

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 454**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/00**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2003** **E 03799773 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013** **EP 1505871**

54 Título: **Conservación de ARN y morfología en células y tejidos**

30 Prioridad:

**10.05.2002 US 379015 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.06.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)  
1600 NORTHWEST 10TH AVENUE  
MIAMI, FL 33136, US**

72 Inventor/es:

**VINCEK, VLADIMIR;  
NASSIRI, MEHDI;  
NADJI, MEHRDAD y  
MORALES, AZORIDES R.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 406 454 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

Conservación de ARN y morfología en células y tejidos

### Antecedentes de la invención

#### 1. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición que contiene polietilenglicol (PEG) y metanol para la conservación de un tejido, especialmente a temperatura ambiente. También se puede utilizar para el almacenamiento de tejido. Un tejido conservado con y/o almacenado en las composiciones de la presente invención mantiene sus características morfológicas, el reconocimiento de sus antígenos por anticuerpos cognados, y la integridad de sus ácidos nucleicos (p. ej., ADN y ARN) sin necesidad de refrigeración o congelación.

#### 10 2. Descripción de la técnica relacionada

- El procesamiento citológico e histológico evita la autólisis de las células y los tejidos, respectivamente, después de su separación de un organismo vivo. Por otra parte, la estructura de las células individuales y su organización dentro del tejido se estabilizan por medio de tal tratamiento. Existe un requerimiento, sin embargo, de procedimientos sofisticados e instrumentos dedicados en la mayoría de los casos al procesamiento de células y tejidos en un entorno clínico. Por lo tanto, los especímenes se recogen normalmente en los consultorios médicos o salas quirúrgicas, y se transportan a un servicio de patología centralizado. Se necesitan composiciones adecuadas para la conservación y/o el almacenamiento de una célula o un tejido para asegurar que se evita la autólisis y que la morfología celular, los antígenos, y los ácidos nucleicos se mantienen hasta su procesamiento.

- Además, el análisis genético es cada vez más importante por sí mismo o complementario a la tinción de células, análisis enzimáticos, y técnicas inmunológicas en patología. La expresión de los genes mutantes o la expresión en exceso de genes normales se pueden examinar mediante el análisis del ácido nucleico. La detección in situ del ARN puede localizar transcritos dentro de los tejidos que contienen diferentes tipos de células; esto también se puede lograr mediante la detección de ARN que ha sido extraído de diferentes porciones de células clasificadas o tejido seccionado. Se pueden observar mutaciones en el ADN o ARN. Se pueden utilizar análisis citológicos/histológicos y genéticos alternantes de células clasificadas o tejido seccionado para correlacionar eventos patológicos a niveles celulares y moleculares. El análisis genético solo será posible si se evita la degradación y se estabilizan las estructuras macromoleculares. Sin embargo, muchas composiciones conservantes y fijadores causan un daño irreversible (p. ej., actividad de las enzimas nucleasas ubicuas, hidrólisis de enlaces fosfodiéster y/o desamidación de bases) a la estructura de los ácidos nucleicos (p. ej., ADN, y especialmente ARN) y reducen su rendimiento, limitando de este modo la utilidad de las técnicas genéticas para el diagnóstico y las aplicaciones de investigación. Por consiguiente, la conservación de ácidos nucleicos en una célula o tejido frescos por lo general requiere una manipulación especial, tal como un procesamiento o congelación inmediatos, para permitir el examen por medio de una combinación de técnicas citológicas, histológicas, inmunológicas, y genéticas.

- La composición descrita en la presente memoria se puede utilizar ventajosamente en el procesamiento de tejido convencional u otros métodos de procesamiento tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408; el documento WO 01/44783; y el documento WO 01/44784. Las técnicas convencionales se describen en referencias generales tales como Thompson (Selected Histochemical and Histopathological Methods, Springfield, IL: Thomas, 1966), Sheehan y Hrapchak (Theory and Practice of Histotechnology, St. Louis, MO: Mosby, 1973), Bancroft y Stevens (Theory and Practice of Histological Techniques, Nueva York, NY: Churchill Livingstone, 1982); Boon & Kok (Microwave Cookbook of Pathology, Leiden, NL: Coulomb, 1989); Woods & Ellis (Laboratory Histopathology, Nueva York, NY: Churchill Livingstone, 1994).

- En las Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.389.052; 3.546.334; 5.104.640; 5.256.571; 5.849.517; y 6.204.375; Florell et al. (Mod. Pathol., 14:116-128, 2001); Bostwick et al. (Arch. Pathol. Lab. Med., 118:298-302, 1994); Dimulescu et al. (Mol. Diagnosis, 3:67-71, 1998); Maxwell et al. (J. Clin. Pathol., 52:141-144, 1999); Shibutani et al. (Lab. Invest., 80:199-208, 2000); y Gillespie et al. (Am. J. Pathol., 160:449-457, 2002) se describen disoluciones conservante y fijadoras.

