

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 523**

51 Int. Cl.:
G01N 1/30 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08700937 .9**
96 Fecha de presentación: **11.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2122324**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Recuperación de antígeno horizontal**

30 Prioridad:
09.02.2007 US 900471 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2012

73 Titular/es:
**DAKO DENMARK A/S
PRODUKTIONSVEJ 42
2600 GLOSTRUP, DK**

72 Inventor/es:
**CHRISTENSEN, Nanna K. y
WINTHER, Lars**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 385 523 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Recuperación de antígeno horizontal

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para aumentar la inmunorreactividad de una muestra de tejido o células fijada en un medio de fijación, una composición de recuperación de objetivos y su uso. La invención se refiere además a la tinción inmunohistoquímica automatizada de dichas muestras, en particular a la reactivación de los antígenos enmascarados por la fijación.

Antecedentes

10 Debido a la introducción de terapias especializadas para tipos específicos de cáncer, se está incrementando la importancia de la tinción inmunohistoquímica para el diagnóstico del cáncer. Además, la demanda creciente de un rendimiento elevado en los laboratorios de anatomía patológica, junto con la importancia de evitar cualquier error de procedimiento, ha acentuado la necesidad de automatizar los procedimientos inmunohistoquímicos.

15 La mayoría del tejido obtenido de muestras clínicas se fija en un fijador por entrecruzamiento tal como formaldehído. Este procedimiento detiene la degradación natural del tejido y así conserva intacta la morfología durante muchos años. La fijación forma entrecruzamientos entre los aminoácidos reactivos de las proteínas del tejido en forma de puentes de metileno y una red de poli-oxi-metileno, que impide la elución de las proteínas solubles y retiene las moléculas en una disposición espacial que se parece mucho al tejido vivo. Posteriormente, la muestra de tejido se deshidrata y se incrusta en un medio de incrustación, normalmente cera de parafina, lo que permite que el tejido se corte en secciones de hasta 2 µm.

20 La fijación, sin embargo, provoca cierta pérdida de antigenicidad. Las modificaciones introducidas en las proteínas cambian químicamente los epítomos reconocidos por los anticuerpos o impiden físicamente el acceso a los epítomos. Se han desarrollado muchos métodos de recuperación de antígenos o de recuperación de objetivos para restablecer la antigenicidad del tejido, y la mayoría pertenecen a uno de dos grupos.

25 Un método tradicional comprende tratar el tejido con una enzima proteolítica, que abre el tejido para permitir que los anticuerpos accedan a los antígenos. Para ciertos anticuerpos específicos, este método es el procedimiento de recuperación de antígenos preferido, pero posee ciertas limitaciones. Debido a que las enzimas proteolíticas degradan las proteínas tisulares, existe un riesgo significativo de destruir el epítomo específico de la proteína que es reconocido por el anticuerpo, y así la antigenicidad se puede perder, en vez de ser restablecida. Además, el tratamiento proteolítico prolongado puede provocar que las proteínas pierdan su estructura tridimensional, que también es importante para el reconocimiento anticuerpo-antígeno. Estos factores requieren obviamente un control estricto de los tiempos de incubación, no obstante el tiempo de incubación necesario depende en gran medida de la actividad de la enzima.

35 Durante el almacenamiento, las enzimas se degradarán lentamente, especialmente si la temperatura de almacenamiento es mayor que la recomendada, y así la actividad de la disolución enzimática puede variar mucho con el tiempo. Esto significa que el tiempo óptimo de incubación cambia con la edad de la disolución enzimática, y de manera ideal se debería ajustar en consecuencia.

40 Otro factor que afecta a la eficacia de la recuperación proteolítica de objetivos es la duración de la fijación del tejido. El grado de entrecruzamiento en el tejido se incrementa con el tiempo de fijación, y así el tejido que se ha fijado durante 72 horas necesitará un tratamiento proteolítico más largo que uno que se ha fijado durante 24 horas. Con frecuencia, sin embargo, la información concerniente al tiempo de fijación no está disponible, en cuyo caso no es posible hacer el ajuste correspondiente del tiempo de incubación enzimática.

45 Un método fundamentalmente diferente consiste en la ebullición del tejido en una disolución acuosa, también conocido como recuperación de antígenos inducida térmicamente (HIAR). Este método de pretratamiento no depende tanto del tiempo de fijación como el pretratamiento enzimático, y se usa de manera más generalizada. La temperatura elevada acelera la hidrólisis de las modificaciones inducidas por el aldehído y el aldehído liberado se diluye en el agua, por lo que se impide que reaccione de nuevo con las proteínas.

50 En la HIAR convencional, los tiempos de ebullición típicos son de entre 20 y 40 minutos a 95-99 °C, dependiendo del antígeno, a los que se añade un tiempo de enfriamiento de aproximadamente 20 minutos antes de que los portaobjetos se puedan extraer con seguridad, sin riesgo de secar el tejido. Cuando la cubeta con la disolución fría de recuperación de objetivos se coloca en un baño de agua precalentado, requerirá de 20 a 30 minutos antes de que alcance 95-99 °C, lo cual se tiene que añadir al tiempo de procedimiento total. Mediante el uso de un horno de microondas se puede reducir esta etapa de calentamiento a 2-3 minutos tal como se describe en el documento USP 5.244.787, sin embargo los tiempos de ebullición y enfriamiento no cambian, y así el procedimiento total sigue durando de 45 a 60 minutos. El calentamiento de los portaobjetos y de la disolución de recuperación de objetivo en un autoclave o dispositivo presurizado similar puede reducir el tiempo de ebullición. Aquí, el tejido se puede hervir a 55 temperaturas superiores a 100 °C. Esto tiene una importancia especial a altitudes elevadas, en las que el punto de

ebullición de las disoluciones acuosas disminuye en comparación con el nivel del mar. A pesar del tiempo de ebullición relativamente corto, el protocolo completo de HIAR tiene una duración similar a la del protocolo sin presurizar, debido a que el enfriamiento del líquido a una temperatura a la que el autoclave se puede abrir con seguridad consume mucho tiempo.

5 Además de agua destilada pura, se usan de manera rutinaria muchos reactivos para la recuperación de antígenos, que incluyen tampones Tris, Urea, EDTA, Citrato y solución salina. Además, muchas disoluciones contienen detergentes, y la selección comprende tanto tensioactivos iónicos como no iónicos. A pesar de la investigación exhaustiva en el área de la intensificación de tinciones, no se ha identificado ningún método o reactivo universal que funcione con todos los procedimientos inmunohistoquímicos o inmunocitoquímicos posteriores.

10 Los informes previos describen el uso de glicerol para la recuperación de antígenos. Beebe (Beebe, K., *Microscopy Today*, 1999, n° 9 (Noviembre), 30-31) ha informado el uso de un 80% de glicerol en un método de recuperación de antígenos por inmersión convencional.

15 Aunque la recuperación de antígenos tradicional inducida térmicamente restablece la antigenicidad del tejido para una amplia diversidad de anticuerpos, el procedimiento tiene desventajas serias cuando se automatiza. El uso de tampones casi en ebullición en un tanque es difícil de incorporar a un instrumento de tinción inmunohistoquímica. El bombeo de tampón dentro y fuera del tanque y el calentamiento de la disolución de tampón consume tiempo, y el consumo de energía asociado a la ebullición del tejido es muy elevado. La evaporación de agua de la disolución tampón es elevada, y se debe añadir tampón adicional durante el tiempo de incubación. Además, el vapor puede provocar quemaduras a los operarios, y se condensará en otras partes del instrumento, donde puede poner en
20 peligro los circuitos electrónicos del instrumento.

En conjunto, estos procesos añaden de manera significativa complejidad a un instrumento de tinción, y tales factores afectan obviamente al coste del instrumento.

25 Ventana Medical Systems tiene en su instrumento Benchmark® un procedimiento de recuperación horizontal de objetivos, en el que el tampón acuoso del portaobjetos de vidrio se cubre mediante un aceite, el denominado Liquid Coverslip™, para reducir la evaporación durante el calentamiento. Además, la humedad dentro del instrumento se mantiene cerca del 100%.

Otro ejemplo de un instrumento que realiza la recuperación de antígenos así como la tinción es el Bond-Max® de Vision Biosystems. Usa un cubreobjetos hueco que se coloca sobre el portaobjetos.

30 Los dos instrumentos mencionados anteriormente tienen el problema de que cualquier líquido se evaporará relativamente rápido a una temperatura cercana a su temperatura de ebullición, y ambos instrumentos requieren el uso de un cubreobjetos sobre la muestra.

35 El documento US 2004/029184 A1 describe un método para recuperar la antigenicidad de una muestra fijada con formaldehído que comprende sumergir una muestra en una composición de líquido de inmersión. La composición de líquido de inmersión comprende un tampón y un compuesto osmóticamente activo tal como glicerol. El documento no describe la recuperación horizontal de objetivos según la presente invención.

El documento WO 2006/007841A describe un método para aumentar la inmunorreactividad de una muestra de tejido o células fijada en un medio de fijación poniendo en contacto la muestra de tejido o células sobre un vehículo con una disolución tamponada de recuperación de objetivos que está en un tanque de inmersión. El documento no describe la recuperación horizontal de objetivos según la presente invención.

40 El documento WO 2006/066039 A describe un método no acuoso de recuperación de objetivos antigénicos en el que no hay evaporación del líquido de recuperación de objetivos cuando se calienta. El líquido de recuperación de objetivos comprende materiales tales como aminoglicol para obtener tal efecto. El documento no describe un método horizontal de recuperación de objetivos mediante el uso de una disolución tamponada de recuperación de objetivos según la presente invención.

