



## **FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

PROPUESTA LIBRE DE XILOL O SUSTITUTO PARA EL ACLARADO EN LA  
COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EN COMPARACIÓN CON EL  
PROTOCOLO CONVENCIONAL

**Línea de investigación**

**Salud pública**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado Tecnólogo Médico en  
Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

**Autora**

Pampañaupa Enciso, Leydi Pilar

**Asesor**

Hurtado Concha, Arístides

Código ORCID 0000-00003-2384-4735

**Jurado**

Suárez Obregón, Evert Segundo

Guerrero Barrantes, Cesar Enrique

Astete Medrano, Delia Jess

**Lima - Perú**

**2024**



# “PROPUESTA LIBRE DE XILOL O SUSTITUTO PARA EL ACLARADO EN LA COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EN COMPARACIÓN CON EL PROTOCOLO CONVENCIONAL”

## INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://repositorio.unfv.edu.pe">repositorio.unfv.edu.pe</a> Fuente de Internet	11%
2	<a href="http://repositorio.unfv.edu.pe:8080">repositorio.unfv.edu.pe:8080</a> Fuente de Internet	4%
3	Submitted to Universidad Nacional Federico Villarreal Trabajo del estudiante	1%
4	<a href="http://archive.org">archive.org</a> Fuente de Internet	<1%
5	<a href="http://1library.co">1library.co</a> Fuente de Internet	<1%
6	<a href="http://dspace.umh.es">dspace.umh.es</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="http://www.lvejo.org">www.lvejo.org</a> Fuente de Internet	<1%
8	Submitted to Universidad de Caldas Trabajo del estudiante	<1%



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

## **FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

PROPUESTA LIBRE DE XILOL O SUSTITUTO PARA EL ACLARADO  
EN LA COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EN COMPARACIÓN  
CON EL PROTOCOLO CONVENCIONAL

**Línea de Investigación: Salud pública**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado Tecnólogo Médico en  
Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

### **Autora**

Pampañaupa Enciso, Leydi Pilar

### **Asesor**

Hurtado Concha, Arístides  
ORCID: 0000-00003-2384-4735

### **Jurado**

Suárez Obregón, Evert Segundo  
Guerrero Barrantes, Cesar Enrique  
Astete Medrano, Delia Jessica

Lima – Perú

2024

## **DEDICATORIA**

A Dios por toda su gratitud y amor misericordioso.

A mi madre Martha Enciso Liceras por su compañía y sacrificio.

A mis hermanos en especial a Keli por su gran apoyo constante y motivación.

A Félix Magallanes por su dedicación, tiempo, amor y paciencia.

### **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por ser mi guía y mi apoyo en cada etapa de mi vida.

A la Universidad Nacional Federico Villarreal, por permitirme cumplir mis sueños.

A los doctores, Cesar Augusto Chian y Miranda Zenaida Lozano, por abrirme las puertas y darme las facilidades para la ejecución de mi tesis.

A todo el personal del laboratorio “Patología Microscópica y Molecular” por su gentileza.

Al magister Gean Carlos por su gran apoyo.

A mis profesores y los grandes profesionales que he conocido a lo largo de mi vida.

## ÍNDICE

Resumen.....	8
Abstract .....	9
I. Introducción.....	10
1.1 Descripción y formulación del problema .....	11
1.2 Antecedentes .....	13
1.3 Objetivos .....	17
1.4 Justificación.....	17
1.5 Hipótesis.....	19
II. Marco teórico .....	20
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	20
III. Método .....	26
3.1 Tipo de investigación .....	26
3.2. Ámbito temporal y espacial .....	26
3.3. Variables.....	26
3.4. Población y muestra.....	28
3.5. Instrumentos.....	29
3.6. Procedimientos.....	29
3.7. Análisis de datos .....	30
3.8. Consideraciones éticas .....	30
IV. Resultados .....	31
4.1. Descripción de los resultados.....	31

V. Discusión de resultados.....	35
VI. Conclusiones.....	38
VII. Recomendaciones .....	39
VIII. Referencias.....	40
IX. Anexos .....	44

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Cuadro de operacionalización .....	27
<b>Tabla 2</b> Características de la muestra estudiada.....	32
<b>Tabla 3</b> Tabla de contingencia entre el protocolo de coloración empleado y la calidad de imagen histológica reportado.....	34
<b>Tabla 4</b> Ficha de recolección de datos.....	46
<b>Tabla 5</b> Modelo Certificado de validez del contenido	
<b>Tabla 6</b> Certificado de validez de contenido del instrumento – experto 1.....	51
<b>Tabla 7</b> Certificado de validez de contenido del instrumento – experto 2.....	53
<b>Tabla 8</b> Certificado de validez de contenido del instrumento – experto 3.....	55

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Comparación entre los protocolos de coloración utilizado .....	33
<b>Figura 2</b> Ficha de recolección de datos.....	46
<b>Figura 3</b> Cálculo de tamaños de muestra.....	47
<b>Figura 4</b> Solicitud de ejecución de proyecto.....	48
<b>Figura 5</b> Coloración hematoxilina eosina convencional .....	59
<b>Figura 6</b> Coloración hematoxilina eosina modificada.....	60

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar si la calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado presentará diferencias significativas en comparación con el método convencional. **Método:** Estudio cuasiexperimental, que evaluó una población de 4477 bloques de biopsias en parafina, obteniéndose 199 bloques para el muestreo en un laboratorio privado. Se elaboraron dos cortes por cada bloque, y se aplicaron métodos de coloración de Hematoxilina-Eosina (HE), convencional y un protocolo libre de xilol para la etapa de aclarado. **Resultado:** los puntajes de calidad de la imagen histológica por el protocolo de coloración convencional en relación con el aspecto general, núcleo, citoplasma y medio extracelular fueron 5.6, 1.9, 1.9 y 1.9, respectivamente. Por otro lado, los promedios de los puntajes de la calidad de la imagen histológica para el nuevo protocolo de coloración en relación con el aspecto general, núcleo, citoplasma y medio extracelular fueron 5.5, 1.8, 1.8 y 1.8. Finalmente, la prueba T de student determinó los siguientes valores en relación a ambos protocolos: núcleo ( $p=0.0747$ ), citoplasma ( $p=0.0747$ ), medio extracelular ( $p=0.0747$ ) y en general se obtuvo un  $p= 0.1243$ , **Conclusiones:** La calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado, no presenta diferencias significativas en comparación con el método convencional con respecto a la calidad de imagen histológica para la dimensión del núcleo, citoplasma y dimensión del medio extracelular. Lo que implica que puede usarse como una alternativa menos tóxica, económica y ecoamigable.

**Palabras clave:** Aclarado, xilol, hematoxilina y eosina.

## ABSTRACT

**Objective:** To determine whether the histological image quality of the xylol-free proposal or substitute for rinsing will present significant differences compared to the conventional method.

**Method:** A quasi-experimental study evaluated a population of 4477 blocks of paraffin biopsies, obtaining 199 blocks for sampling in a private laboratory. Two sections were made for each block, and conventional Hematoxylin-Eosin (HE) staining methods and a xylol-free protocol were applied. **Results:** Histological image quality scores by the conventional staining protocol in relation to general appearance, nucleus, cytoplasm and extracellular medium were 5.6, 1.9, 1.9 and 1.9, respectively. On the other hand, the mean histological image quality scores for the new staining protocol in relation to general appearance, nucleus, cytoplasm, and extracellular medium were 5.5, 1.8, 1.8, and 1.8. Finally, the Student's T test determined the following values in relation to both protocols: nucleus ( $p=0.0747$ ), cytoplasm ( $p=0.0747$ ), extracellular medium ( $p=0.0747$ ) and in general a  $p=0.1243$  was obtained. **Conclusions:** The histological image quality of the xylol-free proposal or substitute for rinsing, does not present significant differences compared to the conventional method with respect to the histological image quality for the dimension of the nucleus, cytoplasm and dimension of the extracellular medium. This implies that it can be used as a less toxic, economical and eco-friendly alternative.

**Key words:** Rinsing, xylol, hematoxylin and eosin.

## I. INTRODUCCIÓN

La técnica de la coloración hematoxilina-eosina, es una coloración rutinaria en el laboratorio de anatomía patológica que tiene por finalidad reconocer tejidos y cambios morfológicos que sirven de gran información para el diagnóstico médico (Santos, 2017). Esta coloración comprende una secuencia; desparafinado, hidratación, coloración, deshidratación y aclarado; es en esta última etapa el personal está más expuesto al xilol, ya que debe montar una gran cantidad de láminas embebidas de xilol, o estar expuestos a los gases tóxicos que se genera al secar las láminas en el horno o en el ambiente.

El xilol es un hidrocarburo aromático inflamable, potencialmente cancerígeno, hepatotóxico que causa efectos nocivos, graves y duraderos en el personal de salud expuesto a tiempos prolongados o a grandes cantidades en periodos cortos (Prema et al., 2020).

Los vapores del xilol causan el efecto de deprimir el sistema nervioso central causando dolores de cabeza, mareos, náuseas y vómitos de igual manera los sustitutos de xilol que son hidrocarburos alifáticos, que contienen benceno, limoneno y tolueno los cuales dañan la muestra y también son tóxicos (Thamilselvan et al., 2021). Por ello es necesario la implementación de agentes ecológicos para la coloración hematoxilina y eosina. Por su parte la regulación de la Administración de salud y seguridad Ocupacional (OSHA), indica que el xilol como un derivado del petróleo lo cual lo convierte en peligroso y por ello exige desplazarlo.

Por lo mencionado este trabajo plantea un nuevo protocolo libre de xilol o sustituto para la etapa de aclarado lo cual contribuye a evitar la exposición al xileno, ya sea por el inadecuado uso de EPPS, accidentes o malas prácticas en esa etapa; además de ello contribuir con el ambiente reduciendo el uso de derivados de petróleo y reducir costos para los laboratorios.