- A. R. Warmington et al. (J. of Histotechnology 23 (4), 12.2000, 299-308) describen composiciones para la conservación de tejidos que comprenden etanol al 60%, metanol al 20% y polietilenglicol al 7-20%. Una composición preferida comprende etanol al 60%, metanol al 20%, polietilenglicol a 7% y agua al 13%.

- 50 Las composiciones de la presente invención son novedosas y no obvias. Son disoluciones no acuosas que comprenden PEG y metanol, que conservan las características morfológicas, el reconocimiento de antígenos por anticuerpos cognados, y la integridad del ácido nucleico (p. ej., ADN y ARN) en tejido sólido sin el inconveniente de la refrigeración o la congelación del espécimen para evitar la degradación. De este modo, el tejido sólido se puede almacenar durante períodos prolongados a la temperatura ambiente. Las ventajas y mejoras adicionales debidas a la invención se comentan a continuación.

## Compendio de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para la conservación y/o almacenamiento de tejidos. La composición contiene un polietilenglicol y metanol de acuerdo con la reivindicación 1. Es convenientemente una disolución no acuosa con un punto de fusión que está sustancialmente por debajo de la temperatura ambiente. Los tejidos pueden conservarse o almacenarse para la histología. Los antígenos o ácidos nucleicos del tejido se pueden analizar. La conservación de la morfología se puede evaluar con un microscopio. La conservación de antígenos y ácidos nucleicos se puede evaluar por medio del rendimiento de antígenos y ácidos nucleicos al menos parcialmente no degradados después de la extracción del tejido, o el incremento de la unión del anticuerpo y la hibridación de una sonda complementaria al tejido. También se proporcionan métodos para elaborar y utilizar la composición.

Otros objetos de la invención son un soporte para muestras y un recipiente a granel con la composición.

Un tejido conservado y/o almacenado de acuerdo con la invención se puede procesar adicionalmente para el análisis citológico, histológico, inmunológico, y/o genético. También se puede proporcionar una sección o bloque de tejido obtenidos después de la impregnación. El ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN) extraído de un tejido sólido conservado, almacenado, o procesado constituye otra realización de la invención.

Las realizaciones adicionales de la invención se describen con detalle a continuación o serán evidentes para el experto en la técnica a partir de la descripción de la presente memoria.

## Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en donde el ARN se ha separado en condiciones de desnaturalización. Después de incubar el tejido en diferentes composiciones durante tres días (Fig. 1A) o una semana (Fig. 1B) a aproximadamente 25°C, se extrajo el ARN utilizando un kit de aislamiento de ARN Trizol (Gibco BRL). Cada muestra (A a F) se hizo circular en calles por duplicado (1 y 2).

La Figura 2 muestra las secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina. Los tejidos se incubaron en polietilenglicol 10% y metanol al 90% (Figs. 2A, 2C, 2E) o más tarde con ARN (Figs. 2B, 2D, 2F) durante 48 h (Figs. 2A-2B), 72 h (Figs. 2C-2D), o una semana (Figs. 2E-2F) a aproximadamente 25°C. Estos se procesaron, mediante el método convencional o de acuerdo con el método descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408, y después se tiñeron. El aumento es de 400 x (Figs. 2A-2F).

## Descripción de las realizaciones específicas de la invención

Las composiciones descritas en la presente memoria se desarrollaron por su simplicidad química, capacidad para conservar las características morfológicas y genéticas de los tejidos, y la conveniencia y practicidad de uso a temperatura ambiente. Un tejido se puede almacenar en las mismas y servir como una fuente de archivo para análisis citológicos, histológicos, y/o genéticos. Se puede conservar y/o almacenar para un estudio prospectivo o retrospectivo. Aunque no se prefiere, el almacenamiento en la composición de la presente invención también puede ser posterior al contacto del tejido con otros conservantes y/o fijadores.

El tejido se puede procesar como se describe en la presente memoria. Puede ser un tejido sólido tal como, por ejemplo, parénquima, tejido conectivo o graso, músculo cardíaco o esquelético, riñón, hígado, piel, músculo liso, o bazo. Opcionalmente, puede ser necesario desmineralizar el tejido calcificado antes del procesamiento adicional. Sin embargo, "tejido" por lo general no se refiere a las células individuales de un fluido biológico (p. ej., ascitis, sangre, exudado pleural), suspensiones de células procedentes de la aspiración de órganos o lavado de cavidades corporales, o frotis celulares. El tejido puede ser un tumor (benigno o maligno), canceroso o precanceroso, obtenido a partir de un animal o sujeto humano aquejado de una enfermedad o sospechoso de padecerla (normal o enfermo), o estar aquejado de otra patología. Éste se puede obtener por autopsia, biopsia (p. ej., endoscopia o laparoscopia), o resección quirúrgica. El tejido se debe colocar en contacto con la composición de uno a 30 min después de la muerte o separación del organismo, pero este tiempo se puede prolongar refrigerándolo con hielo. Una pieza de tejido (p. ej., un lámina o bloque) se puede conservar con y/o almacenar en la composición de la invención; el tejido que se ha conservado y/o almacenado también puede estar embebido en un medio. Los tejidos se pueden analizar por medio de una reconstrucción seriada con diferentes análisis aplicados a las secciones adyacentes. Se puede utilizar la selección negativa o positiva (p. ej., microdissección con pinzas ópticas o ablación con láser) para aislar las poblaciones de células.

