



Un nuevo método para la conservación de animales evita el uso de formaldehído y mejora las características de conservación

Pereyra, C.F.^{1*} ; Parola, D.G.¹ ; Biancardi, M.E.² ; Pérez Mogetta, L.C.¹ ;
Cirimele, M.N.¹ ; Venegas, V.L.¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Rosario. Boulevard Ovidio Lagos y Ruta Nac.

Nº 33 Casilda (C.P. 2170), Santa Fe, Argentina. Teléfono: 03464 422050. ²Facultad de Ciencias Bioquímicas

y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531, Rosario (C.P. 2000), Santa Fe, Argentina.

carlospereyra@fcv.unr.edu.ar

Resumen

El Dr. W. Thiel desarrolló una técnica para preservar cadáveres humanos que conserva características importantes en las preparaciones, como la flexibilidad, la elasticidad, el volumen y el color de los tejidos y órganos, utilizando cantidades reducidas de formaldehído y permitiendo que las estructuras puedan ser reconocidas sin alteraciones en el material conservado. El objetivo de este estudio fue evaluar la aplicación de la técnica de conservación de especímenes CFP-Soft Fix, una técnica de Thiel modificada libre de formaldehído, en el aparato locomotor de conejos de raza neozelandesa. Se extrajeron y preservaron los miembros pélvicos y se evaluó la efectividad de la técnica modificada mediante la determinación de parámetros como la flexibilidad articular, la elasticidad muscular, el volumen muscular, el color de los tejidos y la presencia de contaminación fúngica y/o bacteriana. Además, se realizó un estudio histológico del tejido muscular y los tendones. Se demostró que la fórmula no fue irritante y casi inodora, preservaba el color, la flexibilidad y la plasticidad de las preparaciones de una manera muy similar a las del animal vivo. Se conservaron piezas con gran flexibilidad articular, buena elasticidad tisular, volumen muscular casi normal y con estructura histológica alterada. Con el método CFP-Soft Fix se logró la eliminación total del formaldehído de la fórmula, así como la adaptación a animales domésticos. Mediante la aplicación del método CFP-Soft Fix se pudo llevar a cabo el estudio de la anatomía de forma segura, permitiendo el acercamiento del conocimiento y pudiendo utilizar métodos complementarios como la artroscopía, laparoscopía, endoscopía y diagnóstico por imagen, enfatizando en los estudiantes la necesidad de un conocimiento detallado de la anatomía en un entorno clínico y facilitando el reconocimiento de las estructuras y relaciones topográficas.

Palabras clave: Preservación de tejidos, eugenol, técnicas anatómicas, CFP-Soft Fix, anatomía veterinaria.

A new method for animal preservation avoids the use of formaldehyde and improves preservation features

Abstract. Dr. W. Thiel developed a human cadaver preservation technique that maintains essential features such as tissue flexibility, elasticity, volume, and color, using minimal amounts of formaldehyde. This method enables clear anatomical recognition without significant alterations in the preserved material. The aim of this study was to evaluate the application of the CFP-Soft Fix specimen preservation method—a modified, formaldehyde-free version of Thiel's technique—to the locomotor system of New Zealand rabbits. Twenty rabbits were used. Pelvic members were extracted and preserved. The effectiveness of the modified technique was assessed by examining parameters such as joint flexibility, muscle elasticity, muscle volume, tissue color, and presence of fungal or bacterial contamination. Additionally, a histological analysis of muscle and tendon tissues was performed. The solution proved to be non-irritating and nearly odorless, while effectively preserving color, flexibility, and plasticity, closely resembling live tissue. The preserved specimens exhibited excellent joint flexibility, good tissue elasticity, nearly normal muscle volume, and well-preserved histological muscle structure. The CFP-Soft Fix method successfully eliminated formaldehyde from the preservation process and demonstrated adaptability for use in domestic animals. This technique allows for safe anatomical study, supports the use of complementary tools such as arthroscopy, laparoscopy, endoscopy, and diagnostic imaging, and reinforces the importance of detailed anatomical knowledge in clinical education by improving recognition of topographic structures and spatial relationships.

Key words: Tissue preservation, eugenol, anatomical techniques, CFP-Soft Fix, veterinary anatomy.

INTRODUCCIÓN

La conservación de especímenes para el estudio científico requiere el mantenimiento de las características originales de la manera más fiable posible para admitir comparaciones con nuevas observaciones y así avanzar en el conocimiento.

Aunque los métodos más modernos, como la plastinación, mantienen las propiedades naturales del objeto conservado (Weber et al. 2007), requieren de infraestructura e insumos de alto costo, constituyendo una limitación para su uso frecuente. Además, todas las técnicas tradicionales de conservación contienen mayores o menores cantidades de formalina en su composición. Debido a la toxicidad y los efectos cancerígenos del formaldehído (Sugata et al. 2016), se han investigado diferentes combinaciones de sustancias que reemplazan al formaldehído en preparaciones anatómicas para la fijación (Berke 1987, Pulido Guerrero y Valderrama Sandoval 2007, Molina Aragónés et al. 2018).

Además, las técnicas que contienen formalina provocan variación de color, contracción importante y endurecimiento de los tejidos, por lo que, para mejorar el aspecto y la flexibilidad de las piezas, se debe añadir polietilenglicol a la solución de conservación (König et al. 2013).

En 1992, el Dr. Walter Thiel desarrolló un procedimiento que utiliza formalina en concentraciones más bajas para preservar cadáveres humanos, lo que permite la conservación de las características naturales como la flexibilidad, elasticidad, volumen y color de los tejidos (Thiel 1992). Así, las estructuras del material conservado pueden ser reconocidas sin los cambios observados con las soluciones convencionales, en un ambiente de trabajo libre de vapores tóxicos y cancerígenos; logrando un mejor aprovechamiento de los preparados en el estudio de la anatomía.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de una técnica de conservación modificada tipo Thiel (CFP-Soft Fix), libre de formaldehído, para la preservación del aparato locomotor de conejos de raza Neozelandesa, mediante el análisis de variables morfológicas e histológicas

Tabla 1. Composición de soluciones fijadoras y de inmersión.

| Soluciones | Componentes |
|-----------------------|---|
| Fix I | 2% p/v ácido bórico, etilenglicol 20%, nitrato de sodio 7% P/V, nitrito de sodio 7% P/V, nitrato de potasio 3% P/V. |
| Fix II | 84% etilenglicol, 16% eugenol (Sigma Aldrich) |
| Vascular | 77% Fix I, 5% Fix II, 5% p/v sulfito de sodio, 18% morfolina. |
| Visceral | 70% Fix I, 7% Fix II, 3,5% p/v de sulfito de sodio, 2% morfolina, 21% alcohol isopropílico. |
| Solución de inmersión | 2% Fix II, 3% p/v de ácido bórico, 10% de etilenglicol, 4,5% p/v de nitrato de sodio, 4,5% p/v de nitrito de sodio, 5% de nitrato de potasio, 6% p/v de sulfito de sodio. |

Las soluciones vasculares y viscerales se inyectaron por perfusión manual, utilizando el doble del volumen de sangre extraído. Finalmente, con el fin de acceder al tracto digestivo, se administró solución visceral por vía rectal.

