

Biotempo (Lima)



<https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo>

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

COMPARATIVE ANALYSIS OF THREE HISTOLOGICAL FIXATIVE SOLUTIONS IN THE TRACHEA AND SMALL INTESTINE OF *MUS MUSCULUS* (LINNAEUS, 1758) “ALBINO MOUSE”

ANÁLISIS COMPARATIVO DE TRES SOLUCIONES FIJADORAS A NIVEL HISTOLÓGICO EN TRÁQUEA E INTESTINO DELGADO DE *MUS MUSCULUS* (LINNAEUS, 1758) “RATÓN ALBINO”

Miguel Dávila-Robles^{1*}, Luz Meza-Yance¹ & Jeanfranco Rivas-Narrea¹

¹ Laboratorio de Microscopía (LA 76) - Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú.

* Corresponding author: miguel.davila@urp.edu.pe

Miguel Dávila-Robles:  <https://orcid.org/0000-0002-7429-4836>

Luz Meza-Yance:  <https://orcid.org/0000-0003-4864-5708>

Jeanfranco Rivas-Narrea:  <https://orcid.org/0000-0002-2105-1988>

ABSTRACT

The main objective of tissue preservation with the use of fixatives is to maintain the histology of an organ identical to its natural state for subsequent study. The most common fixatives used in histology are alcohol, formaldehyde, and Bouin's solution. Recent studies on the application of fixative substances in histological processes indicate the need to guarantee the quality of the relationship: type of fixator-sample. For this reason, the purpose of this work is to compare the fixation quality of alcohol, formaldehyde, and Bouin's solution at the tissue level of the trachea and small intestine of *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) “albino mouse”. To do this, the animal was slaughtered using an anesthetic, then the samples were dissected, extracted, and fixed, which were placed in vials containing ethyl alcohol, 10% formaldehyde, and Bouin's solution for a week; Subsequently, the histological process methodology was followed. The results indicate that in the trachea, fixation with Bouin better preserves the cellular structure, including microvilli and glands, while alcohol and formaldehyde show less defined epithelia and differences in the submucosa. On the other hand, in the intestine, Bouin's solution better preserves the four histological layers, while alcohol and formaldehyde stand out in the preservation of microvilli and cell shape, although with variations in the submucosa. In short, it is necessary to use fixing mixtures, such as Bouin's solution, to enhance the qualities of each fixative and attenuate its defects and disadvantages.

Keyword: Alcohol – Bouin's Solution – Formaldehyde – Small Intestine – Trachea



RESUMEN

La conservación de tejidos con el uso de fijadores tiene como principal objetivo mantener la histología de un órgano idéntico a su estado natural para su posterior estudio. Los fijadores más comunes usados en histología son el alcohol etílico, el formol y la solución de Bouin. Estudios recientes sobre la aplicación de sustancias fijadoras en procesos histológicos indican la necesidad de garantizar la calidad de la relación: tipo de fijador-muestra. Por este motivo, la finalidad del presente trabajo es comparar la calidad de fijación del alcohol, formol y Solución de Bouin a nivel tisular de la tráquea y del intestino delgado de *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) “ratón albino”. Para ello, se realizó el sacrificio del animal mediante el uso de un anestésico, luego, se realizó la disección, extracción y fijación de las muestras, las cuales fueron colocadas en viales que contenían alcohol etílico, formol 10% y solución de Bouin durante una semana; posteriormente se siguió la metodología del proceso histológico. Los resultados indican que en la tráquea la fijación con Bouin conserva mejor la estructura celular, incluyendo microvellosidades y glándulas, mientras que alcohol y formol muestran epitelios menos definidos y diferencias en la submucosa. Por otro lado, en el intestino, la Solución de Bouin preserva mejor las cuatro capas histológicas, mientras que alcohol y formol destacan en la conservación de microvellosidades y forma celular, aunque con variaciones en la submucosa. En síntesis, es necesario el uso de mezclas fijadoras, como la solución de Bouin, con el propósito de potenciar las cualidades de cada fijador y atenuar sus defectos y desventajas.

