera riesgos de importancia, mismos que incluyen lesiones agudas en la piel y mucosas, severas quemaduras por corrosión, sensibilización y alergias (Naciones Unidas, 2021). Además, el formaldehído posee un alto potencial cancerígeno y genotóxico a largo plazo como evaluó la International Agency for Research on Cancer (IARC, 2006).

El nivel de riesgo mínimo de exposición por inhalación de formaldehído es de  $0.03 \text{ mg/m}^3$ , una concentración que causa efectos adversos no cancerígenos, como irritación de piel y mucosas (Zhang, 2018). Se ha encontrado en laboratorios de histología e histopatología una concentración media de formaldehído en el aire de  $0.6 \text{ mg/m}^3$ , la cual puede variar entre  $0.01 - 7.3 \text{ mg/m}^3$ , estos valores indican niveles elevados de exposición (IARC, 2006).

Se han reportado casos de trabajadores de la salud expuestos a formaldehído con predisposición al cáncer de cavidad oral, nasal, faringe, leucemia, cerebro, pulmón y páncreas (IARC, 2012). La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) de EEUU y la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) en Ecuador, en sus criterios categóricos para la evaluación del riesgo sanitario de productos de higiene doméstica e industrial, establecen que, el formaldehído es un agente sensibilizante con un nivel de riesgo medio (ARCSA, 2020; ATSDR, 2022).

### ***Inclusión en parafina***

**Deshidratación.** En los pasos posteriores, se requiere cortar el tejido con el microtomo, para ello las muestras deben estar embebidas en un medio de soporte o inclusión, usualmente se emplea cera de parafina (McMillan & Harris, 2018; Salguero & Pallarés, 2023). Los tejidos biológicos están compuestos por aproximadamente un 80% de agua. La deshidratación es el proceso que permite remover el agua y el fijador no enlazado del tejido (Suvarna et al., 2019).

Dado que el agua no es miscible con la cera de parafina, es necesario reemplazar el agua por un medio líquido deshidratante, que generalmente es el etanol (Carson & Hladik, 2009). Para deshidratar una muestra es necesario sumergirla a través de una serie consecutiva ascendente de concentraciones de alcohol, hasta llegar al grado absoluto; donde se considera que toda el agua del tejido ha sido reemplazada por el deshidratante (McMillan & Harris, 2018).

**Aclaramiento o clarificado.** El aclaramiento es el proceso que desplaza la solución deshidratante, haciendo que el tejido sea más receptivo al medio de soporte infiltrante (cera de parafina) (Carson & Hladik, 2009). Para ello se utiliza un medio aclarador, siendo el xileno el agente aclarador más utilizado, el cual es miscible tanto en el alcohol como en la cera, facilitando su remoción e infiltración tisular (Suvarna et al., 2019). Se denomina aclaramiento ya que luego de la inmersión en xileno el tejido adquiere una apariencia traslucida (Mescher, 2018).

**Infiltración.** La infiltración es el proceso donde el tejido se impregna con un medio de soporte infiltrante (Suvarna et al., 2019). El medio infiltrante comúnmente empleado es cera de parafina, la cual brinda soporte para que el tejido pueda ser cortado con el microtomo (McMillan & Harris, 2018). Este proceso se realiza sumergiendo el tejido en un doble baño de cera de parafina derretida y mantenida a una temperatura de entre 52 - 60 °C, lo cual evita cocer el tejido, evaporar al agente aclarador y promueve la infiltración de la cera de parafina en su interior (Mescher, 2018).

**Inclusión, incrustación o bloqueo.** Es el proceso de creación de bloques, hechos a partir del medio de inclusión incrustado junto con el fragmento de tejido en su interior. Para esta etapa se debe considerar que medio de infiltración debe ser el mismo medio de inclusión, en este caso la cera de parafina (O'Dowd et al., 2020). Para la inclusión se debe llenar los moldes de acero con cera de parafina derretida a una temperatura de entre 52 - 60 °C, luego se coloca y orienta el tejido infiltrado en el fondo del molde, se tapa con el cassette plástico, se deja enfriar hasta que se endurezca y posteriormente se realiza el desmoldado (McMillan & Harris, 2018). El bloque de parafina con el tejido incluido, tiene mucha resistencia y es fácil de cortar con un microtomo (Suvarna et al., 2019).

### ***Corte en microtomo***

**Seccionamiento.** Es el proceso de corte de un tejido incluido en bloques de parafina, en finas secciones laminadas utilizando un microtomo (Salguero & Pallarés, 2023; Suvarna et al., 2019). El microtomo es un instrumento especializado para realizar cortes de precisión de escala micrométrica (McMillan & Harris, 2018).

**Tipos de microtomo.** Existen diversos tipos de microtomo dependiendo la necesidad, estos incluyen el microtomo rotativo, de trineo base, oscilante, deslizante y el ultra microtomo (Suvarna et al., 2019).

**Microtomo rotativo.** El microtomo rotativo es el equipo más utilizado, este puede ser manual, semiautomático o automático, dispone de un mecanismo que sujeta el bloque de parafina y lo mueve verticalmente a través de un mecanismo de rotación de rueda de mano (Carson & Hladik, 2009). Durante el movimiento el espécimen toma contacto con el mecanismo de corte, que es una superficie fija que sostiene una cuchilla extra afilada desechable, obteniéndose laminas del tejido de entre 2 a 10  $\mu m$  de espesor (Suvarna et al., 2019).

### **Tinción**

Las células y el material extracelular aún no pueden ser visualizados debido a que no tienen color, por ello para poder ser estudiados microscópicamente el tejido debe ser teñido o coloreado (Mescher, 2018). Una tinción involucra el marcaje visual de los componentes celulares mediante la adición de un reactivo marcador dotado de un color característico, la absorción del colorante está basada en la afinidad que tenga este con el tejido (Suvarna et al., 2019).

Existen varios métodos de tinción que se han diseñado para permitir que los componentes celulares sean distinguibles (O'Dowd et al., 2020). La interacción del colorante con el tejido es un proceso complejo, sin embargo se conoce que durante el proceso intervienen las fuerzas de atracción coulombicas (enlaces salinos o electrostáticos), enlaces covalentes, interacciones dipolo, puentes de hidrógeno y fuerzas de van del Waals (Suvarna et al., 2019).

La mayoría de colorantes poseen cargas eléctricas que se atraen o repelen por cargas electrostáticas presentes en los tejidos (Salguero & Pallarés, 2023). Los colorantes ácidos poseen carga negativa y afinidad por las estructuras de carga positiva, tal como las proteínas con sus grupos amino ionizables (Mescher, 2018). En contraste, los colorantes básicos tienen carga positiva y afinidad por las estructuras de carga negativa como los ácidos nucleicos (Carson & Hladik, 2009).

Las tinciones suelen producir dos patrones de coloración en donde el citoplasma contrasta con el núcleo celular (Suvarna et al., 2019). Los colorantes básicos incluyen el azul de toluidina, azul de metileno, hematoxilina, entre otros. Y los colorantes ácidos incluyen la eosina, naranja G, fucsina ácida, entre otros (Mescher, 2018).

**Montaje y desparafinado.** Las secciones cortadas se colocan en un baño de agua caliente, el cual libera la compresión producida por el seccionamiento en el microtomo (Carson & Hladik, 2009). Luego el tejido es colocado en una laminilla portaobjetos de vidrio, la cual se deja secar en un plato caliente. La cera de parafina debe ser removida de la laminilla, para que el tejido pueda ser receptivo a

las tinciones, usualmente miscibles en agua (Mescher, 2018). Para ello se realiza un baño con el solvente xileno, seguido de una serie de lavados consecutivos, en orden descendente con concentraciones de etanol, hasta llegar a un baño de agua que hidrata el tejido (McMillan & Harris, 2018).

**Tinción de hematoxilina y eosina.** Los tejidos hidratados fácilmente son receptivos a diversas tinciones (Carson & Hladik, 2009). La tinción de hematoxilina y eosina es la técnica más utilizada en histología (Ovalle & Nahirney, 2020; Salguero & Pallarés, 2023). Diseñada por primera vez en 1876 por Wossowsky, es simple de usar, fácil de automatizar y muestra claramente las diferencias de las estructuras de un tejido (Suvarna et al., 2019).

La hematoxilina (del griego *haimatos*: sangre y *xylon*: madera) se extrae partir de la madera del árbol *Hematoxylon campechianum*, el compuesto como tal no es un colorante, pero al oxidarse forma la hemateína, que sí tiene propiedades colorantes (Ovalle & Nahirney, 2020). La hemateína es aniónica y tiene afinidad baja por el tejido, siendo inadecuada para colorear sin la presencia de una sal metálica o mordiente (Suvarna et al., 2019). El mordiente que comúnmente es el sulfato de potasio y aluminio, posee cationes metálicos que confieren una carga positiva neta al quelato formado entre el colorante y el mordiente (Carson & Hladik, 2009; Salguero & Pallarés, 2023).

El quelato hemateína - sulfato de potasio y aluminio es un colorante básico, azul - violeta o púrpura oscuro, cuya afinidad está dada por las estructuras como los ácidos nucleicos, presentes en el núcleo y los ribosomas (Mescher, 2018).

La eosina (del griego *Eos*: diosa del amanecer) es un colorante xanteno ácido, aniónico, color rosa-naranja fluorescente, que se extrae del alquitrán de hulla y es utilizado como contra tinción de la hematoxilina (Ovalle & Nahirney, 2020). Tiene afinidad por estructuras básicas con cargas positivas como el citoplasma y la matriz extracelular (Ovalle & Nahirney, 2020). La eosina permite diferenciar entre los citoplasmas de los diferentes tipos celulares y las fibras de tejido conectivo, coloreándolos con diferentes tonos e intensidad de color rojo, naranja y rosa (Suvarna et al., 2019).

**Cubrimiento.** Luego de la tinción es necesario deshidratar las muestras con el fin de evitar su descomposición, para ello se suele realizar una serie de lavados consecutivos ascendentes con diferentes concentraciones de etanol y de solvente xileno (Suvarna et al., 2019). Por último la placa portaobjetos con el tejido teñido es cubierta con un medio de montaje adhesivo y un cubreobjetos de vidrio, lo cual facilita la observación en el microscopio (McMillan & Harris, 2018; Mescher, 2018).

### ***Microscopía***

Los tejidos procesados y teñidos no pueden ser observados a simple vista, para solventar esta brecha, la histología se soporta en el uso de microscopios y en estrategias de la microscopía (Ovalle & Nahirney, 2020; Salguero & Pallarés, 2023). La microscopía es la especialización técnica en el uso, diseño y producción de microscopios (Cambridge University Press, 2023).

El microscopio es un instrumento que permite visualizar imágenes ampliadas de especímenes pequeños, cuyo tamaño está dado en escala de micrómetros (Shannon & Ford, 2023; The University of Edinburgh, 2018). Es un equipo esencial en un laboratorio de histología, pues permite visualizar los especímenes preparados (Suvarna et al., 2019).

Existen algunos tipos de microscopios con diferentes resoluciones y magnificaciones, entre ellos el microscopio de luz, electrónico, fluorescente, confocal, de contraste de fase, entre otros (Mescher, 2018; Ovalle & Nahirney, 2020). El microscopio de luz compuesto es el más utilizado, consiste en un instrumento que a través de un lente objetivo, brinda una imagen magnificada de un espécimen en el plano de imagen del lente ocular (Murphy & Davidson, 2013). Al mirar a través del ocular, la córnea del ojo humano proyecta una observación aún mayor de la imagen real sobre la retina, y posteriormente ésta es percibida por el cerebro (Carson & Hladik, 2009).

Cada microscopio posee un poder de resolución específico, lo que facilita desarrollar la habilidad para discriminar dos puntos que están muy cercanos entre sí, un microscopio de luz utiliza un campo de iluminación brillante con un poder de resolución de  $0.2 \mu m$  (Ovalle & Nahirney, 2020).

## **Tejido hepático porcino**

El cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*) es un mamífero ungulado artiodáctilo. Su domesticación empezó en Eurasia hace 10 000 años, a partir del jabalí para consumo alimenticio (Aspinall et al., 2020). Sin embargo, desde 1940 se lo ha incluido formalmente como modelo experimental en la investigación biomédica, particularmente para procedimientos quirúrgicos, pues se sabe que existe homología anatómica, fisiológica y genética con el humano (D'Angelo et al., 2016; Lada et al., 2020). La histología del porcino ha sido estudiada minuciosamente con diversos enfoques, no obstante, en este experimento el hígado tiene una especial atención (König & Liebich, 2020).

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, se caracteriza por ser de color rojo parduzco, consistencia friable y por ocupar entre el 1.5 – 2% del peso corporal en porcinos (B. Singh, 2018; Zachary, 2022). Este órgano cumple con funciones esenciales como la hematopoyesis, almacenamiento de hierro y glucógeno, regulación de la temperatura corporal, detoxificación de drogas (Aspinall et al., 2020): además de poseer funciones exocrinas como la formación de bilis y funciones endocrinas como aquellas asociadas al metabolismo de grasas, carbohidratos y proteínas (König & Liebich, 2020).

### ***Anatomía del hígado porcino***

El hígado se encuentra ubicado anatómicamente en la región torácica derecha del abdomen, protegido por las costillas y detrás del diafragma. Estructuralmente, se divide en lóbulos izquierdo, medio izquierdo, derecho, medio derecho, cuadrado y caudado, separados entre sí por una serie de fisuras. Además, entre el lóbulo cuadrado y el medio derecho, se ubica la vesícula biliar (B. Singh, 2018).

El hígado está cubierto por tejido conectivo derivado del peritoneo (membrana serosa) y por la cápsula o túnica fibrosa, también conocida como la cápsula de Glisson. La cápsula permite la irrigación de la sangre, mediante el ingreso de vasos sanguíneos; protege al parénquima hepático y al fusionarse con las trabéculas más finas, lo divide en innumerables unidades, que dan lugar a los lobulillos hepáticos (unidad funcional clásica del hígado) (König & Liebich, 2020).



El hígado recibe un suministro de abundante sangre de la arteria hepática, una rama de la arteria celíaca y la vena porta (Krishna, 2013). La vena porta se forma a partir de tributarios derivados del tracto digestivo, páncreas y bazo (B. Singh, 2018). Las arterias intrahepáticas se dividen en conjunto con las ramas de la vena porta y los ductos biliares, formando las triadas portales. Toda la sangre enviada al hígado es captada por un conjunto de venas centrales que se hallan en los lobulillos hepáticos (Salguero & Pallarés, 2023).

El sistema del ducto hepático comienza en los canalículos o ductos biliares, dispuestos entre los lobulillos y constituidos por los tributarios de ductos más grandes que se ramifican hasta terminar en el ducto cístico y finalmente en la vesícula biliar, donde se almacena la bilis (B. Singh, 2018). El hígado está inervado por los nervios simpáticos y parasimpáticos, recibiendo fibras del tronco vago ventral y del ganglio celíaco (König & Liebich, 2020). La linfa producida en el hígado drena en los vasos linfáticos portales (König & Liebich, 2020).

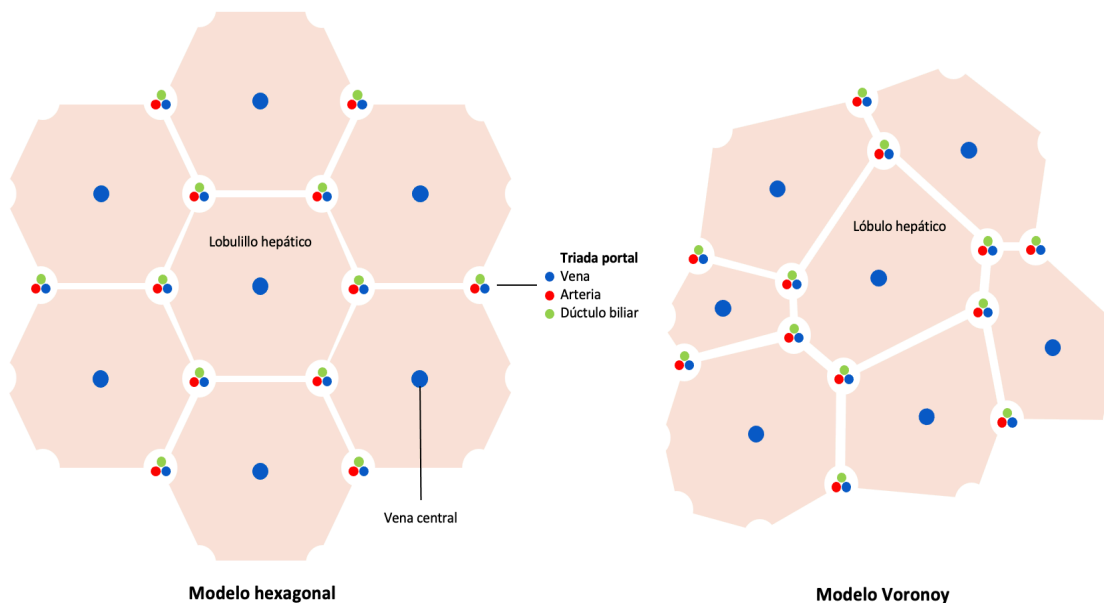
### ***Histología del hígado porcino***

La arquitectura del parénquima hepático de los mamíferos, en este caso del porcino, se organiza en lobulillos poligonales cuyo tamaño oscila entre 1 a 2 mm, demarcados por tejido conectivo y definidos por la presencia de una vena central en la mitad y triadas portales en las esquinas (König & Liebich, 2020; Salguero & Pallarés, 2023).

El modelo clásico de Kiernan describe a estos lobulillos, todos como estructuras iguales con formas poligonales. Usualmente, en humanos los lobulillos se aprecian como formas hexagonales y en porcinos como formas pentagonales (Ekataksin & Wake, 1991). Sin embargo, la arquitectura hepática normal es más congruente con el modelo matemático de Voronoy, el cual describe formas poliédricas irregulares en el tejido hepático, como se indica en la Figura 3 (Lau et al., 2021).

**Figura 3**

*Modelos teóricos de la organización de los lobulillos hepáticos*



*Nota.* Creado por el autor con el software BioRender.

Todo organismo viviente está compuesto por células; la célula es la unidad estructural y funcional de la vida (McMillan & Harris, 2018). La célula eucariota está compuesta principalmente por membrana plasmática, citoplasma y núcleo, además de organelos especializados. El conjunto de células tiende a organizarse en tejidos, éstos en órganos y progresivamente en sistemas, clasificados de acuerdo a su fisiología (Ovalle & Nahirney, 2020).

El hígado está compuesto por tejido parenquimático, del cual un 80% corresponde a células epiteliales poliédricas de origen endodérmico, conocidas como hepatocitos (Salguero & Pallarés, 2023). Los hepatocitos se caracterizan por poseer una estructura poligonal, citoplasma abundante y núcleo central redondo u ovalado, miden aproximadamente entre 25 a 40  $\mu\text{m}$  (Krishna, 2013).

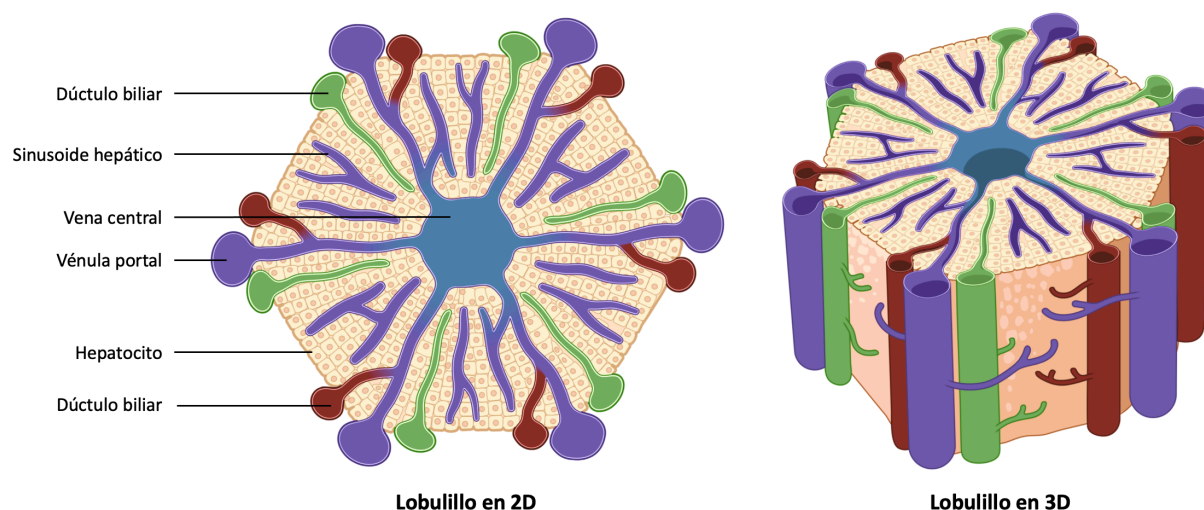
Cada lobulillo contiene entre 100 000 y 200 000 hepatocitos ordenados en filas, cordones o capas laminares curvas paralelas anastomosadas y fenestradas, de una célula de espesor (Zachary, 2022), formando cavidades o canales conocidas como sinusoides que transportan la sangre hacia la vena

central como se ilustra en la Figura 4 (König & Liebich, 2020). Los hepatocitos convierten y almacenan los carbohidratos absorbidos durante la comida en forma de glucógeno, mismo que ocupa un volumen significativo en el citoplasma y puede romperse en unidades de glucosa como un recurso de energía inmediato (Suvarna et al., 2019).