Los cadáveres se mantuvieron en solución de inmersión durante 30 días a temperatura ambiente para

de los miembros pélvianos, con énfasis en la flexibilidad, elasticidad, volumen muscular y color de los tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. A menos que se mencione lo contrario, todos los productos químicos y reactivos que fueron utilizados son del laboratorio Cicarelli (Rosario, Argentina).

Animales. En este estudio se utilizaron veinte conejos neozelandeses cuyo peso medio fue de 2 kg de acuerdo con las normas bioéticas vigentes (American Veterinary Medical Association 2013). El estudio fue aprobado por el comité institucional de ética del uso animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario (Res. 222/15 C.D., FCV-UNR) en el marco del proyecto de Tesis Doctoral.

Se administró una premedicación con sulfato de atropina al 0,1% por vía subcutánea o intramuscular a una dosis de 0,05 mg kg⁻¹ de peso corporal (Laboratorio Fattro-Von Franken, Buenos Aires, Argentina). La anestesia fue inducida por vía intramuscular con una combinación de 25-40 mg kg⁻¹ de Ketamina de peso corporal (Ketamina 50, Laboratorio Holliday Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) y 5-10 mg kg⁻¹ de peso corporal de Xilazina (Kensol, Laboratorio König, Buenos Aires, Argentina), para alcanzar un plano anestésico entre III y IV, siguiendo los procedimientos descritos por Zúñiga et al. (2001).

El volumen de sangre obtenido durante la exanguinación fue utilizado para calcular el volumen de inyección de solución o mediante estimación a partir del peso corporal del animal utilizado (44-70 ml kg⁻¹ de peso corporal).

Después de la exanguinación, los vasos sanguíneos se limpian con NaCl al 0,9% p/v mediante cánula arterial (De Segura 2007).

CFP- Soft Fix. El método CFP-Soft Fix se llevó a cabo mediante el uso de dos soluciones fijadoras principales (Fix I y Fix II) para inyección vascular y visceral, y una solución de inmersión (Tabla 1).

lograr la impregnación y fijación.

Para la disección, se desarticuló la síntesis pélvica y se seccionaron las vértebras lumbares y el sacro a lo largo de la línea media, de modo que los miembros pélvicos derecho e izquierdo se separaron a lo largo del plano sagital medio, dejando ambos miembros independientes.

Se estudiaron dos conejos al mismo tiempo, con un intervalo de 30 días entre cada implementación del método en estudio.

Después de la disección, los miembros pélvicos derechos se mantuvieron en solución de inmersión a temperatura ambiente (A) y los miembros pélvicos izquierdos se mantuvieron en bolsas selladas, sin solución de inmersión a temperatura ambiente (B).

Los miembros pélvicos conservados (A y B) se observaron cada 15 días durante un periodo de 7 meses con el fin de visualizar posibles putrefacciones o contaminación por hongos, el color, el volumen, la elasticidad y la flexibilidad. La conservación del color se evaluó observando el tejido muscular de la región muscular del cuádriceps femoral y comparándolo con un miembro pélvico sin preservación.

Medición de la flexibilidad y elasticidad muscular. La flexibilidad muscular de cada pieza se midió cada 15 días durante el periodo de estudio. Como control, se evaluaron los parámetros en las mismas partes antes del tratamiento con soluciones conservadoras.

La flexibilidad de las piezas preservadas se evaluó mediante goniometría, siendo la unidad de medida el grado sexagesimal representado por el símbolo ($^{\circ}$). La elasticidad de los músculos se controló en el momento de la flexión durante la medición de los ángulos articulares, tomando como parámetro la resistencia a la maniobra. Además, se midió el perímetro muscular con un escrotímetro registrando las mediciones en centímetros (cm).

El estudio histológico del tejido muscular y tendones de los miembros pélvicos derecho e izquierdo se realizó mediante la toma de muestras de los músculos sublumbares y tendones que componen la cuerda femorocalcánea (gastrocnemio y flexor digital superficial) en diferentes momentos de conservación.

Las muestras se tomaron antes y después de inyectar las soluciones fijadoras, durante la inmersión y almacenamiento, los tiempos a los que se tomaron las muestras fueron:

- Tiempo 0: inmediatamente terminada la

exanguinación y previo a la inyección de las soluciones fijadoras;

- Tiempo I: inmediatamente luego de la perfusión de las soluciones fijadoras y previamente a la inmersión;

- Tiempo II: luego de 7 días de inmersión del cadáver completo;

- Tiempo III: luego de 14 días de inmersión del cadáver completo;

- Tiempo IV: luego de 4 meses de conservación de los miembros pélvicos derechos e izquierdos de las 2 formas;

- Tiempo V: luego de 7 meses de conservación de los miembros pélvicos derechos e izquierdos de las 2 formas.

Las muestras de animales conservados por el método CFP-Soft Fix, se fijaron en formaldehído y se procesaron histológicamente hasta su inclusión en parafina. Cada sección de 7 micras, se tiñó con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson (coloración específica para fibras de colágeno) y se analizó con un microscopio de campo óptico (UNILUX, Kyowa) (Clark 1981, García del Moral 1993).

Con el objetivo de evaluar si existieron diferencias estadísticamente significativas en la flexibilidad de las articulaciones en el tiempo sometidas a las distintas formas de conservación, se ajustó para cada articulación un modelo mixto de medidas repetidas con estructura de autocorrelación de orden 1 para la dependencia temporal y el conejo como factor aleatorio. En todos los casos, se ajustó en primera instancia el modelo con interacción entre tratamiento y el tiempo.

Para la variable circunferencia muscular se ajustó también un modelo mixto de medidas repetidas con estructura de autocorrelación de orden 1 para la dependencia temporal, considerando al conejo como factor aleatorio.

RESULTADOS

Método CFP-Soft Fix. Se preparó una nueva solución basada en el método de conservación de Thiel en ausencia de formaldehído y se aplicó a conejos Neozelandeses (método CFP-Soft Fix). La aplicación del método desarrollado logró obtener piezas de un aspecto general muy similar al animal vivo (Figura 1).