Palabras clave: Alcohol – Formol – Intestino Delgado – Solución de Bouin – Tráquea

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de conservación de tejidos con el uso de fijadores tienen la función principal de mantener la histología de un órgano idéntico a su estado natural para su posterior estudio (Poveda & Calvache, 2021). Es por este motivo que, un buen fijador debe cumplir con determinadas características como: a) evitar la autólisis, b) proteger la muestra de diferentes ataques bacterianos, c) insolubilizar elementos observables, d) evitar distorsiones y retracciones tisulares y e) preparar al tejido para procedimientos de tinciones específicas (Megías *et al.*, 2018). Los fijadores comúnmente usados en histología son el alcohol etílico, el formol y la solución de Bouin. Se menciona al alcohol como un fijador no iónico que penetra en el tejido provocando contracción y endurecimiento de la muestra, genera una coagulación total del citoplasma y hace que diversos componentes celulares sufran el “efecto arrastre” (Tomasi, 2013). Por otro lado, el formol es considerado como uno de los mejores fijadores universales del sistema nervioso por lo económico y penetrante (Solís, 1966). Por último, la Solución de Bouin es un compuesto conformado por el formol, ácido pícrico y ácido acético glacial; especialmente indicado para la fijación de tejidos blandos, glándulas y órganos reproductores (Ballesteros, 2022).

La tráquea es un conducto del sistema respiratorio que histológicamente está formada por mucosa, submucosa, capa cartilaginosa y adventicia (Arce & Iniesta, 2015). La

mucosa está formada por un epitelio pseudoestratificado ciliado, el cual posee tres tipos principales de células: ciliadas, mucosas y basales; y por una lámina propia de tejido conectivo laxo (Alfaro, 2007). La submucosa está conformada por tejido conectivo laxo, similar a la lámina propia. La capa cartilaginosa es hialina formada por anillos incompletos en forma de C en el cual se suele encontrar músculo liso dispuesto de forma transversal, aunque en algunas puede tener orientación longitudinal. La adventicia recubre la parte externa de los anillos incompletos cartilaginosos conformada por tejido conectivo, el cual, puede contener tejido adiposo (Megías *et al.*, 2018).

El intestino delgado es un conducto largo que se divide en tres zonas: duodeno, yeyuno e íleon caracterizándose por la presencia de las Glándulas de Brunner, las Células de Paneth y las Placas de Peyer, respectivamente (Ferrufino *et al.*, 1996). Su arquitectura histológica está conformada por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Megías *et al.*, 2018). La capa mucosa presenta un epitelio de revestimiento cilíndrico simple y debajo posee una lámina propia de tejido conectivo laxo. Entre la lámina propia y la submucosa se encuentra la muscular de la mucosa siendo la responsable del movimiento de las vellosidades (Herrería, 2013). La capa submucosa está compuesta por tejido conjuntivo laxo o denso, donde se encuentran las glándulas, los vasos sanguíneos y los plexos nerviosos submucosos (Illanes *et al.*, 2006). La capa

muscular se conforma por dos capas de músculo: capa muscular longitudinal (más externa) y capa muscular circular (más interna). La capa serosa está formada por una capa fina de tejido conjuntivo laxo, revestida de epitelio simple plano conocido como mesotelio (Junqueira & Carneiro, 2015).

Los estudios más recientes sobre la aplicación de sustancias fijadoras en procesos histológicos indican la necesidad de garantizar la calidad del proceso de manipulación y procesamiento del tejido dependiendo de la concentración, el tipo de sustancia, el tiempo y la temperatura (Guamán & Aroca, 2024). De esta manera, las investigaciones referentes al uso del formol mencionan alteraciones de la química y la morfología del tejido al tratarse de un tiempo de fijación muy prolongado (Wu *et al.*, 2022). Por otra parte, se menciona que el fijador de Bouin no es apto para biopsias renales debido a las distorsiones observadas en las muestras (Howat & Wilson, 2014). No obstante, otros estudios han demostrado que la fijación con alcohol logra preservar mejor la morfología de los tejidos que el formol (Haque *et al.*, 2020).

En relación a *Mus musculus* Linnaeus 1758 “ratón albino”, es el animal más utilizado en las pruebas de diagnóstico e investigación debido a su disponibilidad comercial, su pequeño tamaño, vida relativamente corta, su alta tasa reproductiva y su bajo costo de mantenimiento (Benavides & Guenet, 2014; Ayala, 2021). Asimismo, el genoma del ratón posee un 95% de coincidencia con el genoma humano destacando así su valor como un modelo biológico para realizar investigaciones científicas (Hidalgo, 2017).

