

# **Efecto de una solución a base de sulfato de cobre y baja concentración de formol en la preparación de animales para disección**

Effect of a solution with copper sulfate and low concentration of formaldehyde on embalming of animal for dissection

**Fonseca-Matheus J.<sup>1</sup>, Rojas E.<sup>2</sup>, Peraza M.<sup>3</sup>**

Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Decanato de Ciencias Veterinarias.

<sup>1</sup>Área de Anatomía de los Animales Domésticos. Profesor Agregado. Dirección postal: Cabudare estado Lara, Núcleo Héctor Ochoa Zuleta, Decanato de Ciencias Veterinarias, Área de Anatomía de los Animales Domésticos, C.P.: 3023. Teléfono 0251-2592468, e-mail: jfonseca@ucla.edu.ve. <sup>2</sup>Área de Anatomía de los Animales Domésticos. Profesor Agregado. <sup>3</sup>Área de Patología. Laboratorio de Anatomía Patológica.

## **RESUMEN**

La preparación de animales para disección es una práctica común en los laboratorios de anatomía macroscópica veterinaria, ésta generalmente implica el uso de formaldehído como fijador y conservador. La elevada toxicidad y el efecto carcinogénico de esta sustancia ha creado una tendencia hacia la reducción de su uso mediante la incorporación de sustancias coadyuvantes menos tóxicas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de una solución a base de sulfato de cobre y baja concentración de formaldehído en la fijación y conservación de animales para disección. Los animales utilizados fueron 11 cabras y 2 perros destinados a las prácticas docentes de anatomía veterinaria, que fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de tratamiento. El grupo 1 (control) fue tratado con la solución de uso rutinario en el laboratorio que contiene formaldehído al 10%, el grupo 2 fue tratado con una solución alternativa que contiene formaldehído al 2,5% y sulfato de cobre. Todos los animales fueron disecados durante un mes y se les realizó una evaluación macroscópica que consideró características como fijación macroscópica, olor, consistencia y diferenciación de los tejidos. En la evaluación microscópica se tomaron muestras de tejido muscular al inicio de la disección y a los 30 días. La solución alternativa causó un buen efecto fijador y conservador en los cadáveres, éstos presentaron características deseables para la disección sin despedir olor irritante a causa del formaldehído. El efecto fungicida de esta última no fue tan eficiente como el de la solución control ya que se observó crecimiento de hongos en el 75% de los animales. Microscópicamente se observaron ligeros cambios autolíticos que permanecieron constantes durante el ensayo y sin diferencias significativas entre los grupos.

Palabras clave: Formaldehído, sulfato de cobre, anatomía, disección.

## **ABSTRACT**

Embalming of animals for dissection is a common practice in veterinary gross anatomy labs; it usually involves the use of formaldehyde as a fixative and preservative. The high toxicity and carcinogenic effect of this substance has created a trend towards reducing its use by incorporating less toxic adjuvants. The aim of this study was to evaluate the effect of a solution based on copper sulphate and low concentration of formaldehyde in the fixation and preservation of animals to dissection. The animals used were 11 goats and 2 dogs intended for veterinary anatomy teaching practices, which were randomized into two treatment groups. Group 1 (control) was treated with the solution of routine use in the laboratory containing 10% formaldehyde, group 2 was treated with an alternative solution containing 2.5% formaldehyde and copper sulfate. All animals were dissected for a month and underwent gross evaluation taking into account characteristics such as macroscopic fixing, smell, consistency and differentiation of tissues, and others. For microscopic evaluation of tissue samples of muscles were taken at the beginning of the dissection and at the 30th day. The alternative solution had a good fixative and preservative effect on the bodies, these presented desirable characteristics for dissection without irritant smelling by formaldehyde. The fungicidal effect of the latter was not as efficient as the control solution because fungal growth was observed in 75% of animals. Slight autolytic changes were observed microscopically, these remained constant during the experiment and between groups were not significant differences.

Key words: Formaldehyde, copper sulfate, anatomy, dissection.