El procesamiento histológico convencional implica por lo general un agente fijador que se entrecruza con biomoléculas reactivas (p. ej., disolución acuosa que contiene aldehído como formalina tamponada), aunque a veces se utiliza un agente fijador que es un coagulante o precipitante (p. ej., una cetona). El espécimen de tejido a menudo es deshidratado a través de una serie graduada de etanol (p. ej., del 70% al 100%) y a continuación aclarado en una serie de xilenos antes de la impregnación. El procesamiento se produce por lo general a lo largo de varias horas o días (p. ej., durante la noche).

El procesamiento histológico de acuerdo con el método descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408 puede estar compuesto de incubación en una serie de disoluciones no acuosas en diversas condiciones de tiempo, temperatura, y presión. El tejido se puede fijar, deshidratar, opcionalmente aclarar, e impregnar; alternativamente, el tejido se puede endurecer e impregnar. Los límites de cada etapa se pueden solapar debido a que un componente químico de una de las series de disoluciones tiene dos o más de las actividades (p. ej., agente fijador, agente deshidratante, y agente de aclaramiento). El procesamiento del tejido se puede completar en 45 minutos, una hora o menos, 90 min o menos, o dos horas o menos. El procesamiento rápido y continuo se logra mediante la disminución del espesor de los especímenes de tejido, el uso de una serie de disoluciones no acuosas compuestas por mezclas, el calentamiento con energía de microondas, la conducción de intercambio de disolvente/soluto en especímenes de tejido bajo presión o por dilución, agitación mecánica, adición de un potenciador o agente tensioactivo, o una combinación de los mismos.

La mezcla puede incluir al menos un agente fijador, al menos un agente deshidratante, y al menos un agente que aclara el tejido y/o elimina la grasa (p. ej., seleccionado entre alcoholes, cetonas, xilenos). Otra mezcla puede incluir al menos un agente de aclaramiento y al menos un agente de impregnación (p. ej., xilenos, ceras). El espécimen de tejido puede impregnarse en una disolución de cera compuesta por una mezcla de diferentes longitudes de cadena (p. ej., aceite mineral que es líquido y parafina que es sólida a temperatura ambiente). Se debe observar que, aunque muchos productos químicos tienen múltiples actividades, las mezclas preferidas contienen más de un agente químico. Preferiblemente, una mezcla contiene al menos dos o tres agentes químicos diferentes (p. ej., isopropanol, PEG, y acetona; isopropanol, acetona, y parafina). Los especímenes de tejido pueden ser de 3 mm o menos en su dimensión más pequeña para permitir una difusión adecuada: p. ej., el espesor de una lámina o bloque de tejido puede tener entre 0,5 mm y 3,0 mm de espesor, preferiblemente 2,0 mm o menos, más preferiblemente 1,5 mm o menos, y lo más preferiblemente 1,0 mm o menos. Véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408 y su descripción que se incorpora a la presente memoria como referencia.

El medio de inclusión pueden ser nitrocelulosas, plásticos, resinas y ceras. El procesamiento del tejido sirve para inactivar irreversiblemente las enzimas responsables de la autólisis y la degradación de los biopolímeros (p. ej., ácidos nucleicos, proteínas, antígenos). Por lo tanto, los bloques de tejido embebido o secciones de los mismos también se pueden almacenar. Los ácidos nucleicos (p. ej., ADN o ARN) se pueden extraer del tejido o de las secciones, preferiblemente después de la eliminación del medio de inclusión. Una sección de tejido puede tener entre 3 µm y 6 µm de espesor (nitrocelulosa o cera) o 0,5 µm a 1 µm de espesor (plástico o resina).

