



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 363 551**

② Número de solicitud: 201000096

⑤ Int. Cl.:

G01N 1/06 (2006.01)

G01N 1/04 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A01N 1/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **25.01.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.08.2011

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Málaga
c/ Severo Ochoa, 4 (PTA)
29590 Campanillas, Málaga, ES
CIBER-BBN**

⑱ Inventor/es: **Durán Jiménez, Iván;
Santos Ruiz, Leonor;
Santamaría García, Jesús Alberto;
Becerra Ratia, José y
Marí Beffa, Manuel**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Método histológico optimizado para la preservación de epítomos antigénicos y de la arquitectura celular de tejidos de vertebrados.**

㉑ Resumen:

Método histológico optimizado para la preservación de epítomos antigénicos y de la arquitectura celular de tejidos de vertebrados, caracterizado porque combina la fijación por criosustitución y la inclusión en una cera o parafina de baja temperatura de fusión. El método objeto de la presente invención mejora la mayoría de los métodos histológicos actuales diseñados para microscopía óptica. Dicho método también mejora las propiedades antigénicas de tejidos embrionarios y adultos de anfibio, *Danio rerio* y ratón, preservando su estructura y previniendo la degradación de ARN. Este método constituye una buena alternativa los métodos de histología clásica utilizados normalmente en estudios de embriogénesis de vertebrados frente a problemas tan comunes como la labilidad de epítomos o la intercalación de tejidos rígidos en tejidos blandos.

ES 2 363 551 A1

DESCRIPCIÓN

Método histológico optimizado para la preservación de epítomos antigénicos y de la arquitectura celular de tejidos de vertebrados.

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el ámbito de la Histología, y más concretamente en el contexto de los métodos para la preservación y el mantenimiento de muestras histológicas de vertebrados.

Estado de la técnica

La preservación y el mantenimiento de la arquitectura celular y de la antigenicidad nativa durante el procesado histológico es un reto continuo de la Biología Celular. Durante los últimos diez años, se ha desarrollado el estudio de un buen número de organismos modelos útiles para el análisis experimental de muchos aspectos de la biología de los vertebrados, incluido su desarrollo (Haffter *et al.* 1996; Capdevila *et al.* 2000). La Biología del Desarrollo y otras disciplinas también requieren técnicas histológicas que permitan localizar tanto ARN mensajeros como proteínas en experimentos dirigidos a conocer la regulación y función génicas.

Las técnicas actuales más usadas son la fijación mediante paraformaldehído (PFA) seguida de crioprotección y secciones al criostato (Westerfield 2000) o inclusión en parafina y secciones al microtomo. Sin embargo, el PFA es mal un fijador de las propiedades reactivas de los tejidos, tales como la antigenicidad o la actividad enzimática.

En los casos de epítomos sensibles a los métodos más comunes de fijación se suelen usar fijadores de naturaleza alcohólica o de sales como el Zn. Estos, sin embargo, no ofrecen una apropiada preservación tisular y consecuentemente no permiten la obtención de secciones histológicas de buena calidad.

La presente invención supone una optimización de los métodos y técnicas conocidos en la actualidad, lo que se consigue mediante la combinación de la fijación por criosustitución (Hippe *et al.* 1989, Monaghan and Robertson, 1990, Quintana 1994 and Usuda *et al.* 1990) y la inclusión en una cera o parafina de baja temperatura de fusión, en torno a 40°C, como por ejemplo la cera *Polyester Wax* (Steedman, 1957). La invención consiste en un método nuevo con el cual se logra una preservación óptima de la morfología y de las propiedades reactivas del tejido. Este método respeta la forma general de la muestra, eliminando los artefactos debidos a la retracción tisular.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es un nuevo método optimizado de preservación histológica e histoquímica que mejora las técnicas más utilizadas actualmente y ofrece una alternativa a los métodos clásicos. El método en cuestión es compatible con cualquier método de tinción de secciones histológicas, como la inmunolocalización o la hibridación *in situ*.

Por último, el proceso de fijación se combina con materiales de inclusión óptimos para la integridad tisular a la vez que sigue preservando la antigenicidad natural del tejido y reduce pasos del protocolo que aumentan la eficacia del proceso: La criosustitución implica la deshidratación inmediata de las muestras, lo que permite la eliminación de numerosos pasos de deshidratación que pueden alterar la integridad de las muestras; la cera o parafina de poliéster es soluble en alcoholes, lo que permite evitar el uso de solventes agresivos (por ejemplo, xileno) durante los pasos de desparafinado, siendo sustituibles por etanol 100° 0 ó 96°.

El método reivindicado comprende las siguientes fases o etapas:

Fijación por criosustitución

El método objeto de la presente invención comprende el uso de fijación alcohólica (criosustitución en metanol) efectuada a bajas temperaturas, muy efectivo para el mantenimiento de la antigenicidad. La fijación comprende el tratamiento de las muestras, adecuadamente preparadas, con isopentano y metanol.

La realización de dicho método comprende un soporte en columnas diseñado para la optimización del proceso y que son reivindicadas dentro de la misma invención. El solicitante no conoce la descripción de ningún mecanismo para preservar la forma de muestras criosustituidas. Las columnas reivindicadas, formadas por dos tubos de un material resistente a bajas temperaturas, permiten una sustitución sin contacto con objetos que evita que muestras blandas o con disposición definida se deformen por el soporte. Las columnas contienen, una de ellas, isopentano y, la otra, metanol, siendo el volumen de isopentano y de metanol preferentemente proporcional al volumen de la muestra. Las columnas son de tamaño variable, condicionado por el tamaño de la muestra. La longitud de la columna que contiene isopentano es proporcional el tiempo de sustitución en caída libre. Durante el hundimiento de la muestra, todo el contenido hídrico es sustituido por isopentano y, paralelamente, la muestra se congela. Por ello, el que este proceso ocurra durante la

caída sin contacto con ningún instrumento, permite que la sustitución sea homogénea a través de toda su superficie y no se pierda la forma. Finalmente, la muestra llega al fondo, rígida por la congelación y deshidratada. Tras el tiempo requerido, la muestra es trasladada a la segunda columna, con metanol.

5

Inclusión en parafina de temperatura de fusión baja

Comprende la incubación de las muestras fijadas en diferentes soluciones (metanol:butanol 1:1, butanol, butanol:cera poliéster 1:1) a diferentes temperaturas, que van desde temperatura ambiente hasta 40°C; y su solidificación en parafina poliéster.

10

Obtención de secciones

Comprende el uso de microtomo.