Los sinusoides son canales vasculares delimitados por hepatocitos y delineados por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas apoyadas en una membrana basal, Figura 4 (Zachary, 2022). El espacio existente entre estas células se conoce como espacio de Disse y constituye un microentorno donde sucede el intercambio entre la sangre y los hepatocitos (Krishna, 2013).

Los sinusoides se asocian directamente con la función hepática, debido a que su arquitectura promueve la eficiencia de los procesos de absorción y secreción (O'Dowd et al., 2020). La membrana basal está constituida por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, cantidades mínimas de colágeno tipo (I, III, VI, XVIII), glicoproteínas y proteoglicanos (Zachary, 2022).

En el lumen o en el interior de los sinusoides se suelen encontrar varios tipos celulares, tal como los macrófagos hepáticos o llamados células de Kupffer, los cuales son considerados fagocitos móviles, irregulares, capaces de migrar a lo largo de los sinusoides hacia las áreas de lesión y nódulos linfáticos (Abbas et al., 2018). En el espacio de Disse también pueden encontrarse células estrelladas hepáticas o células de Ito, clasificadas como miofibroblastos cuya función es controlar el flujo sanguíneo, la fibrogénesis y el almacenamiento de vitamina A (Krishna, 2013).

**Figura 4***Morfología del lobulillo hepático*

*Nota.* Creado por el autor con el software BioRender.

Los ángulos de los lobulillos hepáticos se hallan sostenidos por un estroma de colágeno, donde se encuentran los tractos, triadas o áreas portales delimitadas por una placa discontinua de hepatocitos. Dichas triadas contienen el ducto biliar, ramas de la vena portal, ramas de la arteria hepática, nervios y vasos linfáticos, Figura 4 (Zachary, 2022). En estas áreas también se puede hallar células dendríticas, células asesinas naturales y linfocitos citotóxicos, cuyas funciones se asocian con el sistema inmunológico (Suvarna et al., 2019).

La sangre fluye desde la arteria hepática y las venas portales, mezclándose en los sinusoides y drenándose en las vénulas centrales (Zachary, 2022). Las arterias consisten en canales vasculares que conducen la sangre desde el corazón hacia los capilares, la pared arterial está compuesta por la túnica íntima, media y adventicia (McMillan & Harris, 2018). La túnica íntima está constituida por células endoteliales planas y alargadas, dispuestas sobre el tejido conectivo areolar, la túnica media es la capa más gruesa del vaso y la túnica adventicia se encuentra compuesta por colágeno y fibras elásticas asociadas con tejido conectivo (Salguero & Pallarés, 2023).

Los capilares se consideran como las unidades más pequeñas del sistema vascular, debido a que poseen un diámetro no mayor al de un eritrocito, su pared se compone por una túnica íntima dispuesta sobre la lámina basal (Mescher, 2018).

Las vénulas particularmente se encargan de colectar la sangre de los capilares. Las vénulas están conformadas de igual manera, por una túnica íntima, una túnica media delgada y por escasas fibras musculares lisas circulares, la túnica adventicia en este caso es la capa más gruesa y se halla constituida por fibras de colágeno con fibras elásticas (Salguero & Pallarés, 2023)

La bilis fluye dentro del lobulillo en la dirección contraria a la del flujo de la sangre (Zachary, 2022). La bilis es un fluido biológico secretado por cada hepatocito, recolectado y dirigido hacia los canalículos o capilares biliares, mismos que están delimitados por las membranas plasmáticas de los hepatocitos (Aspinall et al., 2020).

La bilis se traslada a través de los canales de Hering, los colangiolos y ductos biliares que están delimitados por células epiteliales cúbicas en el área portal y columnares en los ductos interlobulillares (Salguero & Pallarés, 2023). Luego fluye a los ductos lobulares y al ducto hepático para ser almacenada posteriormente en la vesícula biliar (Zachary, 2022).

### **La miel de abeja**

La miel es una sustancia dulce y natural producida por las abejas (*Apis mellifera*) a partir del néctar y polen de las flores. Durante el proceso natural de la polinización, las abejas recolectan y transforman el polen y el néctar en miel, al combinar estos componentes con sustancias propias y luego la almacenan en el panal para su maduración (FAO & OMS, 2019).

La miel de abeja ha sido utilizada hace siglos por los seres humanos, debido a su valor nutricional y medicinal (Albaridi, 2019; El-Soud, 2012). Este producto biológico posee una composición compleja y variable de aminoácidos, vitaminas, carbohidratos, flavonoides, polifenoles, compuestos reductores, alcaloides, entre otros (Islam et al., 2012).

La composición y las propiedades de la miel dependen de ciertas condiciones, tal como el origen floral, zona geográfica, época del año y los cuidados del apicultor (Hegazi et al., 2018). Dichos factores han determinado que existan más de 300 variedades de miel, las más comunes son de eucalipto, pino, aguacate, girasol, acacia, entre otras (Bogdanov, 2016).

### ***Composición de la miel de abeja***

La miel es una solución sobresaturada de azúcar con aproximadamente el 17% de agua, 82.5% de carbohidratos y el 0.5% de proteínas y minerales (Albaridi, 2019). En su mayor parte, está integrada por monosacáridos (fructosa, glucosa), disacáridos (sacarosa, galactosa), trisacáridos y otros oligosacáridos (El-Soud, 2012). Contiene cantidades bajas de ácidos orgánicos como el ácido glucónico, acético, fórmico y cítrico (Pataca et al., 2007).

Se ha encontrado que la miel contiene enzimas como las diastasas, invertasas, glucosa oxidasas, catalasas y fosfatasas ácidas (Rossano et al., 2012). Posee diversas vitaminas como la riboflavina, niacina, ácido pantoténico, B6, B12, folato y vitamina C (Kitzes et al., 1943). Además, se sabe que la miel está conformada por aproximadamente 600 compuestos volátiles, mismos que actúan como antioxidantes e incluyen aldehídos, furanos, cetonas, alcoholes, terpenos, bencenos y sus derivados (Manyi-Loh et al., 2011).

El color característico de la miel de abeja se debe los minerales o compuestos químicos que la constituyen, cuando el color es amarillo claro se debe a componentes como los polifenoles, el polen y los minerales. Cuando el color es ámbar, rojo o negro; se debe a la presencia de compuestos flavonoides (Albaridi, 2019).

La presencia de algunos ácidos, como el ácido acético, cítrico, fórmico, glucónico y otros; otorgan a la miel de abeja un carácter ácido, cuyo pH oscila entre 3.2 a 4.5 (Mato et al., 2003). A su vez, estos componentes hacen de la miel un medio con propiedades antioxidantes (Khalil et al., 2011), antimicrobianas (Wilkinson & Cavanagh, 2005), antiinflamatorias (Hussein et al., 2012) y anticancerígenas (Jaganathan & Mandal, 2009).

### ***Aplicaciones de la miel de abeja***

La miel de abeja es un producto biológico ampliamente utilizado en diversos campos. Existen registros, acerca de antiguas prácticas egipcias que mencionan el uso de la miel en conjunto con la cera de abeja, para la ejecución de procesos de conservación y momificación (Nicholson & Shaw, 2000).

En el campo de la medicina, la miel de abeja se ha convertido en una alternativa emergente y de gran interés, puesto que se la ha aplicado en el tratamiento de lesiones o laceraciones, quemaduras, diabetes, cáncer, asma, enfermedades cardiovasculares y gastrointestinales (Meo et al., 2017; Samarghandian et al., 2017).

Además, este producto posee aplicaciones prácticas tal como la conservación de injertos de tejido y curación de heridas (Emsen, 2007; Subrahmanyam, 1993); e incluso en el embalsamamiento de cuerpos dentro del área forense (Sharquie & Najim, 2004). En la actualidad, la miel de abeja está siendo utilizada para la conservación de tejidos en el campo de la histología en varios países; pues se han realizado estudios que han demostrado que la miel de abeja en bajas concentraciones, proporciona resultados comparables con el formaldehído convencional (Alwahaibi et al., 2022; Thamilselvan et al., 2021).

### **Capítulo III: Materiales y métodos**

#### **Localización Geográfica**

El procesamiento y análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio Histodiagnóstico Veterinario (Hdx-Vet), ubicado en Quito, Ecuador (Pasaje Hernando de la Cruz N31-60 y Av. Mariana de Jesús, Edificio Miguel Ángel, primer piso). Coordenadas: 0°11'19.75"S, 78°29'39.19"W.

#### **Condiciones ambientales del laboratorio**

El laboratorio mantuvo condiciones ambientales de aproximadamente 13 – 15 °C de temperatura, 70 – 80% de humedad, ventilación constante e iluminación artificial.

#### **Revisión bibliográfica**

La recopilación de información se realizó por medio de Google Scholar, la plataforma del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), el sitio web Connected Papers y el software Publish or Perish.

#### **Toma de muestras**

Se utilizó un hígado de porcino obtenido en el Camal Municipal de Cayambe (el muestreo en dicho centro de faenamiento estuvo previsto para garantizar la frescura del tejido). Se escogió un cerdo sano de raza Yorkshire, adulto, macho, de 22 semanas de edad, cuyo peso fue de aproximadamente 100 kg. El hígado del animal estaba bien desarrollado, saludable y tuvo un peso de 1.375 kg. Se escogió al porcino por ser un animal de faenamiento frecuente en establecimientos de rastro, debido a su consumo y se seleccionó el hígado por ser un órgano de gran tamaño lo cual facilita su corte, manipulación y muestreo.



## **Preparación de soluciones**

### ***Solución de miel de abeja al 10% y 20%***

Se utilizaron las soluciones de miel de abeja al 10% y 20%, puesto que éstas concentraciones permiten conservar fragmentos de tejido pequeños, según se recomienda en la bibliografía (Al-Maaini & Bryant, 2006; Alwahaibi et al., 2022; Lalwani et al., 2015a).

Se utilizó miel de abeja (*Apis mellifera*), de la marca comercial (Schullo), con la cual se preparó 1000 mL de solución acuosa de miel al 10%, mediante una dilución de 900 mL de agua destilada y 100 mL de miel. También se preparó 1000 mL de solución acuosa de miel al 20%, mediante una dilución de 800 mL de agua destilada y 200 mL de miel. El pH de las soluciones tuvo valores entre 4.5 y 5.

### ***Solución de formaldehído al 4% (control +)***

Se utilizó la solución de formaldehído al 40% (Merck, 1.04003.2500) (Se reporta en las especificaciones del producto la presencia de 10% de metanol). La preparación de la solución de formaldehído se realizó mediante la metodología referenciada (Carson & Hladik, 2009; Suvarna et al., 2019). Para preparar 1000 mL de solución neutra de formaldehído al 4%, se necesitó 900 mL de agua destilada, 100 mL de solución de formaldehído al 4%, 4 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 6.5 g de fosfato de sodio dibásico anhidro. El pH se reguló entre 7.2 – 7.4.

### ***Solución de cloruro de sodio al 0.9% (control -)***

Se utilizó 1000 mL de solución de cloruro de sodio al 0,9% comercial (suero fisiológico).

## **Procesamiento de tejidos**

El procesamiento de las muestras de tejido, se realizó en base a los criterios convencionales descritos en la bibliografía (Carson & Hladik, 2009; Suvarna et al., 2019; Zachary, 2022); según se detalla a continuación:

### ***Disección primaria***

Tras el muestreo, se lavó el hígado con solución de suero fisiológico al 0,9%, se secó cuidadosamente el tejido con papel absorbente y se le realizó una descripción macroscópica en cuanto a su forma, tamaño y color. Posteriormente para la evaluación microscópica, se utilizó un bisturí sacabocados (punch de biopsia) de 8 mm de diámetro por 10 mm de altura, para diseccionar 20 fragmentos cilíndricos de hígado por cada tratamiento, como se describe en la Tabla 3.

En total se diseccionaron 80 fragmentos de tejido hepático porcino. La descripción fue acompañada de fotografías como registro.

### ***Conservación***

Por duplicado, se colocaron 10 fragmentos de tejido en recipientes plásticos herméticos de 100 mL, cada uno con la solución conservadora respectiva, según los tratamientos, Tabla 3. Los fragmentos de tejido fueron procesados y analizados cada día, durante 10 días. Este período fue definido, considerando el tiempo reportado, en el cual ocurre la autólisis del hígado (Ceciliason et al., 2021). Para el día 0 los fragmentos de tejido estuvieron sumergidos en el medio conservante por dos horas.

**Tabla 3**

*Tratamientos para la conservación de tejido hepático porcino*

<b>Tratamiento</b>	<b>Código</b>	<b>Descripción</b>
1	MA	Solución de miel de abeja al 10%
2	MB	Solución de miel de abeja al 20%
Control (+)	F	Solución de formaldehído al 4%
Control (-)	S	Solución de cloruro de sodio al 0.9%

### ***Fijación inicial***

Dos fragmentos, cada día, durante 10 días, se extrajeron de su recipiente y fueron colocados en otros envases plásticos herméticos de 100 mL con solución fijadora de formaldehído al 4%, en una proporción de tejido: fijador correspondiente a 1:100, por 24 horas. Este proceso permitió detener la descomposición de la muestra de tejido y que éste adquiriera firmeza para facilitar su corte.

***Disección secundaria***

Tras 24 horas, cada día, se extrajeron los dos fragmentos de tejido de la solución de formaldehído, se secaron con papel absorbente y se les realizó una examinación macroscópica.

Los fragmentos se disecaron a la mitad utilizando una cuchilla de microtomo (Leica 818, High profile), y se colocaron en cassettes plásticos estándar para histología (20 × 20 × 5) mm<sup>3</sup>, con las carillas de corte hacia abajo. La descripción fue acompañada con fotografías como registro.

***Fijación intermedia***

Todos los cassettes fueron colocados en un recipiente plástico hermético de 1000 mL con la solución fijadora de formaldehído al 4%, hasta su procesamiento histotecnológico.

***Incrustación en parafina***

Luego de la fijación intermedia se escurrieron los cassettes y se colocaron en una rejilla circular metálica. Esta rejilla fue colocada en el procesador automático de tejido tipo carrusel modelo HS366 (Jinhua Hisure Scientific CO., LTD) donde se realiza la fijación final, deshidratación, aclaramiento e infiltración en parafina. Una vez los tejidos completaron este procesamiento se realizó manualmente la incrustación en bloques de parafina, Como se describe a continuación.

**Fijación final**

Los cassettes pasaron a ser embebidos en dos baños consecutivos de solución neutra de formaldehído al 4%, el primero durante una hora y el segundo durante 45 minutos.

**Deshidratación**

Los cassettes pasaron a ser embebidos con cinco baños de etanol en concentraciones gradualmente ascendentes y consecutivas, es decir 70%, 80%, 95%, 100% y 100%, cada uno con una duración de 45 minutos.

### **Aclaramiento o Clarificado**

Los cassettes pasaron a ser embebidos en Neo-Clear™ (Sigma-Aldrich, 1.09843.5000), durante 45 minutos por tres ocasiones consecutivas. Neo-Clear™ es un sustituto del xileno para microscopía, este agente contiene nafta y un alquilato pesado.

### **Infiltración**

Los cassettes pasaron a ser embebidos en parafina derretida Histoplast IM (Thermoscientific, 8331), a 57°C durante 30 minutos, por cuatro ocasiones consecutivas.

### ***Incrustación o bloqueo***

Se utilizó un sistema de incrustación de tejido en cera de parafina, modelo Zeedo (Jinhua Hisure Scientific CO., LTD). Se dispensó una capa de parafina fundida Histoplast IM (Thermoscientific, 8331) a 60 °C, en un molde de acero inoxidable. Al iniciar su solidificación, se colocó los fragmentos de tejido encima y se rellenó el molde con parafina fundida a 60°C. Los moldes se dejaron enfriar hasta solidificarse totalmente, formando bloques en un equipo crio consola modelo Zeedo (Jinhua Hisure Scientific CO., LTD). Finalmente, se colocaron los bloques sobre hielo para hidratarlos y así facilitar su corte.

### ***Corte en micrótopo***

Para el corte se utilizó un micrótopo rotatorio modelo HM315 (MICROM®), con el cual se consiguió secciones de tejido de 4-5  $\mu\text{m}$  de espesor a partir de cada bloque. Cada sección de tejido fue colocada en un baño de agua caliente a 42°C, por 30 segundos. Luego, se colocó el tejido cortado sobre una laminilla portaobjetos de vidrio y se dejó secar en una estufa, durante 1 h a 60 °C.

### ***Tinción***

Se aplicó el método de tinción con hematoxilina (Sigma-Aldrich, 03971) y eosina (Sigma-Aldrich, 1.09844.1000). Para este proceso se siguió el protocolo lineal regresivo convencional como se especifica en la Tabla 4.

**Tabla 4***Protocolo de tinción regresiva con hematoxilina/eosina*

<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Inmersiones (veces)</b>
Xileno	2	10
Xileno	2	10
Xileno	2	10
Etanol al 100%	2	10
Etanol al 95%	2	10
Etanol al 95%	2	10
Agua corriente	2	10
Hematoxilina	10-15	50
Agua corriente	2	10
Agua corriente	2	10
Ácido hidroclicóric al 1% en etanol al 70%	1-2	5-10
Agua corriente	2	10
Agua de amonio al 0.25%	10-30 segundos (azulado)	2-3
Agua corriente	2	10
Agua corriente	2	10
Eosina	1-3	10-20
Etanol al 70%	2-3	10-15
Etanol al 95%	2-3	10-15
Etanol al 100%	2-3	10-15
Etanol al 100%	2-3	10-15
Etanol al 100%	2-3	10-15
Xileno	2-3	10-15
Xileno	2-3	10-15
Xileno	2-3	10-15

*Nota:* Esta tabla ha sido adaptada de *Histotechnology A Self-Instructional Text* (p. 114), por Carson & Hladik, American Society for Clinical Pathology Press. Copyright© 2009 por the American Society for Clinical Pathology.

**Cubrimiento**

Las laminillas con las secciones de tejido coloreadas se dejaron secar al ambiente por 10 minutos. Luego, en cada laminilla se colocó tres gotas de medio de montaje adhesivo (compuesto por resinas disueltas en xileno) (Histofluído Marienfeld). Se dejó secar el medio por 5 segundos y se colocó encima un vidrio cubreobjetos para su protección. Finalmente, las laminillas cubiertas se dejaron secar al ambiente durante 24 horas.

## ***Evaluación microscópica***

### **Observación**

Se realizó la observación de las laminillas con un microscopio óptico Primo Star (© Carl Zeiss Microscopy GmbH).

### **Fotografía**

Se utilizó la cámara digital Axiocam ERc5s (© Carl Zeiss Microscopy GmbH). Se capturó fotografías con los lentes objetivos de 4X (para lobulillos), 10X (para lobulillos), 40X (para los sinusoides y las triadas portales) y 100X (para los hepatocitos en cinco campos ópticos).

### **Morfometría**

Se utilizó el software ZEISS ZEN versión 3.8 para el análisis de la morfometría celular. Para cada laminilla se seleccionaron 5 campos ópticos representativos en 100X, los cuales incluyeron 6 hepatocitos representativas por campo. Por cada hepatocito, se determinó lo siguiente: tres criterios de arquitectura celular, dos criterios de calidad de tinción y uno de autólisis. Por último, se midieron los perímetro celular y nuclear, con los cuales, mediante el software ZEISS ZEN se obtuvo las áreas celulares y nucleares.

### **Análisis estadístico**

La unidad experimental fue cada laminilla con cortes histológicos de tejido hepático porcino, correspondiente a cada día y tratamiento determinado. Para el análisis de cada variable, planteada en este estudio, se empleó las herramientas informáticas INFOSTAT, Excel y RStudio.

Para la evaluación de los criterios histomorfológicos, es decir, la arquitectura celular y la calidad de la tinción (variables cualitativas nominales), se aplicó la prueba binomial exacta de Fisher para las frecuencias de valores aceptables, considerando un valor- $p \leq 0,05$ . Mientras que, para la evaluación de la autólisis, se aplicó los criterios para variables cualitativas ordinales descriptivas. Los criterios de las variables se indican a continuación, en las Tablas 5, 6 y 7.

**Tabla 5***Operacionalización de variables de criterios histomorfológicos de arquitectura celular*

<b>Variable</b>		<b>Puntuación</b>
<b>Detalle celular (hepatocito)</b>	<b>Detalle del núcleo (hepatocito)</b>	<b>1 (aceptable) 0 (inaceptable)</b>
Membrana citoplasmática, delimitada e intacta Contraste Núcleo: Citoplasma marcado	Membrana nuclear Delimitada Intacta	1
Membrana citoplasmática, no delimitada o desintegrada Contraste Núcleo: Citoplasma indistinguible	Membrana nuclear No delimitada Desintegrada	0

**Tabla 6***Operacionalización de variables de la calidad de tinción Hematoxilina/Eosina*

<b>Variable</b>		<b>Puntuación</b>
<b>Tinción de citoplasma (hepatocito)</b>	<b>Tinción de núcleo (hepatocito)</b>	<b>1 (aceptable) 0 (inaceptable)</b>
Citoplasma rosa	Núcleo violeta azulado	1
Citoplasma violeta	Núcleo violeta oscuro	0

**Tabla 7**

*Operacionalización de variables de criterios histomorfológicos de autólisis.*

<b>Variabes</b>			<b>Puntuación (0-5)</b>
<b>Lobulillos</b>	<b>Sinusoides</b>	<b>Triadas portales</b>	
Distintos y distinguibles	Distintos y distinguibles Hepatocitos alineados	Distinguibles	0
Moderadamente distinguibles	Moderadamente distinguibles Pérdida leve de la alineación de hepatocitos	Moderadamente distinguibles Desintegración leve Dispersión del colágeno	1
Solitarios distinguibles	Poco distinguibles Pérdida moderada de la alineación de hepatocitos	Poco distinguibles Desintegración moderada Dispersión del colágeno	2
Poco distinguible	No identificable Pérdida grave de la alineación de hepatocitos	Difícilmente distinguibles Desintegración avanzada Restos de colágeno	3
Difícil de distinguir	No identificable Pérdida completa de la alineación de hepatocitos	Desintegración completa Restos de colágeno	4
No identificable	No identificable	No identificable	5

*Nota.* Esta tabla ha sido adaptada de *Histological quantification of decomposed human livers: a potential aid for estimation of the post-mortem interval?* (p. 260), por Cecilason et al., 2021, International Journal of Legal Medicine, Springer. Copyright © 2021 por los autores.