En este sentido, la finalidad del presente trabajo es comparar la calidad de fijación del alcohol etílico, formol y solución de Bouin a nivel tisular de la tráquea y del intestino delgado de *M. musculus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Proceso histológico

Obtención y fijación de la muestra

El procedimiento se inició con el sacrificio del animal mediante el uso de un anestésico, posteriormente, se realizó la disección y extracción de las muestras de tráquea e intestino delgado de tres ratones albinos (*M. musculus*), las cuales fueron colocadas en viales que contenían alcohol etílico, formol 10% y solución de Bouin, cada uno con 10 ml del fijador, durante una semana.

Inclusión en parafina y coloración

Las muestras fijadas fueron colocadas en cassettes para realizar el proceso de “deshidratación” en alcoholes etílico de 70°, 80°, 90°-I, 90°-II, 100°-I y 100°-II por 45 min en cada uno; luego, se realizó el “aclaramiento” Xilol-I y Xilol-II por 15 min en cada uno; después, se llevó a cabo la “impregnación” en Parafina-I y Parafina-II fundidas a 60 °C durante 1 h en cada una; por consiguiente, se completó con la “inclusión” en Barras de Leuckart con parafina para obtener un bloque sólido y brindar consistencia a la muestra. Finalmente, se realizaron los “cortes en microtomía” de 6µm para su “coloración” en Hematoxilina-Eosina (H-E) y su “montaje” con Bálsamo de Canadá.

Observación en el microscopio

Para la observación individual de las láminas se empleó un microscopio óptico con cámara incorporada de la marca Leica y el Software Lasez para la adquisición de imágenes de un campo visual por objetivo para la observación de la arquitectura histológica (40x) y detalles celulares (100x). Para el reconocimiento de los tipos de tejidos y células se emplearon los Atlas de Histología Normal (Di Fiore, 2019) e Histología: Texto y Atlas (Ross & Pawlina, 2015).

Aspectos éticos: Los autores indican que se siguieron todos los procesos estándares éticos del país.

RESULTADOS

Tráquea

En la muestra fijada con alcohol, se aprecia la arquitectura histológica compuesta por una mucosa con epitelio disperso e incompleto, una submucosa con la presencia de algunas glándulas y una capa cartilaginosa uniforme. Por otro lado, en la muestra fijada con Bouin, se observa la capa mucosa con células del epitelio compactas y dispuestas sobre la capa submucosa, en la cual se logran distinguir un mayor número de glándulas. Asimismo, se observa la capa cartilaginosa con una mejor coloración que la anterior. Por último, en la muestra fijada con formol, se aprecia una submucosa con la presencia de glándulas, separada de la capa cartilaginosa por un espacio sin tejido (Fig. 1).

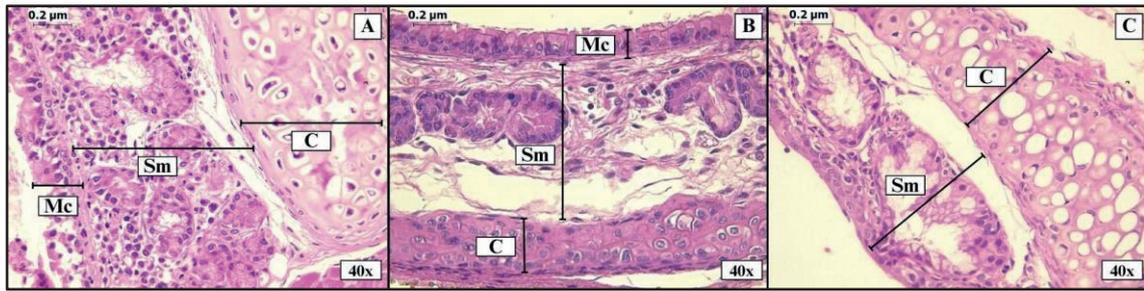


Figura 1. Arquitectura histológica de la tráquea. A: Alcohol, B: Solución de Bouin y C: Formol. Mucosa (Mc), Submucosa (Sm), Cartílago (C). Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