## INTRODUCCIÓN

La enseñanza de la anatomía en Medicina Veterinaria se ha sustentado en la disección como herramienta fundamental para el logro de su objetivo principal, que consiste en la formación de un profesional con conocimientos precisos sobre la composición, consistencia, apariencia y relaciones de las diferentes estructuras que componen el cuerpo de los animales domésticos, que le permitirán desempeñarse de manera efectiva en el ejercicio profesional [1,2]. La preparación de los animales para disección requiere el uso de sustancias como el formaldehído, para conservar los tejidos y prolongar su vida útil durante las prácticas de disección [3]. Esta sustancia tiene una elevada toxicidad y produce daños evidentes a la salud de las personas que se exponen a ella sin adoptar medidas de seguridad [4]. Además, en el año 2006 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (de sus siglas en inglés IARC) la declaró como cancerígena [5], lo que ha incrementado la preocupación sobre su uso en los laboratorios y ha promovido la investigación sobre métodos para reducir la exposición de las personas. Existen dos grandes vertientes en lo que se refiere a las estrategias planteadas para reducir los niveles de formol en los laboratorios. La primera se basa en el control mecánico del flujo de aire dentro del sitio de trabajo, el mismo se realiza mediante el uso de dispositivos que conducen los vapores de formol hacia ductos con filtros especiales [6, 7, 8, 9, 10] o la renovación continua del aire presente en el ambiente de trabajo [11, 12]. La segunda se fundamenta en la incorporación de sustancias alternativas al formaldehído en las soluciones fijadoras-conservadoras para reemplazar o potenciar su efecto, lo que permite suprimir o disminuir la cantidad de formaldehído utilizado en la preparación de las piezas anatómicas [13, 14, 15, 16, 17, 18]. El fin común de las distintas soluciones reportadas es la reducción de los niveles de formol en los vapores emitidos por el material anatómico. El sulfato de cobre pentahidratado se utiliza en la agricultura y en la piscicultura para controlar el crecimiento de hongos [19, 20]. Por esta razón sería interesante probar si esta sustancia también tiene efecto fungicida sobre los tejidos de origen animal, lo que permitiría su incorporación en las soluciones fijadoras-conservadoras como coadyuvante del formaldehído y así reducir la concentración de este último sin disminuir la capacidad conservadora de la preparación. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto fijador y conservador de una solución con bajas concentraciones de formaldehído (1/4 de la concentración utilizada normalmente) y sulfato de cobre, en la preparación animales destinados a la disección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el ensayo fueron seleccionados 11 cabras (*Capra hircus*) y 2 perros (*Canis lupus familiaris*) destinados a las prácticas docentes de anatomía veterinaria. Los caprinos fueron animales de descarte, provenientes de la estación de ovinos y caprinos de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Los caninos fueron animales que requerían eutanasia con fines humanitarios, provenientes del Hospital Veterinario "Dr. Humberto Ramírez Daza" del Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA. Todos fueron distribuidos aleatoriamente en 2 grupos, de los cuales el grupo 1 recibió tratamiento con la solución de uso rutinario en el laboratorio y el grupo 2 fue tratado con la solución alternativa que contenía baja concentración de formaldehído. La preparación, disección y evaluación de todos los animales del estudio se realizó en el Anfiteatro de Anatomía del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". El procesamiento de tejidos para la evaluación microscópica fue realizado en el laboratorio de Anatomía Patológica del mismo Decanato.

### Preparación para la eutanasia

Previo a la anestesia a todos los animales se les administró 200 UI/kg de heparina sódica vía intravenosa. Para la premedicación anestésica se les administró 0,05 mg/kg de acepromacina vía intramuscular. La anestesia se realizó mediante la administración de propofol a dosis de 4 a 6 mg/kg vía intravenosa. Una vez alcanzado el plano anestésico se procedió a disecar la arteria carótida común derecha [21], a la que luego se le realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 1 cm para permitir la exsanguinación.