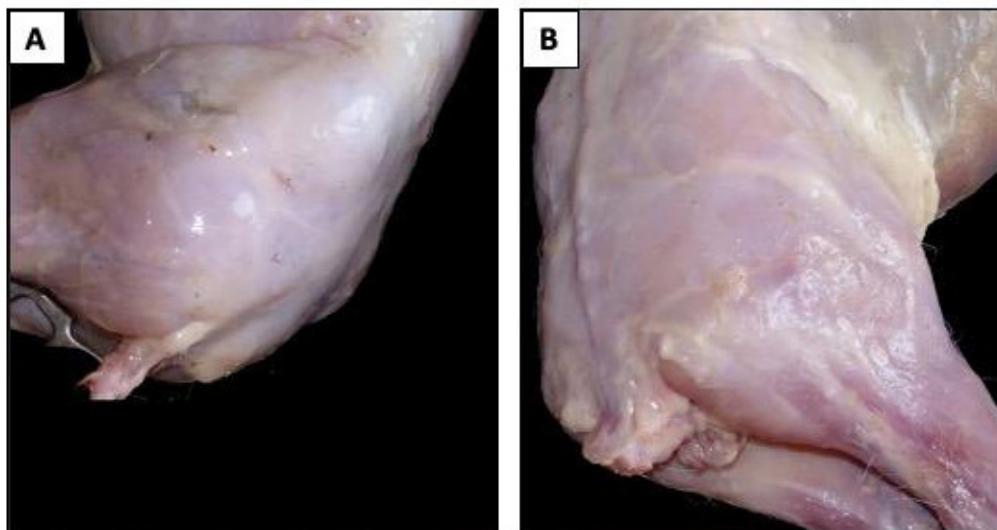


Figura 1. Comparación entre un cadáver fresco y uno tratado con CFP Soft Fix. A) Cadáver fresco recientemente faenado; B) Cadáver conservado CFP-Soft Fix después de 30 días de inmersión en solución conservante.

La inspección de la superficie corporal reveló que la piel era untuosa al tacto y conservaba la elasticidad. El examen de la piel desnuda mostró las modificaciones

cutáneas expuestas, como glándulas, almohadillas digitales, entre otros. El procedimiento provocó un desprendimiento de la capa córnea de las garras (Figura 2).



Figura 2. Superficie del cuerpo antes del proceso de disección. Se puede notar que el pelo de la piel se perdió debido a la erosión epidérmica.

Se observó una resistencia similar a la de la piel del animal vivo cuando se incidió. El tejido celular subcutáneo se encontró hidratado y brillante. El tejido muscular y sus anexos presentaban color y características similares a la res recién faenada, y era turgente y elástico permitiendo movimientos de flexión y extensión en la articulación sin fuerza extrema.

Conservación Post-fijación de los miembros pélvicos. Las preparaciones anatómicas resistieron disecciones y mediciones durante todo el período de estudio, sin mostrar diferencias en la forma de almacenamiento (bolsas herméticas selladas o solución de inmersión). Las muestras permanecieron bien hidratadas y pudieron someterse a varias sesiones de disección sin dificultades (Figura 3).

Eficacia antiséptica y conservación del color. Durante el período de estudio no hubo evidencia de podredumbre ni desarrollo de colonias de hongos. La capacidad antiséptica de las soluciones utilizadas no se vio alterada por la ausencia de formaldehído.

La evaluación de la conservación del color de los miembros pélvicos se realizó por observación simple, sin mostrar grandes diferencias a lo largo del período de estudio.

Medición de la flexibilidad articular y elasticidad de los tejidos pélvicos. Los parámetros de flexibilidad articular fueron diferentes entre las articulaciones coxal, femorotibial y tarsiana cuando se utilizó nuestro método de fijación.

Hubo diferencia en la flexibilidad relativa de la articulación del coxal con respecto al tiempo 0, y se encontraron diferencias significativas según el método de conservación utilizado ($p = 0,0177$). Hubo un aumento en la flexibilidad relativa promedio de los miembros pélvicos conservados con inmersión con respecto a los conservados en bolsa sellada, sin solución. No se observaron diferencias significativas en la articulación coxal entre ambos métodos

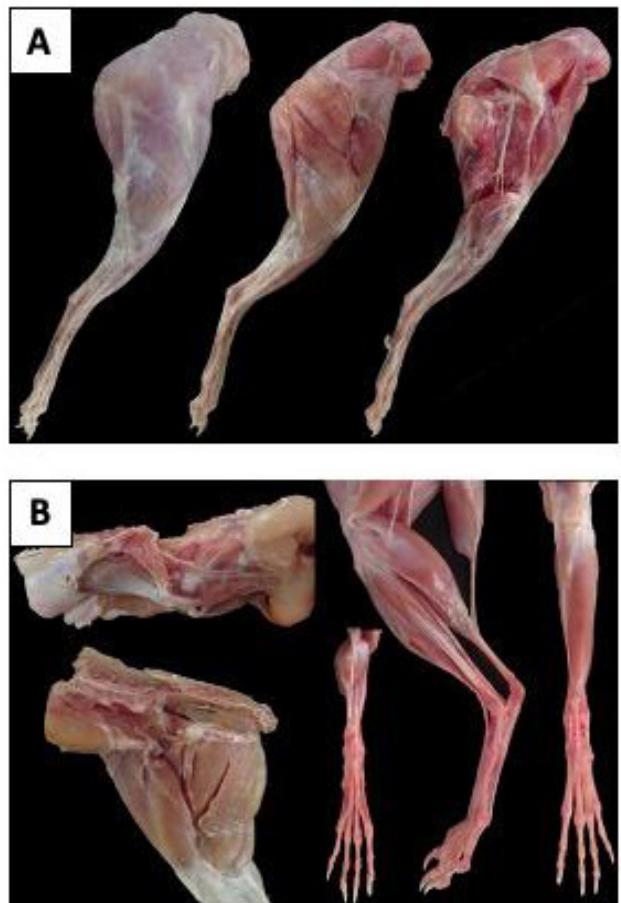


Figura 3. Miembros pélvicos, diferentes planos de disección de la región del muslo (A) y otras regiones (B) conservados por el método estudiado.

de conservación respecto al tiempo de conservación ($p = 0,7442$).

En el caso de la articulación femorotibial, no hubo diferencias significativas según la forma de conservación especificada ($p = 0,1449$) con respecto al tiempo 0, pero se observó un aumento significativo de la flexibilidad relativa con respecto al tiempo de conservación ($p < 0,0001$).