45 **Sumario de la invención**

Existen varios problemas intrínsecos en los métodos de recuperación de objetivos descritos anteriormente. La recuperación enzimática de objetivos depende mucho del estado del tejido, la estabilidad de las enzimas y además funciona solamente con algunos anticuerpos. La HIAR tradicional es un procedimiento largo, que consume mucha energía y que es difícil de automatizar debido a la evaporación de la disolución de recuperación de objetivos.

50 Para resolver los problemas intrínsecos del estado de la técnica, se propone un método de recuperación horizontal de objetivos basado principalmente en disolventes orgánicos con puntos de ebullición más elevados que el punto de ebullición del agua. Preferiblemente, dicho método se automatiza. Esto reducirá la cantidad de disolución de recuperación de objetivos usada por muestra, y también la cantidad de energía usada para calentar la muestra con la disolución y el tiempo usado para que la disolución se enfríe. Además, el método de la invención elimina la
55 necesidad de ningún tipo de recubrimiento u otro medio para encerrar la muestra con los reactivos para impedir la

evaporación.

Según una realización, la invención se refiere a un método para incrementar la inmunorreactividad de una muestra de tejido o células fijada en un medio de fijación que comprende:

- 5 - proporcionar un portador en una posición horizontal, y dicho portador tiene sobre él una muestra de tejido o células, y dicha muestra de tejido o células está sobre el portador,
- poner en contacto sustancialmente el lado de la muestra de tejido o células del portador con una disolución tamponada de recuperación de objetivos, que comprende un disolvente con un punto de ebullición mayor que el punto de ebullición del agua, en el que la disolución de recuperación de objetivos permanece por lo demás expuesta al medio
- 10 - calentar la muestra de tejido o células y la disolución de recuperación de objetivos a una temperatura superior a 100 °C.

Según una realización adicional, la presente invención se refiere a un método en el que se coloca más de una muestra de tejido o células sobre el portador.

- 15 Según una realización adicional, la presente invención se refiere a un método que comprende además retirar el medio de incrustación mediante el uso de cualquier disolvente capaz de disminuir el punto de fusión del medio de incrustación y/o disolver dicho medio.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que el vehículo es un portaobjetos de vidrio, portaobjetos fabricado de un material polimérico, o una membrana.

- 20 Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que la disolución tamponada de recuperación de objetivos tiene una evaporación mínima entre 100 °C y 150 °C.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos se calienta entre 100 °C y 200 °C.

Una realización adicional se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos se calienta entre 100-150 °C.

- 25 Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos se calienta entre 105-130 °C.

Una realización adicional se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos se calienta a 120 °C.

- 30 Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende un disolvente que tiene un punto de ebullición significativamente mayor que el punto de ebullición del agua.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende un disolvente que tiene un punto de ebullición mayor que el punto de ebullición del agua e inferior de 199 °C.

- 35 Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que el disolvente se selecciona de un grupo que consiste en alcoholes, glicoles, cetonas, ésteres, amidas y nitrilos o una mezcla de los mismos.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que el disolvente es glicerol.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que el disolvente es propilen glicol o etilen glicol.

- 40 Según una realización, la presente invención se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende además uno o más reactivos capaces de romper los enlaces formados durante la fijación de la muestra biológica.

Otra realización adicional se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende más de un 25% del disolvente.

- 45 Según otra realización, el método de la presente invención se refiere a una disolución de recuperación de objetivos que comprende entre un 40-80% del disolvente.

Según una realización adicional, la invención se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende entre un 45-75% del disolvente.

Según una realización, el método de la invención se refiere a una disolución de recuperación de objetivos que comprende alrededor de un 50% del disolvente.

Según una realización, el método de una realización de la invención se refiere a una disolución de recuperación de objetivos que comprende alrededor de un 80% del disolvente.

- 5 Según una realización, el método de una realización de la invención se refiere a una disolución de recuperación de objetivos que comprende una mezcla de dos disolventes.

Según una realización, el método de una realización de la invención se refiere a una disolución de recuperación de objetivos que comprende una mezcla de propilen glicol y etilen glicol.

- 10 Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que el medio de fijación es formaldehído, disolución de Bouins u otros agentes de entrecruzamiento usados habitualmente.

Según una realización adicional, la presente invención se refiere a un método que comprende además la automatización de una o más de las etapas.

- 15 Según una realización, la presente invención se refiere a un método que comprende además la etapa de enfriar los portaobjetos y la disolución tras la etapa de calentamiento. Según una realización, la etapa de enfriamiento se lleva a cabo enfriando activamente la muestra de tejido o células.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un método que comprende además la etapa de retirar la disolución de recuperación de objetivos de la superficie del portador tras la(s) etapa(s) de calentamiento y/o enfriamiento.

- 20 Una realización adicional de la invención se refiere a un método en el que la disolución de recuperación de objetivos se retira de la superficie del portador con un disolvente adicional capaz de mezclarse con la disolución de recuperación de objetivos.

Según una realización, la presente invención se refiere a un método en el que el disolvente adicional es un tampón de lavado acuoso o etanol.

- 25 Según otra realización, la presente invención se refiere a un método en el que la retirada de la disolución de recuperación de objetivos se lleva a cabo a temperatura ambiente o por encima de la temperatura ambiente.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un método que comprende además renovar o reemplazar la disolución de recuperación de objetivos una o más veces durante el calentamiento.

Según una realización, la presente invención se refiere a un método que comprende además la etapa de teñir la muestra de tejido o células con una sonda.

- 30 Se describe una disolución acuosa de recuperación de objetivos que comprende un 50% de glicerol, un tampón TRIS (p.ej. tampón TRIS entre 0,1 mM y 1 M) que contiene EDTA (p.ej. EDTA entre 0,01 mM y 100 mM).

Además, se describe una disolución de recuperación de objetivos que comprende un 50% de glicerol, 40% de agua y 10% de tampón TRIS que contiene EDTA.

También se describen disoluciones acuosas de recuperación de objetivos:

- 35 que comprenden un 50% de glicerol, un tampón Citrato (p.ej. tampón Citrato entre 0,01 mM y 1 M) que contiene un detergente (p.ej. detergente entre un 0,01% y un 5%).

que comprenden un 50% de glicerol, 40% de agua y 10% de tampón Citrato que contiene un detergente.

que comprenden un 55% de propilen glicol, 25% de etilen glicol, 10% de agua y 10% de tampón TRIS que contiene EDTA.

- 40 que comprenden un 55% de propilen glicol, 25% de etilen glicol, 10% de agua y 10% de tampón Citrato que contiene un detergente.

La disolución de recuperación de objetivos puede tener una tensión superficial y viscosidad que es lo suficientemente elevada para que la disolución no escape de la superficie del portaobjetos durante el calentamiento.

- 45 La disolución de recuperación de objetivos puede tener una viscosidad entre 4 y 7 cP a una temperatura entre 20 y 25 °C.

Además, se describe una disolución de recuperación de objetivos en la que el contenido de agua está entre un 1% y un 75% (v/v) de la disolución de recuperación de objetivos.

También se describe una disolución de recuperación de objetivos en la que el TRIS tiene una concentración entre 0,1 mM y 1 M, preferiblemente entre 1 mM y 100 mM, más preferiblemente 10 mM.

También se describe una disolución de recuperación de objetivos en la que el EDTA puede tener una concentración entre 0,01 mM y 100 mM, preferiblemente entre 0,1 mM y 10 mM, más preferiblemente 1 mM.

- 5 Las descripciones adicionales se refieren a una disolución de recuperación de antígenos, en la que el pH de la disolución de recuperación de objetivos puede estar entre 2 y 10, preferiblemente entre 6 y 10, más preferiblemente entre 8 y 9.

También se describe una disolución de recuperación de objetivos en la que el Citrato tiene una concentración entre 0,1 mM y 1 M, preferiblemente entre 1 mM y 100 mM, más preferiblemente 2,5 mM.

- 10 También se describe una disolución de recuperación de objetivos en la que el detergente puede tener una concentración entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 1%, más preferiblemente un 0,1%.

Las descripciones adicionales se refieren a una disolución de recuperación de objetivos en la que el pH de la disolución de recuperación de objetivos puede estar entre 2 y 10, preferiblemente entre 4 y 8, más preferiblemente entre 6 y 7.

- 15 Según una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de una disolución de recuperación de objetivos que comprende glicerol, agua, y uno o más de lo siguiente; un nucleófilo, un tampón, un agente quelante o un detergente para la recuperación horizontal de objetivos antigénicos.

Descripción detallada

- 20 Un portador en el contexto de la presente invención puede ser cualquier plataforma que puede actuar como portador para la muestra biológica, p.ej. un portaobjetos. Preferiblemente debería ser mayor que la muestra propiamente dicha, es decir, sostener la muestra completa. Tales plataformas adecuadas incluyen, pero sin limitación, diversos tipos de soportes conocidos para una persona experta en la técnica, p.ej., portaobjetos de vidrio o polímeros. Las membranas, películas y geles también pueden ser portadores adecuados.

- 25 En el contexto de la presente invención, el término "sobre" el portador se debe entender que hace referencia a una superficie sustancialmente plana del portador orientada hacia arriba cuando el portador se coloca en posición horizontal. Se puede colocar un volumen pequeño de una disolución sobre el portador sin que escape por los bordes del portador. La superficie superior puede ser, por ejemplo, una de las superficies principales de una muestra de un portaobjetos.