## 1.1 Descripción y Formulación del Problema

La Hematoxilina-Eosina es una tinción topográfica que sirve para el estudio general de los tejidos y es el método de tinción más usado en investigación y medicina diagnóstica. Esta técnica usa la hematoxilina que fue introducida en 1863 por Waldeyer; según los alemanes, y la eosina es introducida por Fischer en 1875 (Salazar y Moreno, 2017).

La Hematoxilina en sí no es un colorante, ya que debe ser oxidada a hemateína que asociada a iones de aluminio forman hemalumbre, el cual se emplea para esta técnica. (Santos, 2017). El hemalumbre es un colorante básico que contiene grupos catiónicos los cuales le dan la característica básica para colorear estructuras ácidas de la célula; por otro lado, la eosina es un colorante aniónico que tiñe las partes ácidas de la célula. En la actualidad, se usan eosina “Y” conocida como amarilla y la “B” conocida como la azul. Aunque existan múltiples técnicas de coloración para tejidos, esta técnica es la preferida pues genera cromaticidad permitiendo observar los finos detalles del tejido (Cediel et al., 2009).

El protocolo de tinción de Hematoxilina – Eosina requiere antes de su ejecución la preparación del tejido u órgano a estudiar mediante la fijación y en segundo paso la infiltración en parafina con la finalidad de obtener cortes finos medidos en micras. En cuanto a las etapas de la tinción propiamente dichas; comprende el desparafinado, hidratación, tinción de hematoxilina, tinción de eosina, deshidratación y aclarado. (Santos, 2017). En el desparafinado y en el aclarado se usa convencionalmente un compuesto denominado xilol o xileno, este es un material sintético derivado del petróleo el cual resulta muy nocivo para la salud. Comprende una mezcla de tres isómeros de dimetil-benceno y en adición el etilbenceno. Este último es muy volátil e inflamable y se encuentra en un 15% de la mezcla total de xileno. (ATSDR, 2022)

El xilol inhalado o al contacto directo con la piel es absorbido rápidamente apareciendo a las 2 horas en la orina. Además, los vapores son absorbidos en un 50 a 75% del total de aire aspirado, para luego ser retenido 18 horas en el cuerpo; solo un 4 a 10% es almacenado y retenido en el tejido adiposo por un periodo que puede tardar hasta 6 días y a una exposición

aún más prolongada en el caso del personal del área de anatomía patológica. El xilol causa sintomatología variada, así como también enfermedades crónicas: irritación de membranas mucosas, cefalea, desordenes neurológicos, dificultad respiratoria, tumores y leucemias, considerándose muy nocivo y perjudicial para la salud. (Moya y Rojas, 2018)

En ese sentido, es necesario realizar una tinción de Hematoxilina-Eosina que no presente al reactivo Xilol o sustituto de xilol como parte de su protocolo.

### ***1.1.1. Pregunta general***

¿La propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado en la coloración Hematoxilina-Eosina presentará diferencias significativas en la calidad de la imagen histológica en comparación con el protocolo convencional?

### ***1.1.2. Pregunta específica***

¿La propuesta libre de Xilol o sustituto para el aclarado en la coloración Hematoxilina-eosina presentará diferencias significativas en la calidad de la imagen histológica, para la dimensión del núcleo?

¿La propuesta libre de Xilol o sustituto para el aclarado en la coloración Hematoxilina-eosina presentará diferencias significativas en la calidad de la imagen histológica, para la dimensión del citoplasma?

¿La propuesta libre de Xilol o sustituto para el aclarado en la coloración Hematoxilina-eosina presentará diferencias significativas en la calidad de la imagen histológica, para la dimensión del medio extracelular?

## 1.2 Antecedentes

Alwahaibi y Aldughaihi (2019), en su investigación realizada en el país de Omán, tuvieron por objetivo, “evaluar agentes de limpieza y desparafinado alternativos, más seguros antes de cubrir con cubreobjetos en un laboratorio de histopatología”. Diseñaron un estudio observacional donde cortaron 13 tejidos frescos en dos mitades, el primer grupo se procesó con UltraClear, y el segundo con xileno, de los cuales se generaron 5 grupos; A, B, C, D y E. Para los primeros cuatro grupos se realizaron 100 cortes de muestras procesados con xileno y para el grupo E se realizaron 100 cortes con muestras procesadas con UltraClear y procedieron a evaluar los siguientes aspectos: el grupo A se usó como estándar; el B evalúa el UltraClear como agente desparafinante antes de montar con el cubreobjeto; el grupo C evalúa el UltraClear como agente de limpieza antes del montaje; el grupo D evalúa la limpieza y desparafinado antes del montaje y el grupo E evalúa al UltraClear como agente de limpieza y desparafinado antes del montaje. Se tuvo como criterios de evaluación a seis parámetros: tinción nuclear, morfología celular, tinción citoplasmática, claridad de tinción, uniformidad de la tinción y costo. Se obtuvieron por resultado que los grupos B, C y D mostraron 79 % ( $p = 0.054$ ), 83 % ( $p = 0.221$ ) y 80 % ( $p = 0.079$ ) en comparación con el grupo A 89 % de adecuación. El grupo E mostró un 76 % ( $p = 0.016$ ) de adecuación y el xileno resulta más rentable que el UltraClear. Se concluyó por ende que el UltraClear es un buen agente de desparafinado y aclarante antes del montaje.

Thajudeen et al. (2022), en su investigación realizada en la India, tuvieron como objetivo “utilizar productos naturales como aceite de coco (CO), agua de limón diluida (DLW) y sustancias no peligrosas como lavavajillas líquido (DWL), como remplazo de la desparafinación con xileno en la preparación de portaobjetos teñidos con H&E y para comparar la morfología celular y las características de tinción entre los portaobjetos”.

Diseñaron un estudio observacional utilizando 4 grupos tomando 50 bloques de muestras en parafina, de los cuales se realizó 4 cortes, obteniendo en total 200 portaobjetos y usaron como agentes desparafinizantes en la tinción hematoxilina-eosina al aceite de coco, xileno, agua de limón al 1.7 % y solución de lavavajillas líquido al 1.7 %; para cada grupo. Se excluyó la etapa de aclarado en todas las láminas. Se obtuvo como resultado, considerando la calidad de la tinción y la arquitectura celular: mejores características celulares el líquido de lavavajillas, solución de agua de limón y aceite de coco, en un 80 %, 64 % y 42 % respectivamente. El 96 % de los cortes desparafinados con xileno mostraron una tinción de buena calidad, asimismo un 54 % y un 40 % de líquido para lavavajillas y solución de agua de limón respectivamente y solo un 4 % de aceite de coco. Se concluyó que el líquido de lavavajillas produce un mejor resultado y como segunda opción el agua de cal diluida.

Sravya et al. (2018), en su investigación realizada en la India, tuvieron como objetivo “comparar la eficacia de las secciones de hematoxilina y eosina (H y E) sin xileno con las secciones convencionales de H y E”. Diseñaron un estudio observacional en el que usaron 90 muestras, de los cuales, treinta fueron procesados con xileno y sesenta con aceite de sésamo; este último se dividió en tres grupos para ser teñidos por la tinción Hematoxilina-eosina variando en la etapa de desparafinado con agua de limón diluida al 95 %, (grupo A), solución de lavar platos (grupo B) y los treinta restantes con xileno. Para la evaluación se tomaron en cuenta los siguientes parámetros; tinción nuclear, uniformidad, tinción citoplasmática, claridad e intensidad. Se obtuvo como resultado para la tinción nuclear un 90 %, para grupo A, un 100 % para el grupo B, y para el grupo C un  $p < 0.05$ . Para la tinción citoplasmática adecuada, un 96,7 % para el B un 100 % y para el C un  $p = > 0.05$ . Para la uniformidad de la tinción se obtuvo un 53.3 %, 70 % y un 83.3 % para el grupo A, B y C respectivamente. Para la adecuada claridad de la tinción se

obtuvo un 73.3 %, 83.3 % y  $p = > 0.05$  para los grupos A, B y C respectivamente. Para una adecuada intensidad de tinción se obtuvo un 76.6 %, 93.3 % y 100 % para los grupos A, B y C respectivamente. Se mostró finalmente un diagnóstico adecuado para el grupo A (78 %), B (88.7 %) y C (93.3 %) y una adecuada intensidad de tinción en un 76.7 % secciones del grupo A, 93.3 % en el grupo B y 100% en grupo C ( $p < 0.05$ ). Las secciones del grupo C se tiñeron adecuadamente para el diagnóstico (93.3 %), seguidas del grupo B (88.7 %) y el grupo A (78 %;  $p < 0.05$ ). Concluyeron que los tejidos procesados con aceite de sésamo y desparafinados con DWS al 1.7 % son una mejor alternativa al xileno.

Prema et al. (2020), en su investigación que tuvo como objetivo “Evaluar la eficacia de una solución detergente para lavar platos al 1.7%, agua de limón al 95% y aceite de coco al 100% en comparación con el xileno como agente desparafinante durante la tinción con hematoxilina y eosina (H&E)”. Diseñaron un estudio observacional con 15 bloques de parafina; de los cuales, realizaron 4 cortes histológicos para cada uno, y las evaluaron mediante 4 métodos de desparafinación para la coloración Hematoxilina-Eosina: Xilol (grupo A), solución detergente para lavar platos al 1.7% (grupo B), agua de limón al 95% (grupo C) y aceite de coco al 100% (grupo D). Para el grupo B, C y D se obvió la etapa de aclarado. Obtuvieron como resultado una tinción nuclear adecuada al 100% para los grupos A, B, C y D ( $p < 0.001$ ). Se observó una tinción citoplásmica adecuada en el 93.3% para los grupos A, C y D en comparación con el 100% para el grupo B ( $p > 0.05$ ). Con respecto a la tinción uniforme se obtuvo un 80 % para los grupos A y B y en el 73.3 % para los grupos C y D ( $p > 0,05$ ); la claridad de la tinción estuvo presente en el 86.6 % para los grupos A y B, y en el 80 % para los grupos C y D ( $p > 0,05$ ); la nitidez de la tinción se observó en el 73.3 % de los grupos A y D, 86.6 % para el grupo B y 80 % para grupo C ( $p > 0.05$ ). Concluyeron que la solución detergente para lavar platos, el agua de limón y el aceite de coco pueden utilizarse como sustitutos más seguros y rentables que el del xilol para la desparafinación en el procedimiento de tinción H&E.