En las muestras fijadas con Bouin y Formol se identifica la presencia de microvellosidades, siendo el primer fijador el único que logra conservar mejor su disposición y estructura. Esto se evidencia debido a que en las muestras fijadas con Formol se observa un epitelio con espacios vacíos y microvellosidades dispuestas en diferentes direcciones, mientras que en las muestras fijadas con alcohol no se observan microvellosidades y sólo rezagos

de estas mismas. Además, se puede observar la presencia de glándulas (mucosas y serosas) en todas las muestras, sin embargo, tanto el Alcohol como el Formol logran conservar mejor su estructura. De manera similar, en todas las muestras se observa la presencia de condrocitos y condroblastos dispuestos a lo largo del cartílago hialino (Fig. 2).

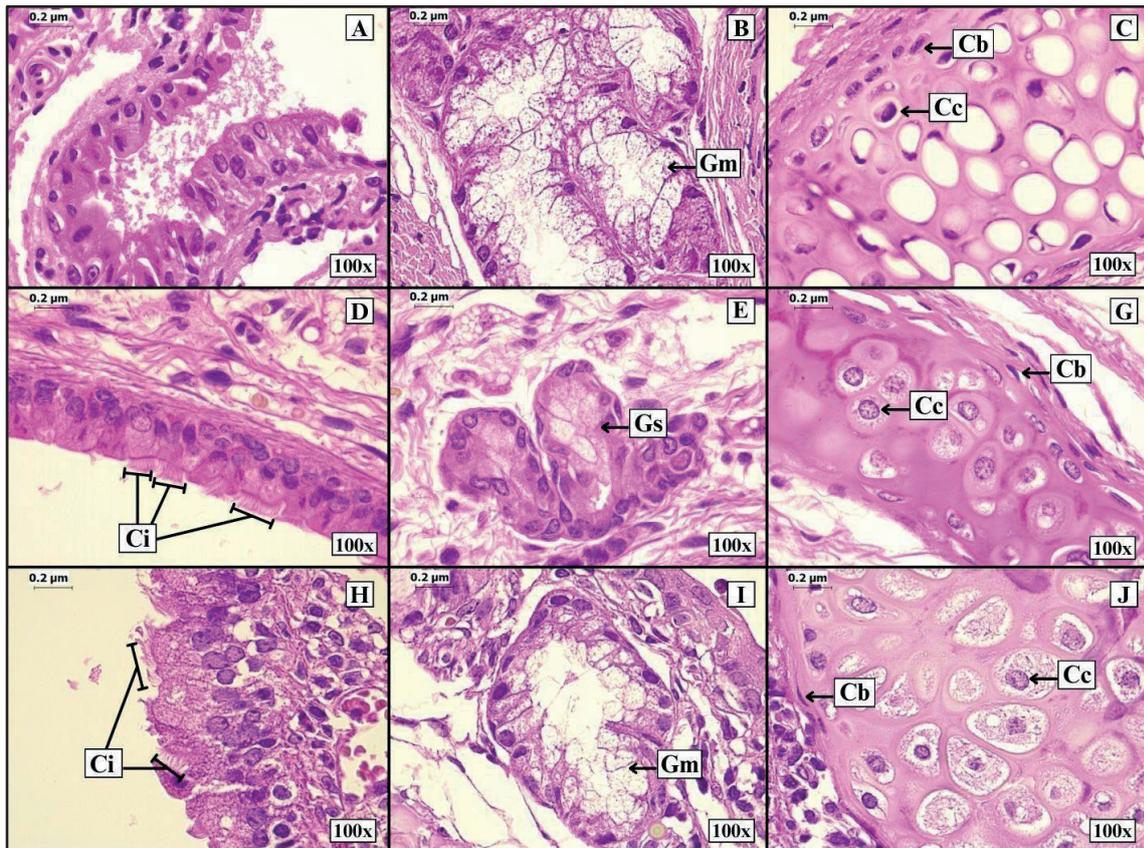


Figura 2. Detalles celulares de la tráquea. A, B y C: alcohol, D, E y F: Solución de Bouin, H, I y J: formol; cilios (Ci), glándula mucosa (Gm), glándula serosa (Gs), condrocito (Cc), condroblasto (Cb). Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