- 30 Una muestra biológica en el contexto de la presente invención es una muestra de células, preferiblemente una muestra de tejido o una muestra citológica. Se puede usar en un método de la invención una muestra que se fija mediante agentes de entrecruzamiento antes del examen inmunopatológico, inmunohistoquímico, inmunofluorescente o por hibridación in situ. Tales muestras pueden ser muestras de tejido, muestras líquidas o incluso muestras ambientales, tales como muestras de agua. Las muestras de tejido se fijan normalmente mediante agentes de entrecruzamiento o son, p.ej., extensiones mucosas. Las muestras de tejido son preferiblemente
35 muestras fijadas con formaldehído, pero también muestras fijadas con PLP (Peryodato/Lisina/Paraformaldehído), paraformaldehído, Boonfix I, Boonfix II, fijador de Myrsky, disolución de Bouin, glutaraldehído, formalinas de zinc u otros aldehídos, o se pueden someter de manera adecuada otros agentes entrecruzadores bifuncionales a un método de la invención.

- 40 La inmunorreactividad de una muestra biológica depende de la capacidad de un anticuerpo, generado hacia un epítipo específico presente en la muestra biológica, de reconocer dicho epítipo en el contexto de la muestra. El epítipo se puede indicar también como el objetivo o el antígeno, y estos términos se usan de manera intercambiable a lo largo de este texto. El término objetivo puede describir también una parte del tejido que es reconocida por algo distinto de un anticuerpo, p.ej. ADN o análogos de ADN tales como APN o ALN o una cadena que se une a compartimentos específicos del tejido/célula.

- 45 Tal como se usa en la presente memoria, el término "sonda" se debe entender que hace referencia a cualquier molécula que es capaz de reconocer un objetivo específico en la muestra de tejido o células. Esto incluye, pero sin limitación, anticuerpos, marcados para la visualización directa o sin marcar mediante el uso de un anticuerpo secundario para la visualización, una molécula de unión de ADN tal como ADN, APN, ALN o moléculas capaces de intercalarse entre las nucleobases del ADN. Estas sondas se pueden visualizar mediante tintes fluorescentes o
50 cromógenos visibles en microscopía de campo claro. El término "sonda" puede incluir también tinciones que se unen a áreas específicas del tejido o de los compartimentos de las células.

- Tal como se usa en la presente memoria, se debe entender que la expresión "disolvente principal" hace referencia a un disolvente que forma por sí solo la mayor parte de una mezcla, y por lo tanto es el factor más influyente para elevar el punto de ebullición de la mezcla. Dependiendo del disolvente, la mayor parte puede ser, por ejemplo, al
55 menos un 30%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90%.

En el contexto de la presente invención, se debe entender que la expresión "temperatura ambiente" hace referencia a la misma temperatura que la del medio circundante.

5 Tal como se usa en la presente memoria, se debe entender que el término "expuesto al medio" hace referencia a que está expuesto a la temperatura y al aire circundante del medio cercano a la muestra, en contraste con poner en contacto la interfase de la disolución de recuperación de objetivos con una interfase adicional que no es un gas. Tal medio cerrado podría ser, por ejemplo, un cubreobjetos, un cubreobjetos líquido, un cubreobjetos hueco u otros medios para encerrar la disolución de recuperación de objetivos tanto como sea posible.

10 También se puede decir que el método de la presente invención comprende un portador sin cubierta y sin cerrar. Se debe entender que la expresión "portador sin cubierta y sin cerrar" hace referencia a un portador en el que la disolución de recuperación de objetivos se expone a la temperatura ambiente y al aire, en contraste con un portador cubierto o un portador cerrado. Un ejemplo de un portador sin cubierta y sin cerrar es un portador tal como un portaobjetos de microscopio, que durante la recuperación de objetivos:

- no se encierra o se sumerge sustancialmente en un tanque de inmersión, pocillo, bolsa, cubeta, cámara, o cualquier tipo de recipiente de líquidos; y
- 15 - no tiene ningún tipo de cubreobjetos sólido o líquido que cubra la disolución de recuperación de objetivos.

Por lo tanto, el método de la invención sería un método para aumentar la inmunorreactividad de una muestra de tejido o células fijada en un medio de fijación que comprende:

- proporcionar un portador sin cubierta y sin cerrar en una posición horizontal, y dicho portador tiene sobre él una muestra de tejido o células, y dicha muestra de tejido o células está sobre el portador,
- 20 - poner en contacto sustancialmente el lado de la muestra de tejido o células de dicho portador con una disolución tamponada de recuperación de objetivos, en el que el portador en contacto con la disolución tamponada de recuperación de objetivos permanece sin cerrar y sin cubierta durante la recuperación de objetivos,
- 25 - calentar la muestra de tejido o células y la disolución de recuperación de objetivos a una temperatura superior a 100 °C.

30 La recuperación de antígenos inducida térmicamente (HIAR) es una hidrólisis de las modificaciones inducidas por la fijación con formaldehído. Esto significa de manera convencional sumergir el portaobjetos con la muestra biológica en un recipiente que contiene un tampón acuoso y hervir dicho tampón durante 20-40 minutos. Tal procedimiento requiere entre otras cosas una gran cantidad de disolución de recuperación de objetivos y, por lo tanto, un consumo elevado de energía para calentar la disolución.

35 La presente invención proporciona un método fiable, más económico y más rápido para la recuperación de objetivos. Llevando a cabo las reacciones horizontalmente, el consumo de volumen se reduce considerablemente, y, debido a que el tiempo de proceso se reduce de forma similar, también se reducen de manera considerable el consumo de energía y las horas-hombre. Además, la aproximación horizontal simplifica el aparato necesario para realizar el proceso, y minimiza el uso de tanques de reacción y evita la implementación de un dispositivo a presión o un dispositivo de microondas en el aparato, lo que añadiría un nivel elevado indeseado de complejidad al instrumento. También se elimina la necesidad de un cubreobjetos de cualquier tipo o un cubreobjetos hueco durante la recuperación del antígeno.

40 El método de la presente invención se puede combinar con un procedimiento horizontal automatizado para la retirada del medio de incrustación. Esto se lleva a cabo tradicionalmente sumergiendo el portaobjetos en una serie de disolventes capaces de disolver el medio de incrustación y rehidratar la muestra de tejido o células. El procedimiento automatizado puede consistir en colocar el portador que contiene la muestra de tejido o células horizontalmente y ponerla en contacto con un disolvente capaz de disolver el medio de incrustación, seguido de una etapa de lavado que retira tanto el disolvente como el medio de incrustación disuelto como se describió en la solicitud de patente PCT/DK2006/000660. Tal procedimiento horizontal para la retirada del medio de incrustación en combinación con un procedimiento de recuperación horizontal de objetivos eliminará completamente la necesidad de cubetas llenas de reactivo durante el pretratamiento de la muestra de tejido o células. Esto reducirá la cantidad de reactivo usado, y así la cantidad de residuos creados durante el pretratamiento, y proporcionará un procedimiento más corto y menos laborioso.

50 Otra ventaja de la invención es que el método no requiere el uso de ninguna cubierta para la muestra y la disolución de recuperación de objetivos, p.ej. para impedir la evaporación. El método de la presente invención es en un medio abierto, es decir, sin cubrir, expuesto al aire. No requiere un cubreobjetos, una cámara o medios de sujeción que están diseñados para conseguir una evaporación mínima. El control de la evaporación de la presente invención está incluido en la propia disolución, es decir, la inclusión de un disolvente que tiene un punto de ebullición elevado.

55 Para ilustrar la cantidad de trabajo manual implicado en un pretratamiento tradicional, el siguiente ejemplo es de un

procedimiento de pretratamiento manual con retirada convencional del medio de incrustación en cubetas y HIAR mediante el uso de tanques de inmersión:

- a) Se coloca una muestra biológica incrustada en un portaobjetos.
- 5 b) Los medios de incrustación se retiran sumergiendo el portaobjetos y la muestra en una serie de disolventes capaces de disolver los medios de incrustación y rehidratar la muestra como conocen los expertos en la técnica. Este procedimiento requiere aproximadamente 25 minutos.
- c) Mientras tanto, se coloca una cubeta que contiene la disolución acuosa de recuperación de objetivos en un baño de agua y se calienta a 95-99 °C. El calentamiento requiere en general alrededor de 20-30 minutos, para calentar 400 mL de disolución de recuperación de objetivos.
- 10 d) El portaobjetos con la muestra se coloca en la disolución caliente de recuperación de objetivos durante 20 minutos.
- e) La cubeta que contiene la disolución de recuperación de objetivos y el portaobjetos con la muestra se retiran del baño de agua y se dejan enfriar durante aproximadamente 20 minutos.
- f) Tras un lavado breve en tampón acuoso, la muestra está preparada para la tinción inmunohistoquímica.
- 15 Esto se puede resumir en más de 1 hora de trabajo, con dos interrupciones de 20 minutos.

En contraste, lo siguiente es un ejemplo de pretratamiento horizontal, que incluye la retirada del medio de incrustación y la recuperación de objetivos. Las etapas b)-e) se pueden automatizar completamente:

- a) Se coloca una muestra biológica incrustada en un portaobjetos.
- 20 b) El medio de incrustación se retira poniendo en contacto el portaobjetos y la muestra con disolventes capaces de disolver el medio de incrustación y rehidratar la muestra tal como se describió anteriormente. Los disolventes se aplican al portaobjetos mientras está colocado en posición horizontal. Esta etapa requiere alrededor de 8 minutos.
- c) Los portaobjetos se colocan en posición horizontal y se aplica una disolución de recuperación de objetivos a la muestra adecuada para la recuperación horizontal de objetivos. Tal disolución contiene preferiblemente uno o más disolventes orgánicos.
- 25 d) La muestra y la disolución de recuperación de objetivos se calientan a una temperatura suficiente para romper los enlaces formados durante la fijación, durante 5-20 minutos. Durante este tiempo, el reactivo se puede cambiar una o más veces si es necesario.
- e) La muestra y la disolución de recuperación de objetivos se dejan enfriar durante alrededor de 1 minuto, y la disolución de recuperación de objetivos se elimina mediante lavado.
- 30 f) Tras un lavado breve en tampón acuoso, la muestra está preparada para la tinción inmunohistoquímica.