Thamilselvan et al. (2021), en su investigación realizada en la India, en la que tuvieron como objetivo “evaluar la capacidad de limpieza del aceite de cedro como alternativa al xileno en el procesamiento rutinario de tejidos”. Diseñaron un estudio observacional con 50 muestras de tejidos clasificándolos en 2 grupos; grupo A (procesados con 95 ml de aceite de cedro en combinación con 5 gotas de xilol), y grupo B (proceso rutinario con xileno). Adicional se sub clasificó en 5 grupos según el tipo de tejido; piel, músculo, tejido adiposo, glándula y mucosa. Ambos grupos fueron coloreados con hematoxilina y eosina, y evaluados por dos patólogos teniendo por criterio de evaluación; la tinción nuclear y citoplasmática, la tinción pobre con mala morfología, la tinción regular, buena tinción y excelente tinción. Se obtuvo como resultado que la tinción con aceite de madera de cedro fue mejor que la del xileno, observándose una tinción nuclear con un valor de  $p = 0.001$ , tinción citoplasmática con valor de  $p = 0.08$  y una tinción de fondo con valor de  $p = 0.045$  para el grupo A. Concluyeron que el aceite de madera de cedro se podría usar como una alternativa natural más segura que xileno.

Alwahaibi et al. (2018), en su investigación en el país de Omán, tuvieron como objetivo “Evaluar un agente de limpieza alternativo más seguro para usar en el laboratorio de histopatología”. Diseñaron un estudio observacional, en el que evaluaron 230 cortes de tejidos fijados con formalina, se dividieron en 2 grupos; el primero tratado con xileno y un segundo grupo con UltraClear; los cuales fueron evaluados por tres patólogos en ciego, teniendo por resultado un 100 % de aprobación para ambos grupos y detalladamente la siguiente información: el seccionamiento tubo una valoración de 81.7 % para las muestras procesadas con el UltraClear y un 96.5 % para el xileno. Las muestras tratadas con el Ultraclear respecto a la tinción nuclear, tinción citoplasmática, morfología celular, claridad de tinción y uniformidad, tuvieron como resultado porcentual los siguientes valores 67 %, 60.9 %, 52.2 %, 63.5 % y 67 % respectivamente. Concluyeron que el

UltraClear es recomendado como agente de limpieza en el laboratorio de histopatología, pero es el doble de costoso que el xilol.

### **1.3 Objetivos**

#### ***1.3.1 Objetivo General***

Determinar la calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado en comparación con el protocolo convencional, en la coloración hematoxilina-eosina.

#### ***1.3.2 Objetivos Específicos***

Identificar la calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado en comparación con el protocolo convencional para la coloración Hematoxilina-eosina, para la dimensión del núcleo.

Identificar la calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado en comparación con el protocolo convencional para la coloración Hematoxilina-eosina, para la dimensión del citoplasma.

Identificar la calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado en comparación con el protocolo convencional para la coloración Hematoxilina-eosina, para la dimensión del medio extracelular.

### **1.4 Justificación**

Este estudio es importante pues desde 1970 el xileno o xilol es considerado como una sustancia peligrosa debido a que es muy inflamable y causante de varios accidentes en el laboratorio, como intoxicación por derrames y combustión. Su exposición es generadora de múltiples alteraciones fisiológicas progresivas. Además posee un punto de ebullición de 137 a 143 ° C y un punto de punto de autoinflamación de 25° C , el cual lo hace tóxico y peligroso (Buesa y Peshkov, 2009).

Estudios han demostrado que el xileno es un potencial neurotóxico y hepatotóxico, y además de ello daña la piel y el pulmón, esa toxicidad es generada por el desacoplamiento mitocondrial y estrés oxidativo. (Wang et al., 2012). Estudios han confirmado que el personal de laboratorio que manipuló y estuvo expuesto al xileno en un periodo comprendido de 1.5 a 18 años tenían trastornos de intoxicación, pancitopenia y toxicidad en la medula ósea (Buesa y Peshkov, 2009).

Por otro lado, en el Perú no hay manuales ni protocolos que indique el pos-almacenamiento del xileno y actividades de prevención de enfermedades ocupacionales y tampoco se indica como esparcirlo ni como descartarlo. El organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental del Perú (OEFA), no tiene normas oficiales para el uso de este biocontaminante. Esto demuestra los riesgos potenciales del xileno para con el personal de salud, así como la falta de interés de los gobiernos, hecho que no solo sucede en Perú sino en varios países de Sudamérica (Moya y Rojas, 2018).

La OSHA (Administración de Seguridad y Salud Ocupacional) y la EPA (Agencia de Protección Ambiental) buscando menguar el uso del xilol, autorizaron el uso de los sustituyentes del xilol como agente de limpieza; estas son soluciones compuestas por diferentes aditivos como el limoneno, hidrocarburos alifáticos, aceites minerales o vegetales, mezclas de isopropanol o mezclas que contienen porcentajes de xilol (Sermadi et al., 2014). Algunos ejemplos de sustitutos de xilol son la Isoparafina H; producto que no detalla su fórmula química precisa, el Citrosol y Tricloroetano (Blázquez et al., 2011). Todos ellos no son exentos de toxicidad ni inocuos para el personal de salud; lo que se demuestra en los pictogramas que vienen en los envases de dichas soluciones. Estos son el GHS08 que significa riesgo mutagénico o cancerígeno para la reproducción, o en resumen peligroso para la salud; adicional a ello tienen advertencias de peligrosidad como son: H302 (nocivo en caso de ingestión), H332 (nocivo en caso de inhalación) entre otros (Guardino, 2010).

Por lo expuesto, este plan de tesis sugiere el descarte del uso del Xilol o sustituto de xilol en la última etapa del método de hematoxilina y eosina (aclarado). Con ello obtener un procedimiento más responsable con la salud del personal de anatomía patológica, asimismo se obtendrá mayor rapidez en el proceso de coloración y reducción del uso del xilol o sustituto, por lo tanto, genera reducción de costos, beneficiando al laboratorio.

### **1.5 Hipótesis**

La propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado en la coloración Hematoxilina-Eosina no presentará diferencias significativas en la imagen histológica en comparación con el protocolo convencional.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

Es un hidrocarburo aromático incoloro de olor dulce que proviene naturalmente del petróleo, alquitrán y el carbón; así como también se puede obtener de forma sintética. Existen tres formas de xileno que varían en las posiciones del anillo de benceno: meta-xileno, orto-xileno y para-xileno a los cuales se les denomina isómeros; estos tres mezclados en las siguientes proporciones 60-70% de meta-xileno, 10-25% de para-xileno, un 10-20% de orto-xileno, y adicionalmente un 6 a 15% de etilbenceno se denomina “xileno”, también conocido como xilol o dimetil-benceno. Es usado en la industria como desinfectante, agente limpiador y en los laboratorios de anatomía patológica se usa como disolvente de la parafina que ah resultando muy útil, además es requerido porque elimina alcoholes de los tejidos y los aclara de forma óptima, así como facilita las infiltraciones de la parafina (Alwahaibi et al., 2018).

**2.1.1. Toxicidad del xileno.** La regulación de OSHA expone que el xileno es una sustancia peligrosa para la salud ya que tras su manipulación resulta tóxico tanto al inhalar y al contacto con la piel. La toxicidad va a depender de muchos factores como son la duración de exposición, la cantidad, el tipo de contacto, así como también características inherentes de la persona como la edad, sexo, estilo de vida y condición de salud (ATSDR, 2021). Las concentraciones límites de exposición del personal según la organización mundial de salud y la organización internacional de trabajo son: Exposición Diaria (VLA-ED) 50 ppm (221 mg/m<sup>3</sup>) y en y los de Exposición de Corta Duración (VLA-EC) 100 ppm ( 442 mg/m<sup>3</sup>) (International Labour Organization, 2018). Una exposición de 30 a 350 ppm está asociado a náuseas y vómitos, una exposición de 100 a 690 ppm puede llegar a producir somnolencia, dolor de cabeza y vértigos, mientras que una exposición de 900 a 10000 ppm puede causar muerte o coma (Céspedes, 2012).

La toxicidad del xileno también depende de las propiedades lipofílicas que posee lo cual facilita su absorción en las partes que entraron en contacto, es por ello que un 95% de xileno absorbido, es metabolizado y el 3 a 6 % se exhala. Una vez en el cuerpo el xileno por oxidación de uno de sus grupos metilos se transforma en ácido metilbenzoico, seguido de una combinación con glicina para formar ácido metilhipúrico que es de esta forma que se excreta en las vías urinarias. A lo largo de este trayecto cabe la posibilidad de que el xileno produzca efectos neurotóxicos como hepatotóxicos y nefrotoxicidad (Pacheco, 2019).

### ***2.1.2. Método de Coloración Hematoxilina de Harris-Eosina***

**2.1.2.1. Hematoxilina de Harris.** La Hematoxilina es un colorante nuclear derivado del árbol *Haematoxylum campechianum*, nombre derivado del griego *Haimato xylon*, que significa sangre y madera respectivamente. Este árbol es proveniente de América Central, siendo usado inicialmente para teñir telas y posteriormente a mediados de 1930 es usado para teñir compuestos celulares. Desde esa fecha los histólogos modifican soluciones que tienen de base a la hemateína, que es la forma oxidada de la hematoxilina; generando una variedad de coloraciones denominadas todas ellas “Hematoxilinas”. Químicamente la hematoxilina pertenece a los grupos fenólicos que son químicos vegetales; se caracteriza por ser incoloros y se ubican dentro del corazón del árbol. Una vez extraído y expuesto a la intemperie se oxida por acción del oxígeno contenido en el aire convirtiéndose así a hemateína. Este compuesto es un colorante que por sí solo no puede teñir las células es por ello que necesita de un mordiente; estas son sales que tienen diferente finalidad; ejemplo de ello es la hematoxilina de Harris, que tiene por mordiente; el alumbre de potasio o amonio (Titford, 2009).