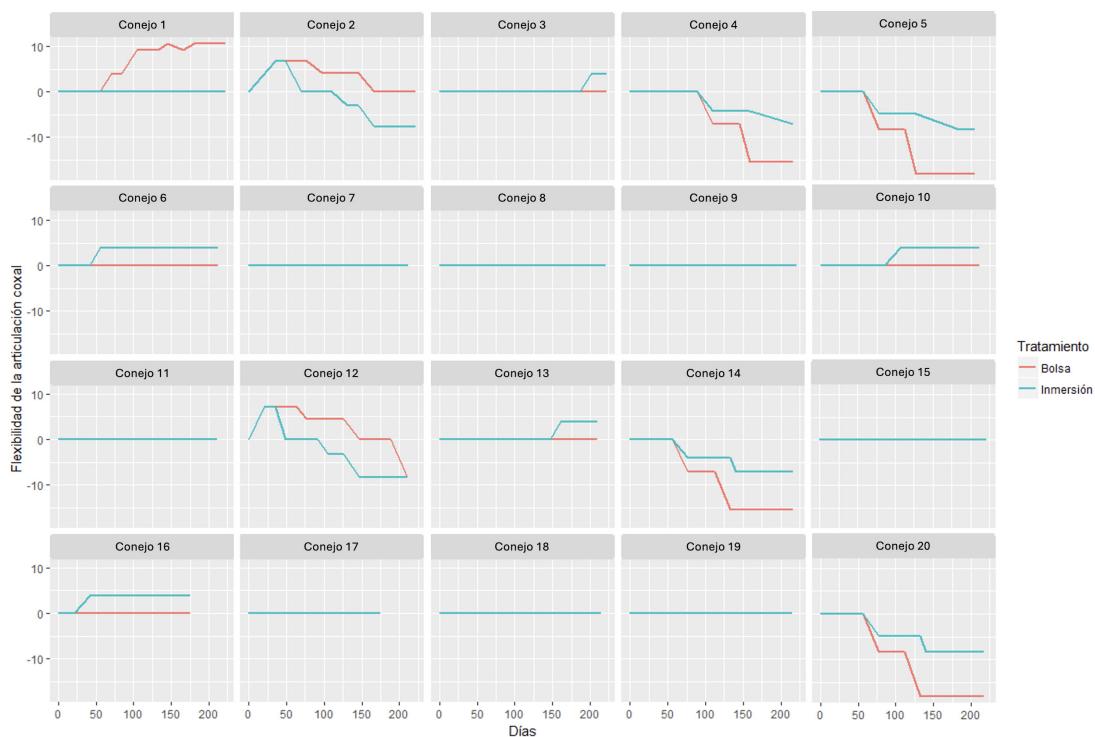


Figura 4. Evolución en el tiempo de la diferencia relativa de flexibilidad de la articulación coxal respecto al día basal. Se muestra que ambos tratamientos tuvieron efecto diferente en el tiempo sobre la flexibilidad de la articulación coxal de los 20 conejos. Se nota que, para 8 de los 20 conejos no se observan diferencias en las flexibilidades en ningún momento del tiempo entre ambos tratamientos.

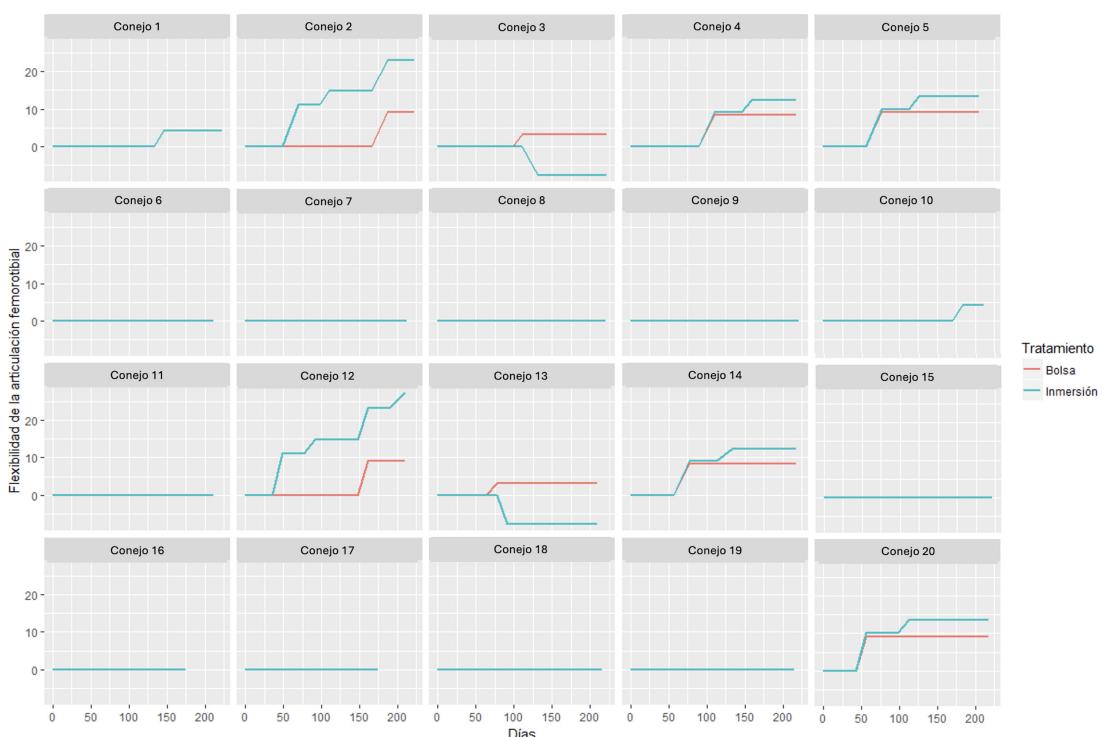


Figura 5. Evolución en el tiempo de la diferencia relativa de flexibilidad de la articulación femorotibial respecto al día basal. Revela que para 12 de los 20 conejos estudiados no hay diferencias en la flexibilidad de la articulación femorotibial observada a través del tiempo para ambos tratamientos de conservación. Para los restantes conejos, la mayoría han presentado una flexibilidad relativa menor con el tratamiento de bolsa con cierre hermético que con el tratamiento de inmersión en solución conservadora. En sólo 2 de los conejos se obtiene una conclusión contraria a lo anteriormente mencionado.

El análisis indicó que hubo una diferencia significativa en la flexibilidad del tarso con respecto al tiempo 0, y se observó una interacción significativa entre el día de conservación y el día de medición ($p = 0,0092$). Estos resultados indican que la flexibilidad relativa promedio del

tarso es diferente entre ambas formas de conservación y según el tiempo de conservación. Además, se observó una disminución de la flexibilidad con el tiempo en las piezas conservadas en solución de inmersión.