Esto se puede resumir en aproximadamente un tiempo de espera de 30 minutos. Un proceso completamente automatizado incluye como máximo 10 minutos de trabajo manual para cargar los portaobjetos con la muestra de tejido o células en el instrumento y programar el funcionamiento.

- 35 Estos ejemplos demuestran las ventajas de un proceso horizontal, en especial cuando está automatizado. Con la retirada de los medios de incrustación y la recuperación de objetivos llevada a cabo horizontalmente, el tiempo de espera se reduce a aproximadamente la mitad del tiempo usado para los procedimientos manuales correspondientes. Además, el procedimiento automatizado requiere solamente 5-10 minutos de trabajo manual para cargar los portadores que contienen la muestra de tejido o células en un instrumento y programar el funcionamiento.
- 40 La reducción del contacto humano reduce el riesgo de error humano. Si se produce un error, p.ej. durante la programación del instrumento, se puede localizar fácilmente en el registro de funcionamiento del instrumento.

Para llevar a cabo la recuperación de objetivos automáticamente, una aproximación horizontal en la que se cubre solamente la muestra biológica mediante el reactivo es ventajosa con respecto al consumo de reactivo, consumo de energía y tiempo. El portador está en una posición sustancialmente horizontal, al menos de tal manera que la muestra se cubre con una cantidad suficiente de disolución durante el proceso. Horizontal se debe entender como paralelo a, en el plano de, u operando en un plano esencialmente paralelo al horizonte o a una línea base.

La presente invención resuelve el problema de la evaporación de la disolución de recuperación de objetivos durante el proceso. El problema se resuelve con el uso de una disolución de recuperación de objetivos que comprende un disolvente de punto de ebullición elevado que tiene un punto de ebullición significativamente mayor que la temperatura necesaria para romper un enlace entre la muestra de tejido o células y el medio de fijación, y después calentando la muestra de tejido o células en el método de la presente invención y la disolución de recuperación de

objetivos a una temperatura por debajo del punto de ebullición del disolvente y por encima de la temperatura necesaria para romper el enlace entre la muestra de tejido o células y el medio de fijación.

Este método es especialmente útil en los procedimientos automatizados llevados a cabo en un aparato.

5 La adición de otros disolventes a la disolución de recuperación de objetivos puede impedir que el reactivo se evapore totalmente, pero también reduce la actividad del agua y, así, la velocidad de la hidrólisis. El incremento del tiempo de reacción o de la temperatura puede compensar la reducción de la velocidad de la reacción. Sin embargo, debido a que el incremento del tiempo de reacción va contra el deseo de un tiempo de espera reducido, el incremento de la temperatura es el método preferido para compensar la velocidad reducida de la hidrólisis. El incremento de la temperatura por encima de 100 °C acelerará la evaporación del agua y otros disolventes con puntos de ebullición en ese intervalo de temperaturas.

15 En el contexto de la presente invención, el disolvente de la disolución de recuperación de objetivos tiene preferiblemente un punto de ebullición que es "significativamente mayor" que la temperatura a la que se calienta la muestra de tejido o células y la disolución de recuperación de objetivos. Se debe entender que esta expresión hace referencia a un punto de ebullición que es tan elevado que el disolvente tiene una presión de vapor muy baja a la temperatura a la que se calienta la disolución de recuperación de objetivos, y así no se evapora en ningún grado medible durante 5, 10 ó 15 minutos a esta temperatura, es decir, preferiblemente no más del 30% de la disolución de recuperación de objetivos se evaporará, más preferiblemente no más del 20%, más preferiblemente no más del 15%, más preferiblemente no más del 10%, más preferiblemente no más del 5%. El punto de ebullición del disolvente debería ser, por ejemplo, al menos 150 °C, al menos 200 °C, al menos 220 °C o al menos 250 °C. Sin embargo, el punto de ebullición del disolvente puede ser también significativamente mayor.

20 El disolvente para la disolución de recuperación horizontal de objetivos debería cumplir preferiblemente uno o más de los criterios siguientes:

- ser miscible con el agua, ya que el agua es una parte esencial del reactivo
- no afectar a la reacción de hidrólisis
- 25 - tener un punto de ebullición que es significativamente mayor que el punto de ebullición del agua.
- no evaporarse significativamente en 10 minutos a temperaturas entre 100 y 150 °C.
- preferiblemente, no provocar daños a la muestra biológica a temperaturas entre 100 y 150 °C, incluso una concentración esencialmente del 100%. La morfología del tejido biológico o de las células debería permanecer preferiblemente intacta.
- 30 - tener una tensión superficial que es lo suficientemente elevada para que forme una "gota" sobre el portaobjetos.
- ser retirado de manera relativamente fácil de la muestra biológica tras la recuperación de objetivos. Preferiblemente, se puede eliminar mediante lavado con agua destilada o tampones acuosos.
- no ser peligroso.

35 Además, es ventajoso si el disolvente es higroscópico, lo que significa que retiene el agua. Esto frenará la evaporación de agua, aún a temperaturas superiores a 100 °C.

El disolvente principal se selecciona preferiblemente de la lista que consiste en alcoholes, glicoles, cetonas, ésteres, amidas o nitrilos. Un tipo de disolvente principal que funciona bien es un glicol. El disolvente principal puede ser también una mezcla de uno o más de los anteriores.

40 Debido a la polaridad elevada del agua, se prefieren los disolventes polares. Los ejemplos de disolventes polares incluyen alcoholes, tales como metanol, etanol, propanol, butanol, isopropanol, terc-butanol y glicoles tales como etilen glicol, glicerol y propilen glicol. Otros disolventes polares incluyen acetona, metilacetona, acetato de etilo, acetonitrilo, formamida, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido y N-metilpirrolidona. Muchos de estos disolventes tienen la ventaja de ser completamente miscibles con el agua, lo que hace posible lavar el disolvente restante con tampones acuosos. Los disolventes preferidos son glicoles tales como etilen glicol, glicerol y propilen glicol o formamida, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido y N-metilpirrolidona.

45 La disolución de recuperación de objetivos comprende preferiblemente más del 25% de disolvente, más preferiblemente más del 35% de la disolución de recuperación de objetivos. Una disolución de recuperación de objetivos especialmente útil contiene entre un 40 y un 60% de disolvente, por ejemplo un 50% de disolvente. Estas concentraciones aseguran que la muestra biológica todavía está completamente cubierta incluso en caso de que se evapore una gran cantidad de agua. Si la disolución no cubre toda la muestra, se secará, y esto tiene un efecto perjudicial sobre la tinción inmunohistoquímica siguiente. Además de contribuir a la tolerancia a la temperatura incrementada de la disolución de recuperación de objetivos, el disolvente tiene el efecto añadido de mantener la

concentración del tampón, agente quelante, nucleófilo y/o detergente lo suficientemente baja si se ha evaporado esencialmente todo el agua. Esto impide el daño al tejido provocado por la concentración incrementada de estos componentes. De manera alternativa, la presión osmótica incrementada puede provocar que las células se colapsen o que de otra manera cambien de forma, lo que reducirá el valor diagnóstico de la muestra biológica.

- 5 El punto de ebullición del disolvente principal es mayor que el punto de ebullición del agua, ya que de otra manera se evaporaría durante el calentamiento. Según otra realización, el punto de ebullición del disolvente principal es mayor que el punto de ebullición del agua y menor de 199 °C.

Al tener un punto de ebullición de 290 °C, y ser higroscópico, el glicerol es un disolvente principal especialmente eficaz. La disolución de recuperación de objetivos puede comprender uno o una mezcla de dos o más disolventes.

- 10 Los disolventes se pueden elegir, pero sin limitación, de los ejemplos presentados anteriormente.

La disolución de recuperación de objetivos se puede calentar preferiblemente a una temperatura entre 100 y 200 °C, más preferiblemente entre 100 y 150 °C, aún más preferiblemente entre 105 y 130 °C sin secar la muestra. A esta temperatura, la disolución de recuperación de objetivos debería tener una tensión superficial que sea lo suficientemente elevada para impedir que escapen del portaobjetos/portador de la muestra. Además, la disolución de recuperación de objetivos no debería tener un efecto dañino sobre la muestra biológica, aún después de la evaporación completa del contenido de agua.

- 15

La recuperación óptima de objetivos que permite una buena tinción de la muestra de tejido o células puede no obtenerse, sin embargo, mediante el uso solamente de disolventes. Se prefiere la inclusión de un agente de hidrólisis, tal como agua, en la disolución de recuperación de objetivos, ya que la reacción deseada es una hidrólisis, en la que el agente de hidrólisis provoca una inversión parcial de las modificaciones inducidas por el fijador, y así restablece los epítomos hasta un estado que permite el reconocimiento por los anticuerpos. Además, también se prefiere una disolución tamponada de recuperación de objetivos para estabilizar el pH de la disolución. Algunos epítomos se pueden desenmascarar de manera eficaz a pH bajo y elevado, pero no a pH neutro. Otros tienen un valor óptimo para el desenmascaramiento solamente a pH elevado, y otros tienen sus valores óptimos en el intervalo de pH bajo a neutro. Por lo tanto, se prefiere controlar el pH de la disolución y optimizarlo para los objetivos que se van a desenmascarar.