15

Montaje

Comprende el uso de agua destilada estéril.

20

Descripción de los dibujos

Figura 1. Efectos de varios fijadores en la preservación morfológica de los tejidos. Los tejidos fueron fijados, incluidos en *Polyester Wax*, y teñidos con la hematoxilina-picosirio. A - H Secciones transversales de un embrión de *Danio rerio* de 72 h teñidas tras fijación por criosustitución (A), con PFA (B), con Bouin (C), con fijador de Zinc (D) y con MAA (E). F-H muestran respectivamente una ampliación de la región cuadrada de A-C. Las puntas de flecha (F) muestran el mesénquima subyacente al pliegue de la aleta. I-J: Secciones transversales de un adulto de anfibio fijado por criosustitución (I) y PFA (J). La barra mide 50 μm .

25

30

Figura 2. Efecto de la fijación en la preservación antigénica. A y B: Secciones del músculo liso del esófago del ratón fijadas con PFA (C) o por criosustitución (D). Ambas secciones se tiñeron con el anticuerpo contra Mimecán-Osteoglicina. Las áreas positivas se muestran teñidas de rojo debido al fluorocromo Alexa Fluor 594 (inmunofluorescencia indirecta). Los núcleos se muestran teñidos de azul debido a la tinción Hoescht. La punta de flecha señala un vaso sanguíneo. El asterisco señala una fibra muscular. Las barras miden 10 (C-D) y 20 μm (A-B). C y D: Uso de secciones obtenidas por nuestro método para diferentes metodología como la inmunolocalización e hibridación *in situ*. Secciones transversales de aleta regenerante (4 dpa). Tinción con anti-Zns-5, marcando escleroblastos o células sintetizadoras de lepidotriquiias en rojo (Alexa Fluor 594; C). Hibridación *in situ* de una sección paralela marcando células que expresan colágeno 10 (D).

35

40

Figura 3. Representación esquemática de un protocolo de criosustitución diseñado para la preservación de la forma tridimensional. 1: Método para muestras grandes. 2: Método para muestras de tamaño pequeño, como podría ser un embrión de *Danio rerio*.

45

Figura 4. Sección de la extremidad anterior de un embrión de ratón (estadio E15.5) fijado por criosustitución e incluido en *Polyester Wax*. La sección fue teñida con el anticuerpo contra la PCNA y el Pro-colágeno. Los núcleos se tiñeron con Hoescht.

50

Modos de realización de la invención

Para validar el método objeto de la presente invención se han utilizado embriones y tejidos adultos de varias especies de cordados, numerosos anticuerpos primarios diferentes, específicos de diversos epítomos, y varias sondas génicas que han permitido conocer la localización de diversos ARN mensajeros de las distintas especies utilizadas. Los anticuerpos usados en las pruebas de optimización fueron marcados tanto con marcadores fluorescentes como con enzimas. Algunos anticuerpos específicos de epítomos muy lábiles, y que habían dado muchos problemas con las técnicas anteriores, ahora se muestran eficaces a la hora de detectar la localización de los antígenos.

55

A continuación se procede a describir, sin carácter limitativo, condiciones y variables que permiten una realización preferida y óptima del método objeto de la presente invención.

60

Columnas de criosustitución

65

Dichas columnas están preferentemente formadas por dos tubos externos de vidrio o material plástico resistente a bajas temperaturas. Su tamaño es variable, aunque preferentemente presentan una altura mínima dependiente del tamaño de las muestras. Por otra parte, el volumen de isopentano y de metanol que contienen es preferentemente de

ES 2 363 551 A1

al menos 10 veces el volumen de la muestra. En una realización preferida las columnas presentan un mecanismo de cierre para evitar la evaporación del isopentano y del metanol.

5 Para el traspaso de la/s muestra/s de una columna a otra, se usa un recipiente intercambiable, preferentemente un recipiente de fondo mallado. El objeto de este recipiente es el de sacar la/s muestras del isopentano sin restos de éste y poder pasarlo rápidamente a la columna de metanol. El tamaño del poro puede ser variable, siempre que cumpla con el objetivo de retener la/s muestra/s mientras se escurre el isopentano. En otra realización preferida, el recipiente intercambiable se complementa con un portaobjetos o equivalente donde se coloca/n la/s muestra/s cuando se pretenda criosustituir tejidos manteniendo una forma plana (figura 3.1). En otra realización preferida, la/s muestra/s se introduce/n en la columna que contiene isopentano en suspensión en una gota de metanol al 70% (figura 3.2).
10

Tamaño de las muestras

15 El tamaño admisible de las muestras a fijar mediante criosustitución viene determinado por su permeabilidad. De este modo, es recomendable que las muestras con piel o epitelios (por ejemplo, cuerpo de anfibio, embrión de ratón, u órganos completos) tengan preferentemente un grosor en la escala de milímetros, y más preferentemente un grosor menor o igual a 5 mm; mientras que en el caso de tejidos seccionados (por ejemplo, secciones de corazón o cerebro), con mayor permeabilidad debido a la inexistencia de epitelios en sus superficie, son aceptables grosores mayores (por ejemplo, 1 cm).
20

Tiempos de criosustitución

25 Dichos tiempos dependen del tamaño y de la permeabilidad de las muestras. La incubación en la columna de isopentano es preferentemente en la escala de minutos, y más preferentemente en el rango de 1 a 10 minutos, pudiendo ser 1 minuto suficiente para muestras muy pequeñas y permeables (por ejemplo, embriones de *Danio rerio*), y siendo 2 minutos un tiempo válido para una gran variedad de muestras. En el caso de la columna de metanol, la incubación es preferentemente en la escala de horas, y más preferentemente en el rango de 24 (muestras muy pequeñas y permeables) a 48 horas (tiempo válido para una gran variedad de muestras), aunque no existe un tiempo máximo de incubación, pudiendo ser almacenadas las muestras en metanol a -80°C, e incluso a -20°C, durante meses.
30

Tejidos estudiados

35 El método se ha aplicado a embriones y tejidos adultos de anfibio, de *Danio rerio*, y ratón. Los embriones de pez (*D. rerio*) se obtuvieron a través de cruces entre individuos comprados en tiendas de la ciudad y mantenidos a 25°C en acuarios con aireación. Los embriones de ratón se obtuvieron mediante cruzamiento de adultos del Estabulario de la Universidad de Málaga. Los especímenes adultos del anfibio se obtuvieron en la localidad francesa de Banyuls. La manipulación animal respetó la normativa establecida en el B.O.E. 67, 1988.
40

Histología

45 A continuación se refiere un ejemplo, en forma de protocolo, de realización preferida del método objeto de la invención.