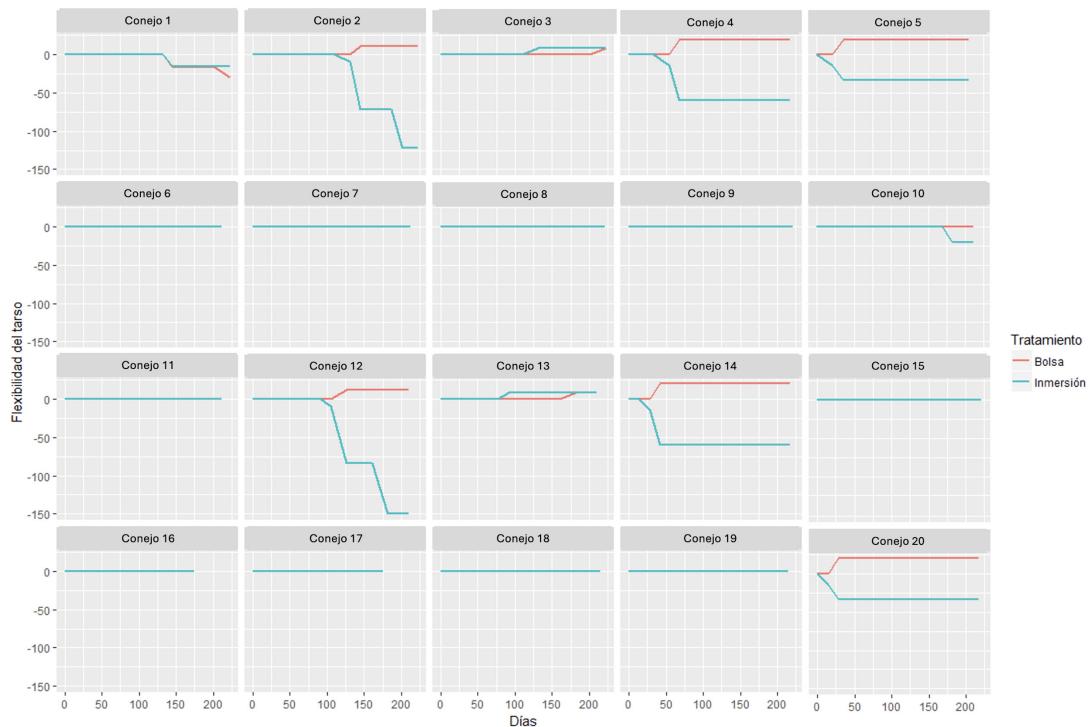


Figura 6. Evolución en el tiempo de la diferencia relativa de flexibilidad del tarso respecto al día basal. Se observa que la flexibilidad relativa del tarso se reduce en el tiempo para 7 conejos con el tratamiento de inmersión en solución conservadora. Sin embargo, para la mayoría de los conejos (10), la flexibilidad relativa de la articulación a través del tiempo resulta igual para ambos tratamientos de conservación. Para los restantes 3 conejos, la flexibilidad relativa del tarso disminuye para el tratamiento de bolsa de cierre hermético.

Finalmente, no se encontraron variaciones en la elasticidad muscular para ninguno de los tiempos de conservación estudiados.

Medición centimétrica de perímetros musculares. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la circunferencia muscular de los conejos entre las dos

formas de conservación ($p = 0,4673$). Sin embargo, el análisis reveló que este parámetro disminuyó entre 2% y 4% ($p < 0,001$) durante los primeros días de conservación (entre los días 50 y 100) y luego se mantuvo estable con todas las técnicas de conservación.

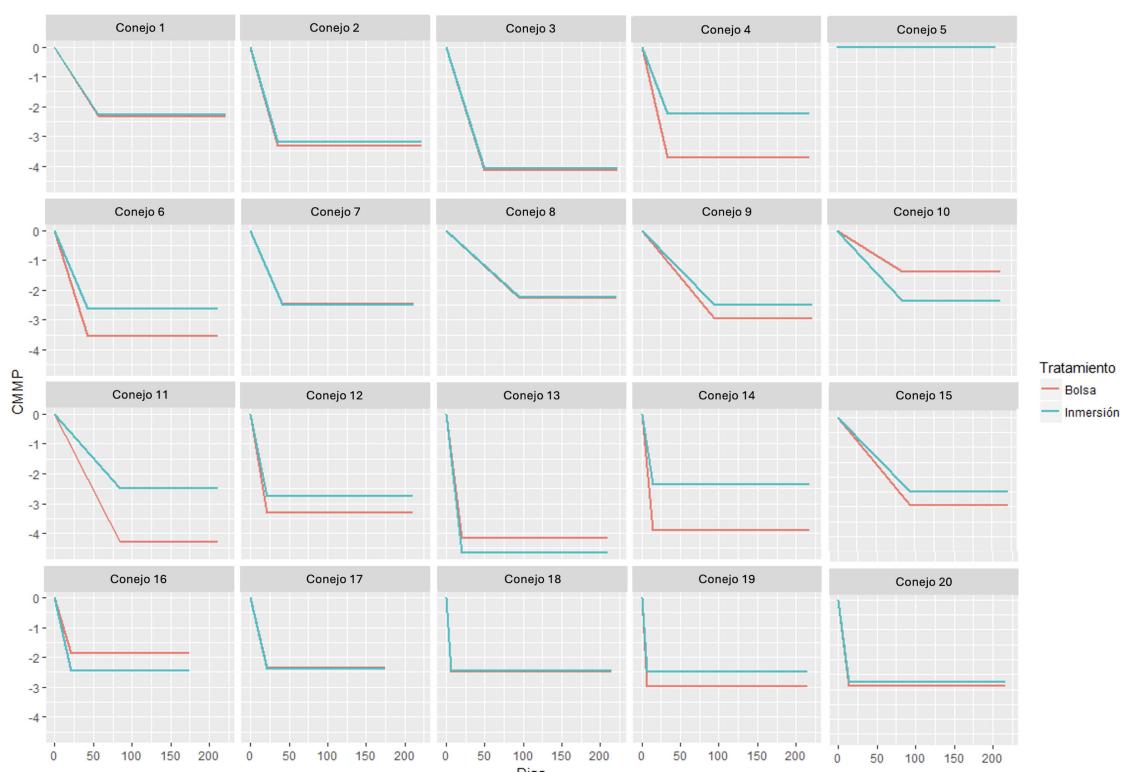


Figura 7. Evolución en el tiempo de la diferencia relativa de circunferencia muscular del muslo respecto al día basal. Se muestra la evolución en el tiempo de la diferencia de circunferencia muscular del muslo relativa al tiempo basal para los 20 conejos. Para 19 de los conejos se observa que la circunferencia del muslo relativa al primer día de registros disminuye en los primeros días de conservación entre un 2% y 4% y luego se mantiene estable para ambos métodos de conservación.

Análisis histológico. El estudio histológico de las muestras de tejido muscular mostró diferencias sustanciales según el tiempo de conservación, pero no en cuanto a los dos métodos de conservación.