- 20
- 25

Antes de la recuperación de objetivos, la muestra de tejido o células se fija en un medio de fijación. La selección de los disolventes adecuados para la disolución de recuperación de objetivos depende del medio de fijación para proporcionar el efecto óptimo, y es muy conocido para una persona experta en la técnica. El medio de fijación es preferiblemente el formaldehído usado tradicionalmente.

- 30

La disolución de recuperación de objetivos comprende uno o más reactivos capaces de romper los enlaces formados durante la fijación de la muestra biológica, ayudar en tal reacción, proteger las proteínas del tejido de reacciones indeseadas y/o retirar el fijador libre.

El método de la presente invención es especialmente adecuado para la automatización de la recuperación de objetivos. Hay varias ventajas para un procedimiento horizontal:

- 35

- consumo de reactivo reducido, ya que el reactivo se añade a la superficie del portaobjetos, directamente sobre la muestra biológica.
- el calentamiento de cantidades más pequeñas de reactivo conduce a un consumo reducido de energía.
- reducción del tiempo de espera durante el calentamiento de los reactivos.
- reducción del tiempo de espera durante el enfriamiento de los reactivos.

- 40

La evaporación del reactivo acuoso y el secado posterior de la muestra biológica durante un procedimiento horizontal automatizado, se pueden evitar mediante el método de la presente invención, es decir, añadiendo un disolvente de punto de ebullición elevado que protege la muestra, tal como glicerol.

Un procedimiento completamente automatizado para la recuperación de objetivos se describe como sigue:

- 45
1. El portaobjetos con la muestra biológica se coloca horizontalmente en el instrumento, con la muestra biológica sobre el portaobjetos. Preferiblemente, el portaobjetos no se calienta antes de añadir la disolución de recuperación de objetivos, ya que esto secaría rápidamente el tejido.
 2. La disolución de recuperación de objetivos se añade al portaobjetos, la disolución debería cubrir toda la muestra biológica. El portaobjetos debería estar esencialmente nivelado, ya que de otra forma el reactivo puede escapar o dar como resultado una cobertura irregular de la muestra.
 3. El portaobjetos que contiene la muestra biológica y el reactivo se calienta a la temperatura necesaria, mediante el calentamiento de la plataforma sobre la que está colocado el portaobjetos, o bajándolo a una placa precalentada.
- 50

4. El portaobjetos con la muestra biológica y el reactivo se mantiene a la temperatura necesaria durante un tiempo predeterminado. El tiempo se basa en cuándo la temperatura de la disolución sobre el portaobjetos alcanza una meseta, es decir, se estabiliza durante una cantidad predeterminada de tiempo. Esto depende de la cantidad de reactivo, de la evaporación del agua del reactivo, así como de la temperatura ambiente, y normalmente es de alrededor de 5 minutos.
5. El portaobjetos con la muestra biológica y la disolución se pueden enfriar activamente antes de retirar la disolución. Esto se puede llevar a cabo alejando el portaobjetos de la plataforma de calentamiento o enfriando activamente la plataforma.
6. a) Si en este punto la recuperación de objetivos es completa, el portaobjetos se enfría a una temperatura cercana a la temperatura ambiente y se lava con agua o un tampón acuoso para retirar cualquier residuo de la disolución de recuperación de objetivos. La temperatura es preferiblemente lo suficientemente baja para evitar secar la muestra cuando se retira el disolvente protector de la disolución de recuperación de objetivos.
- b) Si en este punto la recuperación de objetivos no es completa, se retira la mayoría del reactivo utilizado y se añade disolución nueva. Este intercambio de reactivos no tiene que tener lugar necesariamente a temperatura ambiente, ya que el resto del reactivo utilizado protegerá a la muestra de secarse hasta que se añada el reactivo nuevo. El procedimiento continúa a partir de la etapa 2.

La adición del reactivo nuevo se repite hasta que la recuperación de objetivos es satisfactoria para el objetivo específico. Esto se determina por separado para cada objetivo en cuestión. Tras el lavado, el portaobjetos con la muestra biológica está preparado para la tinción inmunohistoquímica.

También se pueden llevar a cabo manualmente etapas seleccionadas, e incluso todas las etapas descritas en el proceso automatizado anterior.

En ciertas realizaciones, la plataforma de calentamiento puede incluir dispositivos termoeléctricos Peltier (TEDs), dispositivos de calentamiento resistivos, y diversas combinaciones de los mismos. También se pueden apilar dos o más TEDs Peltier o combinarlos de otra manera para proporcionar un calentamiento rápido en un área pequeña, tal como el área de un portaobjetos de microscopio. Los dispositivos termoeléctricos Peltier (TEDs) se pueden hacer funcionar también mediante el uso de la modulación de la anchura de impulsos (PWM) o técnicas de energía modulada similares para optimizar los requisitos de la fuente de alimentación para alimentar los TEDs mientras al mismo tiempo se cumple el perfil de tiempos de calentamiento deseado. En otras realizaciones, los dispositivos termoeléctricos Peltier (TEDs) se pueden combinar con otros dispositivos de calentamiento tales como dispositivos de calentamiento resistivos. En ciertas realizaciones, la polaridad de la corriente eléctrica aplicada a los dispositivos termoeléctricos Peltier se puede invertir para enfriar activamente la plataforma de calentamiento y optimizar el perfil de calentamiento y de enfriamiento a lo largo del tiempo.

En ciertas realizaciones, antes de la recuperación de antígenos inducida térmicamente, se puede calentar la muestra en el portaobjetos para favorecer la adhesión del tejido al portaobjetos. El calentamiento puede ser durante cualquier tiempo deseado, por ejemplo 60 °C durante 60 minutos o puede variar dependiendo del tipo de tejido y el contenido de humedad y el protocolo deseado de recuperación de antígenos. Se pueden usar las plataformas de calentamiento horizontales usadas en ciertas realizaciones de la invención para llevar a cabo tanto las funciones de calentamiento como las de HIAR. Por ejemplo, se pueden usar los dispositivos termoeléctricos Peltier (TEDs) o plataformas de calentamiento similares para calentar los portaobjetos a una temperatura baja y después se pueden usar los mismos TEDs para calentar los portaobjetos a más de 100 °C para la recuperación de antígenos.

Aunque ciertas realizaciones pueden incluir TEDs, la plataforma de calentamiento puede ser cualquier dispositivo de calentamiento horizontal capaz de controlar la temperatura en un intervalo de +/-2 °C hasta 150 °C. Si el reactivo se añade y se retira del portaobjetos mientras está colocado sobre la plataforma de calentamiento, debería ser capaz de resistir un calentamiento y enfriamiento forzados. La plataforma de calentamiento debería ser capaz de incrementar la temperatura de la superficie desde la temperatura ambiente hasta 150 °C en 10 minutos y enfriarla a la temperatura ambiente de nuevo en 10 minutos. Preferiblemente, la plataforma puede forzar la temperatura de la superficie desde la temperatura ambiente hasta 130 °C en 5 minutos o menos, y de 130 °C a la temperatura ambiente en 5 minutos o menos. Si es necesario un intercambio de reactivos mientras el portaobjetos permanece en contacto con la plataforma de calentamiento, la temperatura se debería reducir hasta una temperatura entre 50 y 100 °C, preferiblemente entre 60 y 80 °C. La plataforma de calentamiento debería ser capaz de forzar la temperatura de la superficie de 150 °C a 50 °C en 8 minutos, preferiblemente de 130 °C a 70 °C en 3 minutos o menos. Después de haber sustituido el reactivo antiguo por un reactivo nuevo, la plataforma de calentamiento debería ser capaz de llevar la temperatura de la superficie de 50 °C a 150 °C en 8 minutos, preferiblemente de 70 °C a 130 °C en 3 minutos o menos.

El medio de calentamiento incluye calor radiante, bobinas eléctricas calefactoras, líquido o aire caliente circulante, microondas u otros elementos de radiación electromagnética o elementos Peltier.

La disolución se puede intercambiar en una de varias maneras. Los portaobjetos se pueden girar hasta una posición

vertical para permitir simplemente que la fuerza de la gravedad empuje el reactivo. De manera alternativa, el reactivo se puede soplar mediante el uso de aire comprimido. Esto se puede llevar a cabo mientras el portaobjetos está en una posición horizontal o vertical. No es necesario ningún lavado durante el intercambio de la disolución de recuperación de objetivos.

- 5 En una realización, la disolución de recuperación de objetivos se sustituye una o más veces durante el calentamiento. La sustitución de la disolución de recuperación de objetivos se puede llevar a cabo, p.ej., entre 0 y 10 veces durante el procedimiento.

Una propiedad importante de este procedimiento es que durante el intercambio de reactivos, cuando la temperatura se ha reducido como se describió anteriormente, pero antes de retirar el reactivo viejo, el portaobjetos puede entrar en una fase de espera. La fase de espera puede ser cualquiera entre 1 minuto y 10 minutos o incluso más larga. Esto introduce una gran flexibilidad en un procedimiento automatizado, con respecto a otros procedimientos que pueden estar desarrollándose en el instrumento al mismo tiempo que el procedimiento de recuperación de objetivos. Sin embargo, una vez que se ha retirado el reactivo, el reactivo nuevo se debería añadir rápidamente, es decir, en 30 segundos, preferiblemente en 15 segundos o más preferiblemente 5 segundos.