Intestino delgado

En las muestras fijadas con alcohol, la capa mucosa y la capa muscular se encuentran mejor conservadas, ya que, logran diferenciarse, mientras que la capa submucosa y la capa serosa no se llegaron a conservar. En la fijación de la solución de Bouin, se puede distinguir la arquitectura histológica en una correcta conservación: la mucosa, la

submucosa, la muscular y la serosa. Por último, en la fijación con formol se pueden apreciar las cuatro capas, empero la capa submucosa se observa con una poca o nula conservación de las estructuras; por otro lado, la capa mucosa, la capa muscular y la capa serosa son aquellas que se conservan mejor y poseen las características límites entre cada capa (Fig. 3).

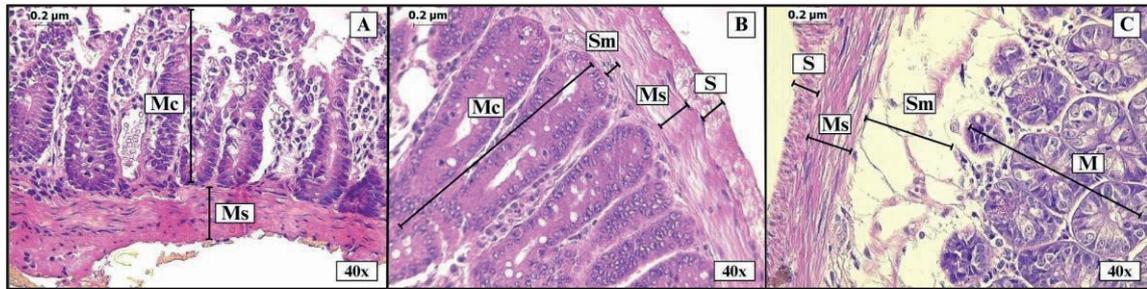


Figura 3. Arquitectura histológica del intestino. A: Alcohol, B: Solución de Bouin y C: Formol. Mucosa (Mc), Submucosa (Sm), Muscular circular (Mc), Serosa. Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

Los tres fijadores son buenos conservantes de las microvellosidades y los núcleos ovalados de los enterocitos, sin embargo, se pueden apreciar diferencias en éstos últimos. El alcohol y el formol conservan la forma cilíndrica, por otra parte, la solución de bouin

no conserva la forma de los enterocitos. Las células caliciformes se visualizan mejor en la solución de bouin, empero no se conserva la forma de cáliz; el alcohol y el formol conservan mejor la forma de la célula, no obstante, puede resultar complejo visualizarlas (Fig. 4).