La hematoxilina (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) no tiene un grupo cromóforo, y no es considerada por ello un colorante, pero frente al oxígeno atmosférico, pasa por un proceso oxidativo que tarda de 4 a 6 semanas, generándose un compuesto llamado hemateína (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), considerándose este proceso como una oxidación natural. Sin embargo, este proceso puede ser acelerado o

inducido artificialmente con agentes oxidantes, a este proceso se le denomina oxidación química. A ambos procesos se le atribuye el termino de ripeming o maduración. La oxidación provoca que se pierda dos átomos de hidrogeno y se reordenen los enlaces que inducen a la formación de un anillo para-quinóide que actúa como cromóforo y así se confiere la capacidad de teñir; adicionalmente le brinda una carga electrostática ácida y un color rojo vino. Luego de la oxidación químicamente inducida, se le agrega un auxocromo que potencia su capacidad tintorial, que además de ello le confiere carga básica por ende la afinidad a colorear núcleos. Estos auxocromos son sales divalentes o trivalentes en forma de alumbres, siendo el más común la sal aluminio potásico que le da característica anfótera; rojo si es pH por debajo de 3 y azul violáceo cuando es mayor a este (Santos, 2017). La hematoxilina de Harris es la laca más utilizada ya que tiene una estabilidad más prolongada que varía de 6 a 12 meses. Este colorante es regresivo y requiere de diferenciación ácida para obtener la intensidad deseada. Asimismo se le adiciona ácido acético glacial que incrementa la especificidad nuclear y se emplea disuelta en etanol (Oltra, 2017).

**2.1.2.2. Eosina.** Es un colorante ácido que se sintetiza a partir de la fluoresceína, es decir son derivados hidroxixanténicos halogenados con tres grupos arilo. Existen dos compuestos, eosina “Y” (tetrabromofluoresceína) que contiene cuatro átomos de bromo y eosina “B” (dibromodinitrofluoresceína) que tiene dos átomos de bromo. La denominación “Y” o “B” se da por las coloraciones que van desde amarillo hasta azul, eosina “B” (bluish) y eosina Y (yellowish). La síntesis de la eosina se produce mediante la bromación de la fluoresceína, donde se utiliza N-bromosuccinimida (NBS), que contiene bromo y se usa para los compuestos aromáticos. La eosina “Y” se sintetiza en una sola fase con fluoresceína en etanol y NBS; mientras que la eosina “B” se sintetiza en dos etapas con la bromación parcial de la fluoresceína con presencia de NBS, se obtiene dibromofluoresceína, está en la segunda

etapa se nitra. Es por ello que la eosina “Y” es la más usada en las coloraciones de rutina (Santos, 2017).

La eosina es un colorante aniónico que tiene auto fluorescencia espontánea que colorea tejidos en tonalidades que van desde rojo a rosa. Su polaridad negativa le permite enlazarse con grupos cargados positivamente, por ello es atraído por los radicales básicos; histidina, arginina y lisina si tiene pH ácido o neutro y si tiene pH ácido tiñe al triptófano; por ello el pH influye en la calidad de coloración. Es recomendable una eosina con pH de 4,5 – 5 (Santos, 2017).

**2.1.2.3. Importancia de la coloración.** La coloración hematoxilina y eosina se considera la técnica de uso más frecuente en el estudio de los tejidos, pues detalla la morfología del núcleo y citoplasma con lo que se puede determinar y diagnosticar diversas patologías. La hematoxilina al ser un colorante básico tiñe al núcleo de colores que varían de negro a violeta y la eosina que posee polaridad negativa, tiñe a las organelas citoplasmáticas, colágeno, fibras elásticas y fibras musculares, definiéndose estas estructuras como acidófilas (Santos, 2017).

**2.1.2.4. Aclaramiento.** Es la última etapa de la tinción, que consiste en disminuir la dispersión y la absorción de luz, pues las secciones histológicas presentan diversas zonas compuestas por pigmentos, lípidos y diversas sustancias que interfieren con el paso de la luz del microscopio óptico, observándose opacos y de muy baja calidad. De igual manera se puede observar una coloración desigual por que el índice de refracción es heterogéneo. La sustancia empleada en el aclaramiento tiene que tener la capacidad de aumentar el coeficiente de refracción de los tejidos, volviéndolo homogéneo; asimismo esta sustancia debe lograr sustituir al alcohol (agente deshidratante) y no producir lesiones en el tejido, endurecimiento y retracciones. Generalmente estas sustancias pertenecen a los derivados del benceno, pero hay otras opciones más sanas y ecológicas que están siendo estudiadas para la sustitución de estos

derivados. El aclarado consiste en sumergir las muestras en dos inmersiones de 3 minutos. (Tian et al., 2021).

### ***2.1.3. Protocolos libres de xilol.***

En el estudio de Wang, et al. (2012), en el que compararon el xilol con una solución compuesta por la hidrogenación del 86 % de aceite blanco de N<sup>o</sup>2 y 14 % de N- heptano (SBO) en 328 muestras histológicas en las etapas de limpieza, desparafinado y en el último proceso de la coloración hematoxilina y eosina; el aclarado. Evaluaron cualitativamente las láminas, reportando resultados similares con las del xileno.

Un resultado idéntico se evidencio en el trabajo de Premalatha et al. (2013), en el que compara el aceite mineral (RMO) con el xileno, para ello usó 30 bloques de muestras divididas en dos grupos, el primer grupo fue teñido convencionalmente y el segundo grupo varió en la desparafinación con RMO, por 1 minuto a 90 grados centígrados y se obvio la etapa de aclarado en cuanto a la coloración hematoxilina y eosina. Se obtuvo como resultados que ambos protocolos son válidos.

Para Negi et al. (2013) quien realizó un estudio donde usa como sustituyente de xileno a la solución de lavar platos (DWS) al 1.7%, donde somete a las láminas histológicas a 2 minutos y obvia el paso de aclarante. Se obtuvo un  $P = 0.05$ , considerando al nuevo método como similar, económico y menos peligroso que el xileno.

En el estudio realizado por Ankle y Joshi (2011), en el que contrastaron el xilol con una solución diluida para lavar platos (DWS) en 60 muestras en la etapa de desparafinación y excluyeron el paso de aclarado en la tinción de hematoxilina y eosina. Evaluaron la tinción nuclear, tinción citoplasmática, tinción uniforme, claridad presente y tinción crujiente y los resultados fueron similares a las muestras trabajadas convencionalmente lo cual es un indicador positivo para el nuevo protocolo.

Posteriormente Thamiselvan et al. (2021) de igual manera compara el xilol con el aceite de cedro como agente aclarador en muestra histológica; igualmente en la coloración de hematoxilina y eosina se excluye el aclarado. Evaluaron la tinción nuclear, citoplasmática y fondo que resultaron optimas según la revisión de los patólogos.

Se evidencio que Alwahaibi et al. (2018) realiza un trabajo de investigación donde compara el UltraClear y el proceso convencional para el aclarado de muestras histológicas, empleando 230 muestras por duplicado. Seguidamente se colorearon en hematoxilina-eosina y tinciones inmunohistoquímicas obteniendo resultados similares para ambos grupos, concluyendo que el UltraClear es recomendable al ser menos tóxico, pero es más costoso.

### III. MÉTODO

#### 3.1 Tipo de Investigación

Estudio cuasiexperimental debido a que el investigador controlará las variables, pero la distribución hacia los grupos de comparación no se realizará al azar; según Hernández et al. (2014), el investigador decidirá qué láminas irán hacia el protocolo convencional o nuevo, pero esta distribución no será al azar, debido a que el código de la lámina predispone a qué protocolo irá para su ejecución (una para el convencional, y la otra para el nuevo). Asimismo, es cuantitativo, observacional, aplicado y correlacional.

#### 3.2. Ámbito Temporal y Espacial

La presente tesis se ejecutó desde abril a mayo del 2023, y se llevó a cabo en el laboratorio, Patología Microscópica y Molecular, ubicado en Av. Paso de Los Andes 830, Pueblo Libre, Lima, Perú.

#### 3.3. Variables

Cuadro de operacionalización en la siguiente página (**tabla 1**).

<b>VARIABLES</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>ESCALA DE MEDICIÓN</b>	<b>INDICADOR</b>
Eficacia del protocolo (v. dependiente)	Medido mediante la valoración de enunciados referentes a la calidad de la imagen histológica observada, y apuntado en un cuestionario propio de esta investigación	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el núcleo	Numérica	Intervalo	0-2 puntos
		Puntaje de calidad de la imagen histológica en el citoplasma	Numérica	Intervalo	0-2 puntos
		Puntaje de calidad de la imagen histológica en el medio extracelular	Numérica	Intervalo	0-2 puntos
Protocolo de aclarado para la coloración (v. independiente)	Medido según la observación del código de lámina histológica y apuntado mediante una ficha de recolección de datos	Unidimensional, dado que no es una variable compleja	Cualitativa	Nominal	Convencional (con uso de Xilol o sustituto previo al montaje) Nuevo (sin uso del Xilol o sustituto previo al montaje)

### **3.4. Población y muestra**

La población estuvo constituida por todos los bloques de parafina provenientes del 2017 y almacenados en el Laboratorio “Patología microscópica y Molecular S.A.C.”. Esta cantidad fue de 4477 bloques.