15 En una realización de la invención, la temperatura se alcanza calentando el portaobjetos por debajo, y así la disolución de recuperación de objetivos no está en contacto directo con el elemento de calentamiento. La temperatura más alta se alcanza sobre la superficie del portaobjetos, en la que se halla la muestra de tejido/células. Preferiblemente, la recuperación de objetivos se aplica a temperatura ambiente, para evitar secar el tejido, y la temperatura se eleva a 100-150 °C en aproximadamente 10 minutos, preferiblemente en aproximadamente 5 minutos, más preferiblemente en aproximadamente 3 minutos.

El enfriamiento se lleva a cabo con uno de tres métodos: enfriamiento pasivo sobre el elemento de calentamiento, enfriamiento activo sobre el elemento de calentamiento o enfriamiento pasivo sin contacto con el elemento de calentamiento. En todos los casos, los portaobjetos se deberían enfriar por debajo de 100 °C, preferiblemente por debajo de 60 °C mientras están cubiertos con la disolución de recuperación de objetivos. Preferiblemente, el enfriamiento es un proceso activo, en el que la temperatura se reduce a una temperatura entre la temperatura ambiente y 90 °C en aproximadamente 10 minutos, más preferiblemente a una temperatura entre la temperatura ambiente y 70 °C en aproximadamente 5 minutos o aún más preferiblemente en aproximadamente 3 minutos.

Después de enfriar, el portaobjetos se lava con agua, un tampón de lavado acuoso, etanol o cualquier otro disolvente adecuado capaz de mezclarse con la disolución de recuperación de objetivos. Esta etapa de lavado se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o por encima de la temperatura ambiente.

Se debería aplicar suficiente disolución de recuperación de objetivos para cubrir el tejido, preferiblemente entre 1 y 2 ml dependiendo del tamaño de la muestra, por ejemplo 1,2 ml, 1,3 ml o 1,5 ml para cada aplicación.

El calentamiento total puede variar con el objetivo que se va a teñir, sin embargo se prefieren los tiempos de calentamiento entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 minutos.

35 Tal como se describió anteriormente, existe una demanda creciente de automatización de los procedimientos inmunohistoquímicos para reducir la cantidad de trabajo manual implicado. Esto se ve impulsado por el deseo de reducir los errores humanos, así como por la carencia de personal de laboratorio cualificado. Con un incremento de la cantidad de portaobjetos de IHC que se tiñen cada año de aproximadamente un 20%, y como máximo un número constante de personas cualificadas para llevar a cabo la tinción, la necesidad de automatización para los procesos continúa.

Aunque se puede llevar a cabo la HIAR convencional en agua pura, la adición de reactivos adicionales a la disolución de recuperación de objetivos acelera la reacción de hidrólisis. Este también es el caso en la presente invención.

Los reactivos adicionales se pueden dividir en 4 categorías:

- 45
- **Agentes de ruptura de enlaces** que degradan los enlaces formados por el formaldehído. Estos podrían ser nucleófilos, ácidos de Lewis o enzimas.
 - **Grupos protectores** que reaccionan de manera reversible con los grupos amino que se liberan durante la recuperación de objetivos y que impiden que reaccionen de nuevo con el fijador.
 - **Agentes eliminadores** que reaccionan de manera irreversible con el fijador.
- 50
- **Agentes quelantes** para retirar los cationes divalentes que estabilizan los polímeros de poli-oxi-metileno.

Estos reactivos se pueden usar solos o en combinación tomando en consideración cualquier reacción posible entre reactivos.

Los nucleófilos pueden atacar los enlaces formados por el formaldehído, y por lo tanto incrementan la velocidad de

degradación. Los ejemplos de tales nucleófilos comprenden amoniaco, aminas primarias, es decir, aminas con una cadena alquilo lineal, ramificada o cíclica que contiene 0, 1 o múltiples enlaces dobles o triples y 0, 1 o múltiples heteroátomos, tales como oxígeno, azufre, nitrógeno u otros, o alquilaminas secundarias, es decir, aminas con dos cadenas alquilo lineales, ramificadas o cíclicas de longitud diferente o igual, y cada una contiene 0, 1 o múltiples enlaces dobles o triples y 0, 1 o múltiples heteroátomos, tales como oxígeno, azufre, nitrógeno u otros, o aminas terciarias, es decir, aminas con tres cadenas alquilo lineales, ramificadas o cíclicas de longitudes diferentes o iguales, y cada una contiene 0, 1 o múltiples enlaces dobles o triples y 0, 1 o múltiples heteroátomos, tales como oxígeno, azufre, nitrógeno u otros. Otros ejemplos de nucleófilos comprenden hidrazinas, halogenuros o agua. Los ejemplos de reactivos específicos que se incluyen en la descripción anterior son tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), etanolamina, hidrazina, etilendiamina, diaminociclohexano, hidrazina, etanol, piperidina, morfolina, fluoruro de tetrabutilamonio u otros.

Otra clase de reactivos son los ácidos de Lewis que debido a su deficiencia de electrones reaccionan con átomos ricos en electrones y por lo tanto debilitan los enlaces a otros átomos. Los ejemplos de ácidos de Lewis comprenden los iones metálicos tales como cloruro de hierro(III), cloruro de aluminio, cloruro de magnesio u otros compuestos deficientes de electrones tales como ácido toluenosulfónico, ácido bórico, trifluoruro de boro, ácido tartárico u otros.

Los reactivos que reaccionan con el fijador liberado impedirán que reaccione de nuevo. Los ejemplos de esto comprenden Purpald o Dimedona, que se usan para determinar las concentraciones de formaldehído, debido a que forman productos muy estables que se pueden medir.

De manera alternativa, para la recuperación de objetivos se puede usar un reactivo que reacciona de una manera reversible con los grupos amino libres de las proteínas, por lo que las protege de la reacción con el formaldehído disponible. El anhídrido citracónico (CCA) reacciona de esta manera.

Además, existen indicios de que los cationes divalentes forman complejos con los polímeros de poli-oxi-metileno, y los tampones de recuperación de objetivos convencionales contienen a menudo agentes quelantes tales como EDTA para retirarlos. Los ejemplos de agentes quelantes comprenden EDTA, EGTA, EGTA/AM, BAPTA, BAPTA/AM, MAPTAM, TPEN, citrato o ionóforos tales como ionomicina o calcimicina.

EDTA y citrato son buenos para el uso en la disolución de recuperación de objetivos, ya que forman complejos de manera eficaz con Ca^{2+} , que es un catión divalente que está presente en abundancia en las muestras de tejido biológico o células.

Además de los reactivos descritos anteriormente, se incluye a menudo un reactivo para controlar el pH de la disolución en la disolución de HIAR. El pH puede tener una influencia profunda sobre la eficacia de la recuperación de objetivos. Los reactivos para controlar el pH de la disolución se pueden elegir de una amplia diversidad de tampones tales como los tampones TRIS, citrato, fosfato, glicina o Good, tales como BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES o TRICINE.

Los reactivos se pueden elegir, pero sin limitación, de los ejemplos presentados anteriormente.

TRIS y citrato son buenos tampones para el uso en la disolución de recuperación de objetivos, ya que tienen un buen efecto tampón en los intervalos de pH relevantes para la recuperación de objetivos, y además no tienen ningún efecto negativo sobre las muestras biológicas.

Ejemplos

Procedimientos Generales

Los métodos tales como la desparafinación, recuperación acuosa de objetivos, recuperación horizontal de objetivos e inmunovisualización, tal como se usan en los ejemplos, se describen en general en la presente memoria. En el presente caso, todos los procedimientos se llevan a cabo de manera manual, excepto la inmunovisualización. En todos los procedimientos se impide que el tejido del portaobjetos se seque.

Desparafinación General. Un tejido Incrustado en Parafina Fijado con Formalina (FFPE) montado sobre portaobjetos de vidrio se desparafina en Xileno y se rehidrata en etanol.

En el procedimiento de desparafinación de cortes de tejido FFPE sobre portaobjetos, los portaobjetos se transfieren manualmente en un soporte de vidrio como sigue en cubetas de 200 ml; 2x 5 minutos en xileno, 2x 3 minutos en un 96% de etanol, 2x 3 minutos en un 70% de etanol y como mínimo 1x 5 minutos en TBS de pH 7,6.

Recuperación acuosa general de objetivos. Recuperación de Epítomos Inducida Térmicamente (HIER) en tejido FFPE desparafinado en portaobjetos en tampón de recuperación de objetivos a 95-99 °C.

Una cubeta de metal con tapa, que contiene 400 ml de tampón de recuperación de objetivos (p.ej. TRIS EDTA de pH 9 o citrato de pH 6) se coloca en un baño de agua a 95-99 °C, y el tampón es precalienta a 95-99 °C. Los tejidos desparafinados de los portaobjetos se transfieren en un soporte de vidrio a los 400 ml de tampón de la cubeta. El proceso de recuperación de objetivos se desarrolla durante 20 ó 40 minutos a 95-99 °C, seguido de un periodo de

enfriamiento de 20 minutos en la cubeta del tampón de recuperación de objetivos sin la tapa a temperatura ambiente. Los portaobjetos se transfieren en el soporte de vidrio y se colocan en 200 ml de TBS (solución salina tamponada con TRIS) durante al menos 5 minutos.

5 **Recuperación horizontal general de objetivos. Recuperación de objetivos en portaobjetos de tejido FFPE desparafinados horizontal a más de 100 °C.**

Se coloca una placa de aluminio (14 cm x 14 cm x 1,5 cm) sobre un dispositivo de calentamiento que está controlado por un termómetro digital y se calienta a más de 100 °C. El dispositivo de calentamiento se coloca en un protector para minimizar el flujo de aire, y la temperatura se mide directamente en la parte superior de la placa mediante un aparato diferente.