Para el estudio de la morfometría celular, se definieron variables cuantitativas y continuas, que corresponden a las medidas de los perímetros celular y nuclear de los hepatocitos observados, en micrómetros. De igual manera, las áreas celular y nuclear de los hepatocitos observados, en micrómetros cuadrados. En este caso, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson entre el área y el perímetro para determinar su correlación.



Para la comparación de las medias se aplicó la prueba de análisis de la varianza ANOVA de un factor, considerando un valor- $p \leq 0.05$ . Finalmente se aplicó las pruebas post-hoc de Dunnet y Tukey, para comparar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y sus controles. Los criterios de las variables se indican en la Tabla 8.

**Tabla 8**

*Operacionalización de variables de criterios morfométricos de perímetro y área celular*

<b>Variable</b>	<b>Indicadores</b>
Perímetro celular	Distancia en micrómetros
Perímetro nuclear	Distancia en micrómetros
Área celular	Medida en micrómetros cuadrados
Área nuclear	Medida en micrómetros cuadrados

## Capítulo IV: Resultados

Se valoró mediante criterios histomorfológicos la arquitectura celular, autólisis, calidad de la tinción hematoxilina/eosina, y morfometría celular y nuclear (área y perímetro), en muestras de tejido hepático porcino conservadas en solución de miel de abeja al 10% (MA) y 20% (MB), solución de formaldehído al 4% (F, control +) y solución de suero fisiológico al 0.9% (S, control -), durante 10 días. Los resultados se detallan a continuación.

### **Arquitectura celular**

La arquitectura celular abarca la morfología y estructura de las membranas citoplasmática y nuclear de los hepatocitos. Si estas están delimitadas e intactas se consideran como aceptables, caso contrario si están desintegradas y no delimitadas son inaceptables. Para la valoración de la arquitectura celular se tomó en cuenta el detalle celular y nuclear aceptable de los hepatocitos.

### **Detalle celular**

En la Figura 5 se pueden visualizar los valores de las frecuencias del detalle celular aceptable, expresados en porcentajes, correspondientes a aquellos hepatocitos de la muestra ( $n=30$ ) que presentaron una membrana citoplasmática delimitada y mantuvieron un contraste marcado entre el núcleo y el citoplasma.

Durante los días 0, 1 y 2, el porcentaje del detalle celular fue superior al 90% en los cuatro tratamientos, mostrando que no hubo diferencias significativas entre ellos usando la prueba binomial exacta de Fisher, ( $\text{valor-}p \leq 0.05$ ). A partir del día 3 hasta el día 7 no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos MA, MB y F, con porcentajes de detalle celular superiores al 80%. De esta manera, el día 7 fue el tiempo máximo que permitió diferenciar un detalle celular definido para los dos tratamientos de miel, MA con un porcentaje del 86.67% y MB con un 80%.

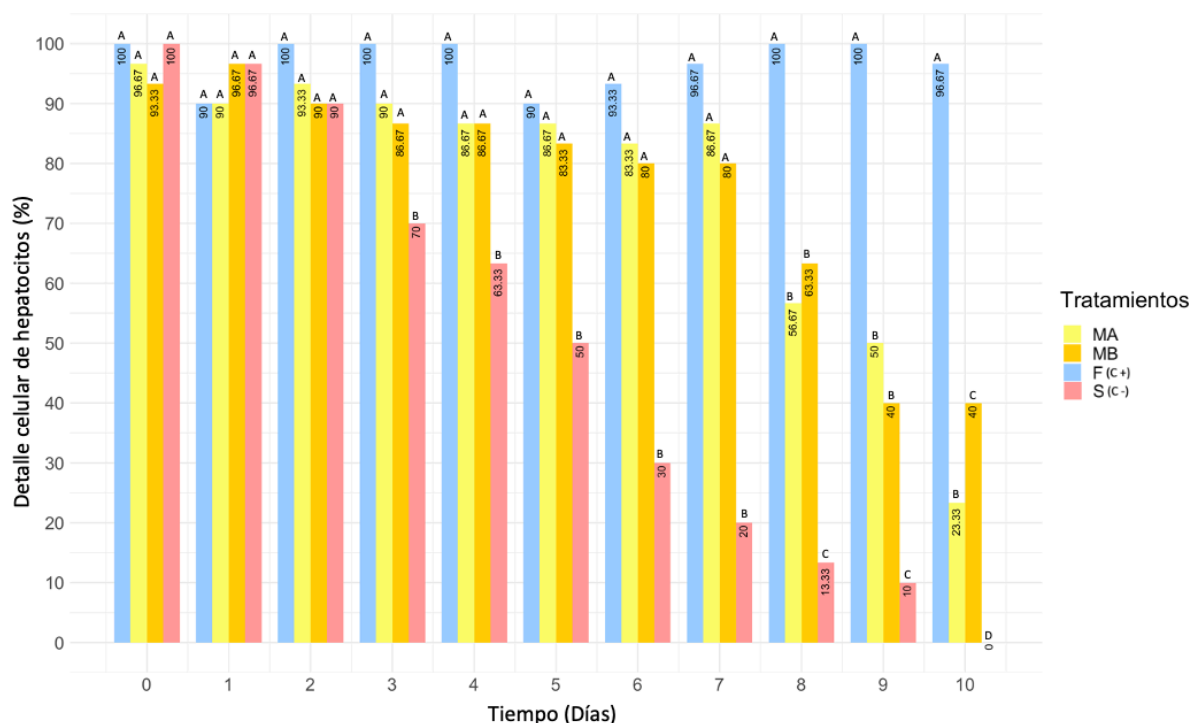
A partir del día 8 y 9, los porcentajes de detalle celular de los tratamientos de miel (MA y MB) disminuyeron y se diferenciaron significativamente del tratamiento de formaldehído (F) ( $\text{valor-}p \leq 0.05$ ),

pero no mostraron diferencias significativas entre sí (valor- $p > 0.05$ ). Mientras que en el día 10 si hubo diferencias significativas entre los tratamientos MA y MB, manteniendo porcentajes mínimos de 23.33% y 40%, respectivamente.

Como era esperado, el tratamiento de formaldehído (F) mantuvo valores de detalle celular superiores al 90% durante todos los días de la experimentación. En contraste con el tratamiento de suero fisiológico (S), el cual a partir del día 3 mostró porcentajes de detalle celular que decrecieron rápidamente del 70% hasta 0% (día 10).

**Figura 5**

*Detalle celular de los hepatocitos*



*Nota.* Cada barra indica el porcentaje de células ( $n = 30$ ) que mostraron un detalle celular aceptable para cada tratamiento durante 10 días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -). Letras iguales sobre las barras indican que no hubo diferencia estadística significativa, mientras que letras distintas indican diferencia significativa (valor- $p \leq 0.05$ ).

### ***Detalle nuclear***

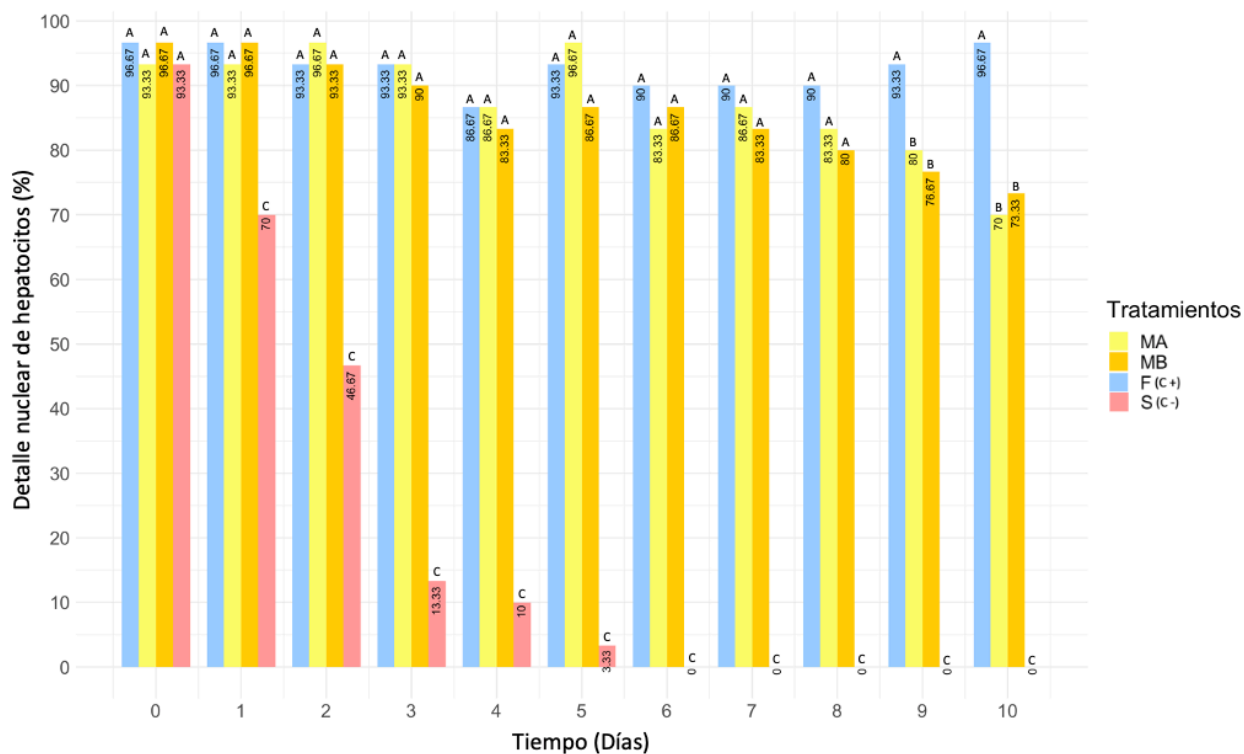
En la Figura 6 se pueden visualizar los valores de las frecuencias del detalle nuclear aceptable, expresados en porcentajes, correspondientes a aquellos hepatocitos de la muestra ( $n = 30$ ) que presentaron una membrana nuclear, delimitada e intacta.

En el día 0 los cuatro tratamientos no mostraron diferencias significativas usando la prueba binomial exacta de Fisher, ( $\text{valor-p} \leq 0,05$ ). Desde el día 1 al día 8, el porcentaje de detalle nuclear de los tratamientos MA, MB y F, fue superior al 80%, sin mostrar diferencia significativa entre sí. Sin embargo, en los días 9 y 10 el porcentaje de detalle nuclear de los tratamientos MA y MB disminuyó, diferenciándose significativamente del tratamiento F ( $\text{valor-p} \leq 0,05$ ). El día 9 fue el tiempo máximo que permitió diferenciar un detalle nuclear aceptable en los tratamientos MA con un porcentaje del 80% y MB con un porcentaje del 76.67%.

El tratamiento F mantuvo valores de detalle nuclear superiores al 80% durante todos los días de la experimentación. Por su parte, el tratamiento S mostró una rápida disminución del porcentaje de detalle nuclear a partir del día 1 con un valor del 70%, hasta el día 6 con un valor de 0%.

Figura 6

Detalle nuclear de los hepatocitos



*Nota.* Cada barra indica el porcentaje de células ( $n = 30$ ) que mostraron un detalle nuclear aceptable para cada tratamiento durante 10 días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -). Letras iguales sobre las barras indican que no hubo diferencia estadística significativa, mientras que letras distintas indican diferencia significativa (valor- $p \leq 0.05$ ).

### Autólisis

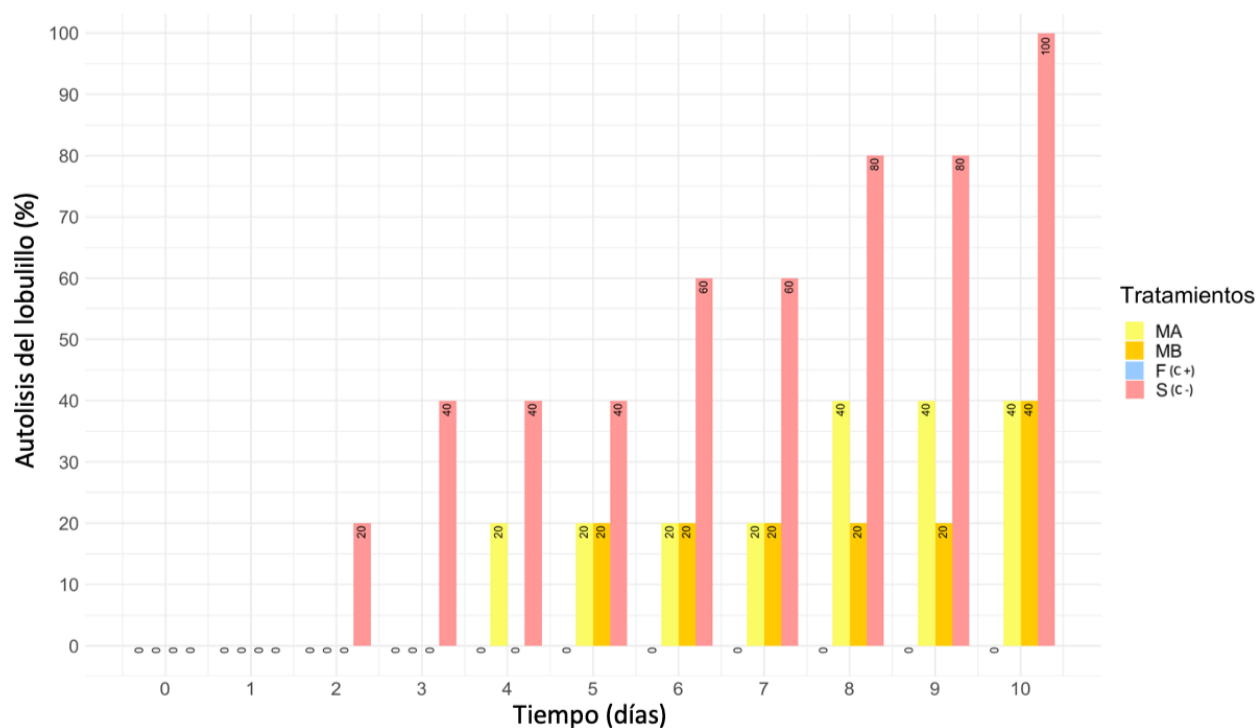
El proceso de autólisis fue valorado mediante el estudio de la estructura del lobulillo, los sinusoides y las triadas portales, para cada uno de los tratamientos durante 10 días.

En la Figura 7 se pueden observar los porcentajes de autólisis de los lobulillos (subunidad anatómica poliédrica hepática, con una vena central y triadas portales en las esquinas). En el tratamiento MA, la autólisis inició con un 20% en el día 4, incrementó al 40% en el día 8 y se mantuvo

igual hasta el día 10. Por su parte, el tratamiento MB mostró evidencia de autólisis un 20% en el día 5 y un 40% en el día 10. El tratamiento F no demostró evidencia de autólisis en ningún día de la experimentación. En contraste, el tratamiento S, el cual presentó autólisis del 20% a partir del día 2, 60% en el día 6, incrementó al 80% en el día 8 y alcanzó el 100% en el día 10.

**Figura 7**

*Autólisis de los lobulillos hepáticos*

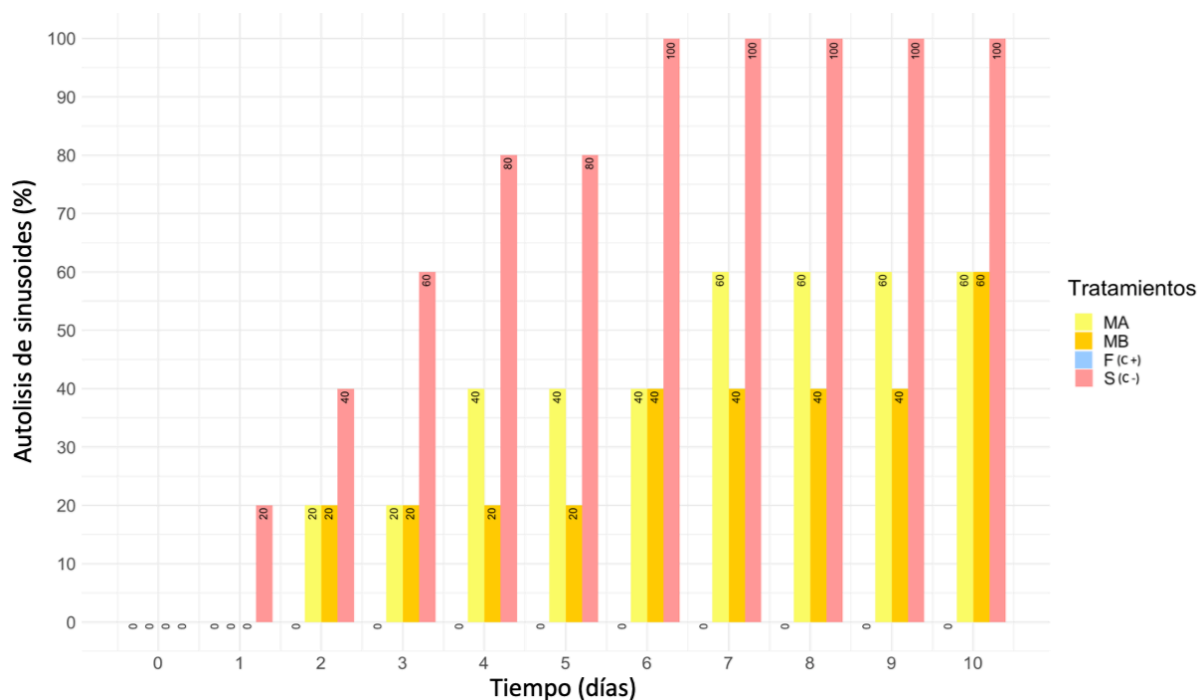


*Nota.* **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).

En la Figura 8 se pueden visualizar los porcentajes de autólisis de los sinusoides (canales vasculares delimitados por hepatocitos). En el tratamiento MA la autólisis empezó con un 20% en el día 2, luego incrementó al 40% el día 4, 60% en el día 7 y se mantuvo así hasta el día 10. De igual manera, la autólisis en el tratamiento MB inició con un 20% en el día 2, luego aumentó al 40% el día 6 y finalmente al 60% en el día 10. El tratamiento F no demostró procesos de autólisis en ningún día de la experimentación. Mientras que el tratamiento S presentó autólisis desde con un 20% en el día 1, 80% al día 4 y degradación completa en el día 6.

**Figura 8**

*Autólisis de los sinusoides hepáticos*



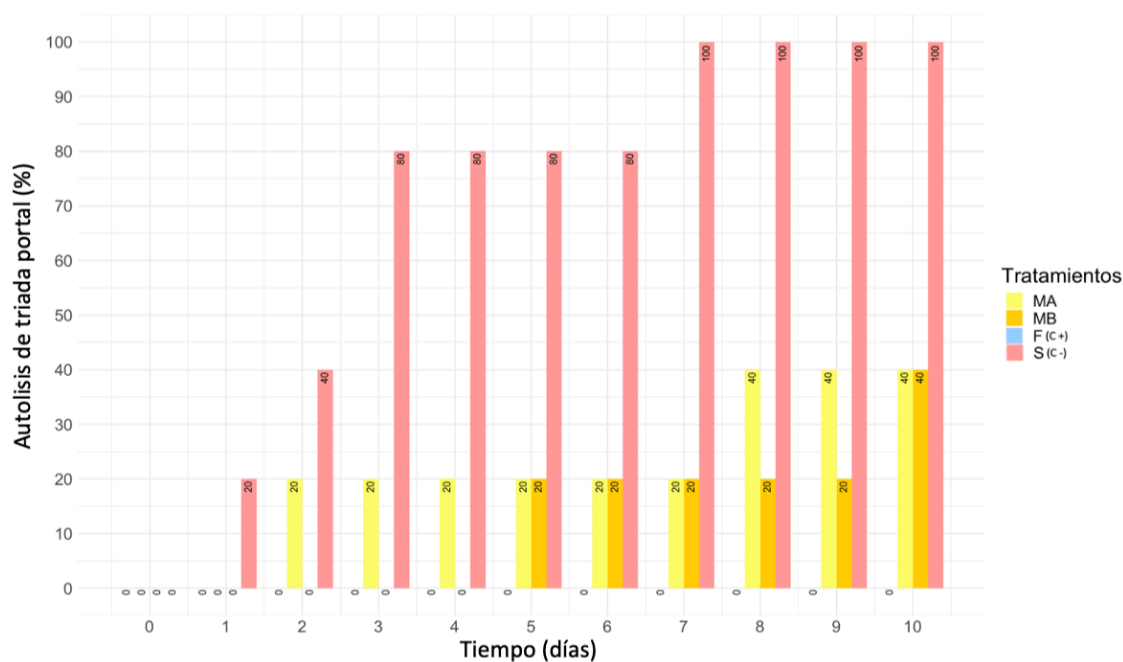
*Nota.* **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).