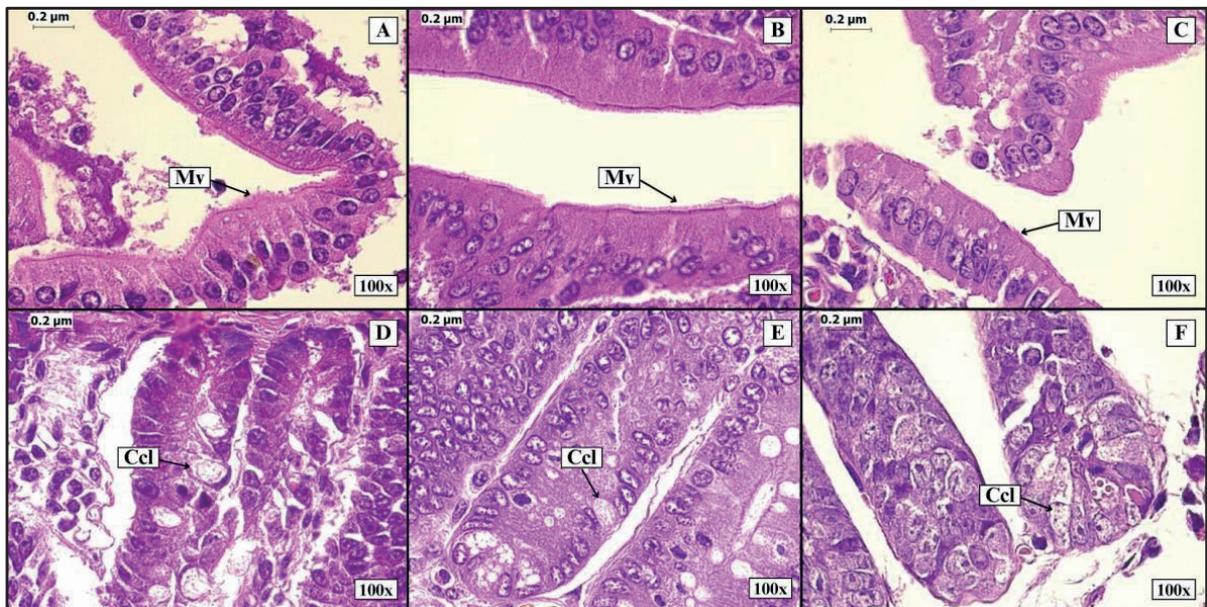


Figura 4. Detalles celulares del esófago. A y D: alcohol, B y E: solución de bouin, C y F: formol; microvellosidades (Mv), células caliciformes (Cel). Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

DISCUSIÓN

En relación a la tráquea, la arquitectura histológica visualizada se compone de las capas mucosa, submucosa y el cartílago, con escasas evidencias de la capa serosa. Según Rajathi (2020), quien estudió la histología completa de la tráquea del perro, menciona que este conducto, desde la luz hasta el exterior, consiste de cuatro capas bien diferenciadas: la mucosa, la submucosa, cartílago hialino y túnica adventicia o serosa. Ello también es afirmado por Alfaro (2007) quien empleó formaldehído al 10% para la fijación de la tráquea del cuy. Estos estudios permiten afirmar que los tres fijadores empleados (alcohol etílico, solución de Bouin y formol) conservan de manera incompleta la capa más externa y, por lo tanto, la arquitectura total de la muestra.

Con respecto a la capa mucosa, los resultados indican que la efectividad de conservación, de mayor a menor, es: Solución de Bouin, formol y alcohol etílico. Según Alfaro (2007) afirma que esta capa se encuentra revestida por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células caliciformes. Sin embargo, a pesar de que en todas las muestras no se evidencie la presencia de células caliciformes, la solución de Bouin logra mantener la característica del epitelio; mientras que el formol conserva pocas microvellosidades y el alcohol ninguna, ambos presentando las células ligeramente separadas e inclinadas, siendo estas características las que difieren con la descripción de Ovalle & Nahirney (2021), quienes afirman que la capa mucosa posee un epitelio columnar alineado.

Además, se reconoce que todos los fijadores conservan de manera adecuada las glándulas de la capa submucosa, ello de manera similar a los resultados de Crespo (1998), en donde el empleo de formol neutro 10% en buffer fosfato en la tráquea de cuyes, logra la conservar las glándulas de la submucosa que conectan con diversos espacios respiratorios. Asimismo, en todas las muestras se logra conservar el cartílago, los condroblastos y condrocitos, por lo que, los tres fijadores permiten la preservación del cartílago para un análisis específico. Sin embargo, de acuerdo a lo descrito por Fletcher (2021) en la tráquea, los anillos cartilagosos se encuentran incompletos y forman parte de aproximadamente dos tercios del círculo. Por lo que, a diferencia del alcohol y el formol, la solución de Bouin mantiene la disposición de aquellas estructuras considerando la arquitectura histológica global.

De la misma manera, los resultados obtenidos en la fijación del intestino delgado demuestran que la conservación de la arquitectura histológica varía con cada fijador.

En este sentido Haque *et al.* (2020) mencionan que los fijadores en base de alcohol no generan alteraciones significativas en los tejidos, a diferencia del formol que causa una deshidratación y, por tanto, una alteración en la morfología del tejido. No obstante, los resultados obtenidos no coinciden con lo previamente mencionado, debido a que el alcohol no preserva adecuadamente la capa submucosa, mientras que el formol sí. No obstante, se logra evidenciar estructuras más específicas con alcohol como: células caliciformes y enterocitos con microvellosidades.