Previo a la aplicación del método, las columnas de isopentano y de metanol deben ser enfriadas a -80°C, y las muestras a tratar deben ser adecuadamente preparadas (por ejemplo, decorionación en el caso de embriones, o disecado en el caso de órganos).
50

Fijación por criosustitución

- 55 1. Transferir las muestras al recipiente intercambiable introducido en la columna de criosustitución que contiene isopentano enfriado a -80°C (figura 3A). Dicha transferencia puede realizarse con la ayuda de un portaobjetos o equivalente en el que se ha colocado la muestra (figura 3.1), en suspensión en metanol al 70%, o simplemente dejando caer la muestra en su interior (figura 3.2).
- 60 2. Incubar las muestras en isopentano (figura 3A) durante un tiempo determinado en función del tamaño y de la permeabilidad de las muestras.
3. Transferir el recipiente intercambiable con las muestras a la columna de metanol enfriado a -80°C (figura 3B).
- 65 4. Incubar las muestras en metanol (figura 3B) durante un tiempo determinado en función del tamaño y de la permeabilidad de las muestras y continuar con la inclusión en cera o parafina de temperatura de fusión baja, o directamente almacenar las muestras en metanol a -80°C o a -20°C (continuar con la inclusión requerirá, en el caso de que las muestras sean almacenadas, su recuperación mediante la incubación de las muestras en un gradiente de temperaturas desde -80°C ó -20°C hasta temperatura ambiente).

ES 2 363 551 A1

Inclusión en cera o parafina de temperatura de fusión baja

1. Incubar las muestras a temperatura ambiente en una mezcla 1:1 de metanol y butanol durante 15-45 minutos, en función del tipo de muestra; durante 30 minutos en una realización más preferida, apta para una gran variedad de muestras.
2. Incubar en butanol a temperatura ambiente durante 5-20 minutos, en función del tipo de muestra; durante 10 minutos en una realización más preferida, apta para una gran variedad de muestras.
3. Incubar en butanol a 40°C durante 10 minutos.
4. Incubar en una mezcla de butanol y cera o parafina poliéster (1:1) durante 30 minutos a 40°C.
5. Incubar en cera o parafina poliéster tres veces a 40°C durante 30 minutos cada vez.
6. Colocar la cera o parafina poliéster sobre el molde.
7. Solidificar completamente el bloque de cera o parafina, con la muestra en su interior, a 4°C.

Obtención de secciones

Cortar las secciones al microtomo, preferentemente en un lugar climatizado, y almacenar las mismas a 4°C hasta su montaje.

Montaje de secciones

Usar agua destilada estéril, preferentemente agua bidestilada estéril enfriada a 4°C.

Validación

Como métodos de control y validación del método se han utilizado paraformaldehído (Akimenko *et al.* 1995), fijador de Bouin (Marí-Beffa *et al.* 1996), fijador de Zn (Beckstead 1994), fijador MAA (metanol:acetona:agua 1:1:8; Muñoz-Chápuli *et al.* 1997); y la inclusión en parafina Histosec (Murciano *et al.* 2002). El resultado de la comparación entre el método objeto de la presente invención y los métodos de referencia antes citados es el siguiente (tabla 1):

	Criosustitución con methanol	PFA	Fijador Bouin	Fijador de Zn	Fijador MAA
Preservación tisular	+++	++/+*	++/+*	-	-
Preservación antigenicidad	+++	-	-	++	++

(+ muestra grados de preservación tisular y antigénica. +++ = preservación muy alta, - = preservación muy pobre, * indica resultados muy variables dependiendo del tejido estudiado)

Tinciones con anticuerpos e histoquímica

Los anticuerpos primarios utilizados permiten la detección de epítomos de membrana citoplasmática, matriz extracelular y orgánulos intracelulares que suelen presentar dificultad de preservación antigénica. Los anticuerpos utilizados para la validación del método objeto de la invención son:

1. Flg (anticuerpo policlonal contra el dominio intra-membrana del FGFR1),
2. Bek C17 (anticuerpo policlonal contra el dominio intra-membrana del FGFR2),
3. C15 (anticuerpo policlonal contra el dominio intra-membrana del FGFR3) y

4. C16 (anticuerpo policlonal contra el dominio intra-membrana del FGFR4; los cuatro obtenidos por Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Alemania);
5. Anti-mimecán (anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína mimecán de ratón (Fernández *et al.* 2003);
6. Ki-S5 (Ki-67; un anticuerpo policlonal de ratón, Roche);
7. Pro-colágeno I (M-38; un anticuerpo monoclonal de ratón, Developmental Studies Hybridoma Bank);
10. 8. C20 TRT (un anticuerpo policlonal de cabra, Santa Cruz Biotechnology).
9. Anti-PCNA (anticuerpo monoclonal de ratón, SIGMA).

15 Asimismo se han utilizado anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor 594 (Invitrogen. Molecular Probes) o biotinilados (a una concentración 1:2000). Estos últimos fueron detectados con la peroxidasa ExtrAvidina (Sigma) y la reacción de la peroxidasa revelada con diamino-bencidina (DAB; Beckstead 1994). Las tinciones hematoxilina-picrosirio (HP) y Hoescht se utilizaron como técnicas histoquímicas de modo simple o acompañando las tinciones con anticuerpos (Bechara *et al.* 2000).

20 *Hibridación in situ*

25 La hibridación *in situ* se realizó según Akimenko *et al.* (1994) usando sondas de RNA para el gen *coll0a1* marcadas con digoxigenina. Brevemente, las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas en pasos sucesivos de alcoholes de menor graduación (libre de RNAsa). Se prehibridaron en tampón de hibridación durante 1 hora a 70°C. Posteriormente se hibridó a la misma temperatura durante toda la noche. Tras los lavados, las secciones se bloquearon durante 4 horas en *Western Blocking Reagent* (Roche) según las instrucciones del fabricante y se incubaron en anti-digoxigenina toda la noche. El revelado se llevo a cabo mediante NBT/BCIP.