### Fijación y conservación

Para la fijación y conservación de los cadáveres se utilizó la técnica de perfusión arterial con las soluciones fijadoras-conservadoras. La vía de acceso vascular fue la arteria carótida común derecha. El grupo 1 (control) fue tratado con la solución utilizada de manera rutinaria en el laboratorio, ésta contenía 100 ml de formaldehído al 37%, 25 ml de glicerina y 755 ml de agua. El grupo 2 fue tratado con la solución alternativa que contenía 25 ml de formaldehído al 37%, 5 g de sulfato de cobre en cristales, 25 ml de glicerina y agua en cantidad suficiente para completar 1 l. Al finalizar la perfusión los cadáveres fueron almacenados a temperatura ambiente durante 24 horas para favorecer el proceso de fijación de los tejidos [22]. Pasado este tiempo fueron llevados a la cámara

frigorífica a temperaturas entre 1 y 4°C para su conservación, en la que permanecieron un mes durante el cual se realizó el trabajo de disección.

### **Evaluación de las piezas**

En todos los ejemplares se realizó una evaluación macroscópica y microscópica de los tejidos. La evaluación macroscópica se llevó a cabo semanalmente durante las clases prácticas de anatomía mediante observación, disección y palpación de los tejidos. Las variables estudiadas fueron la fijación macroscópica [13], la consistencia y la flexibilidad de los tejidos [16, 23], la diferenciación tisular, la facilidad de disección, la presencia de olor a formol, de olor a descomposición y el crecimiento de hongos sobre la superficie de las piezas [24, 25]. La consistencia de los tejidos fue evaluada aplicando una escala de valoración del 1 al 3, en la que 1 significaba consistencia muy dura o firme, 2 consistencia moderada y 3 consistencia muy blanda. El olor a formol fue evaluado por el disector mediante la aplicación de una escala conformada por tres categorías en las que 1 significaba intenso olor a formol (irritante), 2 ligero olor a formol y 3 sin olor a formol. Al evaluar la facilidad de disección fue tomada en cuenta la facilidad con la que el disector pudo identificar y separar las diferentes estructuras, la escala de valoración aplicada tenía dos categorías que fueron 1. fácil y 2. difícil.

Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de los músculos masetero, tríceps braquial, serrato ventral, longísimo y glúteo medio al comenzar la disección y a los 30 días después de la preparación de los cadáveres. A las mismas se les realizaron cortes histológicos que fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Una vez procesadas se observaron bajo el microscopio óptico para determinar el efecto conservador de la solución utilizada [26], los parámetros evaluados fueron la presencia de detalle nuclear y citoplasmático en las células de los tejidos analizados, cambios de coloración nuclear y citoplasmática, presencia de picnosis nuclear y cariólisis [27].

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de las diferentes variables estudiadas fueron analizados con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago IL, USA). El análisis no paramétrico se realizó mediante la prueba de Chi cuadrado y los correspondientes coeficientes de asociación (coeficiente de contingencia, phi y V de cramer para datos nominales; gamma, d de somers y Tau-b de Kendall para datos ordinales). El análisis paramétrico se realizó mediante la prueba "t" de Student para