Se observó una estructura normal en las preparaciones histológicas de las muestras en el tiempo 0, presentando fibras musculares con núcleos periféricos y estrías transversales con cubierta conjuntiva preservada (endomisio) (Figura 8A).

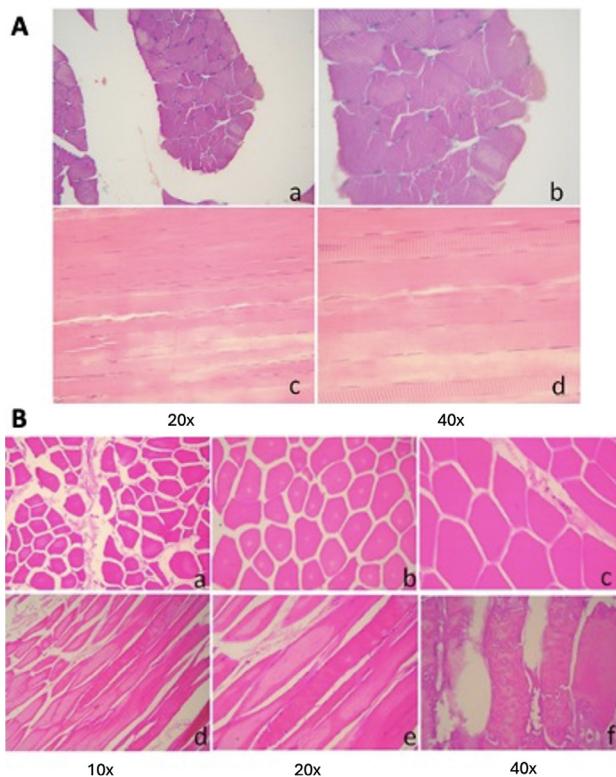


Figura 8. A) Micrografías de fibras musculares estriadas en el tiempo 0, antes de la perfusión. Tinción de hematoxilina-eosina con corte transversal (a y b) y corte longitudinal (c y d). B) micrografías de las fibras musculares estriadas después de 7 meses de conservación (tiempo V). Tinción de hematoxilina-eosina que muestra cortes transversales (a, b y c) y longitudinales (d, e y f). Se puede notar que las fibras musculares carecen de su núcleo y estríacion, y que presentan un sarcoplasma acidófilo homogéneo o vacuulado.

Las muestras obtenidas inmediatamente después de la inyección de las soluciones fijadoras (tiempo I) mostraron la presencia de algunas fibras musculares inflamadas, con núcleo pobre, algunas estrías transversales y vacuolización sarcoplasmática. En las muestras obtenidas después de 7 días de inmersión (tiempo II), el tejido muscular mostró necrosis coagulativa y se conservó la forma de las fibras, pero no se observaron los núcleos ni las estrías transversales típicas del músculo esquelético. En algunas fibras, el sarcoplasma mostró un aspecto acidófilo y homogéneo, mientras que otras fibras presentaron vacuolas.

Después de 14 días de inmersión (tiempo III), el tejido muscular presentaba características de necrosis coagulativa, y las fibras musculares, que presentaban ausencia de núcleo y estrías con sarcoplasma homogéneo acidófilo, estaban contenidas en una vaina de colágeno (endomisio) que permanecía intacta (Figura 8B).

Se conservaron el perimisio y el epimisio, manteniendo la estructura macroscópica del músculo (Figura 9A). Las alteraciones histológicas descritas después de 14 días de inmersión (tiempo III) se mantuvieron en el tiempo cuando se analizaron muestras de tiempos IV y V.

El análisis histológico de las muestras de tejido conjuntivo tomadas de los tendones también mostró diferencias sustanciales según el tiempo de conservación, pero no diferencias en cuanto al método de conservación. En los tiempos 0 y I las preparaciones histológicas mostraron que los tendones presentaban una estructura histológica normal, donde el tejido conectivo no denso mostraba sus típicos haces de fibras de colágeno y núcleo de fibroblastos bien conservados (Figura 9B, a y b). Después de 7 días de inmersión, el tejido conectivo era similar al aspecto de las muestras obtenidas en el tiempo 0, con una menor cantidad de núcleo fibroblástico. Después de 14 días de inmersión (tiempo III), las muestras mostraron fibras de colágeno normales, con un aspecto ondulado, lo que sugiere isquemia, y ausencia de núcleo de fibroblastos (Figura 9B, c y d). Las mismas características se observaron en las muestras obtenidas a los 4 meses (tiempo IV) y a los 7 meses de conservación (tiempo V).

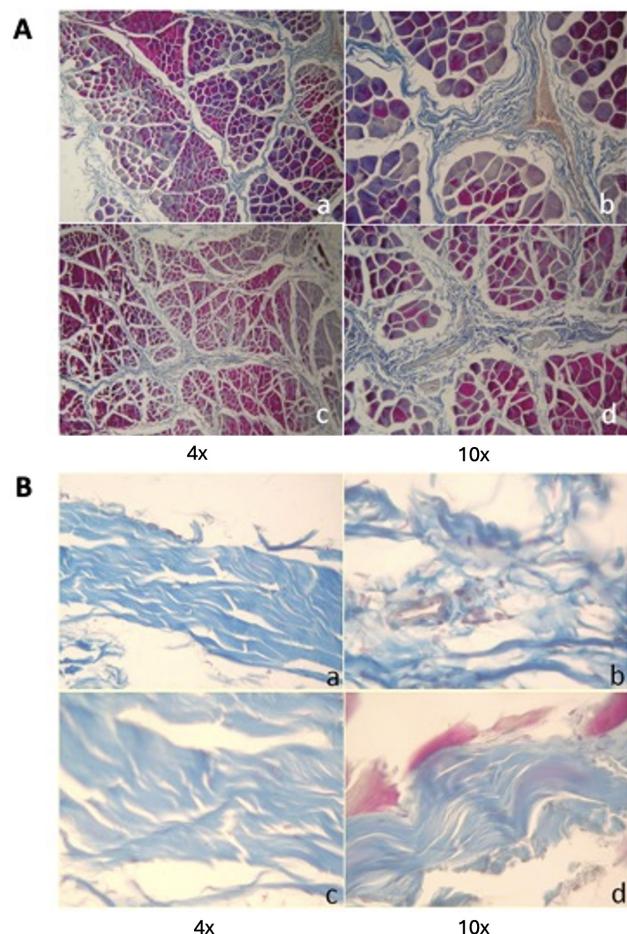


Figura 9. A) estructura de las fibras musculares estriadas. Tinción tricrómica de Masson de secciones musculares en el tiempo 0 (a y b) y después de 7 meses de conservación (c y d). Aumento de 40x y 10x. B) Preparaciones histológicas del tejido conectivo de tendón. Tinción tricrómica de Masson de tejido conectivo tendinoso en el tiempo 0 (a y b) mostrando estructura histológica normal y después de 7 meses de conservación (c y d) mostrando estructura normal con modificaciones isquémicas y ausencia de fibroblastos. Aumento de 20x y 40x.