30 *Resultados*

35 La criosustitución en metanol, combinada con inclusión en cera o parafina de bajo punto de fusión y corte de secciones al micrótopo, parece ser una buena alternativa a la fijación con paraformaldehído (PFA), y secciones al criostato o tras inclusión en parafina tradicional. La preservación de la antigenicidad y morfología tisular se muestran excluyentes en los protocolos histológicos rutinarios. En un primer experimento, se tiñeron secciones de la región caudal de embriones de *Danio rerio* con hematoxilina-picrosirio. En estos estadios, los miotomos y los pliegues de aletas dorsal y anal están bien desarrollados. Los pliegues de la aleta son particularmente sensibles a los métodos 40 histológicos, mostrando normalmente rupturas entre el mesénquima y el ectodermo en la mayoría de los métodos estudiados. En las tinciones realizadas se obtuvo siempre una preservación óptima tras la fijación por criosustitución (figura 1A). Las fijaciones con Bouin (figura 1B), PFA (figura 1C), fijador de Zn (figura 1D) o MAA (figura 1E; tabla 1) mostraron resultados de peor calidad. La fijación PFA generó artefactos de ruptura del mesénquima. Sin embargo, la aplicación de la criosustitución reduce significativamente la aparición de dichos artefactos (figuras 1F, 1G y 1H).

45 Estos métodos también se han aplicado a los tejidos del anfiexo, que presentan una histología muy difícil. Las figuras 1I y 1J muestran claras diferencias histológicas entre los métodos de criosustitución (figura 1I) y fijación con PFA (figura 1J) aplicados al anfiexo. Mientras que en las muestras fijadas con PFA se observan discontinuidades abundantes en las masas musculares y pérdida de integridad del conectivo, las muestras criosustituidas no presentan ningún defecto morfológico.

55 La combinación entre la criosustitución y la cera o parafina de baja temperatura de fusión mejora la preservación histológica de los tejidos. Las figuras 2A y B muestran tinciones con un anticuerpo contra mimecán del músculo liso de la pared del esófago del ratón fijados con PFA (figura 2A) o por criosustitución (figura 2B). Mientras que la sección fijada con paraformaldehídos muestra una inmuno-reactividad muy escasa, la sección obtenida tras la criosustitución muestra una inmuno-tinción muy fuerte y específica de las fibras musculares y vasos sanguíneos. Las figuras 2C y D muestran secciones transversales paralelas de aleta regenerante de 4 días post-amputación (dpa) obtenidas mediante nuestro método. En la figura 2C se observan una tinción por inmunofluorescencia de Zns-5. Este anticuerpo marca específicamente células sintetizadoras de lepidotriquia o escleroblastos. La lepidotriquia es una estructura esquelética 60 de la aleta que presenta marcadores tanto de hueso como de cartilago. Esto se puede demostrar mediante hibridación *in situ* del ARN mensajero del colágeno 10 (figura 2D). En este caso, las secciones paralelas permiten localizar ambos marcadores en las mismas células usando metodologías tan diferentes. Por lo tanto, esta metodología permite la preservación de la antigenicidad de epitopos a la vez que mantiene la integridad de los ARN mensajeros tan sensibles a la degradación por ARNasas.

65 El uso de columnas de gravedad durante la criosustitución (columnas de criosustitución) también permite preservar la forma y posición relativa de los diversos tejidos en el interior de las muestras. Este método permite preservar el tejido de posibles plegamientos por manipulación (por ejemplo, mantener una aleta extendida; figura 3.1). Otro problema

común en las muestras de tamaño pequeño son las transformaciones significativas de forma tras los métodos clásicos de criosustitución. Un ejemplo de ello son los embriones de *Danio rerio*, que, cuando se criosustituyen sobre una superficie, sufren deformaciones debida a la compresión de los tejidos contra el soporte. La caída de una gota de alcohol diluido en la columna de isopentano permite la sustitución homogénea por toda la superficie de la muestra evitando la deformación (figura 3.2).

El método objeto de la presente invención también ha demostrado ser muy útil para la obtención de secciones histológicas de muestras que intercalan tejidos blandos y duros. En estos casos, la separación de ambos suele ocurrir como artefacto durante los fenómenos de deshidratación-rehidratación o mientras es cortado al criostato o al microtomo. La sustitución directa y rápida del contenido hídrico durante criosustitución y la rigidez que esta cera o parafina aporta a los tejidos blandos solucionan estos problemas. Un ejemplo se representa en las muestras de cartílago, que se rodean de tejidos conectivos como la traquea, o de la extremidad de ratón durante el desarrollo (figura 4).

El método reivindicado es útil para analizar muestras teñidas con métodos histoquímicos, o con marcas fluorescentes tales como la fluorescencia endógena de organismos transgénicos. Las propiedades fluorescentes de los tejidos se mantienen durante todo el procesado histológico debido a la baja temperatura utilizada durante la fijación e inclusión.

En conclusión, el método objeto de la presente invención mejora la mayoría de los métodos histológicos actuales diseñados para microscopía óptica. Dicho método también mejora las propiedades antigénicas de tejidos embrionarios y adultos de anfibio, *Danio rerio* y ratón, preservando su estructura y previniendo la degradación de ARN. Este método constituye una buena alternativa los métodos de histología clásica utilizados normalmente en estudios de embriogénesis de vertebrados frente a problemas tan comunes como la labilidad de epítomos o la intercalación de tejidos rígidos en tejidos blandos.

Referencias

Akimenko MA, Johnson SL, Westerfield M, Ekker M (1995) Differential induction of four msx homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development* 121(2):347-57.

Bechara IJ, Joazeiro PP, Marí-Beffa M, Becerra J, Montes GS (2000) Collagen-affecting drugs impair regeneration of teleost tail fins. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 32:273-80.

Beckstead JH (1994) A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem.* 42(8): 1127-1134.

Capdevila J., Vogan K.J., Tabin C.J., Izpisúa-Belmonte J.C. (2000). Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell*, 101, 9-21.

Fernández B, Kampmann A, Pipp F, Zimmermann R, Schaper W (2003) Osteoglycin expression and localization in rabbit tissues and atherosclerotic plaques. *Mol. Cell Biochem.* 246:3-11.

Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123:1-36.

Hippe S, Düring K, Krezauer F (1989) *In situ* localization of a foreign protein in transgenic plant by immunoelectron microscopy following high pressure freezing, freeze-substitution and low temperature embedding. *Eur. J. Cell. Biol.* 50:230-234.

Marí-Beffa M, Mateos I, Palmqvist P, Becerra J (1996) Cell to cell interactions during teleosts fin regeneration. *Int. J. Dev. Biol. Supp.* 1; 179S-180S.

Monaghan P, Robertson D, (1990) Freeze-substitution without aldehyde or osmium fixatives: ultrastructure and implications for immunocytochemistry. *J Microsc.* 158:355-63.

Muñoz-Chápuli R, Gallego A, Pérez-Pomares JM (1997) A Reaction-Diffusion Model can Account for the Anatomical Pattern of the Cardiac Conal Valves in Fish. *J. Theor. Biol.* 21:233-40.