determinar si existían diferencias significativas entre los grupos estudiados. Todos los resultados fueron considerados estadísticamente significativos para un valor de  $p = 0,05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Durante la disección de los cadáveres tratados con ambas soluciones se realizó la evaluación macroscópica de los tejidos, todos los ejemplares presentaron características adecuadas para la disección. La fijación macroscópica, para la cual se tomaron en cuenta los cambios de coloración que ocurren en los tejidos al reaccionar con el formaldehído, fue diferente en ambos grupos y está asociada de manera significativa a la composición de la solución ( $p = 0,05$ ). Aunque la solución del grupo control fue superior que la del grupo 2 al fijar los tejidos, en esta última el grado de fijación observado fue adecuado para realizar el trabajo de disección y garantizar la conservación de los mismos durante este proceso. La consistencia de los diferentes tejidos también presentó una asociación estadísticamente significativa con el tipo de solución utilizada ( $p = 0,05$ ), fue deseable en el 100% de los animales del grupo 1 y en el 50% de los pertenecientes al grupo 2. Los cambios en la consistencia de los tejidos se deben a la reacción química entre los grupos amino de las proteínas y el formaldehído en la que se producen enlaces cruzados entre residuos de lisina [28], la intensidad de esta reacción depende en gran medida de la concentración de formaldehído en la solución utilizada [29], y esto podría explicar la diferencia observada entre ambos grupos respecto a esta característica. Los animales del grupo 2 recibieron una menor cantidad de formaldehído, por lo que los cambios de consistencia fueron menos acentuados que en el grupo 1. Con respecto a la diferenciación de los tejidos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos ( $p > 0,05$ ). En las piezas de ambos grupos fue posible diferenciar los tejidos observados, lo que facilita su identificación y le confiere mayor precisión al disector al separar las estructuras anatómicas de interés. Al evaluar la facilidad de disección se observó que coincide con el resultado anterior ya que depende, en gran medida, de la diferenciación tisular. En la mayoría de los casos fue fácil disecar los tejidos y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para esta característica ( $p > 0,05$ ). Tanto la diferenciación de los tejidos como la facilidad de disección, observadas en ambos grupos, coinciden con los resultados reportados en estudios previos [13, 16]. El olor a formaldehído, emitido por las piezas durante el trabajo de disección, es uno de los aspectos más importantes y preocupantes que motivaron la realización de este ensayo, el mismo se relaciona con

los niveles de formaldehído presentes en el aire del laboratorio y por ende con la exposición del personal a esta sustancia. Se ha reportado que el formaldehído en el aire puede ser percibido por las personas a niveles por encima de 0,1 ppm [30] y que el nivel máximo permitido en algunos países es 0,37 ppm [26]. En las piezas del grupo 1 se pudo percibir un olor moderado a formaldehído y en el grupo 2 no se percibió olor al mismo, al analizar los datos de esta característica se pudo confirmar que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p = 0,05$ ) y que existe una asociación significativa entre el tipo de solución utilizada y la emisión de vapores con niveles perceptibles de formaldehído. La solución utilizada en el grupo 2 fue eficiente al reducir los niveles de formaldehído emitido por las piezas ya que durante la disección no se percibió olor al mismo durante la disección, estos resultados coinciden con lo reportado para otras formulaciones que también tenían como objetivo la reducción o sustitución del formaldehído [14, 18, 24, 31, 32]. Ninguno de los animales del estudio presentó olor a descomposición de los tejidos. Al evaluar la efectividad de las soluciones para controlar el crecimiento de hongos sobre la superficie de las piezas se pudo confirmar que existe una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de solución y el crecimiento de hongos ( $p = 0,05$ ). Las piezas del grupo 1 no presentaron hongos durante el proceso de disección, en el caso del grupo 2 se observó que 75% de las piezas fueron afectadas por estos microorganismos. La inhibición del crecimiento de hongos es una de las bondades que ofrece el formaldehído [33] y debido a que este efecto puede estar disminuido en las soluciones con bajas concentraciones del mismo, se recomienda la adición de otras sustancias que permitan suplir su efecto sobre estos microorganismos [26]. La solución del grupo 2 contenía sulfato de cobre como fungicida adicional, no obstante, su efecto no fue adecuado para compensar la reducción del formaldehído. Como alternativa para solucionar este problema se podría considerar la incorporación de etanol o isopropanol a la fórmula o incrementar la concentración de formaldehído a 5%, cambios que deberán ser evaluados para asegurar que no contribuyan a aumentar significativamente los niveles de formaldehído presente en el aire del laboratorio. Al realizar la evaluación microscópica de los músculos se observaron ligeros cambios autolíticos como picnosis, cariólisis y pérdida de detalle citoplasmático sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p > 0,05$ ). Estos cambios podrían deberse al tiempo que transcurre entre la muerte del animal y la fijación de los tejidos, ésta última al ser realizada mediante perfusión puede ser menos efectiva que la obtenida mediante inmersión de pequeños fragmentos de tejido

en grandes cantidades de solución, como se realiza en el caso de las biopsias. Un aspecto resaltante de estas observaciones es que fueron similares en las dos muestras tomadas a cada músculo (al inicio y a los 30 días), lo que podría indicar que los cambios ocurrieron en el periodo previo a la fijación de los tejidos y que las soluciones evaluadas, una vez alcanzada la fijación, fueron capaces de conservarlos y detener el proceso de autólisis hasta el final del estudio.