10 El portaobjetos se extrae del tampón TBS y se seca con un trozo de papel evitando el tejido, y se colocan aproximadamente 1-2 mL del tampón de recuperación horizontal de objetivos sobre el portaobjetos asegurándose de que el tejido se cubre completamente, y después el portaobjetos con tampón se coloca horizontalmente sobre la placa caliente. Se tiene cuidado de que el tampón de recuperación horizontal de objetivos no escape del portaobjetos para asegurar que el tejido está protegido de la desecación durante el calentamiento.

15 Es posible renovar o cambiar el tampón de recuperación horizontal de objetivos en el portaobjetos simplemente elevando los portaobjetos de la placa caliente, y manteniendo el portaobjetos verticalmente sobre un recipiente de residuos para dejar que caiga el tampón. Posteriormente, el portaobjetos se cubre con tampón de recuperación horizontal de objetivos nuevo sin usar, y se coloca de nuevo sobre la placa caliente si es necesario. Esto se puede repetir si es necesario.

20 Para terminar el proceso de recuperación horizontal de objetivos, el tampón se deja caer del portaobjetos, y el portaobjetos se transfiere a una cubeta de agua Milli Q y a continuación se lava pulverizando con agua desde una botella y finalmente se transfiere a una cubeta de TBS de pH 7,6.

Tampón de recuperación horizontal general de objetivos. Tampón concentrado 10x para el uso en el tampón de recuperación horizontal de objetivos.

25 En general, se hacen dos tampones concentrados 10x para el uso en la preparación del tampón de recuperación horizontal de objetivos como se menciona en los ejemplos. Se hacen como sigue; 1) TE de pH 9; TRIS 0,1 M (Tris(hidroximetil)aminometano), EDTA 10 mM (ácido etilendiamintetraacético), 2Na, 2H₂O de pH 9,2) citrato de pH 6,1; citrato 2,5 mM, 0,1% de tensioactivo (alquilfenilpolietilenglicol), 0,01% de Bronidox L de pH 6,1.

30 **Inmunovisualización general. Uso de AutoStainer® (Dako) para llevar a cabo la inmunotinción en tejido FFPE desparafinado y con recuperación de objetivos.**

El portaobjetos se coloca en el AutoStainer® y se lleva a cabo la inmunovisualización como sigue; se lava en TBST (solución salina tamponada con TRIS que contiene Tween), 5 minutos de incubación en disolución bloqueante de peroxidasa (Dako, S2023), lavado en TBST, 30 minutos de incubación en anticuerpo primario, lavado en TBST, 30 minutos de incubación en un reactivo de visualización HRP/anti-ratón/conejo EnVision+ (Dako, K5007), doble lavado en TBST, 3 minutos de incubación en DAB+ (Dako, K5007), lavado en TBST, 5 minutos de incubación en hematoxilina (Dako, S3301), lavado en agua, 5 minutos de incubación en TBST, lavado en TBST. Finalmente, el portaobjetos se transfiere a una cubeta con agua del grifo.

Tras la inmunovisualización, el tejido se deshidrata por medio de cubetas que contienen un porcentaje creciente de etanol en agua, se acaba en xileno y se monta de forma permanente mediante el uso de unas cuantas gotas de medio de montaje de tejidos (Sakura, 1467) y un cubreobjetos. Tras un periodo de secado, el portaobjetos se examina en un microscopio óptico.

Ejemplo 1. Recuperación de objetivos horizontal mediante el uso de un reactivo que contiene un 30%, 50% o 70% de glicerol.

Se hacen tres tampones diferentes de recuperación horizontal de objetivos; 1) 30% de glicerol (anhidro), 60% de agua Milli Q, 10% de TE de pH 9,2) 50% de glicerol (anhidro), 40% de agua Milli Q, 10% de TE de pH 9,3) 70% de glicerol (anhidro), 20% de agua Milli Q, 10% de TE de pH 9.

Mediante el uso de un tejido de carcinoma de mama, los portaobjetos se desparafinan y se recuperan horizontalmente así como mediante el uso de la recuperación acuosa de objetivos tal como se describió anteriormente en los procedimientos generales. La recuperación horizontal de objetivos se lleva a cabo a una temperatura de 130 °C medida en la placa caliente. Además, el reactivo se cambia cada 5 minutos durante un total de 10 minutos (2x 5 minutos) o 15 minutos (3x 5 minutos). Se ensayan los tres tampones de recuperación horizontal de objetivos. La recuperación acuosa de objetivos, que se hace como comparación con los portaobjetos de recuperación horizontal de objetivos, se lleva a cabo en S2368 durante 20 minutos.

Al llevar a cabo la inmunovisualización, todos los tejidos se tiñen como se describió en el procedimiento general,

mediante el uso de anticuerpo anti-ER α humano de ratón (Dako, M7047) diluido 1:35 (diluyente, Dako, S2022) como anticuerpo primario.

5 Los tampones de recuperación horizontal de objetivos que contienen un 50 y 70% de glicerol proporcionaron una tinción específica de ER α de una intensidad que es comparable a la recuperación acuosa de objetivos. El tampón de recuperación de objetivos que contenía un 30% de glicerol proporcionó una tinción ligeramente inferior.

Hubo una evaporación insignificante de la disolución de recuperación de objetivos en todos los casos, y ninguna de las muestras se secó durante el procedimiento.

Ejemplo 2. Recuperación horizontal de objetivos con o sin tampón en el reactivo.

10 Se hacen tres reactivos diferentes de recuperación horizontal de objetivos; 1) 50% de glicerol, 50% de agua Milli Q. 2) 50% de glicerol, 40% de agua Milli Q, 10% de TE de pH 9,3) 50% de glicerol, 40% de agua Milli Q, 10% de citrato de pH 6,1.

15 Mediante el uso del tejido mencionado en la tabla 1, los portaobjetos se desparafinan y se recuperan horizontalmente así como mediante el uso de la recuperación acuosa de objetivos como se describió en los procedimientos generales. La recuperación horizontal de objetivos se lleva a cabo a una temperatura de 125 °C medida en la placa caliente. Además, el reactivo se cambia cada 5 minutos durante 10 minutos en total (2x 5 minutos) con respecto al anticuerpo anti CD21 (Dako M0784) o 15 minutos (3x 5 minutos) con respecto al anticuerpo anti ER α . Los tres reactivos de recuperación horizontal de objetivos se ensayan con ambos anticuerpos. La recuperación acuosa de objetivos recomendada para cada anticuerpo se lleva a cabo en el tampón mencionado en la tabla 1 durante 20 minutos.

20

Anticuerpo	Dilución	Tejido	Recuperación acuosa de objetivos
Anti-Humano de Ratón			
ER α	1:35	Carcinoma de mama	S2368
CD21	1:50	Amígdala	S1700

Tabla 1: Tejido, dilución de anticuerpo y RO acuosa usados para cada anticuerpo.

Al llevar a cabo la inmunovisualización, todos los tejidos se tiñen como se describe en el procedimiento general. Los anticuerpos primarios se usan en las diluciones específicas mencionadas en la tabla 1.

25 Para ambos anticuerpos ensayados, el reactivo de recuperación horizontal de objetivos 1) conduce a una tinción insuficiente. Se observó cierta tinción de ER α , sin embargo la intensidad fue demasiado baja, y en áreas del tejido en las que la recuperación acuosa de objetivos proporcionó una tinción débil pero diferente, el reactivo de recuperación horizontal de objetivos 1) no proporcionó tinción. La tinción con CD21 fue completamente negativa. El reactivo 2) también proporcionó una tinción completamente negativa para CD21, sin embargo la tinción de ER α fue comparable a la tinción alcanzada con la recuperación acuosa de objetivos. El reactivo de recuperación horizontal de objetivos 3) condujo a una tinción que fue comparable a la recuperación acuosa de objetivos para ambos anticuerpos.

30 Este ejemplo ilustra la importancia del control del pH en el reactivo de recuperación de objetivos. Tal como se ejemplifica mediante CD21, una diferencia en el pH del reactivo de recuperación de objetivos puede significar la diferencia entre una buena tinción y una tinción completamente negativa.

35 **Ejemplo 3. Renovación del tampón de recuperación horizontal de objetivos.**

Se hace un tampón de recuperación horizontal de objetivos; 50% de glicerol, 40% de agua Milli Q, 10% de TE de pH 9. Mediante el uso de un tejido de carcinoma de mama, los portaobjetos se desparafinan y se recuperan horizontalmente así como mediante el uso de la recuperación acuosa de objetivos tal como se describió en los procedimientos generales. La recuperación horizontal de objetivos se lleva a cabo a una temperatura de 125 °C medida en la placa caliente.

40 La recuperación horizontal de objetivos se lleva a cabo añadiendo el reactivo y calentando los portaobjetos durante 10 ó 15 minutos. Para la mitad de los portaobjetos, el mismo reactivo permanece durante todo el periodo de calentamiento. Para la otra mitad de los portaobjetos, el tampón se cambia cada 5 minutos durante un total de 10 minutos (2x 5 minutos) o 15 minutos (3x 5 minutos). La recuperación acuosa de objetivos se lleva a cabo en S2368 durante 20 minutos.

45 Al llevar a cabo la inmunovisualización, se tiñe todo el tejido como se describe en el procedimiento general, mediante el uso de anticuerpo anti-ER α humano de ratón diluido 1:35 como anticuerpo primario.