Murciano C, Fernández TD, Durán I, Maseda D, Ruiz-Sánchez J, Becerra J, Akimenko MA, Marí-Beffa M (2002) Ray-Interray interactions during fin regeneration of *Danio rerio*. *Dev. Biol.* 252: 214-224.

Quintana C, (1994) Cryofixation, cryosubstitution, cryoembedding for ultrastructural, immunocytochemical and microanalytical studies. *Micron.* 25:63-99.

Santamaría JA, Marí-Beffa M, Becerra J (1992) Interactions of the lepidotrichial matrix components during tail fin regeneration in teleosts. *Differentiation* 49:143-50.

ES 2 363 551 A1

Santos-Ruiz L, Santamaría JA, Becerra J (2001) Differential expression of FGF receptors during zebrafish fin regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 45: S131-S132.

Steedman HF (1957) Polyester wax; a new ribboning embedding medium for histology. *Nature.* 179:1345.

5

Usuda N, Ma HJ, Hanai T, Yokota S, Hashimoto T, Nagata T. (1990) Immunoelectron microscopy of tissues processed by rapid freezing and freeze-substitution fixation without chemical fixatives: application to catalase in rat liver hepatocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 38:617-23.

10

Westerfield, M (2000) The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método histológico optimizado para la preservación de epítomos antigénicos y de la arquitectura celular de tejidos de vertebrados **caracterizado** porque comprende la combinación de la fijación por criosustitución y la inclusión en una cera o parafina de baja temperatura de fusión.
- 10 2. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque comprende las siguientes fases o etapas:
- 15 a. Fijación por criosustitución, que comprende el uso de fijación alcohólica (criosustitución en metanol) efectuada a bajas temperaturas, mediante el tratamiento de las muestras, adecuadamente preparadas, con isopentano y metanol;
 - 20 b. Inclusión en cera o parafina de temperatura de fusión baja, que comprende la incubación de las muestras fijadas en diferentes soluciones (metanol:butanol 1:1, butanol, butanol:cera poliéster 1:1) a diferentes temperaturas, que van desde temperatura ambiente hasta 40°C; y su solidificación en cera o parafina poliéster.
 - c. Obtención de secciones; y
 - d. Montaje de secciones.
- 25 3. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la fijación por criosustitución comprende el uso de “columnas de criosustitución”, formadas por dos tubos de un material resistente a bajas temperaturas, de tamaño variable, que permiten una sustitución sin contacto con objetos que evita que muestras blandas o con disposición definida se deformen por el soporte; así como de un recipiente intercambiable para el traspaso de las muestras de una columna de criosustitución a la otra.
- 30 4. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el recipiente intercambiable presenta un fondo mallado.
- 35 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 **caracterizado** porque las “columnas de criosustitución” contienen, una de ellas, isopentano y, la otra, metanol, siendo el volumen de isopentano y de metanol preferentemente proporcional al volumen de la muestra.
- 40 6. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque las muestras a fijar son transferidas a la columna de criosustitución que contiene isopentano enfriado a -80°C.
- 45 7. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la transferencia se realiza con la ayuda de un portaobjetos o equivalente en el que se ha colocado la muestra, en suspensión en metanol al 70%, o simplemente dejando caer la muestra en su interior.
- 50 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 **caracterizado** porque las muestras se incuban en isopentano durante un tiempo determinado en función del tamaño y de la permeabilidad de la muestras.
- 55 9. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque dicha incubación se realiza en el rango de 1 a 10 minutos.
- 60 10. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque dicha incubación es de 2 minutos, tiempo válido para una gran variedad de muestras.
- 65 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 **caracterizado** porque el recipiente intercambiable con las muestras es transferido a la columna de metanol enfriado a -80°C.
12. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque las muestras se incuban en metanol durante un tiempo determinado en función del tamaño y de la permeabilidad de la muestras.
13. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque dicha incubación se realiza en el rango de 24 a 48 horas.
14. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque dicha incubación es de 48 horas, tiempo válido para una gran variedad de muestras.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la inclusión en cera o parafina de temperatura de fusión baja comprende la incubación de las muestras fijadas a temperatura ambiente en una mezcla 1:1 de metanol y butanol durante 15-45 minutos, en función del tipo de muestra.

ES 2 363 551 A1

16. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la incubación en la mezcla 1:1 de metanol y butanol es de 30 minutos, tiempo apto para una gran variedad de muestras.

5 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 **caracterizado** porque las muestras, tras la incubación en la mezcla metanol:butanol 1:1, se incuban en butanol a temperatura ambiente durante 5-20 minutos, en función del tipo de muestra.

10 18. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la incubación en butanol a temperatura ambiente es de 10 minutos, tiempo apto para una gran variedad de muestras.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18 **caracterizado** porque, tras la incubación en butanol a temperatura ambiente, las muestras son incubadas. Incubar en butanol a 40°C durante 10 minutos.

15 20. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque, tras la incubación en butanol a 40°C, las muestras son incubadas en una mezcla de butanol y cera o parafina poliéster (1:1) durante 30 minutos a 40°C.

20 21. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque, tras la incubación en la mezcla de butanol:parafina poliéster 1:1, las muestras se incuban en cera o parafina poliéster tres veces a 40°C durante 30 minutos cada vez.

22. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la inclusión en cera o parafina de temperatura de fusión baja finaliza colocando la cera o parafina poliéster sobre un molde y dejándolo, en última instancia, solidificar completamente a 4°C.

25 23. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la obtención de secciones se realiza utilizando un microtomo, preferentemente en un lugar climatizado.

30 24. Método según la reivindicación anterior **caracterizado** porque el montaje de las secciones obtenidas comprende el uso agua destilada estéril, preferentemente agua bidestilada estéril enfriada a 4°C.