Al ser el primer estudio en evaluar este nuevo método para la fase de aclaración para el método de coloración de Hematoxilina-Eosina (por ende, sin los datos necesarios para poder realizar el cálculo de tamaño de muestra), primero, se realizó una prueba piloto con 50 bloques seleccionados aleatoriamente, de los cuales, se sacaron 50 cortes para ser coloreados por el método convencional vs. 50 cortes del método nuevo de aclarado. Posterior a la elaboración de estas láminas, estas fueron entregadas al experto, y luego de las lecturas correspondientes, se ingresaron los datos correspondientes para realizar el cálculo de tamaño de muestra para esta investigación basado en la comparación de dos medias (se calculó la media del puntaje de la eficacia del método convencional vs. la del método nuevo), dando como resultado de 199 muestras (199 bloques, y se sacaron 2 cortes histológicos por cada uno, 1 corte para el método convencional vs. 1 corte para el método nuevo) (anexo D).

Posterior a la obtención de este tamaño de muestra final, se realizó también un muestreo aleatorio simple a partir de la población de estudio. Los cálculos de tamaños de muestra y muestreos se realizaron mediante el software EPIDAT versión 4.2.

#### ***3.4.1. Criterios de Inclusión***

- Bloques de parafina que se encontraron presentes (archivador) en el laboratorio especificado.

#### ***3.4.2. Criterios de Exclusión***

- Bloques de parafina deteriorados o que no contaron con tejido remanente, es decir, no aptos para realizar las nuevas secciones a estudiar.

- Bloques de parafina con identificación dudosa o inadecuada (rótulo no coincidió con el registro virtual del software del laboratorio o no es legible).

### **3.5. Instrumentos**

Para medir la variable principal (calidad de la imagen histológica), el instrumento fue un cuestionario. Este instrumento creado y validado (anexo A), consta de tres dimensiones para medir la calidad de la imagen histológica según el núcleo, citoplasma y medio extracelular. Cada dimensión consta de una pregunta que presenta tres alternativas, variando el puntaje de 0 a 2, dependiendo de la calificación que le dé el experto evaluador.

La validación se realizó a través de un juicio de expertos y la confiabilidad lo realizó a través del cálculo del estadístico alfa de Cronbach, el cual fue de 0.91 (siendo un valor confiable a partir de 0.70).

### **3.6. Procedimientos**

Esta investigación, previo a recolectar los datos, se envió para su evaluación a la Facultad de Tecnología Médica de la Universidad Nacional Federico Villareal y al jefe del Laboratorio “Patología Microscópica”. Y se inició con la recolección.

Se realizó 2 secciones por cada bloque de parafina escogido aleatoriamente y que haya cumplido con los criterios de selección. Luego, se realizó el protocolo convencional de coloración para los cortes histológicos en base a la rutina propia del lugar de ejecución, y a los otros cortes se le realizó el nuevo protocolo, el cual, consiste en no realizar la fase de aclaramiento previo al montaje de la lámina histológica respectiva.

Posteriormente, estas láminas se entregarán a un anatomopatólogo experto para la lectura de estas, y los resultados serán llevados a un documento de Excel. Finalmente, esta información será importada hacia una base de datos del programa estadístico STATA 17.0.

### **3.7. Análisis de Datos**

Se utilizó el software estadístico STATA 17.0 (licencia: 301709027730), y los valores  $p < 0.05$  se consideraron como estadísticamente significativos.

Para la descripción de las variables cualitativas, se utilizaron las frecuencias relativas y absolutas. Para describir las variables numéricas, se utilizó la media.

Con el fin de evaluar si se encontraron diferencias significativas de las estas eficacias de la calidad de la imagen histológica entre ambos métodos de aclaramiento (nuevo vs convencional), se utilizó la prueba T de student debido a que la variable dependiente (eficacia para el aclaramiento) fue numérica y la independiente (método de aclaramiento) fue cualitativa o categórica.

### **3.8. Consideraciones Éticas**

El presente proyecto de investigación no utilizó consentimientos informados debido a que no necesitará la participación de sujetos humanos.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Descripción de los resultados

Se puede observar que los promedios de los puntajes de la calidad de la imagen histológica por el protocolo de coloración convencional en relación con el aspecto general, núcleo, citoplasma y medio extracelular fueron 5.6, 1.9, 1.9 y 1.9, respectivamente. Por otro lado, los promedios de los puntajes de la calidad de la imagen histológica por el protocolo de coloración nuevo en relación con el aspecto general, núcleo, citoplasma y medio extracelular fueron 5.5, 1.8, 1.8 y 1.8. Ambos promedios se pueden observar en la **tabla 2**.

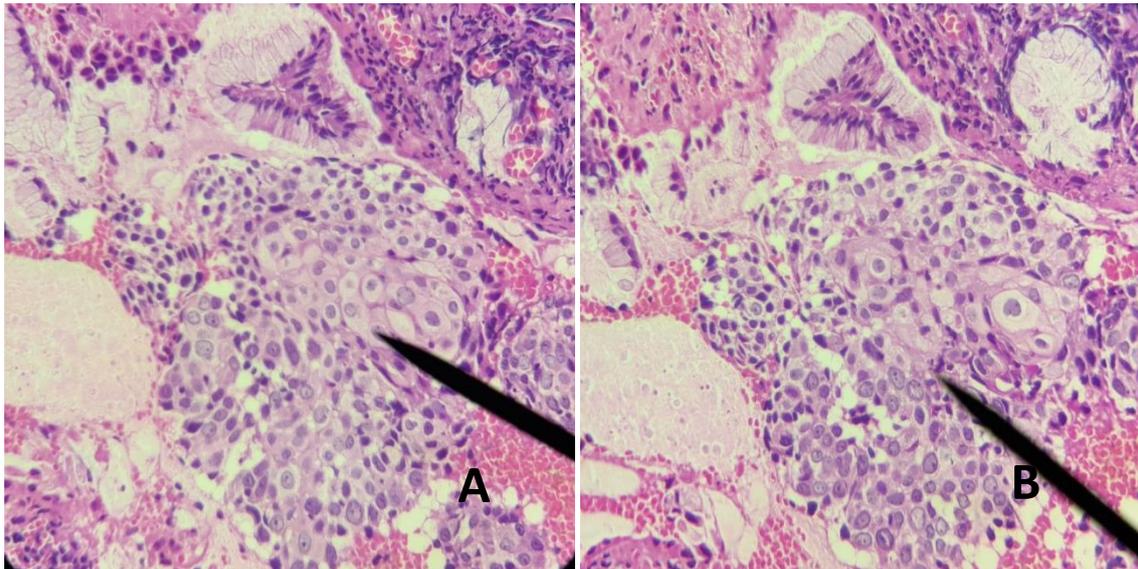
Además, el tipo de muestra más y menos frecuente fueron piel (73.9%) y estómago/mama (6% para ambos), respectivamente. Finalmente, la comparación visual se puede observar en la **figura 1**, en la que se aprecia que no se presentan diferencias significativas de las imágenes histológicas entre estos protocolos.

**Tabla 2***Características de la muestra estudiada (n=199).*

<b>Calidad de la imagen histológica (puntaje)</b>	<b>Media</b>
<b>Coloración Hematoxilina-Eosina convencional</b>	
Global	5.6
En el núcleo	1.9
En el citoplasma	1.9
En el medio extracelular	1.9
<b>Coloración Hematoxilina-Eosina modificada</b>	
Global	5.5
En el núcleo	1.8
En el citoplasma	1.8
En el medio extracelular	1.8
	<b>N (%)</b>
<b>Tipo de muestra</b>	
Cérvix	28 (14.1)
Piel	147 (73.9)
Estómago	12 (6.0)
Mama	12 (6.0)

## Figura 1

*Comparación entre los protocolos de coloración utilizados.*



*Nota.* A: Coloración convencional. B: Coloración modificada. Cérvix(40x).

### 4.2. Análisis entre las calidades de la imagen histológicas de los protocolos de coloración empleados

La prueba T de student determinó que no se encontraron diferencias significativas de las calidades de la coloración entre el protocolo de coloración convencional y nuevo en todos los aspectos (**tabla 3**):

- No se encontraron diferencias significativas de los promedios del puntaje global de las calidades de la coloración entre el protocolo de coloración convencional y nuevo ( $p=0.1243$ ).

- No se encontraron diferencias significativas de los promedios del puntaje en el núcleo de las calidades de la coloración entre el protocolo de coloración convencional y nuevo ( $p=0.0747$ ).

- No se encontraron diferencias significativas de los promedios del puntaje en el citoplasma de las calidades de la coloración entre el protocolo de coloración convencional y nuevo ( $p=0.0747$ ).

- No se encontraron diferencias significativas de los promedios del puntaje en el medio extracelular de las calidades de la coloración entre el protocolo de coloración convencional y nuevo ( $p=0.0747$ ).

**Tabla 3.**

*Tabla de contingencia entre el protocolo de coloración empleado y la calidad de imagen histológica reportada (n=199).*

Calidad de la imagen histológica (puntaje*)	Protocolo empleado		p†
	Convencional	Nuevo	
<b>Global</b>	5.6	5.5	0.1243
<b>En el núcleo</b>	1.9	1.8	0.0747
<b>En el citoplasma</b>	1.9	1.8	0.0747
<b>En el medio extracelular</b>	1.9	1.8	0.0747

*Nota.* \*Media. †Prueba T de student.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este estudio se comparó dos métodos para la coloración hematoxilina-eosina; el convencional y el libre de xilol o sustituto para el aclarado, evaluando así la calidad del núcleo, citoplasma y medio extracelular. Los resultados obtenidos permitieron visualizar una alta coincidencia entre ambos protocolos obteniéndose para el núcleo, citoplasma y medio extracelular resultados de 1.9 para cada dimensión en el protocolo convencional, y un 1.8 para cada dimensión en el nuevo protocolo. Ambos protocolos se encuentran en el intervalo de bueno (1 punto) y excelente (2 puntos) y adicionalmente se obtuvo un valor  $p=0.0747$ , siendo las diferencias no significativas es decir ambos protocolos son aplicables y de calidad. Estos resultados tuvieron ciertas diferencias con respecto a otros estudios realizados anteriormente.