## CONCLUSIONES

La solución alternativa utilizada en este ensayo permite preparar ejemplares de origen animal con características deseables para la disección, similares a las que se obtienen con la solución de rutina, con la ventaja que reduce la exposición de las personas al formaldehído.

La baja concentración de formol presente en la solución alternativa evita que las piezas emitan olor irritante o perceptible a formaldehído durante la disección.

La solución control fue más efectiva al controlar el crecimiento de hongos sobre la superficie de las piezas durante la disección.

La cantidad de sulfato de cobre utilizada en el ensayo no ejerce un buen efecto fungicida, ya que la solución que lo contenía no fue tan eficiente en inhibir el crecimiento de hongos como la solución control.

Desde el punto de vista microscópico las soluciones utilizadas no permiten conservar de manera óptima los tejidos. Sin embargo, los cambios tisulares son mínimos y permanecen estables en el tiempo, lo que indica buena conservación.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" por el financiamiento otorgado y al Laboratorio de Anatomía Patológica del Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA por su apoyo en el procesamiento de las muestras de tejidos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Older J. Anatomy: a must for teaching the next generation. *Surgeon* 2004; 2(2):79-90.
- [2] Elizondo-Omaña RE, Guzmán-López S, García-Rodríguez Mde L. Dissection as a teaching tool: past, present, and future. *Anat Rec B New Anat*. 2005; 285(1):11-15.
- [3] Tolhurst DE, Hart J. Cadaver preservation and

dissection. *Eur J Plast Surg* 1990; 13:75-78.

[4] Duque JE, Díaz JJ. El formol. Su génesis, normas, aplicaciones e incidencia sobre la salud humana. *Medicina UPB. Medellín (Colombia)* 1999; 18(1): 35-46.

[5] International Agency for Research on Cancer (IARC). Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropanol-2-ol. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC 2006; 88: 39-325.

[6] Coleman R. Reducing the levels of formaldehyde exposure in gross anatomy laboratories. *Anat Rec* 1995; 243(4):531-533.

[7] Cowan J, Abu-Daibes M, Banerjee S. Controlling formaldehyde emissions with boiler ash. *Environ Sci Technol* 2005; 39(13):5101-5104.

[8] Ohmichi K., Matsuno Y., Miyaso H., Yamamoto H., Toriuchi M., Shimane M., Mori C. Pilot study of a dissection table for gross anatomy laboratory equipped with a photocatalytic device that decomposes formaldehyde. *J Occup Health* 2007; 49(6):499-503.

[9] Shinoda K, Oba J. Formaldehyde-reducing efficiency of a newly developed dissection-table-connected local ventilation system in the gross anatomy laboratory room. *Kaibogaku Zasshi*. 2010; 85(1):5-15.

[10] Shin S, Song J. Modeling and simulations of the removal of formaldehyde using silver nano-particles attached to granular activated carbon. *J Hazard Mater* 2011; 194:385-392.

[11] Edwards FP, Campbell AR. Removal of formaldehyde and xylene fumes from histopathology laboratories: a functional approach to the-design of extraction systems. *J Clin Pathol* 1984; 37:401-408.

[12] Kikuta A, Yamato H, Kunugita N, Nakashima T, Hayashi H. Reducing the levels of formaldehyde exposure during a gross anatomy dissection course with a local ventilation system. *Kaibogaku Zasshi*. 2010; 85(1):17-27.