35

40

45

50

55

60

65

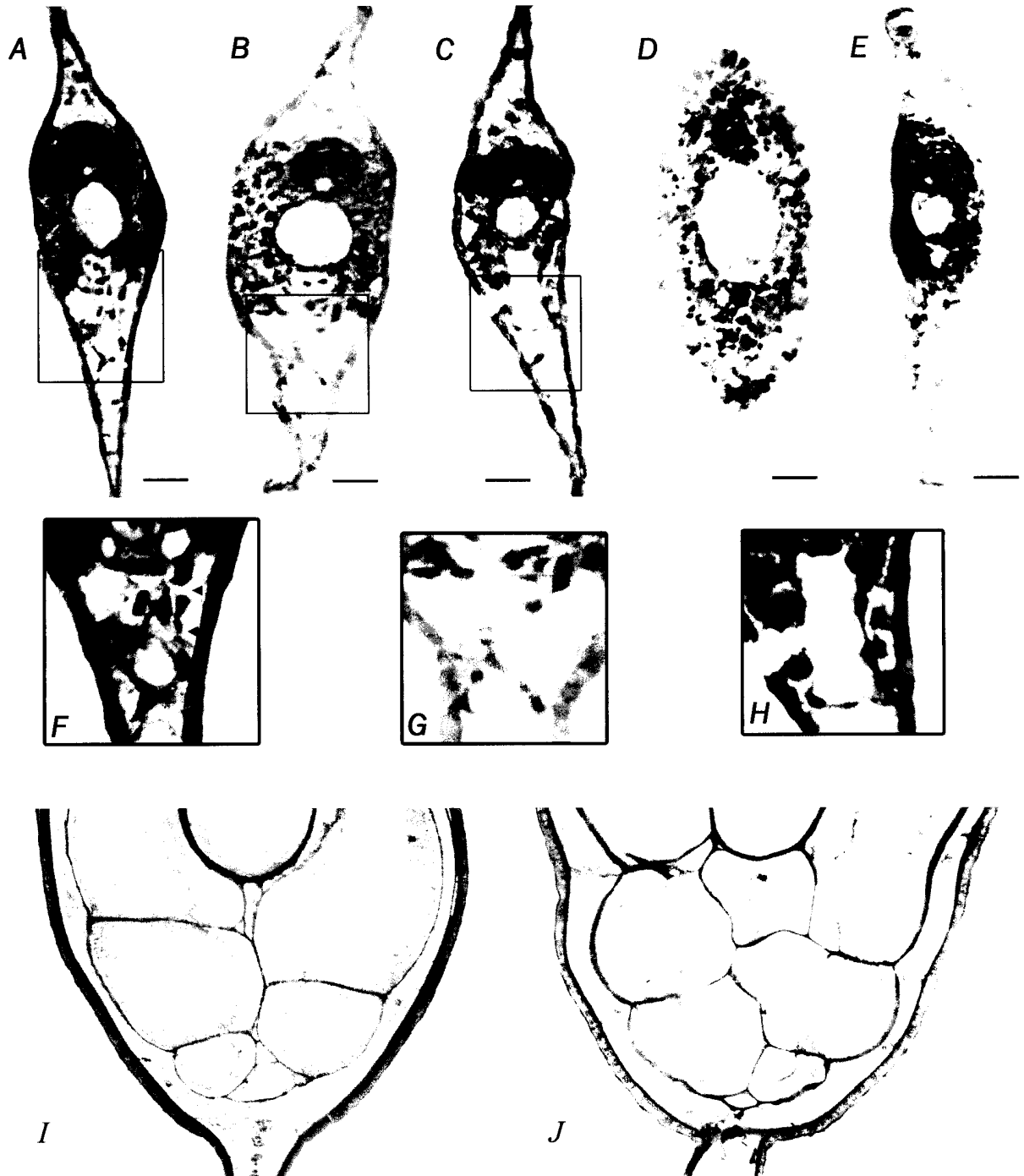


Figura 1

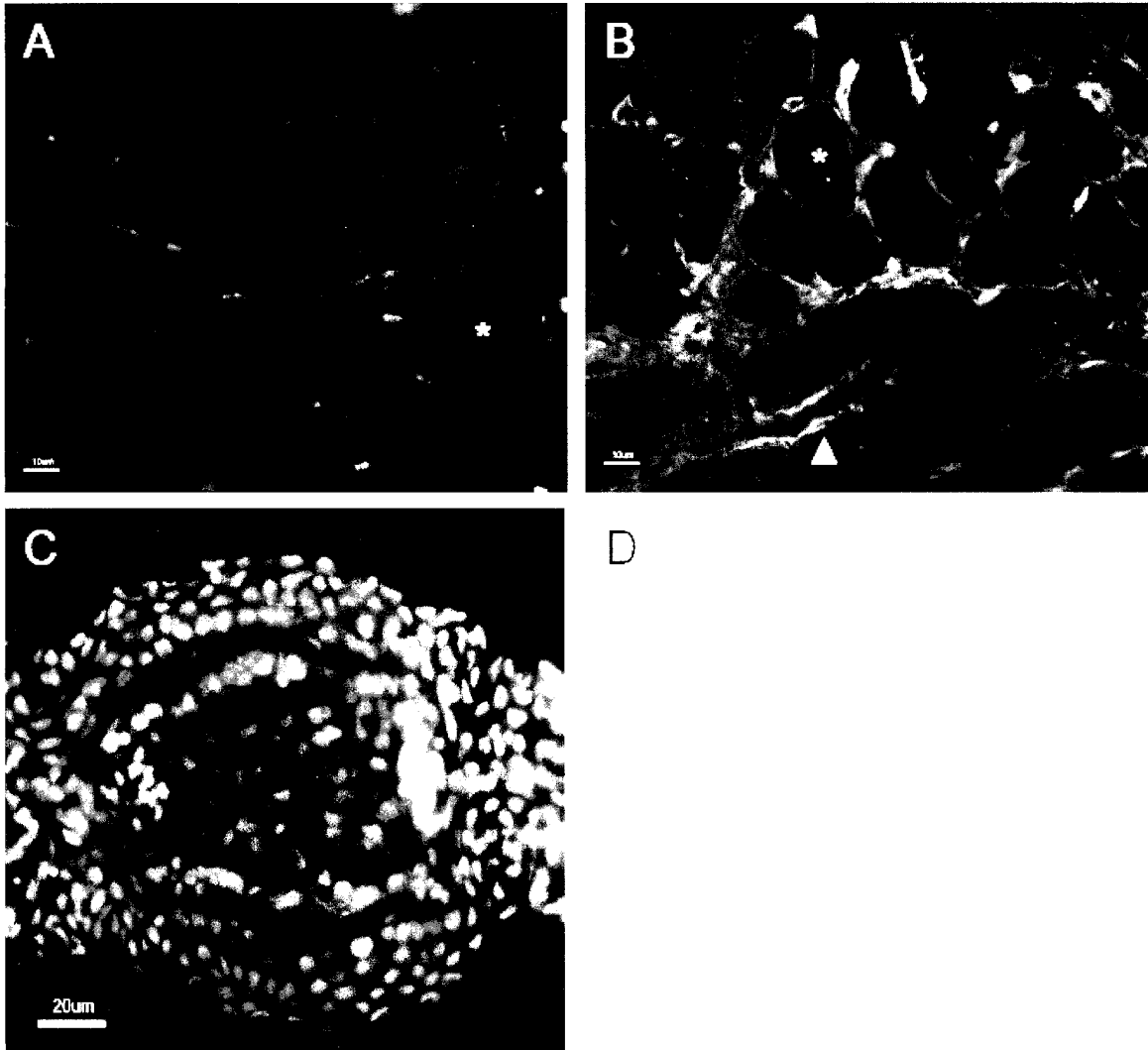


Figura 2

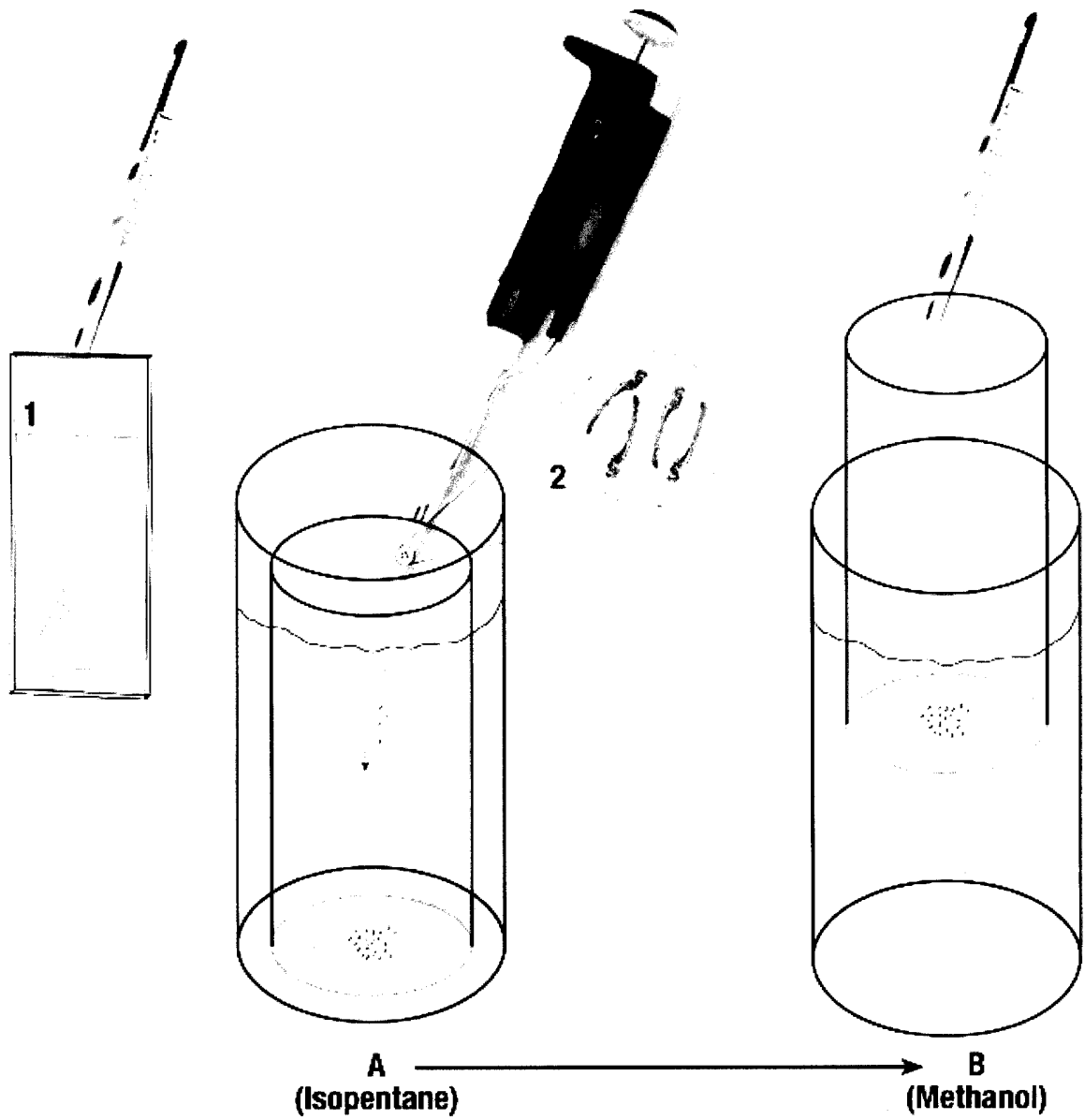


Figura 3

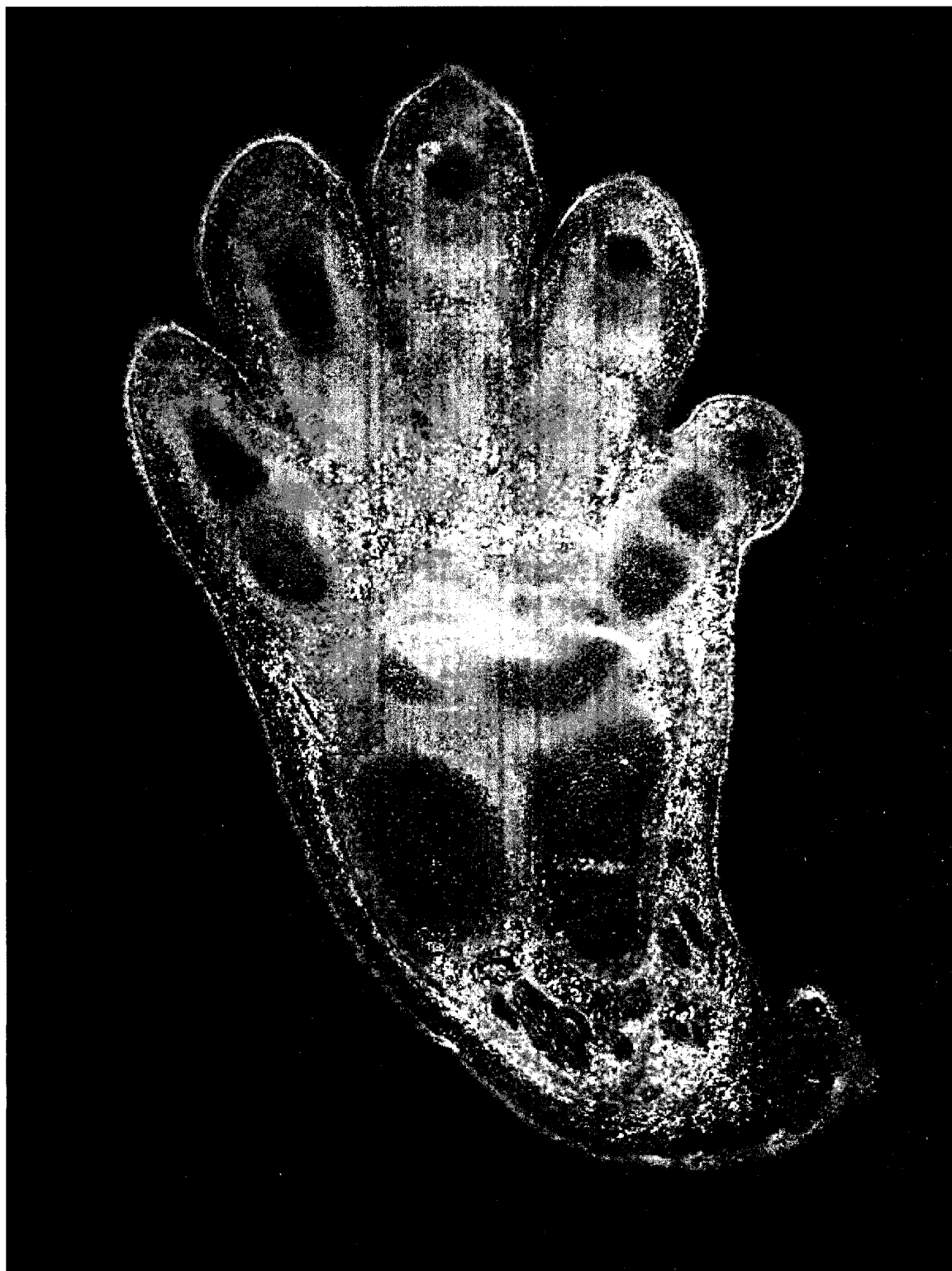


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000096

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.01.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ONODERA Y et al.: "Cryofixed, Freeze-Dried and Paraffin-Embedded Skin Enables Successful Immunohistochemical Staining of Skin Basement Membrane Antigens", <i>Histochemistry</i> (1992), vol. 98 (2), pp.: 87-91, todo el documento, en particular, resumen y pág. 88, -Materials and Methods: Cryofixation, freeze drying, and paraffin embedding procedure".	1
X	ONODERA, Y. et al.: "Immunohistochemical, and Morphological Alterations in Epidermal Basement Membrane in Skin Cancers Study Using Cryofixed, Freeze-Dried and Paraffin-Embedded Skin Sections" <i>J. Dermatol. Sci.</i> (1993), vol. 6 (1), pp.: 5; resumen; ISSN 0923-1811.	1
A	US 2003003577 A1 (HORSTMANN HEINZ) 02.01.2003, todo el documento.	1-24
A	NAGATA T: "X-Ray Microanalysis of Biological Specimens by High Voltage Electron Microscopy" <i>Progress in Histochemistry and Cytochemistry</i> (2004), vol. 39 (4), pp.: 185-319, todo el documento.	1-24
A	VERDIER F et al.: "Aluminium Assay and Evaluation of the Local Reaction at Several Time Points after Intramuscular Administration of Aluminium Containing Vaccines in the <i>Cynomolgus monkey</i> ", <i>Vaccine</i> (2005), vol. 23 (11) pp.: 1359-1367, todo el documento.	1-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.03.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N1/06 (2006.01)