En el estudio realizado por Prema et al. (2020) evaluó tres métodos para desplazar al xilol en la etapa de deshidratación de la coloración hematoxilina-eosina y excluyeron el paso del aclarado. Estos tres métodos obtuvieron un 93% (solucion de lavavajillas), 86% (agua de limón) y un 80% (aceite de coco) de aprobación en comparación con un 100 % del protocolo convencional; cabe resaltar que en este trabajo evalúan más parámetros como son la uniformidad, claridad, nitidez y retención de cera; siendo la uniformidad el parámetro que le resta más puntos pues podría deberse al trabajo mecánico del operador al realizar cortes gruesos, debido a la inexperticia o a la cuchilla mal afilada o desgastada, aun así los valores obtenidos son positivos y útiles para remplazar al xilol; sin embargo resalta en sus protocolo el nivel de peligrosidad al trabajar con reactivos y agua a temperaturas de 95° C, lo cual podría ocasionar quemaduras a diferencia del presente trabajo que solo usa un sustituto comercial del xilol en el paso de la desparafinización.

El segundo estudio realizado por Sravya et al. (2018), demuestra la eficacia de los protocolos libres de xilol; donde usaron aceite de sésamo para el procesamiento de tejidos y

como agente desparafinante en la coloración hematoxilina-eosina usaron agua de limón diluida al 95% (grupo A) y solución para lavavajillas al 1,5% (grupo B), los cuales fueron comparados con el protocolo convencional (grupo C), obviando también el paso de aclarado. Descubriendo un 78 % de adecuación para el agua de limón al 95%, y un 88.7% para la solución de lavar platos. Con respecto a los parámetros evaluados se encontró que la uniformidad fue muy pobre en los nuevos protocolos en comparación con el xileno, debido al endurecimiento de la muestra por el aceite de sésamo, lo que resultó en secciones desiguales y gruesas, aun así, se obtuvo resultados positivos y adecuados para ambos protocolos. Cabe señalar que se usaron reactivos y agua a temperaturas elevadas que pueden ocasionar accidentes a diferencia del presente trabajo. Seguidamente se pudo trabajar las muestras con otro sustituto de xilol para evitar problemas de endurecimiento por el aceite de sésamo.

El tercer estudio realizado por Thajudeen et al. (2022), donde compara el método convencional de la coloración hematoxilina-eosina, y otros tres nuevos métodos que no usan xileno, sino el aceite de coco, agua de cal diluida y líquido para lavavajillas, obviando también el paso del aclarado. Su intención fue evaluar la arquitectura celular y la calidad de la tinción, donde observaron que de las 50 láminas trabajadas para cada protocolo; líquido para lavar platos, agua de cal diluida y aceite de coco, presentaron excelente arquitectura celular un 40, 32 y 21 secciones y un 54 % 40% y 4% mostraron una tinción de buena calidad en la tinción respectivamente, llegando a la conclusión que el agua de cal y el líquido para lavar platos son excelentes sustitutos del xileno en la coloración hematoxilina-eosina. Sin embargo, se observa que el aceite de coco no es considerado óptimo como desparafinante, además de ello es costoso y se oxida fácilmente. Cabe señalar que a diferencia de nuestro estudio los protocolos usan reactivos a temperaturas de 90 ° C lo que lo hace peligroso y a la vez alarga más el proceso a diferencia del trabajo investigado que es más económico y rápido.

Como principales fortalezas del presente estudio, primero, es reducir el uso del xilol en la coloración hematoxilina-eosina en la etapa de aclarado para evitar así la producción de vapores tóxicos que se desprende en el aclarado y posterior secado de las láminas por el método convencional, evitando una exposición mayor a 200 ppm de xilol en el personal de histología. El siguiente punto es reducir el tiempo de proceso para la coloración y dar a conocer una alternativa más ecoamigable con el ambiente, así como reducción de presupuesto en esta coloración.

La principal limitación de esta investigación es que no se pudieron estudiar todos los tipos de tejidos que se procesan en un laboratorio de anatomía patológica, debido a que la mayoría de tejidos procesados el año 2017 fueron piel.

## VI. CONCLUSIONES

- 6.1 La calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado, y el protocolo convencional de la coloración hematoxilina-eosina, se encuentran entre el intervalo bueno y excelente, no habiendo diferencias significativas entre ambos. En tanto la nueva propuesta resulta eficaz y de calidad al igual que el protocolo convencional.
- 6.2 La calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado, y el protocolo convencional de la coloración hematoxilina-eosina, se encuentran en el intervalo de bueno y excelente, no habiendo diferencias significativas entre ambos para la dimensión del núcleo.
- 6.3 La calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado, y el protocolo convencional de la coloración hematoxilina-eosina, se encuentran en el intervalo de bueno y excelente, no habiendo diferencias significativas entre ambos para la dimensión del citoplasma.
- 6.4 La calidad de la imagen histológica de la propuesta libre de xilol o sustituto para el aclarado, y el protocolo convencional de la coloración hematoxilina-eosina, se encuentran en el intervalo de bueno y excelente, no habiendo diferencias significativas entre ambos para la dimensión del medio extracelular.

## VII. RECOMENDACIONES

- 7.1. Se recomienda replicar el estudio en un laboratorio donde se manejen mayores volúmenes de cortes histológicos y de mayor diversidad de muestras para corroborar el estudio.
- 7.2. Se sugiere evaluar más parámetros como nitidez, claridad, etc., para potenciar esta nueva modificación en la coloración hematoxilina-eosina.
- 7.3. Se sugiere seguir buscando más protocolos libres de toxicidad en los procesos de la coloración de tejidos tanto en la fase de tinción propiamente, como en otras como la desparafinización mediante sustitutos naturales de xilol.
- 7.4. Se sugiere realizar pruebas de Inter laboratorios para corroborar los resultados.

## VIII. REFERENCIAS

- Alwahaibi, N., Aljaradi, S., & Alazri, H. (2018). Alternative to xylene as a clearing agent in histopathology. *Journal of Laboratory Physicians*, *10*(2), 189-193. [https://doi.org/10.4103/JLP.JLP\\_111\\_17](https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_111_17)
- Alwahaibi, N. Y., & Aldughaihi, S. H. (2019). A substitute to xylene in deparaffinization and clearing prior to coverslipping in histopathology. *Journal of Laboratory Physicians*, *11*(2), 118-122. [https://doi.org/10.4103/JLP.JLP\\_169\\_18](https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_169_18)
- ATSDR. (2021, enero 25). *Resumen de Salud Pública: Xileno (Xylene) | PHS | ATSDR*. [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs71.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs71.html)
- ATSDR. (2022, septiembre 2). *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*. <https://www.atsdr.cdc.gov/index.html>
- Blázquez Castro, A., López Arias, B., Castillo, P., & Stockert, J. C. (2011). Sustitución del xilol por heptano para la inclusión en parafina. *Técnicas de laboratorio*, *367*, 916-918. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3812074>
- Buesa, R. J., & Peshkov, M. V. (2009). Histology without xylene. *Annals of Diagnostic Pathology*, *13*(4), 246-256. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2008.12.005>
- Cediel, J. F., Cárdenas, M. H., & García, A. (2009). *Manual de histología: Tejidos fundamentales*. Universidad del Rosario.
- Céspedes Torres, Y. P. (2012). Peligros del Xileno. *Cap&Cua*, *7*(1), 2-11. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4762923>
- Díaz, G. (2020). Metodología del estudio piloto. *Revista chilena de radiología*, *26*(3), 100-104. <https://doi.org/10.4067/S0717-93082020000300100>
- Guardino Solá, X. (2010). *Regulación UE sobre productos químicos (II). Reglamento CLP*. INSHT.

- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014a). Concepción o elección del diseño de investigación. En *Metodología de la Investigación* (Quinta edición, pp. 137-144).
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014b). Recolección de datos cuantitativos. En *Metodología de la Investigación* (Quinta edición, pp. 201-203).
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014c). Recolección de datos cuantitativos. En *Metodología de la Investigación* (Quinta edición, p. 200).
- International Labour Organization. (2018). *International Chemical Safety Cards* [Database]. <https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.listCards3>
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. 3. [https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf?fbclid=IwAR3z9\\_ljzoGBF2taww\\_xeAuX2t1CkN](https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf?fbclid=IwAR3z9_ljzoGBF2taww_xeAuX2t1CkN)
- Mora, E. A., Carrasco, A. A. S., Muñoz, V. P. M., Salinas, R. S., Huerta, S. C., Noriega, E. P., & Landeros-Olvera, E. A. (2015). Características de la prueba piloto: Revisión de artículos publicados en enfermería. *Revista de Enfermería Neurológica*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.37976/enfermeria.v14i3.212>
- Moya-Salazar, J., & Rojas-Zumaran, V. (2018). Análisis de la problemática del xileno en los laboratorios Sudamericanos de citología. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 65(3), 150-158. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=82737>
- Oltra Romero, A. M. (2017). *Estudio de la eficacia de tratamiento de verrugas plantares con infiltración intralesional de suero fisiológico con dermojet* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Miguel Hernández de Elche]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=146656>