DISCUSIÓN

En este estudio, la técnica de conservación desarrollada por Thiel se aplicó en el aparato locomotor de conejos de la raza neozelandesa (método CFP-Soft Fix) mediante el uso de una nueva solución “libre de formaldehído”, de fácil aplicación y que permitió lograr piezas de apariencia similar al animal vivo. Los resultados indicaron que el tiempo de fijación por inmersión durante 30 días arrojó resultados satisfactorios.

En estudios previos, muchos autores han intentado modificar la técnica original de Thiel para reducir la concentración de formaldehído y de esta manera reducir su toxicidad (Eisma et al. 2013). Sin embargo, todas las modificaciones propuestas contenían formaldehído en alguna medida (Kerckaert et al. 2008, Bertone et al. 2011, Eisma et al. 2013, Hayashi et al. 2014). En este estudio, se logró eliminar completamente el formaldehído de todas las soluciones de tratamiento.

De acuerdo con nuestros resultados, la inyección intravascular de la solución fijadora vascular permitió una excelente distribución dentro de todos los cadáveres, llegando a los vasos de los miembros pélvicos sin dificultad, como lo demuestra la ausencia de podredumbre de los dedos. Se utilizó a la arteria carótida para injectar la solución, ya que es una vía de fácil acceso que evita el daño potencial a los vasos pequeños y el consiguiente flujo de salida de la solución.

Además, se modificaron los tiempos de inmersión durante los cuales se mantuvieron los cadáveres. El método original de Thiel propone una inmersión completa en cadáver humano de 6 meses (Thiel 1992). Otros autores también modificaron el tiempo de inmersión y mantuvieron los cuerpos sumergidos durante 1 mes (Hammer et al. 2015), 2 meses (Eisma et al. 2013), 3 meses (Healy et al. 2015), y de 4 a 6 semanas (Kerckaert et al. 2008) con resultados similares a los de Thiel. En este estudio, los resultados mostraron que un tiempo de inmersión del cadáver completo de 30 días proporcionó resultados satisfactorios.

Después del tratamiento de inmersión, las observaciones indicaron que la piel y el tejido muscular de los conejos estaban bien conservados, ya que se detectaron características similares a las de la piel de los animales vivos. Además, los resultados sugirieron que ambos métodos de almacenamiento aplicados a los miembros pélvicos presentaron resultados similares. El uso de bolsas herméticas es ventajoso, ya que permite retirar la solución de inmersión, proporcionando un nuevo enfoque práctico.

De acuerdo con nuestras observaciones, los tejidos se conservaron bien después de 7 meses con el uso de CFP-Soft Fix, ya que han obtenido características de buena calidad como el color, la consistencia, la flexibilidad, la plasticidad y la conservación de la transparencia.

El método consta de 3 pasos principales: fijación, desinfección y conservación. El eugenol y el etilenglicol se utilizaron como fijadores y conservantes, mientras que el ácido bórico proporcionó propiedades desinfectantes. Se considera que la plasticidad de los tejidos se conservó gracias al etilenglicol. La presencia de sustancias altamente higroscópicas como sales como el sulfato de

sodio, el nitrato de amonio, el nitrato de potasio y la morfolina fueron capaces de retener el agua del tejido. La conservación del color podría atribuirse a la presencia de nitratos que producen nitrosomioglobina al reaccionar con la mioglobina muscular. Además, las características de olor de las muestras mejoraron con respecto al formaldehído, ya que el olor a eugenol solo se percibió durante los primeros meses y fue menos intenso que el olor a formaldehído.

Curiosamente, no se observó ningún desarrollo de pudrición u hongos en las muestras conservadas durante el período de estudio, lo que indica que las soluciones de conservación presentaron una buena capacidad antiséptica. En este estudio, la capacidad desinfectante de formaldehído fue reemplazada por ácido bórico y eugenol. La acción antifúngica y antibacteriana se atribuiría al eugenol como se informó anteriormente (Parodi et al. 2012).

Por otro lado, la flexibilidad de las articulaciones se midió en diferentes momentos en comparación con el día 0. Los resultados indicaron que la flexibilidad de las articulaciones coxal y tarsiana se preservó con menor eficacia cuando los miembros pélvicos se mantuvieron en solución de inmersión, la flexibilidad se conservó en el tiempo solo en la preservación de bolsas selladas. Sin embargo, en el caso de la articulación femorotibial, ambos métodos de preservación fueron capaces de mantener la flexibilidad articular, con un leve aumento con el tiempo. En cuanto a la elasticidad muscular, no hubo alteración en el rango de movimiento relacionada con el tiempo o el método de conservación. Estos hallazgos sugieren que la conservación de las bolsas selladas sería más confiable para preservar estas propiedades.

El estudio mostró que el tamaño muscular se redujo ligeramente (2-4%) durante los primeros días de conservación y se mantuvo estable en el siguiente período de tiempo. Estos resultados podrían estar relacionados con una disminución del volumen muscular, lo que sugiere una pequeña pérdida de masa muscular.

El análisis histológico indicó que las muestras musculares fueron alteradas durante el período de conservación y se desarrolló necrosis, coagulación, pero la estructura macroscópica muscular estaba bien conservada. Se ha reportado que los ácidos tienen efectos corrosivos sobre las proteínas (Benkhadra et al. 2011). Se podría pensar que este efecto se produjo en las proteínas musculares por la presencia de ácido bórico (Hayashi et al. 2016).

El análisis histológico del tejido conectivo no indicó cambios según el tiempo o el método de conservación. Las alteraciones histológicas observadas en las muestras de músculo podrían explicar el aumento de la flexibilidad y la disminución del tamaño muscular. Aunque el análisis histológico demostró que el tejido conectivo estuvo conservado, la ultraestructura del colágeno debe analizarse más a fondo mediante microscopía electrónica para descartar alteraciones a este nivel.

El método de conservación CFP-Soft Fix, libre de formaldehído, demostró ser eficaz para la preservación de los miembros pélvicos de conejos de raza Neozelandesa, manteniendo de forma satisfactoria las características físicas evaluadas. En comparación con los métodos tradicionales que emplean formaldehído, se observaron mejoras o conservación adecuada en las siguientes variables:

Flexibilidad articular; se conservó especialmente en las articulaciones femorotibial y coxal, siendo más estable en los miembros almacenados en bolsas selladas que en solución de inmersión.