En la Figura 9 se pueden observar los porcentajes de autólisis de las triadas portaes (Ramificaciones del conductos biliares, vena porta, arteria hepática, nervios y vasos linfáticos, soportados por un estroma de colágeno). En este caso, la autólisis en el tratamiento MA, empezó con un

20% en el día 2, incrementó al 40% en el día 8 y se mantuvo igual hasta el día 10. En el tratamiento MB, la autólisis se evidenció con un 20% en el día 5 e incrementó al 40% en el día 10. El tratamiento F no demostró procesos de autólisis en ningún día de la experimentación. Por el contrario, el tratamiento S demostró procesos de autólisis en ningún día de la experimentación. Por el contrario, el tratamiento S mostró autólisis del 20% en el día 1, e incremento progresivamente al 40% en el día 2, 80% en el día 3 y se degradó totalmente en el día 7.

**Figura 9**

*Autólisis de las triadas portales hepáticas*



*Nota.* **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).

En resumen, a la autólisis, la morfología de los lobulillos hepático, se demostró una buena conservación de la estructura poligonal en el tratamiento MB. Al contrario del tratamiento con MA, donde la autólisis del lobulillo fue más evidente. Considerando la estructura de los sinusoides en el tratamiento MB la autólisis fue levemente más tardía, Mientras que el tratamiento con MA evidenció



una autólisis más pronunciada. Finalmente, tomando en cuenta la morfología de las triadas portales, en el tratamiento MB, la autólisis fue ligera, mientras que en el tratamiento MA, la autólisis fue más rápida.

### **Calidad de la tinción hematoxilina y eosina**

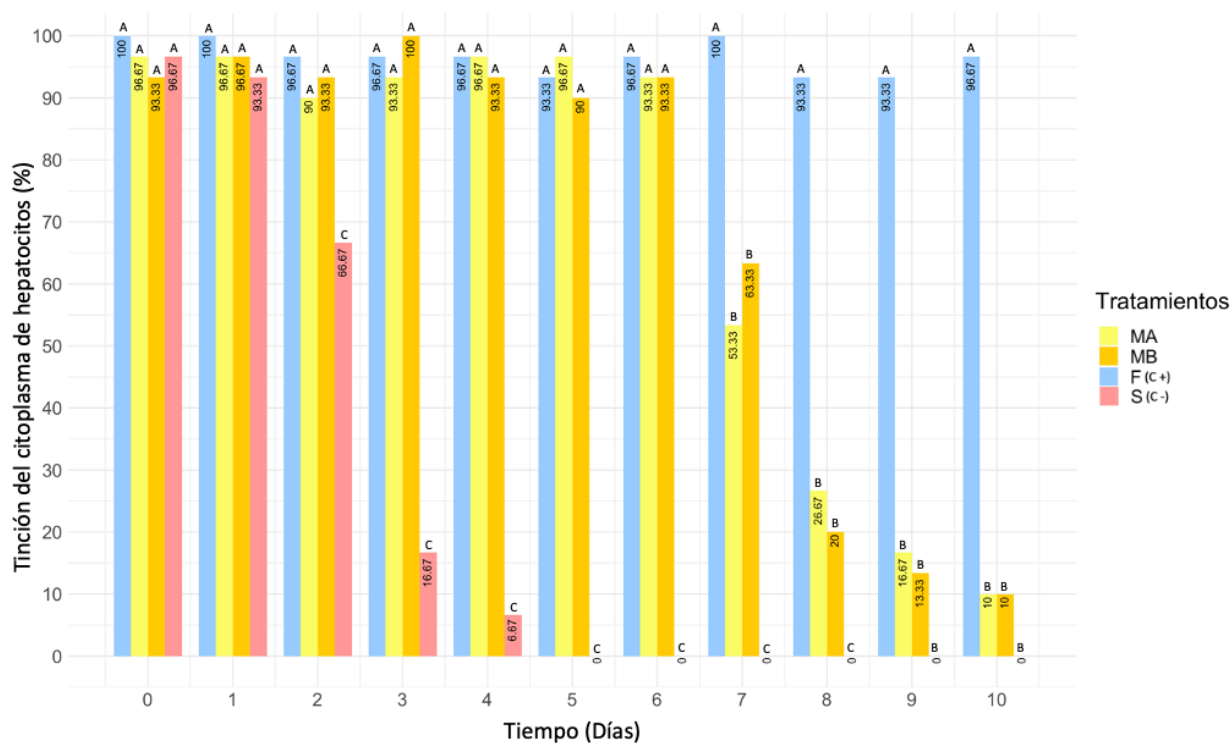
Para la valoración de la calidad de la tinción hematoxilina y eosina, se tomó en cuenta la coloración aceptable de los citoplasmas y núcleos de los hepatocitos.

### ***Tinción del citoplasma***

En la Figura 10 se pueden visualizar los valores de las frecuencias de la calidad de tinción aceptable, expresados en porcentajes, correspondientes a aquellos hepatocitos de la muestra ( $n = 30$ ) que presentaron una coloración rosa del citoplasma. Durante los días 0 y 1, los cuatro tratamientos mostraron porcentajes de tinción del citoplasma superiores al 90%, revelando que no hubo diferencias significativas entre sí (valor- $p > 0.05$ ). Desde el día 2 hasta el día 6, los tratamientos de miel (MA, MB) y formaldehído (F) no evidenciaron diferencias significativas (valor- $p > 0.05$ ), con porcentajes de tinción del citoplasma que se mantuvieron  $> 90\%$  en los tres tratamientos. El día 6 fue el tiempo máximo donde se pudo diferenciar una tinción del citoplasma aceptable con los tratamientos MA y MB, ambos con un 93.33%.

Figura 10

## Tinción de los citoplasmas de los hepatocitos



*Nota.* Cada barra indica el porcentaje de células ( $n = 30$ ) que mostraron una tinción de los citoplasmas aceptable para cada tratamiento durante 10 días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -). Letras iguales sobre las barras indican que no hubo diferencia estadística significativa, mientras que letras distintas indican diferencia significativa (valor- $p \leq 0.05$ ).

En los días 7 y 8, el porcentaje de la tinción del citoplasma en los tratamientos MA y MB disminuyó abruptamente en ambos casos con respecto al tratamiento F (valor- $p \leq 0.05$ ), pero sin mostrar diferencias significativas entre sí (valor- $p > 0.05$ ). Posteriormente, en los días 9 y 10 el porcentaje de tinción del citoplasma se redujo radicalmente a valores menores de 16.67% en los tratamientos MA, MB, sin diferencias significativas entre sí (valor- $p > 0.05$ ).

Como esperado, el tratamiento de formaldehído (F) mostró una tinción del citoplasma aceptable con valores superiores al 93.33% durante todos los días de la experimentación. Mientras que en el tratamiento de suero fisiológico (S), el porcentaje de la tinción del citoplasma disminuyó drásticamente desde 66.67% en el día 2 a 0% en el día 5.

### ***Tinción del núcleo***

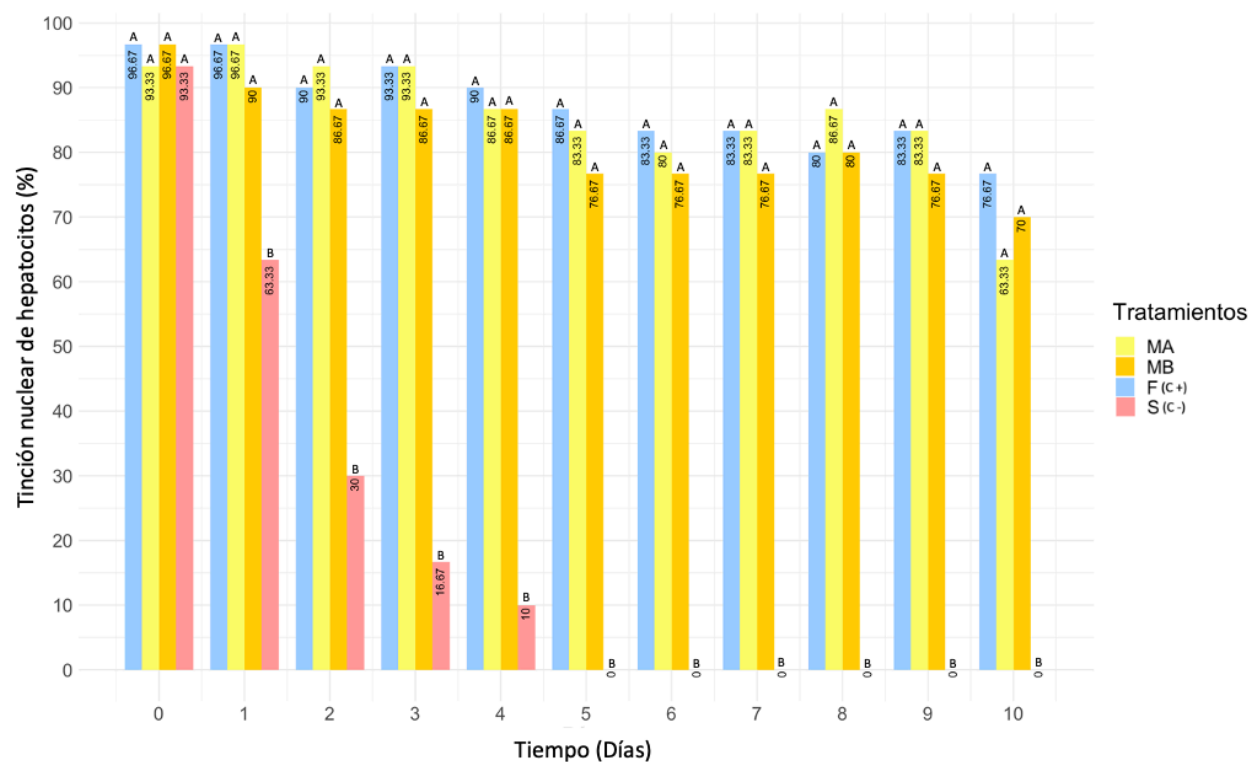
En la Figura 11 se puede visualizar los valores de las frecuencias de la calidad de tinción aceptable, expresados en porcentajes, correspondientes a aquellos hepatocitos de la muestra ( $n = 30$ ) que presentaron una coloración violeta azulada del núcleo.

En el día 0 el porcentaje de la tinción nuclear en los cuatro tratamientos no mostró diferencias significativas. Desde el día 1 hasta el día 10, los tratamientos MA, MB y F mostraron valores similares de calidad de tinción nuclear (valor- $p > 0.05$ ) Sin embargo, los tres tratamientos mostraron un decline leve pero progresivo. Se pudo identificar que el día 9 fue el tiempo máximo para diferenciar una tinción nuclear aceptable  $>70\%$  en los tratamientos MA con un valor de 83.33% y MB con 76.67%.

El tratamiento F mostró una tinción del núcleo aceptable con valores superiores al 76.67% durante todos los días de la experimentación. En contraste, el tratamiento S, disminuyó su porcentaje de tinción nuclear desde 63.33% en día 1 hasta 0% en el día 5.

Figura 11

## Tinción de los núcleos de los hepatocitos



*Nota.* Cada barra indica el porcentaje de células ( $n = 30$ ) que mostraron una tinción de los núcleos aceptable para cada tratamiento durante 10 días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -). Letras iguales sobre las barras indican que no hubo diferencia estadística significativa, mientras que letras distintas indican diferencia significativa (valor- $p \leq 0.05$ ).

## Morfometría celular

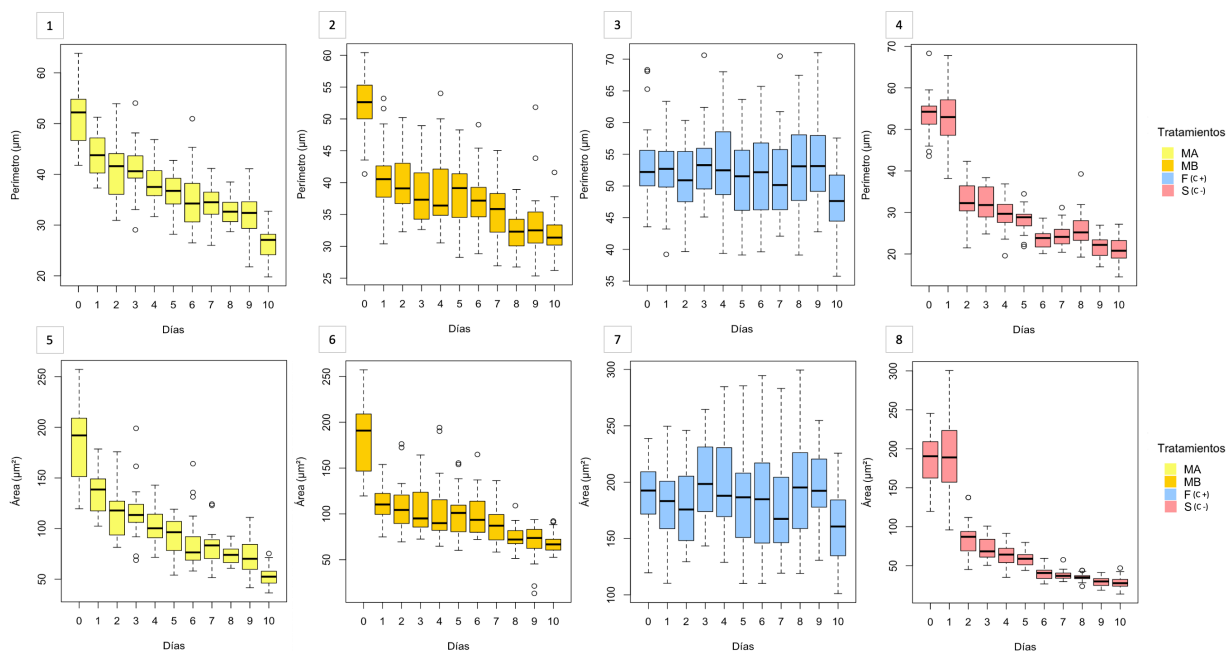
Se determinó los efectos de la contracción celular mediante morfometría, midiendo los perímetros y áreas celulares y nucleares, de los hepatocitos en las muestras de tejido hepático porcino, conservadas con el tratamiento MA y MB, F y S, teñidos con hematoxilina/eosina, durante 10 días. Los resultados se detallan a continuación.

## Perímetro y área celular

Los valores de los perímetros y áreas celulares pueden observarse en la Figura 12 y el porcentaje de contracción celular puede visualizarse en la Tabla 9. El coeficiente de correlación de Pearson mostró una correlación significativa entre el perímetro y el área celular para todos los tratamientos, con valores del coeficiente de 0.99 para el tratamiento MA, 0.99 para el tratamiento MB, 0.93 para el tratamiento F y 0.99 para el tratamiento S. Consecuentemente, los análisis comparativos se describen únicamente para los valores de las áreas celulares (Figura 13), ya que esta variable representa y es una función del perímetro.

**Figura 12**

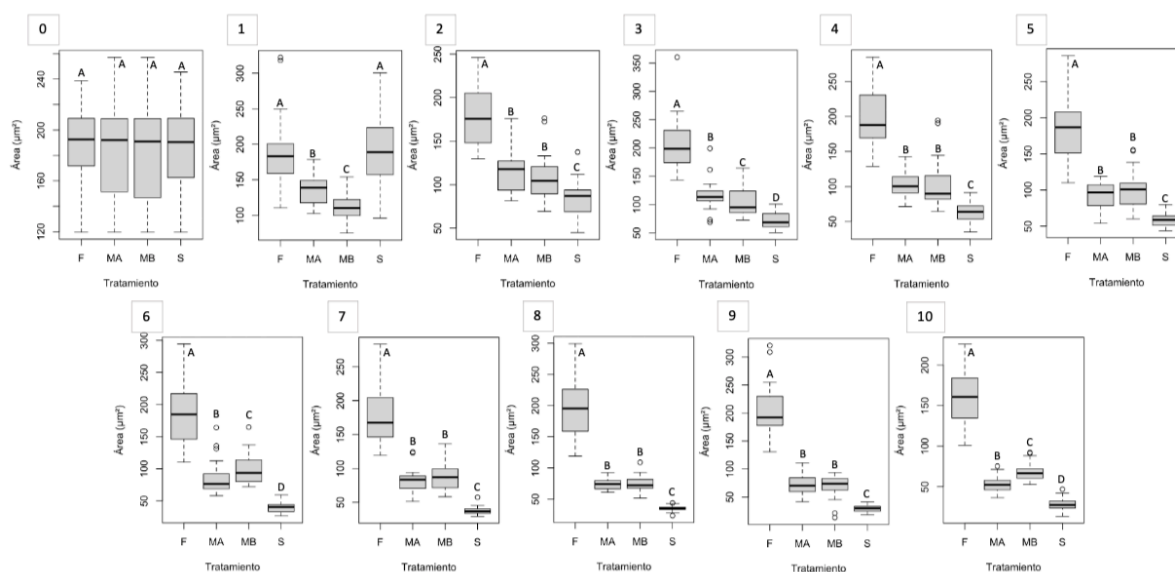
### Morfometría de los perímetro y áreas celulares



**Nota.** Los gráficos de caja muestran la dispersión de los valores de perímetro (paneles 1-4) y área celular (paneles 5-8) de hepatocitos porcinos ( $n = 30$ ) para cuatro tratamientos de preservación y 10 días de experimentación. **F:** formaldehído al 4%. **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9%.

Figura 13

Morfometría comparada del área celular por días



*Nota.* Los gráficos de caja muestran la dispersión de los valores de área celular (paneles 0-10) de hepatocitos porcinos (n = 30) para cuatro tratamientos de preservación y 10 días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -). Letras iguales sobre las barras indican que no hubo diferencia estadística significativa, mientras que letras distintas indican diferencia significativa (valor-p ≤ 0.05).

**Tabla 9***Porcentaje de contracción del área celular*

Tiempo (días)	Contracción celular (%)				Valor-p MA - MB
	S	F	MA	MB	
0	0	0	0	0	0.95
1	(-) 1.16	6.31	27.17	39.12	0.001
2	54.75	8.02	38.14	42.07	0.24
3	61.92	(-) 5.49	37.77	44.6	0.04
4	67.08	(-) 4.2	44.68	45.23	0.84
5	69.23	2.89	50.33	46.43	0.20
6	78.76	3.5	54.4	47.42	0.03
7	80.2	7.12	56.45	52.58	0.16
8	81.39	(-) 1.85	59.95	60.18	0.81
9	84.59	(-) 2.11	60.43	62.61	0.40
10	85.05	9.87	71.82	63.34	1e-07

**Nota. 0 – 10:** Días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:**

miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -). El valor-p es resultante de la prueba de

Tukey (valor-p  $\leq$  0.05). Los valores con signo (-) representan un aumento porcentual en la medida

(Expansión).

En el día 0 de la experimentación, no se evidenció diferencias significativas entre ninguno de los cuatro tratamientos. Posteriormente, en general se pudo observar que los tratamientos de miel (MA y MB) y suero fisiológico (S) mostraron valores medios de área celular menores al del tratamiento de formaldehído (F) (Figura 12). Los tratamientos de miel (MA y MB) mostraron una tendencia similar a lo largo del experimento, aunque se pudo distinguir diferencias estadísticamente significativas en cuanto al área celular entre los tratamientos durante los días 1, 3, 6 y 10; mientras que en los días 2, 4, 5, 7, 8 y 9, el área celular se mantuvo invariable (Tabla 9; Figura 13).

Es así como se determinó las áreas celulares ( $n = 30$  hepatocitos) en el día 0 tuvieron una media de  $186.64 \mu\text{m}^2$  para MA,  $186.14 \mu\text{m}^2$  para MB,  $191.05 \mu\text{m}^2$  para F y  $189.65 \mu\text{m}^2$  para S. En el transcurso del tiempo se encontró que los dos tratamientos con miel de abeja presentaron una considerable contracción celular de los hepatocitos en los tratamientos MA de 27.17% con una media de  $135.94 \mu\text{m}^2$  y MB de 39.12% con una media de  $113.33 \mu\text{m}^2$  en el día 1. Llegando a contraerse aproximadamente a la

mitad de su tamaño en MA en un 50.33% con una media de  $92.71 \mu\text{m}^2$  y MB en un 46.43% con una media de  $99.73 \mu\text{m}^2$  en el día 5, sin diferencias significativas en la mayoría de los días.

Relacionado a los controles, el tratamiento con formaldehído demostró mantener la medida del área celular durante todos los días, presentando una media global de  $185.79 \mu\text{m}^2$  (Figura 12). En contraste, el tratamiento con suero fisiológico evidenció una severa contracción celular del 54.75% con una media de  $85.82 \mu\text{m}^2$  desde el día 2, hasta una contracción celular de 85.05% en el día 10 (Tabla 9).