- Pacheco Coello, F. J. P. (2019). Niveles de ácido metilhipúrico por exposición ocupacional a xileno, Valencia estado Carabobo, Venezuela 2018. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, 20(3), Article 3. <https://revsaludtrabajo.sld.cu/index.php/revsyt/article/view/97>
- Prema, V., Prasad, H., Srichinthu, K. K., Kumar, S. S., Rajkumar, K., & Marudhamani, C. (2020a). Biofriendly Substitutes for Xylene in Deparaffinization. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(Suppl 1), S623-S630. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_164\\_20](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_164_20)
- Prema, V., Prasad, H., Srichinthu, K. K., Kumar, S. S., Rajkumar, K., & Marudhamani, C. (2020b). Biofriendly Substitutes for Xylene in Deparaffinization. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(Suppl 1), S623-S630. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_164\\_20](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_164_20)
- Salazar, L., & Moreno, F. (2017). Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Comparaci%C3%B3n-de-tres-tipos-de-tinciones-en-secciones-Salazar-Moreno/fd0f07b5e8bad10d818e432b72fcd2feb5e2>
- Santos Vidal, S. (2017a). *Tinción Hematoxilina-Eosina*. <http://espacio.uned.es/fez/view/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Ssantos>
- Santos Vidal, S. (2017b). *Tinción Hematoxilina-Eosina*. <http://62.204.194.43/fez/view/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Ssantos>
- Sermadi, W., Prabhu, S., Acharya, S., & Javali, S. (2014). Comparing the efficacy of coconut oil and xylene as a clearing agent in the histopathology laboratory. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 18(Suppl 1), S49-53. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.141348>

- Sravya, T., Rao, G. V., Kumari, M. G., Sagar, Y. V., Sivaranjani, Y., & Sudheerkanth, K. (2018). Evaluation of biosafe alternatives as xylene substitutes in hematoxylin and eosin staining procedure: A comparative pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 22(1), 148. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_172\\_16](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_172_16)
- Thajudeen, A., Srinivasan, S., Govindarajan, G., & Shanmugam, A. (2022). A comparative study of efficacy of coconut oil, lemon water and dishwashing liquid as surrogates to xylene. *Environmental Analysis, Health and Toxicology*, 37(3), e2022026-2022020. <https://doi.org/10.5620/eaht.2022026>
- Thamilselvan, S., Sherlin, H. J., Jayaraj, G., Don, K. R., & Santhanam, A. (2021). Cedarwood oil as an alternative to xylene as a clearing agent in histopathological tissue processing – A comparative study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 25(2), 299-305. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.325232>
- Tian, T., Yang, Z., & Li, X. (2021). Tissue clearing technique: Recent progress and biomedical applications. *Journal of Anatomy*, 238(2), 489-507. <https://doi.org/10.1111/joa.13309>
- Titford, M. (2009). The long history of hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry*. <https://doi.org/10.1080/10520290500138372>
- Wang, K., Fan, C., Lai, T., Yang, Y., Yang, Y., Zhang, X., Guo, X., & Lai, X. (2012). A novel non-toxic xylene substitute (SBO) for histology. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, 9(1), 43-49. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i1.6>

## IX. ANEXOS

### Anexo A: Instrumento (cuestionario)

#### 1. Identificación de la lámina histológica

2.3. Código:

2.4. Fecha de la evaluación: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

2.5. Suma total de puntajes:

#### 2. Secciones

##### 2.1. Puntaje de calidad de la imagen histológica en el núcleo celular

El COLOR reportado en núcleos celulares mediante el método de coloración Hematoxilina - Eosina es AZUL O MORADO y una INTENSIDAD adecuada PERMITE: Reconocer el tamaño del núcleo y al comparar esto en un mismo tipo de células, también poder especificar si los núcleos son homogéneos o heterogéneos; reconocer si el borde nuclear está intacto o no; reconocer la presencia o no de nucleolos.

Marque una sola opción con respecto al puntaje de calidad de la imagen histológica en los núcleos celulares observados en esta lámina histológica:

- a) Excelente, el color e intensidad fueron los esperados. (2 puntos)
- b) Buena, el color fue el esperado, pero la intensidad no. (1 punto)
- c) Mala, el color y la intensidad no fueron los esperados. (0 puntos)

##### 2.2. Puntaje de calidad de la imagen histológica en el citoplasma celular

El COLOR reportado en citoplasmas celulares mediante el método de coloración Hematoxilina-Eosina es ROSADO A ROJO y esta INTENSIDAD varía dependiendo de la cantidad de proteína presente (como en los miocitos y hematíes) o el grado de maduración de la célula. Además, si esta intensidad es la adecuada, PERMITE PRINCIPALMENTE: Reconocer el tamaño del citoplasma y al comparar esto en un mismo tipo de células, también se puede especificar si los citoplasmas son homogéneos o heterogéneos; reconocer si el borde del citoplasma está intacto o no; reconocer la presencia o no de inclusiones.

Marque una sola opción con respecto al puntaje de calidad de la imagen histológica en los citoplasmas celulares observados en esta lámina histológica:

- a) Excelente, el color e intensidad fueron los esperados. (2 puntos)
- b) Buena, el color fue el esperado, pero la intensidad no. (1 punto)
- c) Mala, el color y la intensidad no fueron los esperados. (0 puntos)

### **2.3. Puntaje de calidad de la imagen histológica en el medio extracelular**

El COLOR del medio extracelular mediante el método de coloración Hematoxilina-Eosina es ROSADO A ROJO (por la eosina) con excepción de algunos pocos tejidos donde esto cambia, por ejemplo, la matriz cartilaginosa de la tráquea es AZUL O MORADA (por la hematoxilina) y una INTENSIDAD adecuada PERMITE PRINCIPALMENTE: Reconocer el tejido conjuntivo (fibras colágenas, elásticas, moco, entre otros); diferenciar a las células de este medio extracelular (contraste), de tal manera, que en la visualización no exista obstrucción entre estos.

Marque una sola opción con respecto al puntaje de calidad de la imagen histológica en el medio extracelular observada en esta lámina histológica:

- a) Excelente, el color e intensidad fueron los esperados. (2 puntos)
- b) Buena, el color fue el esperado, pero la intensidad no. (1 punto)
- c) Mala, el color y la intensidad no fueron los esperados. (0 puntos)

## Anexo B: Ficha de recolección de datos

<b>1. Código de la lámina histológica (el cual representa al tipo de agente utilizado para el montaje utilizado):</b>
<b>2. Eficacia total emitida:</b> _____ puntos
<b>3. Eficacia en el núcleo:</b> _____ puntos
<b>4. Eficacia en el citoplasma:</b> _____ puntos
<b>5. Eficacia en el medio extracelular:</b> _____ puntos

## Anexo C: Cálculo de tamaños de muestra.

**Datos:**

Varianzas:	Distintas
Diferencia de medias a detectar:	0,220
Desviación estándar esperada:	
Población 1:	0,690
Población 2:	0,860
Razón entre tamaños muestrales:	1,00
Nivel de confianza:	95,0%

**Resultados:**

Potencia (%)	Tamaño de la muestra		
	Población 1	Población 2	Total
80,0	199	199	398

Anexo D: Validación a través del juicio de expertos

### CARTA DE PRESENTACIÓN

Magíster/Doctor:

.....

Presente:

Asunto: VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO A TRAVÉS DE JUICIO DE EXPERTOS

Es muy grato comunicarme con usted para expresarle mi saludo y, asimismo, hacer de su conocimiento que, siendo bachiller en Tecnología Médica de la Universidad Nacional Federico Villarreal, requiero validar el instrumento con el cual recogeré la información necesaria para desarrollar mi investigación que me permitirá obtener mi título profesional.

El título de mi proyecto de investigación es “PROPUESTA LIBRE DE XILOL O SUSTITUTO PARA EL MONTAJE EN LA COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EN COMPARACIÓN CON EL PROTOCOLO CONVENCIONAL”, y siendo imprescindible contar con la aprobación de profesionales especializados para aplicar el instrumento en mención, he considerado conveniente recurrir a usted, ante su connotada experiencia en temas de patología, histología e histopatología.

El expediente de validación que le hago llegar contiene:

- Carta de presentación.
- Instrumento.
- Certificado de validez de contenido del instrumento.

Atentamente,

---

Nombre y firma

---

DNI

**ANEXO E. CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DEL INSTRUMENTO**

N	DIMENSIONES/ítem	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		Sí	No	Sí	No	Sí	No	
	<b>DIMENSIÓN 1</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	
<b>1</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el núcleo							
	<b>DIMENSIÓN 2</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	
<b>2</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el núcleo							
	<b>DIMENSIÓN 3</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>	
<b>3</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el núcleo							

Observaciones (precisar si hay suficiencia):

---

Opinión de aplicabilidad:           Aplicable ( )           Aplicable después de corregir ( )           No aplicable ( )

Apellidos y nombres del juez validador: Dr/Mg. ....

DNI: .....

<sup>1</sup>**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

.....de.....del 20....

<sup>2</sup>**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión exacto y directo.

<sup>3</sup>**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo.

**Nota:** Suficiencia, se dice cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión.

---

Firma del Experto Informante.

**TABLA 3. CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DEL INSTRUMENTO – EXPERTO 1**

N	DIMENSIONES/ítem	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		Sí	No	Sí	No	Sí	No	
	<b>DIMENSIÓN 1:</b>	Sí	No	Sí	No	Sí	No	
<b>1</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el núcleo	X		X		X		
	<b>DIMENSIÓN 2:</b>	Sí	No	Sí	No	Sí	No	
<b>2</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el citoplasma	X		X		X		
	<b>DIMENSIÓN 3:</b>	Sí	No	Sí	No	Sí	No	
<b>3</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el medio extracelular	X		X		X		

**Observaciones (precisar si hay suficiencia):**

---

**Opinión de aplicabilidad:**                      **Aplicable (X)**                      **Aplicable después de corregir ( )**                      **No aplicable**

**( )Apellidos y nombres del juez validador:** Mg. Eduardo Eulogio Sedano Gelvet

**DNI:** 07112744

**Especialidad del validador:** Magíster en Investigación y Docencia Universitaria. Docente de Histotecnología UNMSM y UNFV.

<sup>1</sup>**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

<sup>2</sup>**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión exacto y directo.

<sup>3</sup>**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo.