En relación al formol, Moreno-Durán *et al.* (2007) mencionan que posterior a la fijación del intestino delgado en formol buferado al 10% se logra diferenciar tres capas: la mucosa, la submucosa y la muscular. Por otro lado, Santos *et al.* (2016), empleando solución Bouin, obtuvieron el mismo resultado al lograr diferenciar las tres capas del intestino delgado. Los resultados de ambos estudios coinciden con los del presente estudio, pues ambos fijadores permiten apreciar las tres capas tisulares mencionadas. Empero, se logra evidenciar que la solución de Bouin conserva en mejores condiciones las características de las estructuras celulares presentes en este órgano.

De esta manera, se destacan estructuras como: enterocitos con borde estriado y células caliciformes, las cuales son características del intestino delgado. En relación a la investigación realizada por Ontiveros *et al.* (2014) obtienen que, con el uso de formol, los enterocitos presentan un borde estriado (microvellosidad), sin embargo, no se logra conformar una visión de la forma del enterocito. En contraste, los resultados obtenidos revelan una apreciación clara de la forma completa del enterocito. Ello destaca la calidad del formol como fijador, siendo una característica determinante para la observación de las características del enterocito. Por otro lado, Santos *et al.* (2016) mencionan que la capa mucosa presenta células caliciformes notorias al ser fijadas en solución de Bouin, sin una visualización clara de las células epiteliales del intestino delgado: enterocitos. Del mismo modo, en este estudio, las células caliciformes se visualizan con mayor claridad en la solución de Bouin; sin embargo, no se conserva la forma de cáliz.

Se concluye que los fijadores empleados presentan capacidades variables para conservar la histología de la tráquea y el intestino delgado. En la muestra de tráquea, la solución de Bouin conserva de mejor manera la arquitectura histológica, como los anillos cartilagosos y el epitelio columnar en la mucosa; mientras que el formol y el alcohol muestran una conservación menos

óptima, siendo el alcohol el menos efectivo. En cuanto al intestino delgado, el formol y la solución de Bouin logran una diferenciación adecuada de las capas tisulares, siendo la última la que ofrece una mejor conservación de las estructuras celulares y sus características, como las células caliciformes y los enterocitos. En este contexto, una única sustancia fijadora difícilmente cumple con todos los requisitos para lograr una fijación óptima, ello considerando la arquitectura total del tejido y los detalles celulares en el mismo. Por lo tanto, es necesario el uso de mezclas fijadoras, como la solución de Bouin, con el propósito de potenciar las cualidades de cada fijador y atenuar sus defectos y desventajas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú por la oportunidad de investigación.

Author contributions: CRediT (Contributor Roles Taxonomy)

MDR = Miguel Davila-Robles

LMY = Luz Meza-Yance

JRN = Jeanfranco Rivas-Narrea

Conceptualization: MDR, LMY, JRN

Data curation: MDR, LMY, JRN

Formal Analysis: MDR, LMY, JRN

Funding acquisition: MDR

Investigation: MDR, LMY, JRN

Methodology: MDR, LMY, JRN

Project administration: MDR

Resources: MDR

Software: MDR, LMY, JRN

Supervision: MDR

Validation: MDR, LMY, JRN

Visualization: MDR, LMY, JRN

Writing – original draft: MDR, LMY, JRN

Writing – review & editing: MDR, LMY, JRN

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfaro, C. (2007). *Contribución al estudio histológico del respiratorio del cuy (Cavia porcellus)*. [Tesis de tipo Bachiller, Universidad Nacional de Cajamarca]. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Cajamarca.
- Arce, R., & Iniesta, J. (2015). *Libro virtual de formación en Otorrinolaringología*. SEORL-PCF.
- Ayala, M. (2021). El ratón como animal de experimentación. En Carbone, C., Ayala, M., & Cagliada, M. (Eds.), *Ciencia del bienestar de los animales del laboratorio*. (pp. 128-141). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Ballesteros, J. (2022). *Procesamiento histológico: Fijadores*. PanReac AppliChem. https://www.itwreagents.com/download_file/ce_ivd_instructions/CEIVD06/es/CEIVD06_es.pdf
- Benavides, F., & Guenet J. (2014). Capítulo II: Biología y manejo reproductivo del ratón *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (309). (pp. 59-81). <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/02-GENETICA-Pba-2.pdf>.
- Crespo, F. (1998). *Morfología funcional en el sistema respiratorio de mamíferos marinos*. [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires]. Repositorio Digital Institucional de la Universidad de Buenos Aires.
- Di Fiore, M. (2019). *Atlas normal de Histología* (8^{va} ed). El Ateneo.
- Ferrufino, J., Taxa, L., & Ángeles, G. (1996). Histología normal del intestino delgado. Normal Histology of Small Bowel. *Revista Medica Herediana*, 7, 46-57.
- Fletcher, C. (2021). Chapter 4: Tumors of the Upper Respiratory Tract. En: Fletcher, C. (ed.) *Diagnostic Histopathology of Tumors* (96-224). Elsevier Health.
- Guamán, Y., & Aroca, C. (2024). *Aplicación de sustancias fijadoras en tejidos humanos en procesos histológicos* [Tesis para optar el Título de Licenciado en Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico]. Universidad Nacional de Chimborazo.
- Haque, Z., Rahman, A., Khan, Z., Hussan, M., & Alam, M. (2020). Alcohol-Based Fixatives can Better Preserve Tissue Morphology than Formalin. *International Journal of Morphology*, 38, 1371-1375.