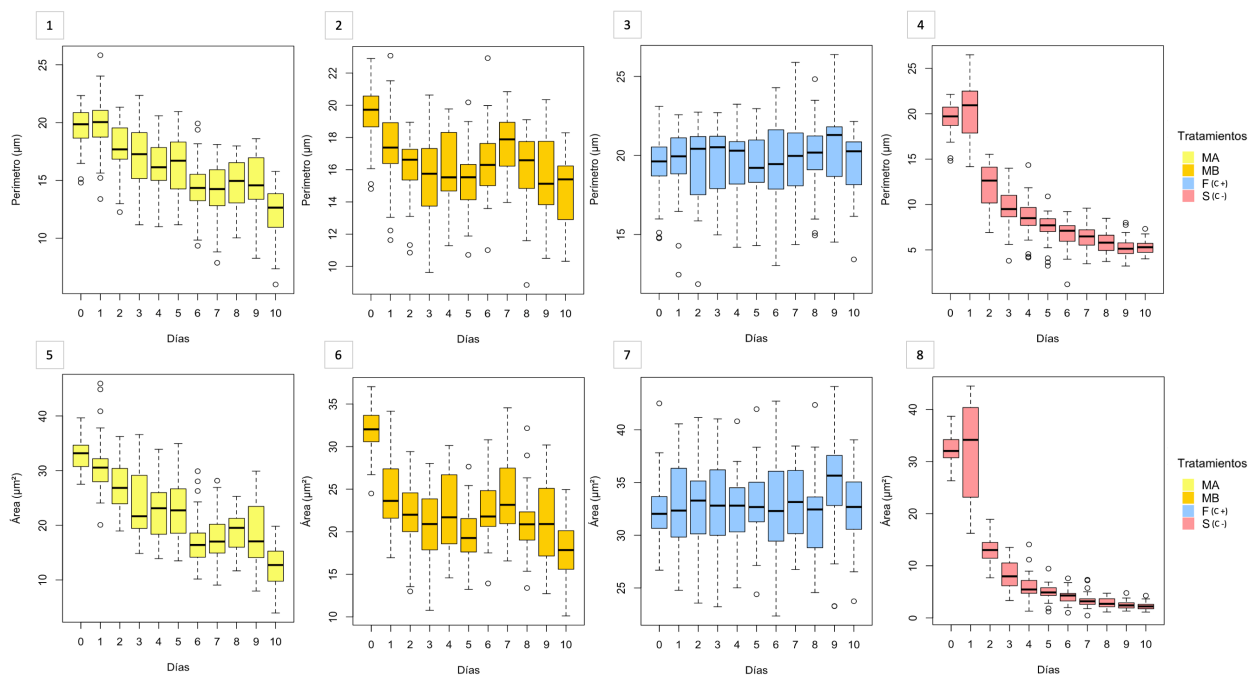
### ***Perímetro y área nuclear***

Los valores de perímetros y áreas nucleares pueden observarse en la Figura 14 y el porcentaje de contracción nuclear puede visualizarse en la Tabla 10. El coeficiente de correlación de Pearson mostró una correlación significativa entre el perímetro y el área nuclear para todos los tratamientos, con valores del coeficiente de 0.99 para el tratamiento MA, 0.97 para el tratamiento MB, 0.8 para el tratamiento F, y 0.99 para el tratamiento S. Consecuentemente los análisis comparativos se describen únicamente para los valores de las áreas nucleares (Figura 15), ya que esta variable representa y es una función del perímetro.



Figura 14

## Morfometría de los perímetros y áreas nucleares



*Nota.* Los gráficos de caja muestran la dispersión de los valores de perímetro (paneles 1-4) y área nuclear (paneles 5-8) de hepatocitos porcinos ( $n = 30$ ) para cuatro tratamientos de preservación y 10 días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).

**Tabla 10***Porcentaje de contracción del área nuclear*

Tiempo (días)	Contracción nuclear (%)				Valor-p MA - MB
	S	F	MA	MB	
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13
1	(+) 0.56	(-) 1.31	5.50	22.24	8.22e-05
2	59.05	(-) 1.15	18.17	31.41	3.9e-06
3	74.55	(-) 2.08	27.48	35.14	0.02
4	81.39	(-) 0.83	30.77	30.14	0.87
5	84.62	(-) 1.99	31.15	37.21	0.02
6	87.28	(-) 0.33	47.32	30.11	3.5e-05
7	89.45	(-) 2.20	46.25	23.99	7e-07
8	91.20	1.52	43.19	33.89	0.01
9	92.41	(-) 6.67	42.72	34.01	0.13
10	93.04	(-) 0.60	61.30	44.21	2.3e-06

*Nota. 0 – 10:* Días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:**

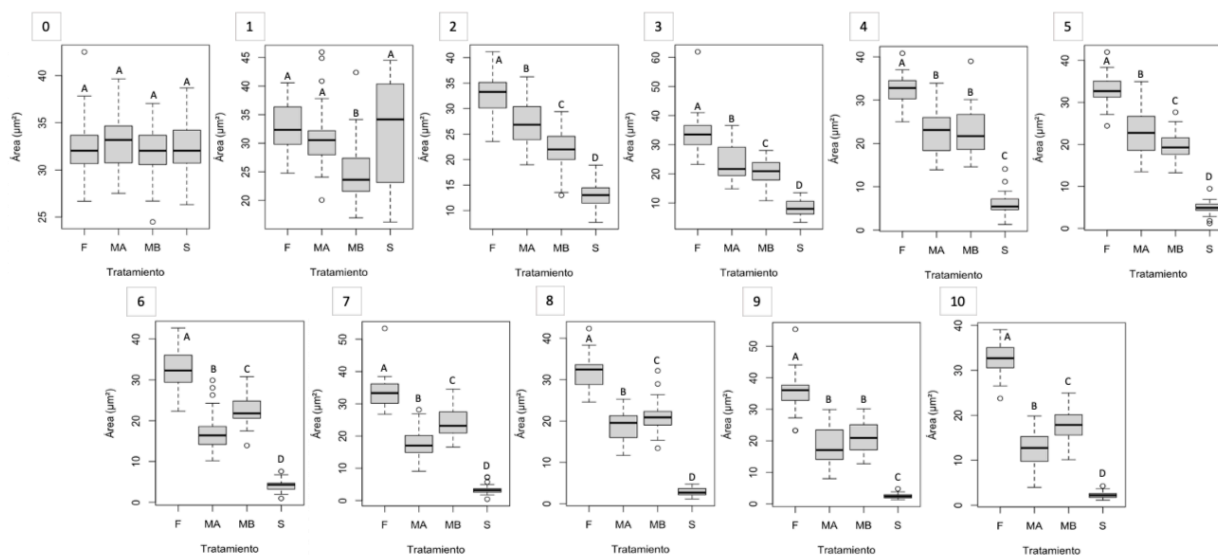
miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -). El valor-p es resultante de la prueba de

Tukey (valor-p  $\leq$  0.05). Los valores con signo (-) representan un aumento porcentual en la medida

(Expansión).

Figura 15

## Morfometría comparada del área nuclear por días



*Nota.* Los gráficos de caja muestran la dispersión de los valores de área nuclear (paneles 0-10) de hepatocitos porcinos ( $n = 30$ ) para cuatro tratamientos de preservación y 10 días de experimentación. **F:** formaldehído al 4% (control +). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -). Letras iguales sobre las barras indican que no hubo diferencia estadística significativa, mientras que letras distintas indican diferencia significativa (valor- $p \leq 0.05$ ).

En el día 0 no se evidenció diferencia significativa entre ninguno de los cuatro tratamientos. En el día 1 no hubo diferencia significativa entre las áreas de los tratamientos MA, F y S; no obstante, el tratamiento MB si fue diferente (Figura 15).

Particularmente, durante los días 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 10 se pudo evidenciar diferencias significativas entre las áreas nucleares de los tratamientos MA y MB (Tabla 10; Figura 15). Únicamente en los días 4 y 9 no se observaron diferencias significativas, entre las áreas nucleares de los tratamientos MA y MB. En concordancia con la contracción citoplasmática, a partir del día 1 al día 5, la contracción nuclear fue mayor en MB. Mientras, que desde el día 6 al día 10, la contracción nuclear fue mayor en MA (Tabla 10).

Las áreas nucleares en el día 0 tuvieron una media de  $32.87 \mu\text{m}^2$  para MA,  $31.79 \mu\text{m}^2$  para MB,  $32.34 \mu\text{m}^2$  para F y  $32.25 \mu\text{m}^2$  para S. En el transcurso del tiempo los dos tratamientos con miel de abeja presentaron una leve contracción nuclear de los hepatocitos en los tratamientos MA de 5.5% con una media de  $31.07 \mu\text{m}^2$  y MB de 22.24% con una media de  $24.73 \mu\text{m}^2$ , en el día 1. Llegando a contraerse casi a la mitad de su tamaño en MA en un 42.72% con una media de  $18.83 \mu\text{m}^2$  en el día 9 y MB en un 44.21% con una media de  $17.74 \mu\text{m}^2$  en el día 10, siendo significativamente diferentes en la mayoría de los días.

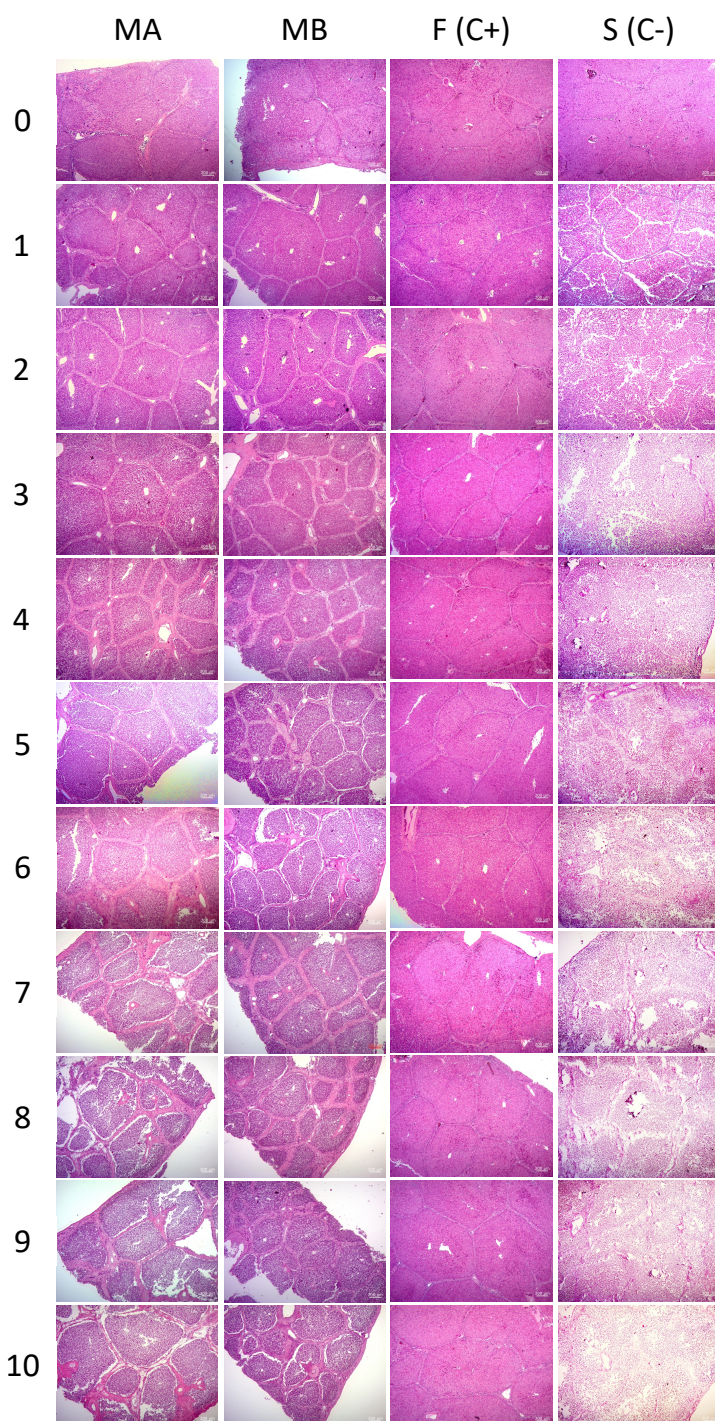
Respecto a los controles, el tratamiento con formaldehído demostró mantener la medida del área nuclear durante todos los días, presentando una media global de  $32.8 \mu\text{m}^2$  con un ligero hinchamiento nuclear de  $\pm 1.42 \mu\text{m}^2$  como se muestra en la Tabla 10. Por su parte el tratamiento con suero fisiológico evidenció una grave contracción nuclear del 59.05% con una media de  $13.21 \mu\text{m}^2$  desde el día 2 y máximo de 93.04%, como se describe en la Tabla 10.

### **Fotografías**

En las Figuras 16, 17, 18, 19 y 20, se muestran las fotografías de campos ópticos del tejido hepático porcino sometido a cuatro diferentes tratamientos con miel (MA y MB), formaldehído (F) y suero fisiológico (S), observados con un aumento de 4X (lobulillos), 10X (lobulillos), 40X (sinusoides), 40X (triadas portales) y 100X (hepatocitos), respectivamente. Las figuras muestran la progresión del estado del tejido en función de los tratamientos. Se puede notar como el tejido fue conservado en miel de abeja y mantiene la morfología de sus estructuras principales, como se describe en la sección de autólisis.

Figura 16

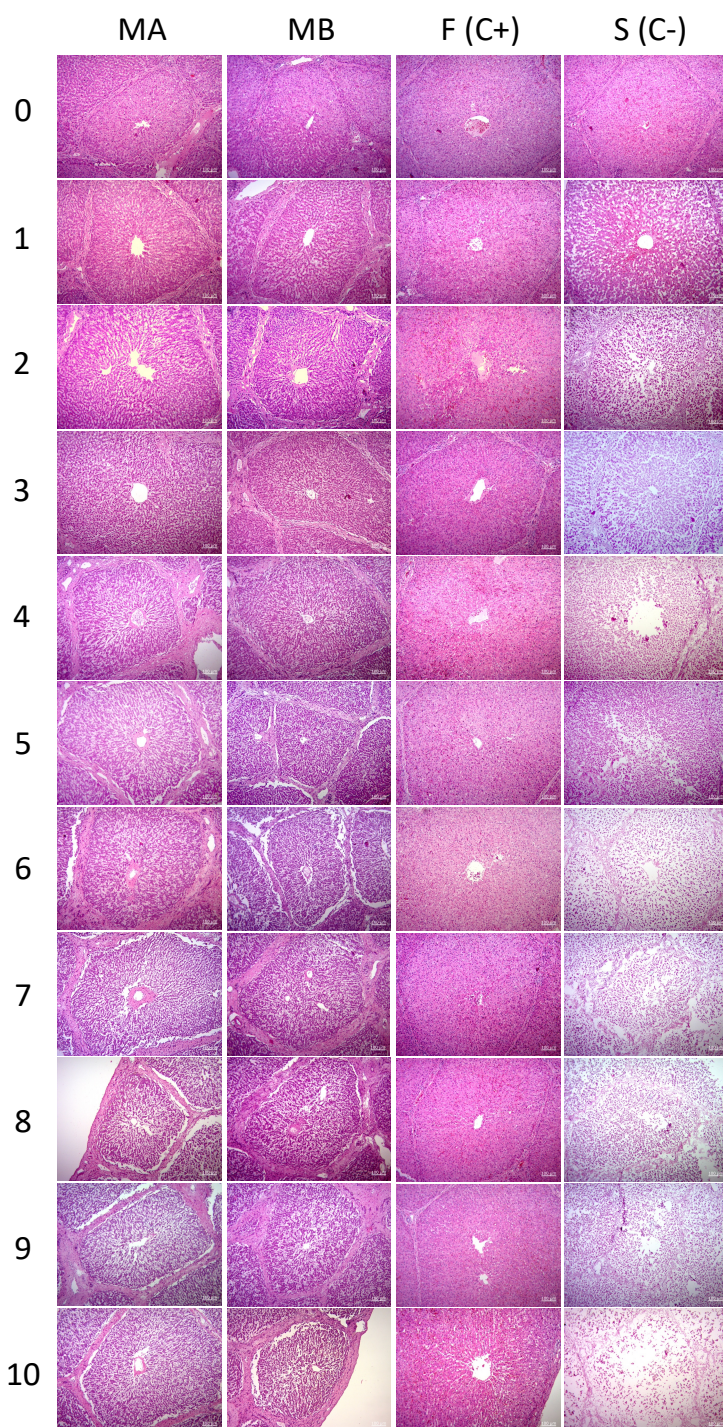
*Histología del tejido hepático porcino (4X)*



*Nota.* **0 – 10:** Tiempo (días). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **F:** formaldehído al 4% (control +). **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).

Figura 17

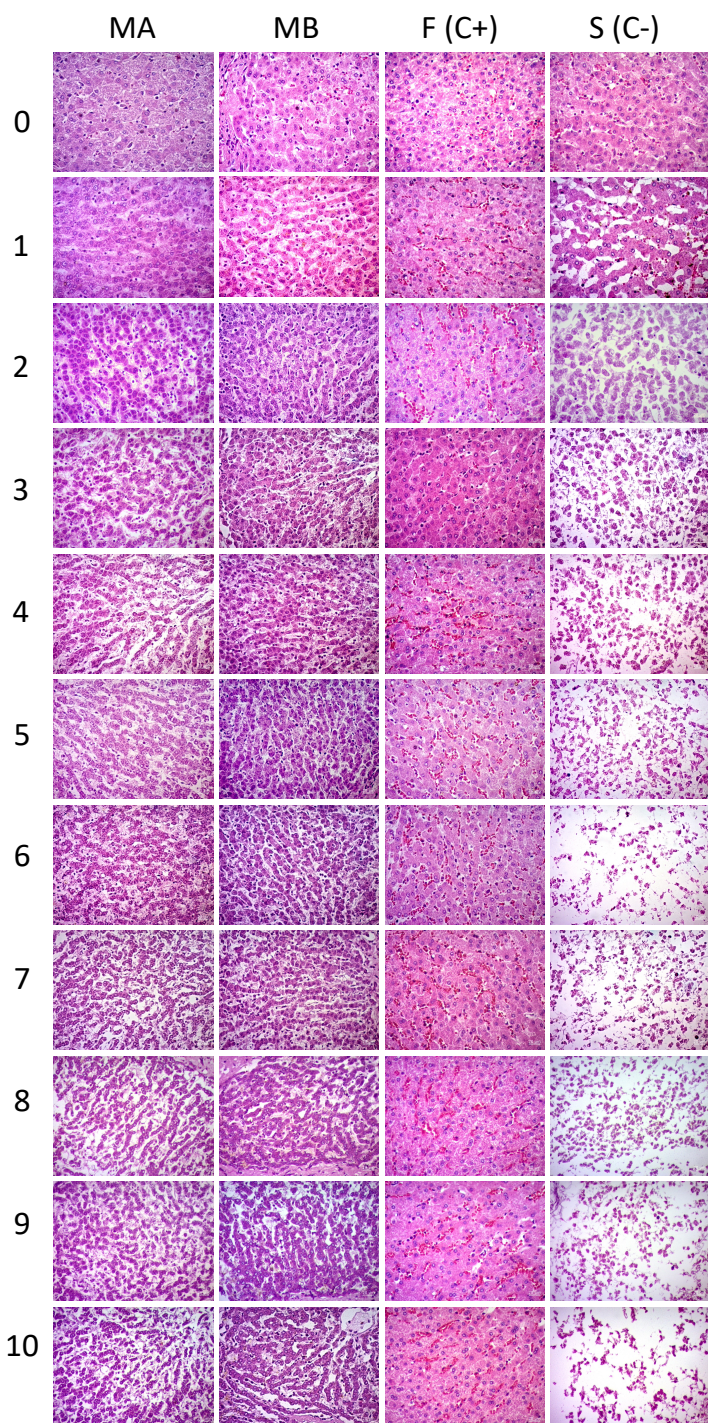
*Histología del tejido hepático porcino: lobulillos (10X)*



*Nota.* **0 – 10:** Tiempo (días). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **F:** formaldehído al 4% (control +). **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).