**Nota:** Suficiencia, se dice suficiente cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión.

Informante



Firma del Experto

30 de mayo del 2023

## ANEXO G. CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DEL INSTRUMENTO – EXPERTO 2

N	DIMENSIONES/ítem	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		Sí	No	Sí	No	Sí	No	
	<b>DIMENSIÓN 1:</b>							
<b>1</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el núcleo	X		X		X		
	<b>DIMENSIÓN 2:</b>							
<b>2</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el citoplasma	X		X		X		
	<b>DIMENSIÓN 3:</b>							
<b>3</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el medio extracelular	X		X		X		

Observaciones (precisar si hay suficiencia):

---

Opinión de aplicabilidad:           Aplicable (X)                           Aplicable después de corregir ( )                           No aplicable

( ) Apellidos y nombres del juez validador: Mg. Carlos Ricardo Neira Montoya

**DNI:** 06580542

**Especialidad del validador:** Magíster en Investigación y Docencia Universitaria. Docente de Histotecnología UNMSM.

<sup>1</sup>**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

<sup>2</sup>**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión exacto y directo.

<sup>3</sup>**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo.




---

Firma del Experto

**Nota:** Suficiencia, se dice suficiente cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión.  
Informante

30 de mayo del 2023

## ANEXO H. CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DEL INSTRUMENTO

N	DIMENSIONES/ítem	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		Sí	No	Sí	No	Sí	No	
	<b>DIMENSIÓN 1:</b>							
<b>1</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el núcleo	X		X		X		
	<b>DIMENSIÓN 2:</b>							
<b>2</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el citoplasma	X		X		X		
	<b>DIMENSIÓN 3:</b>							
<b>3</b>	Puntaje de calidad de la imagen histológica en el medio extracelular	X		X		X		



## ANEXO I. SOLICITUD DE EJECUCION DE PROYECTO

Lima, 04 de abril del 2023

Jefe del laboratorio "Patología Microscópica y Molecular S.A.C."

Dr. César Chian García

De mi mayor consideración:

Yo, Leydi Pilar Pampañaupa Enciso, Bachiller en Tecnología Médica de la Universidad Nacional Federico Villarreal, tengo a bien dirigirme a usted para saludarlo cordialmente, y, asimismo, solicitarle el poder utilizar sus ambientes y bloques de parafina almacenados del año 2017 para la ejecución de mi proyecto de investigación titulado "PROPUESTA LIBRE DE XILOL O SUSTITUTO PARA EL ACLARADO EN LA COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EN COMPARACIÓN CON EL PROTOCOLO CONVENCIONAL".

Sin otro particular, agradezco su atención.



Leydi Pilar Pampañaupa Enciso

DNI: 48122416

## ANEXO J: APROBACIÓN DE SOLICITUD DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

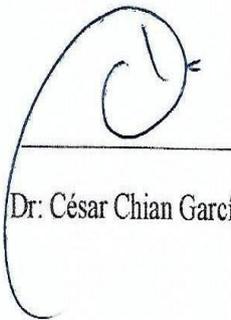
Lima, 04 de abril del 2023

Bachiller: Leydi Pilar Pampañaupa Enciso,

De mi mayor consideración:

Yo, Dr. César Chian García, jefe del área del laboratorio "Patología microscópica y molecular S.A.C." (Dirección: Av. Paso de Los Andes 830), tengo a bien dirigirme a usted para saludarla cordialmente y, asimismo, informarle que APRUEBO que pueda utilizar el ambiente y los bloques de parafina para la ejecución de su proyecto de investigación titulado "PROPUESTA LIBRE DE XILOL O SUSTITUTO PARA EL ACLARADO EN LA COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EN COMPARACIÓN CON EL PROTOCOLO CONVENCIONAL".

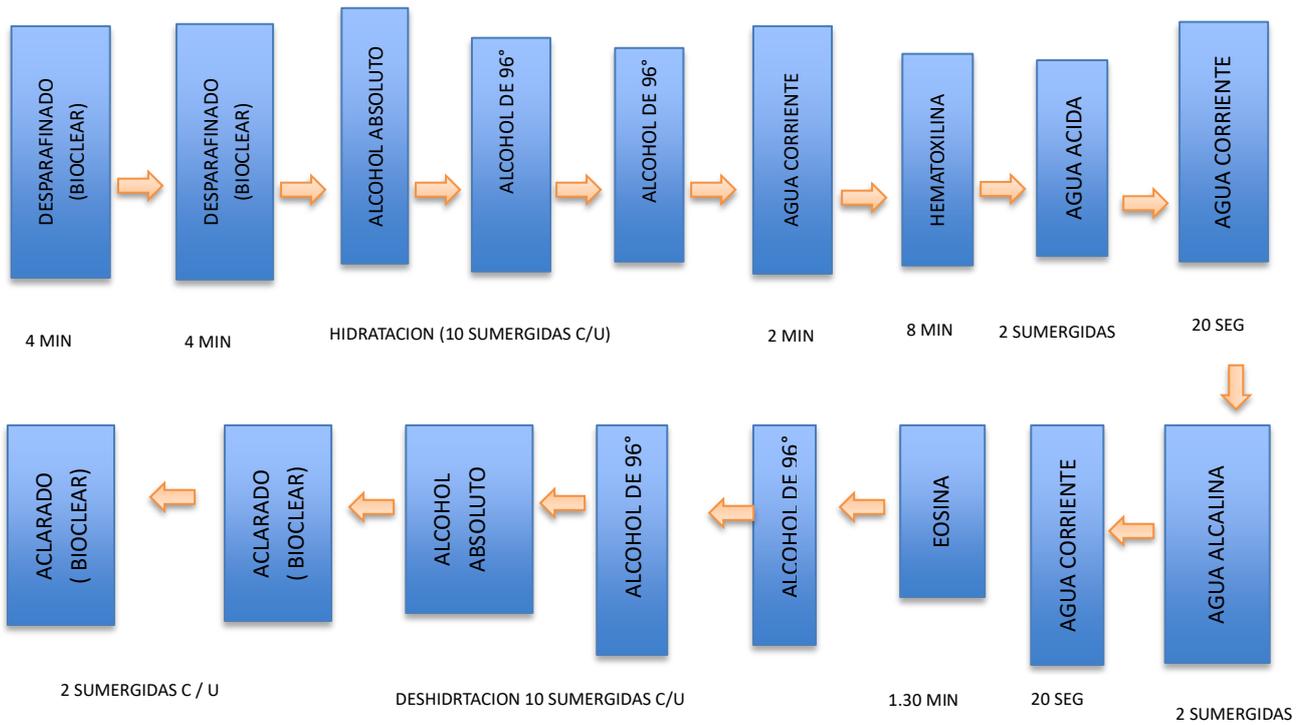
Sin otro particular, agradezco su atención.



---

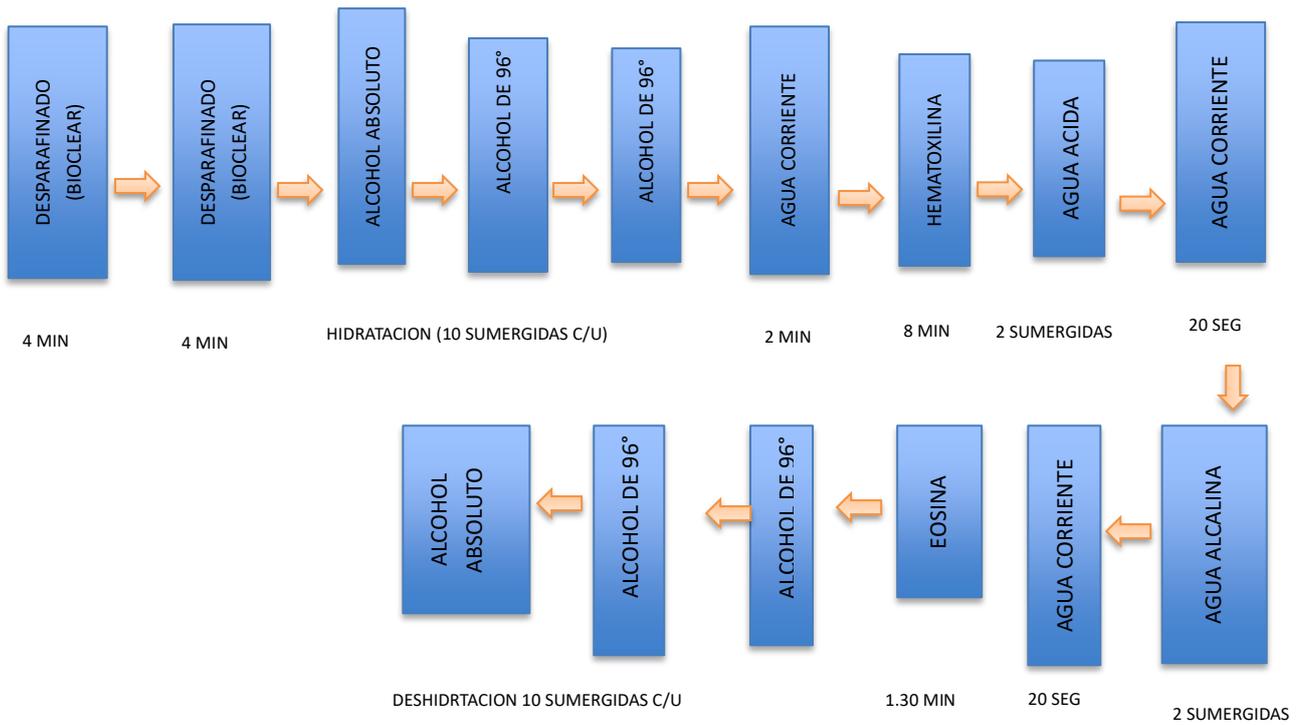
Dr: César Chian García

## ANEXO K. COLORACIÓN HEMATOXILINA EOSINA CONVENCIONAL



Elaboración propia del autor

## ANEXO L. COLORACIÓN HEMATOXILINA EOSINA MODIFICADA



Elaboración propia del autor