- Herrería, E. (2013). *Intestino delgado y patologías asociadas a la malabsorción intestinal*. [Tesis para optar por el grado en Enfermería, Universidad de Cantabria]. Repositorio Abierto de la Universidad de Cantabria.
- Hidalgo, J. (2017). *Equipamientos para ratones de laboratorio* [Tesis para optar el título de Diseñador inédita]. Universidad Pontificia Católica de Chile.
- Howat, W., & Wilson, B. (2014). Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*, 70, 12–19.
- Illanes, J., Fertilio, B., Chamblas, M., Leyton, V., & Verdugo, F. (2006). Descripción Histológica de los Diferentes Segmentos del Aparato Digestivo de Avestruz (*Struthio camelus var. domesticus*). *International Journal of Morphology*, 24, 205-214.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2015). Capítulo 15: Sistema Digestivo. Ponce, S. (Ed.) *Histología Básica* (pp. 280-310). Médica Panamericana.
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2018). *Técnicas histológicas: Fijación*. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. <https://atlashistologia.webs7.uvigo.es/pdfs-descargas/tecnicas-fijacion>
- Moreno-Durán, C., López-Hurtado, C., & Ruiz-Sanchez, F. (2007). Histología del sistema digestivo de *Didelphis albiventris* (Lund, 1840). *Universitas Scientiarum*, 12, 41-53.
- Ontiveros, R., Muñoz, F., & Anzaldúa, S. (2014). Características histológicas e histoquímicas del intestino delgado en crías de la tortuga caguama (*Caretta caretta*). *Veterinaria México OA*, 1, 1-15.
- Ovalle, W., & Nahirney, P. (2021). Chapter 15: Respiratory System. En Ovalle, W., & Nahirney, P. (Eds.). *Netter's Essential Histology* (pp. 359-380). Elsevier.
- Poveda, H., & Calvache, Z. (2021). *Conocimiento sobre la técnica de fijación de muestras anatomopatológicas, por parte del personal que labora en una institución prestadora de servicios de salud Hospital de San José de Popayán*. Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud - FUCS. <https://repositorio.fucsalud.edu.co/handle/001/1946>
- Rajathi, S. (2020). Histology of the Trachea in Dogs. *International Journal of Arts, Science and Humanities*, 7, 80-83.
- Ross, M.; & Pawlina, W. (2015). *Histología: Texto y Atlas* (7^{ma} ed). Lippincott Williams & Wilkins.
- Santos, H., Vieira, L., Nunes, S., & Gruppi, R., (2016). Análise do intestino delgado de Danio rerio exposto a organofosforado e detergente: um estudo histológico e morfométrico. *Revista Conexão*, 11, 51-58.
- Solís, M. (1966). Técnicas de fijación y coloración histológicas. *Instituto Nacional de Investigaciones*, 11, 1-44.
- Tomasi, H. (2013). *Métodos Histológicos*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Wu, X., Deng, C., Su, Y., Chaoyi, Z., Chen, M., Tian, K., Wu, H., & Xu, S. (2022). The effect of prolonged formalin fixation on the expression of proteins in human brain tissues. *Acta Histochemica*, 124, 1-9.

Received August 29, 2024.

Accepted October 11, 2024.