**Figura 18**

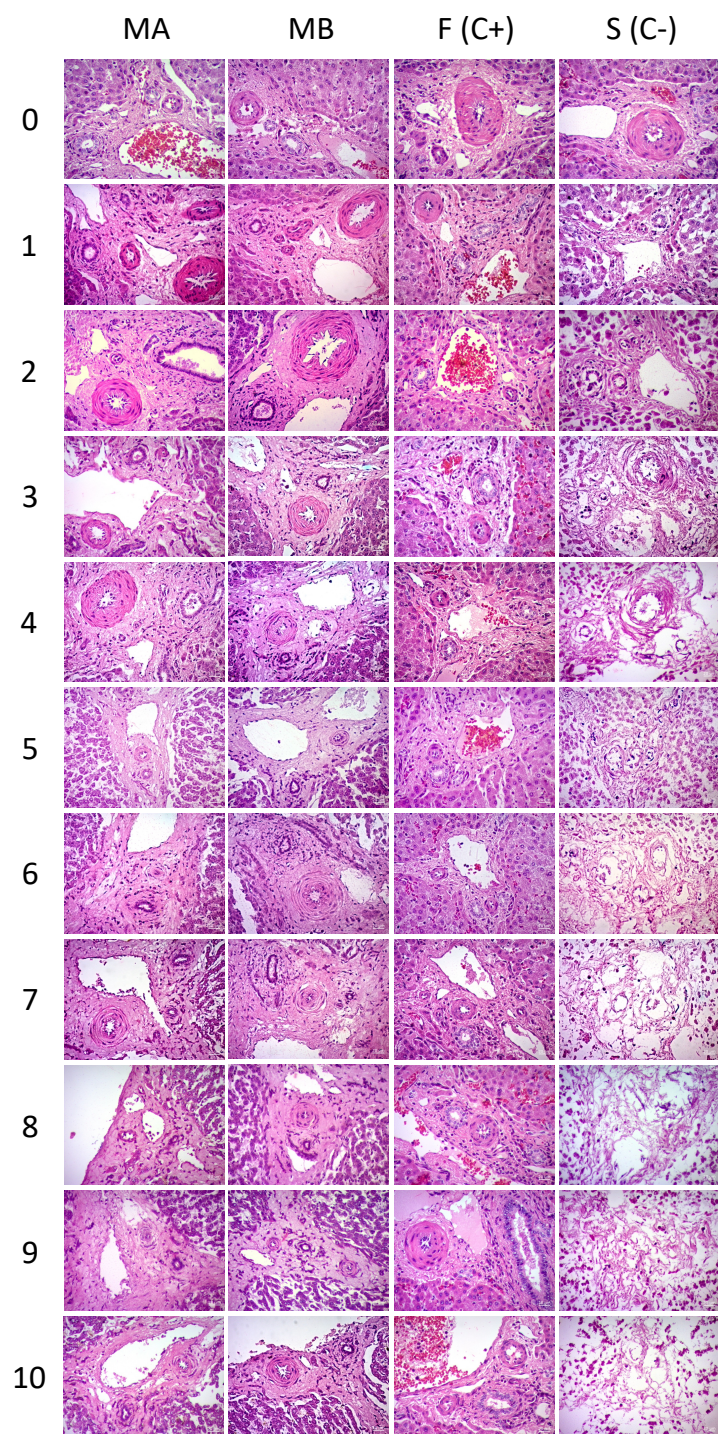
*Histología del tejido hepático porcino: sinusoides (40X)*



*Nota.* **0 – 10:** Tiempo (días). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **F:** formaldehído al 4% (control +). **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).

Figura 19

*Histología del tejido hepático porcino: triada portal (40X)*

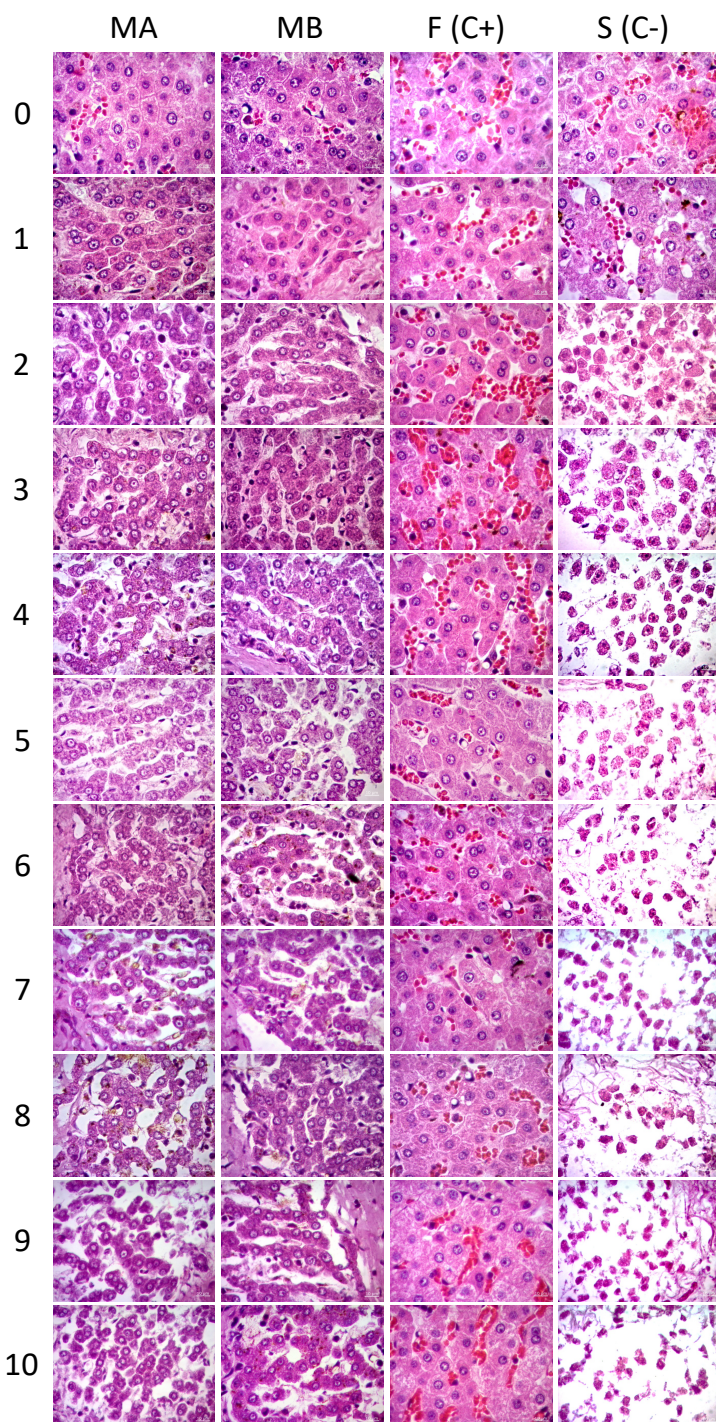


**Nota. 0 – 10:** Tiempo (días). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **F:** formaldehído al 4% (control +). **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).



Figura 20

*Histología del tejido hepático porcino: hepatocitos (100X)*



*Nota.* **0 – 10:** Tiempo (días). **MA:** miel de abeja al 10%. **MB:** miel de abeja al 20%. **F:** formaldehído al 4% (control +). **S:** suero fisiológico al 0.9% (control -).

## Capítulo V: Discusión

Este estudio es pionero en Ecuador en evaluar el efecto preservativo de la miel de abeja (*Apis mellifera*) en tejido hepático de cerdo (*Sus scrofa*) para potenciales aplicaciones histológicas. Diversos aspectos del estado tisular y celular de las muestras fueron evaluados durante el transcurso de 10 días. En este experimento se evaluaron dos tratamientos de miel (a concentraciones 10% y 20%) que fueron comparados con un control estándar de preservación (formaldehído al 10%) y un control que permitió observar la degradación natural del tejido (suero fisiológico). A continuación, se discuten los aspectos estudiados.

Este estudio permitió mantener la morfología celular, se encontró que los hepatocitos mostraron conservar la arquitectura celular en los tratamientos con miel de abeja hasta el día 7. Durante este periodo, no hubo diferencias significativas en el parámetro de aceptación (para citoplasma y núcleo) entre estos tratamientos con el de formaldehído (Figuras 5 y 6).

El detalle del citoplasma pudo ser identificado como aceptable hasta el día 7 en los tratamientos con miel de abeja, MA (concentración 10%) con un porcentaje del 86.67% y en el tratamiento MB (concentración 20%) con un 80%. Como esperado en los controles, el tratamiento con formaldehído (F) conservó el detalle de los citoplasmas con porcentajes superiores del 90% durante todo el experimento, pero el tratamiento con suero fisiológico (S) solo funcionó en un 70% hasta el día 2, luego de esto su detalle fue inaceptable debido a la degradación (Figura 5).

Respecto al detalle nuclear, este pudo ser identificado como aceptable hasta el día 9 en los tratamientos con miel de abeja, MA con un porcentaje del 80% y MB con un 76.67%. En tanto que, en los controles el tratamiento con formaldehído mantuvo valores de detalle nuclear superiores al 80% en todo el experimento; y en contraparte, el tratamiento S mostró un detalle nuclear leve que disminuyó del 70% considerablemente desde el día 1 (Figura 6).

El primer día de preservación de un tejido es de gran importancia ya que determina la finalización de los procesos biológicos del organismo fuente y el comienzo de procesos propios del compuesto conservante (difusión, resistencia a la autólisis e inactivación de microorganismo) (O'Dowd et al., 2020; Salguero & Pallarés, 2023; Suvarna et al., 2019). En investigaciones llevadas a cabo en hígado de rata (*Rattus rattus*) e hígado de cabra (*Capra hircus*) conservados en miel de abeja al 10% por 24 horas, se obtuvo excelentes resultados de detalle celular de los hepatocitos, diferenciándose claramente el contorno del citoplasma y del núcleo (Al-Maaini & Bryant, 2006, 2008). Estos resultados se afirman con otra investigación que utilizó hígado de rata conservado en miel de abeja al 10% por 24 horas a temperatura ambiente con detalles morfológicos de citoplasma y núcleo similares al formaldehído (Alwahaibi et al., 2022). Estas investigaciones concuerdan con los resultados del primer día de este estudio, mostrando que por este tiempo la miel es totalmente apropiada para la conservación inicial del tejido hepático por mínimo un día.

La mayoría de las investigaciones previas han probado la capacidad de conservación de la miel por no más de 24 horas. Este tiempo de estudio, relativamente corto, estuvo relacionado estos estudios buscaban comparar sus tratamientos de miel con formaldehído, utilizando fragmentos pequeños de tejidos. La fijación con formaldehído por lo general emplea de 24 a 48 horas según su coeficiente de difusión teórico, que se ha calculado es capaz de penetrar 1 mm/hora en los tejidos (Hopwood, 1969; Muddana et al., 2017). Adicionalmente a la preservación de tejido hepático, existen investigaciones que probaron la capacidad conservadora o fijadora de la miel, aplicada a otro tipo de tejidos como son endometrio, placenta, útero, estómago, pulmón, conservados en miel de abeja al 10% por 24 h. Estos estudios demostraron que el detalle de los citoplasma y el núcleo eran aceptables, sin una diferencia significativa entre la miel y el formaldehído (Al-Maaini & Bryant, 2008; Özkan et al., 2012).

Particularmente, algunas investigaciones han sido realizadas conservando tejido de mucosa oral de cabra conservada en miel al 20% (Patil et al., 2013) y mucosa oral de humanos (*Homo sapiens*)

conservados con miel de abeja al 10% por 24 horas (Sabarinath et al., 2014; Srii et al., 2017; Srii & Marla, 2016) obteniendo resultados satisfactorios y similares de detalle celular y nuclear comparables al formaldehído, destacando que la morfología celular es apropiada para el diagnóstico (Kuriachan et al., 2017; Lalwani et al., 2015)

En vista de esta limitación de tiempo en investigaciones previas, en el presente estudio se planteó alargar este tiempo a 10 días para determinar hasta que momento los tejidos conservados en miel de abeja pueden conservarse manteniendo su morfología y morfometría celular, logrando resultados satisfactorios hasta el séptimo día, como se mencionó previamente.

Los estudios que han aplicado miel de abeja por un tiempo más prolongado muestran que es posible conservar hígado de rata en miel pura, manteniendo su morfología celular y demostrando que la miel, aparte de tener propiedades antibióticas, es capaz de prevenir la autólisis hasta por 30 días (Avwioro et al., 2010). Este efecto también ha sido demostrado en mucosa de cabra conservada en miel de abeja al 20% hasta por 6 meses sin diferencia significativa con el formaldehído. Sin embargo, los autores destacan existió una pérdida del detalle celular tanto con la miel como con el formaldehído en los estadios finales (Patil, Rao, Agarwal, et al., 2015; Patil, Rao, Ganavi, et al., 2015). Estas aseveraciones mostraron que el tejido se conservó por un mayor tiempo, lo cual no es acorde con este estudio, donde se observó un tiempo menor de conservación.

Este estudio encontró que los hepatocitos en los tratamientos con miel de abeja lograron asimilar la coloración hematoxilina y eosina con una calidad de tinción muy buena para el citoplasma y el núcleo (Figuras 10 y 11). Específicamente la tinción de los citoplasmas de los hepatocitos pudo ser identificada como aceptable en los tratamientos con miel de abeja, MA y MB, ambos con un porcentaje sobre el 93.33% hasta el día 6. En los controles el tratamiento con formaldehído demostró una tinción de los citoplasmas aceptable con valores superiores al 93.33% durante todos los días. Al contrario, en el tratamiento con suero fisiológico, donde la tinción de los citoplasmas fue distinguible en un 66.67% solo hasta el día 2 (Figuras 10).

Por otro lado, la tinción de los núcleos de los hepatocitos pudo ser identificada como aceptable en los tratamientos con miel de abeja, MA con un valor de 83.33% y MB con 76.67% hasta el día 9 de la experimentación. Estos resultados fueron similares al tratamiento con formaldehído que demostró una tinción de los núcleos aceptable con valores superiores al 76.67% durante todo el experimento. En contraste, en el tratamiento con suero fisiológico, la tinción de los núcleos fue identificable en un 66.63% apenas hasta el día 1. (Figura 11). Estos resultados demuestran que el efecto de preservación de la miel es ligeramente más prolongado a nivel nuclear (9 días) que a nivel citoplasmático (6 días).

Todos las investigaciones realizadas hasta por 24 horas, recalcaron que los tejidos conservados en miel de abeja al 10% mostraron una buena calidad de tinción con hematoxilina y eosina de los citoplasmas y núcleos, similares al formaldehído (Al-Maaini & Bryant, 2008; Lalwani et al., 2015; Sabarinath et al., 2014; Srii & Marla, 2016; Thamilselvan et al., 2021). Pero en muchos casos la tinción nuclear fue mejor que la tinción de citoplasma, tal como se observó en este experimento. Esto ocurre debido a que los fijadores ácidos no favorecen la preservación de los constituyentes citoplasmáticos, pero son buenos fijadores nucleares (Alwahaibi et al., 2022; Muddana et al., 2017; Sabarinath et al., 2020).

Diversas investigaciones han analizado la posibilidad de utilizar otro tipo de tinciones en tejidos conservados con miel obteniendo buenos resultados, entre estas algunas de tipo histoquímicas como tinción de Gieson, Miller, tricromo Masson o Gomori, y técnicas inmunohistoquímicas como la tinción de vimentina, ki-67, citoqueratina, entre otras (Alwahaibi et al., 2021; Özkan et al., 2012; Ramamoorthy et al., 2016; Srii et al., 2017; Thamilselvan et al., 2021).

La autólisis es el proceso de digestión enzimática natural, espontánea y rápida de células y tejidos por la acción de sus propias enzimas al ser liberadas durante la muerte celular (Hyun et al., 2012). En cuanto a la morfología de los lobulillos hepáticos, se demostró una buena conservación de la estructura en el tratamiento de miel MB (concentración 20%) que mostró una autólisis tardía en un 20% en el día 5, llegando al 40% en el día 10. La autólisis de lobulillos fue ligeramente mayor en el tratamiento de miel MA (concentración 10%), donde la autólisis del lobulillo fue más evidente, pues inició con un 20% en el día 4, y llegó a 40% en el día 8 donde se mantuvo constante hasta el día 10 (Figura 7, 16 y 17).

Considerando la estructura de los sinusoides, en el tratamiento MB, la autólisis fue levemente más tardía, ya que inició con un 20% en el día 2, luego aumentó al 40% el día 6, y finalmente al 60% en el día 10. Mientras que el tratamiento con MA evidenció una autólisis más pronunciada que empezó con un 20% en el día 2, luego incrementó al 40% el día 4, y llegó a 60% en el día 7 donde se mantuvo constante hasta el día 10 (Figura 8 y 18).

Por último, tomando en cuenta la morfología de las triadas portales, en el tratamiento MB, la autólisis fue ligera, pues se evidenció con un 20% en el día 5 e incrementó al 40% en el día 10. Mientras que en el tratamiento MA, la autólisis fue más rápida empezando con un 20% en el día 2, y aumentó al 40% en el día 8 donde se mantuvo constante hasta el día 10 (Figura 9 y 19).

Concerniente a los controles, el tratamiento con formaldehído no evidenció autólisis de ninguna de las estructuras durante los 10 días, como esperado. En tanto que, el tratamiento con suero fisiológico

demostró una autólisis marcada, progresiva y acelerada de todas las estructuras hepáticas, llegando a la degradación completa de los lobulillos en el día 8, de los sinusoides en el día 4 y de las triada portal en el día 3. La comparación de los tratamientos con miel y los controles es evidente en las Figuras 16-20.

En una investigación forense realizada con hígados de humano (*Homo sapiens*) se pudo determinar los cambios que ocurren en el tejido relacionados a la autólisis (Ceciliason et al., 2021). En este estudio, se consideró el proceso de descomposición natural sin conservantes, y se logró establecer un sistema para cuantificar el grado de autólisis mediante una tabla descriptiva de calificaciones de los acontecimientos que ocurren durante la descomposición del hígado. En estos cambios progresivos se puede clasificar la pérdida de la morfología celular (Ceciliason et al., 2021)

En las investigaciones desarrolladas en hígado de rata y cabra conservados en miel de abeja al 10%, se menciona que algunas estructuras hepáticas (lobulillos, sinusoides y triadas portales) fueron claramente identificables durante las primeras 24 horas de preservación (Al-Maaini & Bryant, 2006, 2008), lo cual concuerda con este estudio para el primer día. Algunos autores han propuesto que las propiedades de la miel podrían detener los procesos de autólisis (Sabarinath et al., 2014, 2020). En este estudio, la autólisis empezó a observarse en los tratamientos con miel de manera más evidente desde los días 4-5 (Figura 7, 17, 18, 19). Esta fue evidenciada como una falta de fijación, momento en el cual algunas células empiezan a desaparecer, y se presenta contracción celular generando artefactos alrededor de las células (Carson & Hladik, 2009).

Cabe mencionar que los criterios histomorfológicos al ser cualitativos son de naturaleza subjetiva, limitando el análisis de los tejidos (Lalwani et al., 2015). Para observar cambios consistentes en los tejidos es necesario determinar la contracción mediante la técnica de morfometría asistida por un computador y un software para análisis de imágenes (Muddana et al., 2017). Esto permite superar las limitaciones de la naturaleza subjetiva de las variables cualitativas que provocan variabilidad por el observador. En la siguiente sección se discuten los resultados de análisis cuantitativos en este estudio (morfometría), los mismos que fueron conducidos para complementar los resultados cualitativos descritos anteriormente.

Se determinó las áreas celulares ( $n = 30$  hepatocitos) en cada tratamiento. En el transcurso del tiempo se encontró que los dos tratamientos con miel de abeja presentaron una considerable contracción celular de los hepatocitos en los tratamientos MA de 27.17% y MB de 39.12% con una en el día 1. Llegando a contraerse aproximadamente a la mitad de su tamaño en MA en un 50.33% y MB en un 46.43% en el día 5, sin diferencias significativas en la mayoría de los días.

Relacionado a los controles, el tratamiento con formaldehído (F) demostró mantener la medida del área celular durante todo el experimento. En contraste, el tratamiento con suero fisiológico (S) evidenció una severa contracción celular del 54.75% desde el día 2.

Se determinó las áreas nucleares ( $n = 30$  hepatocitos) en cada tratamiento. En el transcurso del tiempo los dos tratamientos con miel de abeja presentaron una leve contracción nuclear de los hepatocitos en los tratamientos MA de 5.5% y MB de 22.24% en el día 1. Llegando a contraerse casi a la mitad de su tamaño en MA en un 42.72% en el día 9 y MB en un 44.21% en el día 10, siendo significativamente diferentes en la mayoría de los días.

Respecto a los controles, el tratamiento con formaldehído (F) demostró mantener la medida del área nuclear durante todo el experimento. Por su parte el tratamiento con suero fisiológico (S) evidenció una grave contracción nuclear del 59.05% desde el día 2.



En la única investigación que aplicó morfometría de diversos tejidos orales de humanos no especificados conservados en miel de abeja al 10% por 24 horas, encontraron que con la miel se produce menor contracción celular (Muddana et al., 2017). En contraste, en el presente estudio donde se encontró que los tratamientos con miel de abeja sufrieron mayor contracción celular de los hepatocitos al final del primer día. Adicionalmente los autores mencionan que la contracción del tejido siempre va a ser evidente, porque este efecto es atribuido a la osmolaridad de la miel (Udonkang et al., 2018).

Los autores explican la capacidad de conservación de la miel por diversos factores. La miel de abeja concentrada posee diversos amino-ácidos y ácidos orgánicos que le brindan a la miel un pH aproximado de entre 4.0; esta acidez particularmente inhibe el crecimiento bacteriano (Albaridi, 2019; Al-Maaini & Bryant, 2006).

Al diluir la miel, aumenta el pH a aproximadamente 5.5 y la enzima glucosa oxidasa, que es uno de sus componentes, aumenta su actividad oxidando la glucosa y generando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno que proporcionan a la miel propiedades antibacterianas (Kuriachan et al., 2017; Özkan et al., 2012), protegiendo al tejido del daño celular de la putrefacción (Lalwani et al., 2015). El ácido glucónico es un ácido orgánico débil, no corrosivo, poco irritante, inodoro, no tóxico, biodegradable y no volátil (Srii et al., 2017). Este compuesto está normalizado por la FDA (Food and drug administration) de los Estados Unidos y se utiliza en la industria alimenticia, de higiene y farmacéutica como conservante. Se ha reportado que en la miel puede encontrarse una concentración de ácido glucónico de aproximadamente el 1% (Ramachandran et al., 2006).