[13] O'Sullivan E, Mitchell BS. An improved composition for embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching in the United Kingdom. *J Anat* 1993; 182(Pt 2): 295-297.

[14] Whitehead MC, Savoia MC. Evaluation of methods to reduce formaldehyde levels of cadavers in the dissection laboratory. *Clin Anat* 2008; 21:75-81.

[15] Al-Hayani A, Hamdy RM, El-Aziz GS, Badawoud MH, Aldaqal S, Bedir Y. Shellac: A Non-Toxic Preservative for Human Embalming Techniques. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2011; 10(12): 1561-1567.

[16] Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, Kaessmeyer S, Plendl J. Nitrite pickling salt as an al-

ternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy-A study based on histo- and microbiological analyses. *Ann Anat* 2011; 193(1):71-75.

[17] Muñetón GC, Ortiz JA. Conservación y elaboración de piezas anatómicas con sustancias diferentes al formol en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Salle. *Rev Med Vet* 2011; 22: 51-55.

[18] Wolff D, Villa P, Neirreitter A, Ruibal C, Armand UG, Salgado G, et al. Estudio comparativo entre soluciones conservadoras con y sin formol en placenta humana. *Int J Morphol* 2012; 30(2):432-438.

[19] Mitchell AJ, Straus DL, Farmer B, Carter R. Comparison of percent hatch and fungal infestation in channel catfish eggs after copper sulfate, diquat bromide, formalin, and hydrogen peroxide treatment. *North American Journal of Aquaculture* 72:201-206, 2010.

[20] Judet-Correia D, Charpentier C, Bensoussan M, Dantigny P. Modelling the inhibitory effect of copper sulfate on the growth of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. *Lett Appl Microbiol*. 2011; 53(5):558-564.

[21] Ajayi IE, Shawulu JC, Ghaji A, Omeiza GK, Ode OJ. Use of formalin and modified gravity-feed embalming technique in veterinary anatomy dissection and practicals. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 2011; 3(6):79-81.

[22] Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microsc Today* 2000; 8 (1): 8-12.

[23] Silva RM, Matera JM, Ribeiro AA. New alternative methods to teach surgical techniques for veterinary medicine students despite the absence of living animals. Is that an academic paradox? *Anat Histol Embryol* 2007; 36(3):220-224.

[24] Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, Richardson KC, Plendl J. A pilot study on ethanol-polyethylene glycol-formalin fixation of farm animal cadavers. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2011; 124(5-6):225-227.

[25] Jaung R, Cook P, Blyth P. Comparison of embalming fluids for use in surgical workshops. *Clin Anat* 2011; 24:155-161.

[26] Coleman R, Kogan I. An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J Anat* 1998; 192(3):443-446.

[27] Ortloff AR, Peña PA, Ildfonso R. Efecto de tres ambientes de transporte sobre el tiempo de aparición de la autólisis en muestras de alevines de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch Med Vet* 2011; 43:307-312.

[28] Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP.

Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1985; 33(8):845-853.

[29] Zeng F, Yang W, Huang J, Chen Y, Chen Y. Determination of the lowest concentrations of aldehyde fixatives for completely fixing various cellular structures by real-time imaging and quantification. *Histochem Cell Biol.* 2013; 139(5):735-749.

[30] Golden R. Identifying an indoor air exposure limit for formaldehyde considering both irritation and cancer hazards. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41(8):672-721.

[31] Groscurth P, Eggli P, Kapfhammer J, Rager G, Hornung JP, Fasel JDH. Gross anatomy in the surgical curriculum in Switzerland: improved cadaver preservation, Anatomical models, and course development. *Anat Rec* 2001; 265: 254-256.

[32] Boaz NT, Anderhuber F. The uses of soft embalming for cadaver-based dissection, instruction in gross anatomy, and training of physicians. *FASEB J* 2009; 23:480-483.

[33] Fahmy A, Flournoy DJ, Stewart CV. Effect of formalin on the survival of systemic fungi in tissue. *Mycopathologia* 1983; 82(3):175-178.