G01N1/04 (2006.01)

G01N21/00 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

A01N1/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-24	SI
	Reivindicaciones 1	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2-24	SI
	Reivindicaciones 1	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ONODERA Y et al.: "Cryofixed, Freeze-Dried and Paraffin-Embedded Skin Enables Successful Immunohistochemical Staining of Skin Basement Membrane Antigens", <i>Histochemistry</i> (1992), vol. 98 (2), pp.: 87-91, todo el documento, en particular, resumen y pág. 88, -Materials and Methods: Cryofixation, freeze drying, and paraffin embedding procedure".	
D02	ONODERA, Y. et al.: "Immunohistochemical, and Morphological Alterations in Epidermal Basement Membrane in Skin Cancers Study Using Cryofixed, Freeze-Dried and Paraffin-Embedded Skin Sections" <i>J. Dermatol. Sci.</i> (1993), vol. 6 (1), pp.: 5; resumen; ISSN 0923-1811.	
D03	US 2003003577 A1 (HORSTMANN HEINZ)	02.01.2003
D04	NAGATA T: "X-Ray Microanalysis of Biological Specimens by High Voltage Electron Microscopy" <i>Progress in Histochemistry and Cytochemistry</i> (2004), vol. 39 (4), pp.: 185-319, todo el documento.	
D05	VERDIER F et al.: "Aluminium Assay and Evaluation of the Local Reaction at Several Time Points after Intramuscular Administration of Aluminium Containing Vaccines in the <i>Cynomolgus monkey</i> ", <i>Vaccine</i> (2005), vol. 23 (11) pp.: 1359-1367, todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un procedimiento para el tratamiento de muestras biológicas de vertebrados de manera que conserven sus epítomos