Elasticidad muscular; no se observaron alteraciones significativas a lo largo del tiempo, lo que indica una adecuada preservación estructural con el método propuesto.

Volumen muscular; se registró una ligera reducción inicial (2-4%), estabilizándose posteriormente, lo que sugiere una pérdida de masa muscular mínima.

Color de los tejidos, fue mantenido de forma satisfactoria, atribuido probablemente a la acción de los nitratos presentes en la fórmula, los cuales favorecen la formación de nitrosomioglobina.

Estos resultados confirman que el método CFP-Soft Fix es una alternativa viable y menos tóxica al uso de formaldehído, con capacidad para preservar adecuadamente las propiedades físicas de los tejidos blandos. No obstante, se sugiere continuar evaluando su desempeño frente a métodos convencionales mediante estudios comparativos controlados.

Se recomienda explorar con mayor profundidad el uso de cadáveres conservados con CFP-Soft Fix para estudios biomecánicos musculares. Aunque su utilidad ha sido demostrada en prácticas de entrenamiento clínico, como procedimientos laparoscópicos, anestesia regional y maniobras de intubación, aún se requiere validar la preservación funcional de las propiedades biomecánicas del músculo esquelético para ampliar sus aplicaciones.

Agradecimientos. Este equipo de trabajo agradece a la Dra. Madariaga María José miembro jubilada de este equipo de Investigaciones por sus aportes y guía durante la dirección de la tesis doctoral del Dr. MSc. MV. Carlos Pereyra. Este trabajo fue apoyado por la Universidad Nacional de Rosario, Secretaría de Ciencia y Tecnología (código de proyecto 1VET235). Agradecemos a la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR, (Argentina) y Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Área Morfología, Departamento de Ciencias Fisiológicas.

ORCID

- Pereyra, C.F.  <https://orcid.org/0000-0001-9207-7264>
 Parola, D.G.  <https://orcid.org/0009-0001-7509-6102>
 Biancardi, M.E.  <https://orcid.org/0009-0008-2894-2848>
 Pérez Mogetta, L.C.  <https://orcid.org/0009-0000-1541-0318>
 Cirimele, M.N.  <https://orcid.org/0009-0005-2138-8248>
 Venegas, V. L.  <https://orcid.org/0009-0006-5944-7669>

REFERENCIAS

1. American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals. Schaumburg, Illinois, EEUU. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey C, Grandin T, et al., Editores. 2013.
2. Benkhadra M, Bouchot A, Gérard J, Genelot D, Trouilloyd P, Martin L, Girard C, Danino A, Anderhuber F, Feigl G. Flexibility of Thiel's embalmed cadavers: the explanation is probably in the muscles. *Surg Radiol Anat.* 2011; 33(4): 365-8.
3. Berke JH. Cytologic examination of the nasal mucosa in formaldehyde-exposed workers. *J Occup Med.* 1987; 29(8): 681-4.
4. Bertone V, Blasi E, Ottone N, Dominguez M. Walther Thiel Method for the Preservation of Corpses with Maintenance of the main physical properties of Vivo. *Rev. argent. anat. online.* 2011; 2: 71-100.
5. Clark G. Staining Procedures. 4th ed. Baltimore: Biological Stain Commission (U.S.) Williams & Wilkins; 1981.
6. De Segura I. Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. Madrid: La Paz; 2007.
7. Eisma R, Lamb C, Soames RW. From formalin to thiel embalming: What changes? One anatomy department's experiences. *Clin Anat.* 2013; 26(5): 564-71.
8. García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana; 1993.
9. Hammer N, Löffler S, Bechmann I, Steinke H, Hädrich C, Feja C. Comparison of modified Thiel embalming and ethanol-glycerin fixation in an anatomy environment: Potentials and limitations of two complementary techniques. *Anat Sci Educ.* 2015; 8(1): 74-85.
10. Hayashi S, Homma H, Naito M, Oda J, Nishiyama T, Kawamoto A, Kawata S, Sato N, Fukuhara T, Taguchi H, Mashiko K. Saturated salt solution method: a useful cadaver embalming for surgical skills training. *Medicine.* 2014; 93(27): e196.
11. Hayashi S, Naito M, Kawata S, Qu N, Hatayama N, Hirai S, Itoh M. History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method. *Anat Sci Int.* 2016; 91(1): 1-7.
12. Healy SE, Rai BP, Biyani CS, Eisma R, Soames RW, Nabi G. Thiel embalming method for cadaver preservation: a review of new training model for urologic skills training. *Urology.* 2015; 85(3): 499-504.
13. Kerckaert I, Hoof T, Pattyn P, D'Herde K. Endogent: Centre for anatomy and invasive techniques. *anatomy (International journal of Experimental and Clinical Anatomy).* 2008; 1.
14. König HE, Probst A, Dier H, Sora C. Production of anatomical specimens for teaching practice in veterinary anatomy by means of polyethylene glycole (PEG) impregnation. A comparison with the method of plastination. *Agrociencia.* 2013; 29: 23-8.
15. Molina Aragón JM, Bausà Peris R, Carreras Valls R, Carrillo Castillo A, Fribà Nicolau F, Gaynés Palou E, Guerrero Monge J, Inglés Torruella J, López Muñoz JA, Martínez Martínez-Carrasco E, Matllo Aguilar J. Toxicidad del formaldehído en trabajadores profesionalmente expuestos. Revisión bibliográfica. *Arch Prev Riesgos Labor.* 2018; 21(3): 128-57.
16. Parodi TV, Cunha MA, Heldwein CG, de Souza DM, Martins ÁC, Garcia LD, Junior WW, Monserrat JM, Schmidt D, Caron BO, Heinzmann. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comp*

- Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2012; 155(3): 462-8.
17. Pulido Guerrero JA, Valderrama Sandoval JA. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Formaldehído capaz de disminuir el crecimiento bacteriano de cepas obtenidas en piscinas de conservación cadavérica. Bogotá: Javeriana Facultad De Ciencias Carrera de Microbiología. 2007; 20 SRC: 48-9.
18. Sugata Y, Miyaso H, Odaka Y, Komiyama M, Sakamoto N, Mori C, Matsuno Y. Levels of formaldehyde vapor released from embalmed cadavers in each dissection stage. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016; 23(16): 16176-82.
19. Thiel W. Die Konservierung ganzer Leichen in natürlichen Farben. *Ann Anat.* 1992; 174: 185-95.
20. Weber WA, Weiglein A, Latorre R, Henry R. Polyester plastination of Biological tissue: P35 technique. *J Int Soc Plastination.* 2007; 22: 50-8.
21. Zúñiga J, Marí Tur J, Milocco S. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. 1st ed. Madrid, España: Mc Graw-Hill Interamericana; 2001.