Con respecto al efecto osmótico de la miel solución, en la miel concentrada la osmolaridad es muy alta y produce contracción excesiva de los tejidos por liberación de agua, mientras que la miel diluida es menos hipertónica y no produce cambios aparentes en los tejidos, pero contribuye a la inhibición bacteriana (Al-Maaini & Bryant, 2008; Srii et al., 2017; Srii & Marla, 2016).

La miel de abeja contiene fructosa y glucosa, mismas que a pH ácido, exposición al calor o un excesivo tiempo de almacenamiento se descomponen produciendo aldehídos. Se ha reportado en la miel la presencia de un conjunto de compuestos que se denominan como el índice furánico y que está conformado por el 2-furaldehído, ácido 2-furóico, 3-furaldehído y el ácido 3-furóico (Salis et al., 2021), y el de mayor importancia el 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) (Al-Maaini & Bryant, 2008; Alwahaibi et al., 2022; Fallico et al., 2008). Estos aldehídos posiblemente podrían formar enlaces cruzados con las proteínas y ácidos nucleicos de los tejidos en un proceso similar a la fijación con formaldehído (Bhattacharyya et al., 2018; Gunter & Bryant, 2009; Pandiar et al., 2017; Patil et al., 2013; Sabarinath et al., 2014; Srii et al., 2017). La presencia de estos aldehídos podría ser la razón de que los tejidos se conserven o fijen de igual manera a como pasa con el formaldehído.

El hidroximetilfurfural (HMF) en particular es un compuesto orgánico común, presente en bajas concentraciones en muchos alimentos ricos en carbohidratos como el pan, café, bebidas alcohólicas y la miel exponiendo a la población humana a un consumo incidental (Husøy et al., 2008; Shapla et al., 2018). En concentraciones bajas, este compuesto no presenta riesgos significativos para la salud si se tiene contacto con la piel, sin embargo, cabe mencionar que, si se ingieren productos con HMF en cantidades significativas, la enzimas sulfotransferasas de nuestro cuerpo catalizan la transformación del HMF en el metabolito 5-sulfoximetil-2-furfural que si muestra efectos carcinogénicos, genotóxicos y citotóxicos en humanos (IARC, 2019).

Estudios realizados en Ecuador, analizaron diversos tipos de mieles comerciales que pueden encontrarse en supermercados locales con el fin de evaluar la presencia de HMF mediante el método de espectrofotometría. En Quito se analizó cinco mieles y se encontró los valores que van de 3.01 a 18.64 mg HMF/kg de miel (Velásquez & Goetschel, 2019). En Guayaquil, se analizó cinco mieles de abeja comerciales y se encontró valores promedios que oscilan entre 0,283 – 1,48 mg HMF/kg de miel (Jiménez, 2016), y en Babahoyo tras analizar tres tipos de mieles, donde se encontró valores de 0.76 a

1.75 mg HMF/kg de miel (Salazar et al., 2023). Estos valores son bajos y cumplen la normativa NTE INEN 1572 para el consumo humano, pero primordialmente son importantes para este estudio como evidencia de que el HMF está presente en la miel de abeja y podría como aldehído formar enlaces cruzados en las proteínas y ácidos nucleicos de los tejidos, representando uno de los factores que ayudan en la conservación de los tejidos de manera similar a como lo hace formaldehído.

La solución de formaldehído es el fijador más utilizado para la conservar de tejidos en histología (Salguero & Pallarés, 2023), con una historia de uso científico de más de 100 años. Dadas sus altas propiedades preservantes, no ha podido ser reemplazado en su totalidad (Patil et al., 2013). El formaldehído está prohibido en la Unión Europea desde el 2016, a pesar de que la sociedad europea de patología y la Unión Europea de médicos especialistas se encuentran en desacuerdo, puesto que estas políticas impiden su trabajo. Estos gremios mencionaron que este compuesto es indispensable para su trabajo y aún no se ha identificado una alternativa de igual eficacia (EMO & UEMS, 2018). A nivel internacional el formaldehído está considerado como un agente de alto potencial cancerígeno y altamente genotóxico y sensibilizante para quien lo manipula (IARC, 2012). Considerando además que inhabilita la posibilidad de realizar pruebas moleculares en los tejidos puesto que genera daños irreversible en los ácidos nucleicos (Özkan et al., 2012).

En el Ecuador no existen políticas tan rigurosas, siendo permisible el uso del formaldehído con una debida normalización (ARCSA, 2020). Sin embargo, se sugiere que en países en desarrollo el uso de este compuesto debería terminar, considerando que la aplicación de la bioseguridad y los sistemas de gestión de residuos aún presentan falencias (Srii et al., 2017; Srii & Marla, 2016).

Por ello, es indispensable la búsqueda continua de alternativas y compuestos naturales que puedan sustituir o por lo menos disminuir las emisiones de formaldehído que se utilizan en el trabajo rutinario. Considerando en primer lugar las salud de los trabajadores que están directa o indirectamente expuestos (Alwahaibi et al., 2021), luego la fiabilidad de los resultados de los diagnósticos y, por último,

pero no menos importante la contaminación al medio ambiente. En consideración de estas problemáticas y los peligros a la salud, la miel de abeja constituye una alternativa natural y biotecnológica como conservante de tejidos, misma que es recomendada por diversos autores, que promueven a los científicos a realizar más experimentos con esta opción para lograr crear un cuerpo de literatura sólido que permita disminuir o erradicar el uso del formaldehído en la histología (Alwahaibi et al., 2022; Bhattacharyya et al., 2018; Srii et al., 2017).

El objetivo de la fijación es preservar el tejido, prevenir la putrefacción y la autólisis (Suvarna et al., 2019), en este sentido la miel es un buen conservante que podría llegar a ser considerado un agente fijador debido a sus propiedades. En este estudio se pudo determinar que los parámetros de arquitectura, autólisis, tinción y contracción celular de tejido hepático porcino fueron aceptables hasta el día 6 del experimento, y así la miel de abeja puede ser utilizada como agente preservante durante este periodo de tiempo.

Utilizar miel de abeja trae beneficios en la preservación de tejidos, no tiene riesgos para la salud, es compatible con el procesamiento rutinario en laboratorios y con diversas técnicas de tinción, y no requiere equipos adicionales (Alwahaibi et al., 2022). Adicionalmente, la miel de abeja constituye un sustituto natural, fácilmente accesible y económico (Muddana et al., 2017). De esta manera, obtener un buen rendimiento en la conservación de tejidos con miel de abeja constituye un hito en el avance del campo de la histología (Patil, Rao, Ganavi, et al., 2015). Los autores recomiendan el uso de la miel de abeja como un conservante efectivo de tejidos natural, económico, fácil de conseguir, no tóxico, no inflamable, no alergénico y eco amigable (Lalwani et al., 2015; Patil et al., 2013; Srii et al., 2017).

La miel de abeja a bajas concentraciones y temperatura ambiente proporciona resultados similares al formaldehído, constituyendo una alternativa segura y aceptable (Al-Maaini & Bryant, 2008). Además puede funcionar como una alternativa para el trabajo y transporte en campo o en clínicas como alternativa al formaldehído ante su desconocimiento, ausencia y riesgos de uso (Bhattacharyya et al.,

2018; Patil, Rao, Agarwal, et al., 2015). Esta aplicación puede ser utilizada en laboratorios de histología e histopatología, extendiéndose hasta especímenes de museos y departamentos forenses sin perder la calidad de los estudios (Muddana et al., 2017; Sharquie & Najim, 2004).

Se ha recomendado que los residuos generados con miel de abeja al no ser tóxicos pueden ser desechados en la alcantarilla como desecho común (Muddana et al., 2017), lo cual disminuiría las emisiones tóxicas del formaldehído y gastos en la gestión de residuos, sin embargo, es necesario llevar a cabo un estudio adicional de la demanda bioquímica de oxígeno y compararlo con los límites permisibles de la normativa ecuatoriana para poder realizar este proceso.

Como desventajas de esta aplicación en este estudio se evidenció la presencia de moho en el tratamiento con miel al 10% a partir del día 8. Esto se corrobora en algunos estudios donde se menciona que una desventaja de utilizar miel de abeja es la posible aparición de moho y fermentación (Bhattacharyya et al., 2018), mismos que pueden ser contrarrestados con la adición de cristales de timol y la utilización de recipientes estériles (Al-Maaini & Bryant, 2008; Patil et al., 2013). Esta desventaja, combinada con el hecho que el desempeño de la miel como preservante de tejido empieza a declinar desde el día 6, sugiere que la miel tiene su mayor beneficio en los primeros días de preservación, pero no puede ser usada como preservante de largo tiempo. Sin embargo, estos primeros días pueden resultar sumamente útiles para preservar y transportar muestras recientemente tomadas.

Cabe mencionar algunas limitaciones técnicas de este estudio. No se evaluó la preservación de fragmentos grandes de tejido puesto que no se dispuso de un espacio grande de almacenamiento, y así, la velocidad de penetración de la miel en este tipo de fragmentos es desconocida. No se estudió otro tipo de tejidos debido a que la cantidad de procesamientos y análisis no es factible en el tiempo de desarrollo de la investigación.

Solo se evaluó un método de tinción, que es el más utilizado; aunque existen diversos métodos de tinciones en el mercado. Con respecto a las propiedades de la miel utilizada, no se realizaron pruebas de medición del HMF. No se aplicaron pruebas de la demanda bioquímica de oxígeno para determinar si el desecho de las soluciones de miel abeja cumplen los límites de descarga en alcantarillado después de su uso. No se realizaron pruebas moleculares para determinar la integridad de ADN y ARN de los tejidos preservados.

Sin embargo, adicional a los costos que hubiera contemplado usar métodos adicionales y un mayor tiempo de análisis, agregar más variables al experimento podría haber resultado contraproducente dentro del diseño experimental de este estudio. Evaluaciones de estas pruebas son recomendadas en futuros estudios que utilicen miel de abeja como agente preservante de tejidos.

## Capítulo VI: Conclusiones

En la valoración de los criterios histomorfológicos, el tejido hepático porcino conservado en los tratamientos con miel de abeja al 10% (MA) y 20% (MB), evidenció tener en conjunto una arquitectura celular de los hepatocitos con detalles celulares identificables, autólisis lenta con estructuras hepáticas moderadamente distinguibles y una calidad excelente de la tinción H/E en los hepatocitos hasta el día 6 de la experimentación con resultados similares al formaldehído.

La determinación de la contracción celular de los hepatocitos conservados con miel de abeja al 10% (MA) y 20% (MB) mediante morfometría celular computarizada, encontró que el área celular se contrajo moderada y progresivamente sin diferencias entre sí durante la mayoría de los días. Y con respecto al área nuclear, se evidenció una contracción nuclear lenta y progresiva, con diferencias entre MA y MB en la mayoría de los días. La menor contracción nuclear se evidenció con el tratamiento MB. Estos resultados no fueron comparables al tratamiento con formaldehído.

En conjunto, todos los aspectos valorados demuestran que la miel de abeja puede ser utilizada como un medio conservante alternativo al formaldehído, deteniendo la autólisis y conservando la arquitectura celular con una excelente tinción de H/E hasta por 6 días. Sin embargo, la morfometría celular demostró que para este día los hepatocitos se reducen por contracción celular a la mitad de su tamaño. Este aspecto recalca que, los tiempos de preservación menores a 6 días, conservan de mejor manera las características morfológicas y morfométricas del tejido hepático porcino.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Realizar ensayos con la miel de abeja, sometiéndola a diferentes temperaturas, tiempos de almacenamiento y pH, para cuantificar la concentración de HMF. Posteriormente diseñar experimentos que utilicen y comparen estas mieles en la conservación de tejidos para histología.

Realizar pruebas histológicas con otros tipos de tejidos (sanos, patológicos, pequeños y grandes) para valorar la efectividad de conservación de la miel de abeja.

Aplicar otros métodos de tinción con el fin de estudiar características específicas de los tejidos.

Realizar análisis de la demanda bioquímica de oxígeno para determinar si los desechos líquidos generados con miel de abeja cumplen los límites de descarga en alcantarillado. Lo podría disminuiría las emisiones contaminantes al medio ambiente, así como los costos de gestión de residuos tóxicos.

Aplicar pruebas moleculares en tejidos conservados con miel de abeja para determinar la integridad del ADN y ARN, lo cual demostraría su viabilidad.



## Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2018). *Cellular and molecular immunology* (Ninth edition). Elsevier. <https://evolve.elsevier.com/cs/product/9780323479783?role=student>
- Albaridi, N. A. (2019). Antibacterial Potency of Honey. *International Journal of Microbiology*, 2019(1), 1-10. <https://doi.org/10.1155/2019/2464507>
- Al-Maaini, R. & Bryant, P. (2006). The Effectiveness of Honey as a Substitute for Formalin in the Histological Fixation of Tissue. *The Journal of Histotechnology*, 29(3), 173-176. <https://doi.org/10.1179/his.2006.29.3.173>
- Al-Maaini, R. & Bryant, P. (2008). Honey as an Alternative to Formalin in the Demonstration of Connective Tissue Components. *The Journal of Histotechnology*, 31(2), 67-72. <https://doi.org/10.1179/014788808794748421>
- Altamirano, Z. & Montero, M. (2015). *Desarrollo de un atlas interactivo de la histología del cerdo, como soporte en el aprendizaje de la morfología animal* [Tesis de maestría, PUCE]. Repositorio PUCE. <https://repositorio.pucesa.edu.ec/handle/123456789/1369>
- Álvarez, J. (2016). *Estudio de las propiedades fisicoquímicas y biológicas en cinco mieles de abeja (Apis mellifera) distribuidas en la red de supermercados del distrito metropolitano de Quito* [Tesis de pregrado, UPS]. Repositorio Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13532>
- Alwahaibi, N., Al Dhahli, B., Al Issaei, H., Al Wahaibi, L. & Al Sinawi, S. (2021). Efficiency of neutral honey as a tissue fixative in histopathology. *bioRxiv*, 1(4), 1-25. <https://doi.org/10.1101/2021.04.27.437988>
- Alwahaibi, N., Al Dhahli, B., Al Issaei, H., Al Wahaibi, L. & Al Sinawi, S. (2022). Effectiveness of neutral honey as a tissue fixative in histopathology. *F1000Research*, 11(1014), 1-14. <https://doi.org/10.12688/f1000research.122598.1>

- ARCSA. (2020). *Instructivo externo criterios para la categorización del riesgo sanitario de productos de higiene doméstica e industrial para sistemas de control y vigilancia sanitaria*. Agencia nacional de regulación, control y vigilancia sanitaria. <https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2020/06/IE-B.2.2.3-PHDI-01-Criterios-para-categorización-del-riesgo-sanitario-de-productos-de-higiene-domestica-e-industrial-para-sistemas-de-control-y-vigilancia-sanitaria.pdf>
- Aspinall, V., Cappello, M. & Phillips, C. (Eds.). (2020). *Introduction to animal and veterinary anatomy and physiology* (4.<sup>a</sup> ed.). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781789241150.0000>
- ATSDR. (2022). *Resúmenes de Salud Pública—Formaldehído (Formaldehyde)* (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades). [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs111.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs111.html)
- Avwioro, G., Bankole, J., Iyiola, S., Avwioro, T. & Akinola, G. (2010). *One of the Properties of Honey in Wound Healing Is Prevention of Autolysis*. 2(3), 321-325. [semanticscholar.org/paper/One-of-the-Properties-of-Honey-in-Wound-Healing-Is-Avwioro-Bankole/ed562c29d7f79d289937c20b37395aa7d9670ae3](https://www.semanticscholar.org/paper/One-of-the-Properties-of-Honey-in-Wound-Healing-Is-Avwioro-Bankole/ed562c29d7f79d289937c20b37395aa7d9670ae3)
- Beltrán, A., Debut, A., Vaca, A., Ortiz, J. & Proaño, F. (2017). Processing and characterization of canine mixed mammary tumor using transmission electron microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 80(11), 1229-1233. <https://doi.org/10.1002/jemt.22921>
- Bhakuni, V. (1998). Alcohol-Induced Molten Globule Intermediates of Proteins: Are They Real Folding Intermediates or Off Pathway Products? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 357(2), 274-284. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0794>
- Bhattacharyya, A., Gupta, B., Singh, A., Sah, K. & Gupta, V. (2018). Probing natural substitute for formalin: Comparing honey, sugar, and jaggery syrup as fixatives. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 9(1), 14-21. [https://doi.org/10.4103/njms.NJMS\\_57\\_17](https://doi.org/10.4103/njms.NJMS_57_17)
- Bogdanov, S. (2016). Book of Honey. *Bee Product Science*, 1(1), 6.

- [https://www.researchgate.net/publication/304011775\\_Honey\\_Composition](https://www.researchgate.net/publication/304011775_Honey_Composition)
- Boon, M. E. & Kok, L. P. (1994). Microwaves for immunohistochemistry. *Micron*, 25(2), 151-170.  
[https://doi.org/10.1016/0968-4328\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0968-4328(94)90040-X)
- Cambridge University Press. (2023). *Microscopy*. Cambridge dictionary.  
<https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/microscopy>
- Carrillo Parra, E. R., Rojas Oviedo, L. A. & Novoa Abdo., T. E. (2021). Determinación de la demanda insatisfecha de miel de abeja en el cantón morona, provincia de Morona Santiago. *ConcienciaDigital*, 4(3.1), 381-404. <https://doi.org/10.33262/concienciadigital.v4i3.2.1845>
- Carson, F. & Hladik, C. (2009). *Histotechnology A Self-Instructional Text* (3rd ed.). American Society for Clinical Pathology Press. <http://ebooks.ascp.org/product/histotechnology-selfinstructional-text>
- Ceciliason, A., Andersson, M., Nyberg, S. & Sandler, H. (2021). Histological quantification of decomposed human livers: A potential aid for estimation of the post-mortem interval. *International Journal of Legal Medicine*, 135(1), 253-267. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02467-x>
- Choca, A. & Menoscal, W. (2020). *La producción de miel de abeja en la Provincia del Guayas como estrategia para mejorar las condiciones de vida de la población rural* [Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil].  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/54779/1/CHOCA%20RUIZ%20AGUSTÍN%20%20Y%20%20MENOSCAL%20SANTANA%20WILLIAM.pdf>
- D'Angelo, L., Lossi, L., Merighi, A. & De Girolamo, P. (2016). Anatomical features for the adequate choice of experimental animal models in biomedicine: I. Fishes. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 20(5), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.02.001>
- Dapson, R. W. (1993). Fixation for the 1990's: A Review of Needs and Accomplishments. *Biotechnic & Histochemistry*, 68(2), 75-82. <https://doi.org/10.3109/10520299309104670>
- Ekataksin, W. & Wake, K. (1991). Liver units in three dimensions: I. organization of argyrophilic

- connective tissue skeleton in porcine Liver with particular reference to the "compound hepatic lobule" *American Journal of Anatomy*, 191(2), 113-153. <https://doi.org/10.1002/aja.1001910202>
- El-Soud, N. (2012). Honey between Traditional Uses and Recent Medicine. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 1(1), 1-10. <https://doi.org/doi:10.3889/MJMS.1857-5773.2012.0213>
- Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R. B. & Grizzle, W. E. (2001). Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *Journal of Histotechnology*, 24(3), 173-190. <https://doi.org/10.1179/his.2001.24.3.173>
- EMO & UEMS. (2018). *Joint Statement EMOs – Use of Formaldehyde*. EMO & UEMS. [https://www.uems.eu/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0007/74851/Joint-statement-on-use-of-Formaldehyde-SEPT-2017.pdf](https://www.uems.eu/__data/assets/pdf_file/0007/74851/Joint-statement-on-use-of-Formaldehyde-SEPT-2017.pdf)
- Emsen, I. M. (2007). A different and safe method of split thickness skin graft fixation: Medical honey application. *Elsevier: Burns*, 33(6), 782-787. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.12.005>
- Fallico, B., Arena, E. & Zappala, M. (2008). Degradation of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey. *Journal of Food Science*, 73(9), 625-631. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00946.x>
- FAO & OMS. (2019). *Codex Alimentarius International Food Standards: Standard for Honey CXS 12-1981*. FAO & OMS. [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS\\_012e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf)
- Ferrell, L. (2000). Liver Pathology: Cirrhosis, Hepatitis, and Primary Liver Tumors. Update and Diagnostic Problems. *Modern Pathology*, 13(6), 679-704. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880119>
- Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J. & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(8), 845-853. <https://doi.org/10.1177/33.8.3894502>
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J. G., Bolleyn, J., Borner, C., Böttger, J., Braeuning, A., Budinsky, R. A., Burkhardt, B., Cameron, N. R., Camussi, G.,