antigénicos y la arquitectura celular que les es propia. De este modo, las muestra así tratada podrán someterse, posteriormente a tinciones con anticuerpos, para su estudio histológico e histoquímico. La invención surge como solución al dilema creado en el estado de la técnica por la metodología anterior de preparación de muestras histológicas. De un lado, la técnica más antigua se basa en la fijación de las muestras con paraformaldehído y su posterior inclusión en parafina. Esta técnica respeta al máximo la arquitectura celular de la muestra, pero, a cambio, no preserva los epítomos antigénicos de la muestra. De otro, la inclusión en parafina, tras la etapa de criosustitución aporta rigidez a los tejidos blandos de la muestra.

Para llevar a cabo el procedimiento de la invención se utiliza una estructura con doble columna que contiene isopentano y metanol enfriados a - 80° C (cada columna un disolvente). Una vez tratada la muestra con estas sustancias, se incuba con otros disolventes orgánicos y se incluye en parafina líquida de bajo punto de fusión.

D01 y D02 constituyen el estado de la técnica más cercano. Se refieren a un método para preparar muestras biológicas que comprende su enfriamiento brusco en isopentano enfriado mediante nitrógeno líquido y su posterior inclusión en parafina líquida.

El contenido de estos documentos es particularmente relevante para la reivindicación 1 debido a que ésta se ha redactado en términos muy generales. Así pues, la reivindicación 1 no cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva. En cuanto a las reivindicaciones 2-24, se considera que sí tienen novedad y actividad inventiva.