Los portaobjetos en los que permanece el mismo reactivo durante 10 minutos muestran una tinción débil o negativa. Al incrementar el tiempo a 15 minutos, también se incrementa la intensidad de la tinción, sin embargo los reactivos de este ejemplo muestran una tinción más pobre en comparación con la recuperación acuosa de objetivos. Los portaobjetos en los que se renueva el tampón cada 5 minutos muestran todos una tinción aceptable, y los portaobjetos que se han sometido a una recuperación horizontal de objetivos de 3x 5 minutos muestran una tinción de la misma intensidad que la recuperación acuosa de objetivos.

Ejemplo 4. Recuperación horizontal de objetivos mediante el uso de TE de pH 9 como tampón en el reactivo de recuperación horizontal de objetivos.

Se ensayan cinco anticuerpos diferentes; Anticuerpo anti-PR humano de ratón (Dako M3569), BCL2 (Dako M0887), Citoqueratina 5/6 (Dako M7237), CD20cy (Dako M0755) y anticuerpo anti-HER2 humano de conejo (Dako, K5204).

Se hace un tampón de recuperación horizontal de objetivos con TE de pH 9; 50% de glicerol, 40% de agua Milli Q, 10% de TE de pH 9.

Mediante el uso del tejido mencionado en la tabla 2, los portaobjetos se desparafinan y se recuperan horizontalmente así como mediante el uso de la recuperación acuosa de objetivos como se describió en los procedimientos generales. La recuperación horizontal de objetivos se lleva a cabo a una temperatura de 125 °C medida en la placa caliente. Además, el reactivo se cambia cada 5 minutos durante un total de 10 minutos (2x 5 minutos) o 15 minutos (3x 5 minutos). La recuperación acuosa de objetivos se lleva a cabo en el tampón mencionado en la tabla 2 durante 20 minutos, excepto por el tejido usado con el anticuerpo HER2, que se recupera durante 40 minutos.

Anticuerpo	Dilución	Tejido	Recuperación acuosa de objetivos
Anti-Humano de Ratón			
PR	1:20	Carcinoma de mama	Citrato pH 6
BCL2	1:100	Múltiple y extenso	TRIS EDTA pH 9
Citoqueratina 5/6	1:100	Múltiple y extenso	TRIS EDTA pH 9
CD20cy	1:400	Múltiple y extenso	TRIS EDTA pH 9
HER2 (conejo)	LPU	Carcinoma de mama	Tampón Herceptest ER

Tabla 2: Tejido, dilución de anticuerpo y recuperación acuosa de objetivos usados para cada anticuerpo.

Al llevar a cabo la inmunovisualización, todos los tejidos se tiñen como se describe en el procedimiento general, excepto con respecto al anticuerpo de HER2, que se inmunotizó mediante el uso de los reactivos Herceptest tal como se especifica en el equipo. Los anticuerpos primarios se usan en la dilución específica mencionada en la tabla 2.

Para todos los anticuerpos se obtuvo una tinción específica de una intensidad que fue comparable a la tinción obtenida con la recuperación acuosa de objetivos. Para PR, HER2 y CD20cy, se obtuvieron los mejores resultados con 2x 5 minutos, y para BCL2 y Citoqueratina 5/6 fueron óptimos 3x 5 minutos.

Ejemplo 5. Recuperación horizontal de objetivos mediante el uso de citrato de pH 6,1 como tampón en el tampón de recuperación horizontal de objetivos.

Se ensayaron dos anticuerpos diferentes; anticuerpo anti-CD21 humano de ratón y Antígeno Epitelial (Dako M0804).

Se hace un tampón de recuperación horizontal de objetivos con citrato de pH 6,1; 50% de glicerol, 40% de agua Milli Q, 10% de citrato de pH 6,1.

Mediante el uso del tejido mencionado en la tabla 3, los portaobjetos se desparafinan y se recuperan horizontalmente así como mediante el uso de la recuperación acuosa de objetivos como se describió en los procedimientos generales. La recuperación horizontal de objetivos se lleva a cabo a una temperatura de 125 °C medida en la placa caliente. Además, el reactivo se cambia cada 5 minutos durante un total de 10 minutos (2x 5 minutos) o 15 minutos (3x 5 minutos). La recuperación acuosa de objetivos se lleva a cabo en el tampón mencionado en la tabla 3 durante 20 minutos.

Anticuerpo	Dilución	Tejido	Recuperación acuosa de objetivos
Anti-Humano de Ratón			
CD21	1:50	Amígdala	Citrato pH 6
Antígeno Epitelial	1:400	Múltiple y extenso	Citrato pH 6

Tabla 3: Tejido, dilución de anticuerpo y RO acuosa usados para cada anticuerpo.

Al llevar a cabo la inmunovisualización, todos los tejidos se tiñen como se describe en el procedimiento general. Los anticuerpos primarios se usan en la dilución específica mencionada en la tabla 3.

- 5 Para ambos anticuerpos se obtuvo una tinción específica de una intensidad que fue comparable a la tinción obtenida con la recuperación acuosa de objetivos. Para CD21 se obtuvo el mejor resultado con 2x 5 minutos y para el Antígeno Epitelial fueron óptimos 3x 5 minutos.

Ejemplo 6. Recuperación de objetivos horizontal mediante el uso de citrato de pH 6,1 y TE de pH 9 como tampones en una mezcla de propilen glicol y etilen glicol para la disolución de recuperación horizontal de objetivos.

- 10 Se hicieron dos disoluciones de recuperación de objetivos; 55% de propilen glicol, 25% de etilen glicol, 10% de agua Milli Q, 10% de citrato de pH 6,1 o TE de pH 9. Mediante el uso de un tejido de carcinoma de mama, los portaobjetos se desparafinan y se recuperan horizontalmente así como mediante el uso de la recuperación acuosa de objetivos tal como se describió en los procedimientos generales. La recuperación horizontal de objetivos se lleva a cabo en una estufa a 120 °C tal como se mide en el reactivo.
- 15 La recuperación horizontal de objetivos se lleva a cabo añadiendo la disolución de este ejemplo al portaobjetos y colocando los portaobjetos en la estufa precalentada. Los portaobjetos se calientan durante 20 ó 40 minutos. Después se intercambia la disolución de recuperación de objetivos cuando sea necesario. Después de completar la recuperación horizontal de objetivos, los portaobjetos se lavan con un 99,9% de etanol seguido de inmersión 2 veces en un 96% de etanol y 2 dos veces en un 70% de etanol, y se finaliza en TBS. La recuperación acuosa de objetivos se lleva a cabo en S2368 durante 20 minutos.
- 20

A llevar a cabo la inmunovisualización, se tiñe todo el tejido como se describe en el procedimiento general, mediante el uso de anticuerpo anti-ERα humano de ratón diluido 1:35 como anticuerpo primario.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la inmunorreactividad de una muestra de tejido o células fijada en un medio de fijación que comprende:
 - 5 - proporcionar un portador en una posición horizontal, y dicho portador tiene sobre él una muestra de tejido o células, y dicha muestra de tejido o células está sobre el portador,
 - poner en contacto sustancialmente el lado de la muestra de tejido o células del portador con una disolución tamponada de recuperación de objetivos que comprende un disolvente con un punto de ebullición mayor que el punto de ebullición del agua, en el que la disolución de recuperación de objetivos permanece por lo demás expuesta al medio,
 - 10 - calentar la muestra de tejido o células y la disolución de recuperación de objetivos a una temperatura superior a 100 °C.
2. El método según la reivindicación 1, en el que se coloca más de una muestra de tejido o células sobre el portador.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la disolución tamponada de recuperación de objetivos tiene una evaporación mínima a una temperatura entre 100 °C y 150 °C.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la disolución de recuperación de objetivos se calienta a una temperatura entre 100 °C y 200 °C.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende un disolvente que tiene un punto de ebullición significativamente mayor que el punto de ebullición del agua.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el disolvente se selecciona del grupo que consiste en alcoholes, glicoles, cetonas, ésteres, amidas y nitrilos o una mezcla de los mismos.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el disolvente es glicerol.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el disolvente es propileno glicol o etileno glicol o una mezcla de los mismos.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende además uno o más reactivos capaces de romper los enlaces formados durante la fijación de la muestra biológica.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende un 40-80% del disolvente.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la disolución de recuperación de objetivos comprende alrededor de un 50% del disolvente.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además la automatización de una o más de las etapas.
13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende además la etapa de enfriar el portador y la disolución de recuperación de objetivos tras la etapa de calentamiento.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende además la etapa de retirar la disolución de recuperación de objetivos de la superficie del portador tras la etapa de calentamiento y/o la(s) etapa(s) de enfriamiento.
15. El método según la reivindicación 14, en el que la disolución de recuperación de objetivos se retira de la superficie del portador con un disolvente adicional capaz de mezclarse con la disolución de recuperación de objetivos.
16. El método según la reivindicación 15, en el que el disolvente adicional es agua, un tampón de lavado acuoso o etanol.
17. El método según cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que la retirada de la recuperación de objetivos se lleva a cabo a temperatura ambiente o por encima de la temperatura ambiente.
18. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, que comprende además la etapa de teñir la muestra de tejido o células con una sonda.

19. El uso de una disolución de recuperación de objetivos que comprende glicerol, agua, y uno o más de los siguientes; un nucleófilo, un tampón, un agente quelante y un detergente para la recuperación de objetivos de una muestra de tejido o células, y dicha muestra de tejido o células está sobre un portador, en el que dicho portador está en una posición horizontal.

5