- Cho, C.-S., Choi, Y.-J., Craig Rowlands, J., Dahmen, U., ... Hengstler, J. G. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of Toxicology*, *87*(8), 1315-1530. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>
- Grizzle, Stockard, C. & Billings, P. (2001). The Effects of Tissue Processing Variables Other Than Fixation on Histochemical Staining and Immunohistochemical Detection of Antigens. *Journal of Histotechnology*, *24*(3), 213-219. <https://doi.org/10.1179/his.2001.24.3.213>
- Grizzle, W. (1996). Theory and Practice of Silver Staining in Histopathology. *Journal of Histotechnology*, *19*(3), 183-195. <https://doi.org/10.1179/his.1996.19.3.183>
- Guaico, L., Villavicencio, L., Araujo, S., Sánchez, M. E., Paz, W., Oviedo, M. & Paz, C. (2013). Evaluación genotóxica en individuos expuestos al formaldehído en los departamentos médicos legales de la Policía Judicial del Ecuador. *Revista Facultad Ciencias Médicas*, *38*(1-2), 44-49. [https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS\\_MEDICAS/article/view/1114](https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/1114)
- Gunter, M. & Bryant, P. (2009). Immunocytochemical Evaluation of Ductal Carcinoma in Breast after Preservation in Honey. *Journal of Histotechnology*, *32*(2), 54-59. <https://doi.org/10.1179/his.2009.32.2.54>
- Gurina, T. & Simms, L. (2022). Histology, Staining. En *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557663/?report=classic>
- Hegazi, A., Al Guthami, F. M. & Al Gethami, A. F. M. (2018). Physiochemical Analysis of Some Saudi Arabia Honey. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(2), 1441-1448. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.174>
- Heydari, Z., Najimi, M., Mirzaei, H., Shpichka, A., Ruoss, M., Farzaneh, Z., Montazeri, L., Piryaeei, A., Timashev, P., Gramignoli, R., Nussler, A., Baharvand, H. & Vosough, M. (2020). Tissue

- Engineering in Liver Regenerative Medicine: Insights into Novel Translational Technologies. *Cells*, 9(2), 1-28. <https://doi.org/10.3390/cells9020304>
- Hoffman, E. A., Frey, B. L., Smith, L. M. & Auble, D. T. (2015). Formaldehyde Crosslinking: A Tool for the Study of Chromatin Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(44), 26404-26411. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.651679>
- Hopwood, D. (1969). Fixatives and fixation: A review. *The Histochemical Journal*, 1(4), 323-360. <https://doi.org/10.1007/BF01003278>
- Hopwood, D. (1985). Cell and tissue fixation, 1972-1982. *The Histochemical Journal*, 17(4), 389-442. <https://doi.org/10.1007/BF01003203>
- Husoy, T., Haugen, M., Murkovic, M., Jöbstl, D., Stølen, L. H., Bjellaas, T., Rønningborg, C., Glatt, H. & Alexander, J. (2008). Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3697-3702. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.048>
- Hussein, S. Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S. & Mohd Yusof, Y. A. (2012). Gelam Honey Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators NO, PGE 2, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in Carrageenan-Induced Acute Paw Edema in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(1), 1-13. <https://doi.org/10.1155/2012/109636>
- Hyun, J. J., Chun, H. J., Keum, B., Seo, Y. S., Kim, Y. S., Jeon, Y. T., Lee, H. S., Um, S. H., Kim, C. D., Ryu, H. S. & Chae, Y.-S. (2012). Autolysis: A Plausible Finding Suggestive of Long ESD Procedure Time. *Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques*, 22(2), 115-117. <https://doi.org/10.1097/SLE.0b013e318247c347>
- IARC. (2006). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Formaldehyde*. IARCPress. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326468/>
- IARC. (2012). *A review of human carcinogens*. IARCPress. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23189753/>

- IARC. (2019). *Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2020–2024*. IARCPress. [https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/10/IARCMonographs-AGReport-Priorities\\_2020-2024.pdf](https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/10/IARCMonographs-AGReport-Priorities_2020-2024.pdf)
- Islam, A., Khalil, I., Islam, N., Moniruzzaman, M., Mottalib, A., Sulaiman, S. A. & Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(177), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-177>
- Jaganathan, S. & Mandal, M. (2009). Honey Constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, *1*(2), 29-36. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.2.02>
- Jiménez, V. (2016). *Evaluación de hidroximetilfurfural en diferentes marcas de miel de abeja, comercializadas en un supermercado de Guayaquil* [Tesis de maestría, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/12966>
- Khalil, M. I., Alam, N., Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A. & Gan, S. H. (2011). Phenolic Acid Composition and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys. *Journal of Food Science*, *76*(6), 921-1928. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02282.x>
- Kiernan, J. A. (2015). *Histological and histochemical methods: Theory and practice* (5. ed.). Scion.
- Kitzes, G., Schuette, H. A., & Elvehjem, C. A. (1943). The B Vitamins in Honey. *The Journal of Nutrition*, *26*(3), 241-250. <https://doi.org/10.1093/jn/26.3.241>
- König, H. E. & Liebich, H.-G. (Eds.). (2020). *Veterinary Anatomy of Domestic Animals. Textbook and Colour Atlas* (7.<sup>a</sup> ed.). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-46958>
- Krishna, M. (2013). Anatomía microscópica del hígado. *Wiley: Clinical Liver Disease*, *1*(2), 109-112. doi: 10.1002/cld.287
- Kuriachan, D., Suresh, R., Janardhanan, M., Savithri, V., Aravind, T., & Thampy, L. M. (2017). Analysis of

- Fixative Properties of Three Eco-friendly Substances: A Comparison with Formalin. *Oral and Maxillofacial Pathology Journal*, 8(2), 1-6. <https://www.semanticscholar.org/paper/Analysis-of-Fixative-Properties-of-Three-A-with-Kuriachan-Suresh/cd936cc03ea1e79a9fc7bc9b7cc668d20e1e33f5>
- Lada, E., Anna, M., Patrik, M., Zbynek, T., Miroslav, M., Hynek, M., Richard, P., Sarah, L. & Vaclav, L. (2020). Porcine Liver Anatomy Applied to Biomedicine. *Journal of Surgical Research*, 250(1), 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.12.038>
- Lalwani, V., Surekha, R., Vanishree, M., Koneru, A., Hunasgi, S. & Ravikumar, S. (2015). Honey as an alternative fixative for oral tissue: An evaluation of processed and unprocessed honey. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 19(3), 342-347. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.174641>
- Lau, C., Kalantari, B., Batts, K. P., Ferrell, L. D., Nyberg, S. L., Graham, R. P. & Moreira, R. K. (2021). The Voronoi theory of the normal liver lobular architecture and its applicability in hepatic zonation. *Scientific Reports*, 11(1), 39-43. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88699-2>
- Lerner, K. & Lerner, B. (Eds.). (2006). *World of Forensic Science* (Vol. 1). Thomson Gale.
- Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N. & Clarke, A. M. (2011). Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 9514-9532. <https://doi.org/10.3390/ijms12129514>
- Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J. & Sancho, M. T. (2003). Significance of Nonaromatic Organic Acids in Honey. *Journal of Food Protection*, 66(12), 2371-2376. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.12.2371>
- McMillan, D. B. & Harris, R. J. (2018). *An atlas of comparative vertebrate histology*. Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/book/9780124104242/an-atlas-of-comparative-vertebrate-histology>



- Means, G. E. & Feeney, R. E. (1995). Reductive Alkylation of Proteins. *Analytical Biochemistry*, 224(1), 1-16. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1001>
- Medawar, P. (1941). The rate of penetration of fixatives. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 61(12), 46-57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1941.tb00884.x>
- Melgar, V. (2021). *Manejo de la producción de miel de abeja en la comuna Olón, provincia de Santa Elena, un estudio de caso* [Proyecto de titulación, UPSE]. Repositorio Universidad Estatal Península de Santa Elena. <https://repositorio.upse.edu.ec/xmlui/handle/46000/6297?locale-attribute=es>
- Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L. & Ansari, M. J. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 975-978. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>
- Mescher, A. L. (Ed.). (2018). *Junqueira's basic histology: Text and atlas* (Fifteenth edition). McGraw-Hill Education. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2430&sectionid=190219970>
- Muddana, K., Muppala, J. K., Dorankula, S. R., Maloth, A., Kulkarni, P. & Thadudari, D. (2017). Honey and olive oil as bio-friendly substitutes for formalin and xylene in routine histopathology. *Indian Journal of Dental Research*, 28(3), 246-286. [https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR\\_246\\_16](https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_246_16)
- Murphy, D. & Davidson, M. (2013). *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Wiley-Blackwell. <http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/book.pdf>
- Musiał, A., Gryglewski, R. W., Kielczewski, S., Loukas, M. & Wajda, J. (2016). Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries. *Folia Medica Cracoviensia*, 56(3), 31-40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28275269/>
- Naciones Unidas. (2021). *Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA)*. Naciones Unidas. [https://unece.org/sites/default/files/2022-01/GHS\\_Rev9S.pdf](https://unece.org/sites/default/files/2022-01/GHS_Rev9S.pdf)
- NCBI. (2022). *PubChem Compound Summary for CID 712, Formaldehyde*. PubChem.

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/712>
- Nicholson, P. T. & Shaw, I. (2000). *Ancient Egyptian materials and technology*. Cambridge University Press. <http://assets.cambridge.org/052145/2570/sample/0521452570WSC00.pdf>
- NLM. (2019). *Collection Development Guidelines of the National Library of Medicine*. National Library of Medicine. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518693/pdf/Bookshelf\\_NBK518693.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518693/pdf/Bookshelf_NBK518693.pdf)
- NSH. (2019). *About Histotechnology*. National Society for Histotechnology. <https://www.nsh.org/about/about-histotechnology/why-histotechnology>
- NYSHS. (2022). *What is Histotechnology?* New York State Histotechnological Society. <http://www.nyhisto.com/home/what-is-histotechnology/>
- O'Dowd, G., Bell, S. & Wright, S. (2020). *Wheater's Pathology: A Text, Atlas and Review of Histopathology*. ELSEVIER. <https://www.elsevier.com/books/wheater%27s-pathology-a-text-atlas-and-review-of-histopathology/978-0-7020-7559-9>
- Olszewski, W. L., Zolich, D., Manokaran, G. & Tripathi, M. F. (2004). Sodium chloride fixation of tissues under field conditions in tropical countries. *Journal of Immunological Methods*, 284(1-2), 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2003.09.019>
- Ovalle, W. K. & Nahirney, P. C. (Eds.). (2020). *Netter's essential histology: With correlated histopathology* (3rd ed.). Elsevier. <https://www.asia.elsevierhealth.com/netters-essential-histology-9780323694643.html>
- Özkan, N., Şalva, E., Çakalağaoğlu, F. & Tüzüner, B. (2012). Honey as a substitute for formalin? *Biotechnic & Histochemistry*, 87(2), 148-153. <https://doi.org/10.3109/10520295.2011.590155>
- Pandiar, D., Baranwal, H., Kumar, S., Ganesan, V., Sonkar, P. & Chattopadhyay, K. (2017). Use of jaggery and honey as adjunctive cytological fixatives to ethanol for oral smears. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(2), 1-32. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_224\\_15](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_224_15)
- Paredes, F. (2018). *Propuesta de buenas prácticas aplicadas a la producción de miel de abejas para*

*mejorar la calidad y productividad en la empresa Ambamiel* [Tesis de maestría, PUCE].

Repositorio Digital PUCE.

<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14927/Paredes%20Fernanda%20Trabajo%20Titulación.pdf?sequence=1>

Pataca, L., Neto, W., Marcucci, M. & Poppi, R. (2007). Determination of apparent reducing sugars, moisture and acidity in honey by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry. *Talanta*, 71(5), 1926-1931. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.08.028>

Patil, S., Premalatha, B., Rao, R. & Ganavi, B. (2013). Revelation in the Field of Tissue Preservation: A Preliminary Study on Natural Formalin Substitutes. *Journal of International Oral Health*, 5(1), 31-38. [https://www.researchgate.net/publication/258041354\\_Revelation\\_in\\_the\\_Field\\_of\\_Tissue\\_Preservation\\_-\\_A\\_Preliminary\\_Study\\_on\\_Natural\\_Formalin\\_Substitutes](https://www.researchgate.net/publication/258041354_Revelation_in_the_Field_of_Tissue_Preservation_-_A_Preliminary_Study_on_Natural_Formalin_Substitutes)

Patil, S., Rao, R., Agarwal, A. & Raj, T. (2015). Instant Transport Media for Biopsied Soft Tissue Specimens: A Comparative Study. *Scientifica*, 20(15), 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/876531>

Patil, S., Rao, R., Ganavi, B. & Majumdar, B. (2015). Natural sweeteners as fixatives in histopathology: A longitudinal study. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 6(1), 1-67. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.149089>

Pearse, A. G. (1980). *Histochemistry, theoretical and applied* (Vol. 1). Edinbuegh: Churchill Livingstone. <https://catalogue.nla.gov.au/Record/2567080>

Piątek-Koziej, K., Hołda, J., Koziej, M., Tyrak, K., Jasińska, K. A., Bonczar, A., Walocha, J. A. & Hołda, M. K. (2019). Fixative properties of honey solutions as a formaldehyde substitute in cardiac tissue preservation. *Folia Medica Cracoviensia*, 59(1), 101-114. <https://doi.org/10.24425/FMC.2019.128029>

Proaño, A. (2020). *Influencia del tratamiento térmico en la capacidad antimicrobiana de la miel de eucalipto de la provincia de Pichincha, Ecuador* [Tesis de Pregrado, UDLA]. Repositorio Digital

- Universidad De Las Américas. <https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12232>
- Rait, V. K., Zhang, Q., Fabris, D., Mason, J. T. & O'Leary, T. J. (2006). Conversions of Formaldehyde-modified 2'-Deoxyadenosine 5'-Monophosphate in Conditions Modeling Formalin-fixed Tissue Dehydration. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(3), 301-310.  
<https://doi.org/10.1369/jhc.5A6725.2005>
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. & Larroche, C. (2006). Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. *Food Technology Biotechnology*, 44(2), 185-195.  
[https://www.researchgate.net/publication/228342155\\_Gluconic\\_Acid\\_Properties\\_Applications\\_and\\_Microbial\\_Production](https://www.researchgate.net/publication/228342155_Gluconic_Acid_Properties_Applications_and_Microbial_Production)
- Ramamoorthy, A., Ravi, S., Jeddy, N., Thangavelu, R. & Janardhanan, S. (2016). Natural Alternatives for Chemicals Used in Histopathology Lab- A Literature Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(11), 1-4. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/23420.8860>
- Remache, K. (2022). *Estudio de la miel de Apis mellifera y sus adulteraciones* [Tesis de Pregrado, UCE]. Repositorio Universidad Central del Ecuador.  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/27005/1/UCE-FCQ-CQA-REMACHE%20KARLA.pdf>
- Rossano, R., Larocca, M., Polito, T., Perna, A. M., Padula, M. C., Martelli, G. & Riccio, P. (2012). What Are the Proteolytic Enzymes of Honey and What They Do Tell Us? A Fingerprint Analysis by 2-D Zymography of Unifloral Honeys. *PLoS ONE*, 7(11), 49-64.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049164>
- Ruiz, P. (2019). *Caracterización fisicoquímica y microbiológica de miel de la tribu Meliponini en la provincia de Orellana-Ecuador* [Tesis de Pregrado, ESPE]. Repositorio Institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.  
<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/20824>

- Sabarinath, B., Sivapathasundharam, B. & Sathyakumar, M. (2014). Fixative properties of honey in comparison with formalin. *Journal of Histotechnology*, 37(1), 21-25.  
<https://doi.org/10.1179/2046023613Y.0000000037>
- Sabarinath, B., Sundaraman, P. & Sivapathasundharam, B. (2020). Honey as a cytological fixative: A comparative study with ethanol. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7(9), 1015-1019. <https://doi.org/10.31838/ejmcm.07.09.102>
- Salazar, E., Alvarado, H., Castro, J., Sosa, B. & Puga, S. (2023). Evaluación del contenido de hidroximetilfurfural en miel comercial y artesanal de Los Ríos-Babahoyo. *Journal of Science and Research*, 8(1) 1-10. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.7734033>
- Salguero, F. & Pallarés, F. (2023). *Aughey and Frye's Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates* (2nd Edition). CRC Press. <https://www.vet-library.com/p-3181-aughey-and-frye-s-comparative-veterinary-histology-with-clinical-correlates.html>
- Salis, S., Spano, N., Ciulu, M., Floris, I., Pilo, M. I. & Sanna, G. (2021). Electrochemical Determination of the "Furanic Index" in Honey. *Molecules*, 26(14), 4115-4125.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26144115>
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T. & Samini, F. (2017). Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Research*, 9(2), 121-127. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204647>
- Shannon, R. & Ford, B. (2023). *Microscope*. Encyclopedia Britannica.  
<https://www.britannica.com/technology/microscope>
- Shapla, U. M., Solayman, Md., Alam, N., Khalil, Md. I. & Gan, S. H. (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: Effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 25-35. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0408-3>
- Sharquie, K. & Najim, R. (2004). Embalming with honey. *Saudi medical journal*, 25(11), 1755-1756.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15573225/>

- Singh, A., Hunasgi, S., Koneru, A., Ramalu, S., Manvikar, V. & Vanishree, M. (2015). Comparison of honey with ethanol as an oral cytological fixative: A pilot study. *Journal of Cytology*, 32(2), 113-118.  
<https://doi.org/10.4103/0970-9371.160563>
- Singh, B. (2018). *Dyce, Sack, and Wensing's Textbook of Veterinary Anatomy* (5th ed.). Elsevier.  
<https://evolve.elsevier.com/cs/product/9780323442589?role=student>
- Singhal, P., Singh, N., Sreedhar, G., Banerjee, S., Batra, M. & Garg, A. (2016). Evaluation of histomorphometric Changes in Tissue Architecture in Relation to Alteration in Fixation Protocol – An Invitro Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(8), 28-32.  
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/19007.8236>
- Singhal, P., Sreedhar, G., Singh, N., Sharma, D., Bannerji, S. & Gowhar, O. (2017). Evaluation of histomorphometric changes in tissue architecture due to fixation delay. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(1), 70-85. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.203771>
- Srii, R. & Marla, V. (2016). BEE Honey As a Locum for Routine Formalin Fixative. *International Journal of Scientific Research*, 5(10), 498-500.  
[https://www.researchgate.net/publication/308886725\\_BEE\\_Honey\\_As\\_A\\_Locum\\_for\\_Routine\\_Formalin\\_Fixative](https://www.researchgate.net/publication/308886725_BEE_Honey_As_A_Locum_for_Routine_Formalin_Fixative)
- Srii, R., Peter, C., Haragannavar, V., Shashidara, R., Sridhara, S. & Srivatsava, S. (2017). Bee Honey as a Safer Alternative for Routine Formalin Fixation. *Kathmandu University Medical Journal*, 60(4), 308-312. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30580347/>
- Subrahmanyam, M. (1993). Storage of skin grafts in honey. *The Lancet*, 341(88), 36-63.  
[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92547-7](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92547-7)
- Suvarna, K., Layton, C, & Bancroft, J. (2019). *Bancroft's Theory and practice of Histological techniques*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00143-5>
- Thamilselvan, S., K. R, D., Sherlin, H. J., Jayaraj, G, & Santhanam, A. (2021). Honey as a Natural

- Alternative for Formalin Fixative—A Systematic Review. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 10(6), 369-374. <https://doi.org/10.14260/jemds/2021/82>
- The University of Edinburgh. (2018). *Microscopy*. Edinburgh imaging. <https://www.ed.ac.uk/clinical-sciences/edinburgh-imaging/education-teaching/short-courses/all-our-courses/light-microscopy>
- Thomas, T., Gopikrishna, V. & Kandaswamy, D. (2008). Comparative evaluation of maintenance of cell viability of an experimental transport media «coconut water» with Hank's balanced salt solution and milk, for transportation of an avulsed tooth: An *in vitro* cell culture study. *Journal of Conservative Dentistry*, 11(1), 22-30. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.43414>
- Titford, M. E. & Horenstein, M. G. (2005). Histomorphologic Assessment of Formalin Substitute Fixatives for Diagnostic Surgical Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 129(4), 502-506. <https://doi.org/10.5858/2005-129-502-HAOFSS>
- Toaquiza, M. (2020). *Análisis microbiológico de la miel de abejas sin aguijón (meliponas) en la provincia de Loja, Ecuador* [Tesis de Pregrado, ESPE]. Repositorio Institucional de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/22797/1/T-ESPE-043999.pdf>
- Torres, F. (2016). *Histología ósea de una Tortuga Gigante del Pleistoceno (Testudinidae) de Ecuador Continental, con comentarios del origen de las Tortugas de Galápagos* [Tesis de pregrado, PUCE]. Repositorio PUCE. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/13230>
- Udonkang, M., Ubi, K. & Inyang, I. (2018). Honey as fixative and safer substitute for formalin in histology. *International Journal of Medical Laboratory Research*, 3(3), 11-17. <https://doi.org/10.35503/IJMLR.2018.0303>
- UMMS. (2022). *Michigan Histology and Virtual Microscopy Learning Resources*. UMMS. <https://histology.medicine.umich.edu/resources>
- Velásquez, D. & Goetschel, M. L. (2019). Determinación de la calidad físico-química de la miel de abeja

comercializada en Quito y comparación con la miel artificial. *Enfoque UTE*, 10(2), 52-62.

<https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n2.406>

Vivanco, I., Rosillo, W., Villavicencio, B. & Macias, V. (2020). El mercado de la producción de miel de abeja en la provincia del Guayas. *Revista Espacios*, 41(29), 11-20.

<http://es.revistaespacios.com/a20v41n29/a20v41n29p23.pdf>

Walker, J. (1964). *Formaldehyde*. REINHOLD PUBL. CO. <https://es.3lib.net/ireader/1304891>

Wilkinson, J. M. & Cavanagh, H. M. A. (2005). Antibacterial Activity of 13 Honeys Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Food*, 8(1), 100-103.

<https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.100>

Zachary, J. (2022). *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (7th ed.). Elsevier.

<https://evolve.elsevier.com/cs/product/9780323713139?role=student>

Zhang, L. (2018). *Formaldehyde: Exposure, Toxicity and Health Effects*. Royal Society of Chemistry.

<https://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-1-78262-973-3>