Los estudios con tejidos conservados en las composiciones de la presente invención indican una mejor conservación de los ácidos nucleicos que con las disoluciones conservantes convencionales. El tejido fresco se pone en contacto con la composición de acuerdo con la presente invención, y se puede procesar para estudios citológicos, histológicos, inmunológicos, y/o genéticos poco después de la entrega al laboratorio, o el material de archivo se puede almacenar y poner a disposición para la investigación futura y otras aplicaciones. Se observan mejoras en el rendimiento del material genético, la estabilidad del material genético en forma de archivo, el tamaño y la integridad del material genético, y la reducción de la modificación química del material genético en comparación con la técnica anterior. La reconstrucción seriada puede usar los mismos o diferentes análisis sobre secciones adyacentes. Las muestras se pueden conservar en diferentes momentos y se pueden conservar para su posterior análisis. El tejido conservado es adecuado para estudios prospectivos o retrospectivos.

La composición conservante de la presente invención comprende polietilenglicol (PEG). El PEG tiene preferiblemente un punto de fusión por debajo de la temperatura ambiente. Tiene un peso molecular medio de 600 daltons o menos, más preferiblemente de aproximadamente 400 daltons o menos, y aún más preferiblemente de aproximadamente 300 daltons o menos; el peso molecular medio puede estar entre 100 y 600 daltons, o entre 200 daltons y 400 daltons. El término "aproximadamente" cuando hace referencia al peso molecular medio de PEG significa que es admisible una variación de 10, 25 o 50 daltons. No se prefieren los PEG de peso molecular superior (p. ej., peso molecular medio de 1.000 o más) a pesar de que pueden estar presentes en cantidades de menos de 5%, 10% o 20% de la distribución de peso molecular. El punto de fusión del PEG 400 es de aproximadamente 4°C a aproximadamente 8°C y del PEG 600 es de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C. El punto de fusión del PEG utilizado en la composición puede ser de 37°C o menos, 32°C o menos, 27°C o menos, 22°C o menos, 15°C o menos, 10°C o menos, o 5°C o menos; los puntos de fusión más bajos son los preferidos para los tejidos que están refrigerados o son enfriados rápidamente durante el almacenamiento.

La concentración de PEG en la presente invención es de 15% (v/v) o menos, y de 10% (v/v) o más, y cualquiera de sus intervalos intermedios. El término "aproximadamente" se refiere a concentraciones de PEG con una variación de 1% (v/v) o 2,5% (v/v). El PEG tiene una densidad de aproximadamente 1,1 a 1,2 g/ml, dependiendo de su peso molecular por lo que las concentraciones dadas en la presente memoria se pueden convertir entre mediciones de peso y volumen utilizando 1,1 como gravedad específica.

La composición conservante de la presente invención también comprende metanol. Los alcoholes tales como, por ejemplo, el etanol no son eficaces para conservar tejidos para análisis tanto morfológicos como genéticos. Pero la mayoría de los histotecnólogos prefieren el etanol al metanol y no estarían motivados a sustituir entre alcoholes, debido a la volatilidad, inflamabilidad, y el coste del metanol. Pero de acuerdo con las enseñanzas de la presente

invención, se requiere metanol para la conservación eficaz del tejido. No se requieren fijadores que se entrecrucen con grupos reactivos (p. ej., aldehídos, cetonas).

La concentración de metanol en la presente invención es 90% (v/v) o menos, y 85% (v/v) o más, y cualquier de sus intervalos intermedios. El término "aproximadamente" se refiere a las concentraciones de metanol con una variación de 2,5% (v/v) o 5% (v/v). El metanol tiene una densidad de aproximadamente 0,79 g/ml por lo que las concentraciones dadas en la presente memoria se pueden convertir entre las mediciones de peso y volumen utilizando 0,79 como gravedad específica.

No se requieren procedimientos especiales tales como, por ejemplo, agitación/sacudimiento, microondas, ultrasonido, calentamiento o refrigeración de la temperatura ambiente, congelación o procesamiento inmediato para una conservación eficaz de acuerdo con la presente invención. La invención permite la conservación y/o el almacenamiento a temperatura ambiente (p. ej., por debajo de 42°C, 37°C, o 30°C; entre 15°C y 30°C, o de 20°C a 25°C). De este modo, no se requieren temperaturas bajas (p. ej., aproximadamente de 4°C o por debajo de 15°C) para la conservación, pero se pueden utilizar para el almacenamiento. Para un gramo de tejido, se pueden usar aproximadamente de 10 ml a 25 ml de la composición como medio conservante y/o de almacenamiento. El tejido se puede cortar en láminas finas (p. ej., aproximadamente 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm, 3 mm, 3,5 mm, o 4 mm o menos en la dimensión más pequeña de lámina) para fomentar el paso de la composición por el tejido. El almacenamiento puede ser por más de una semana, dos semanas, un mes, tres meses, seis meses o un año.

La composición de la presente invención (es decir, una disolución no acuosa a temperatura ambiente) puede ser elaborada mezclando PEG y metanol en las cantidades de acuerdo con la reivindicación 1 y apropiadas para alcanzar las concentraciones deseadas. Se pueden tolerar cantidades menores de otros productos químicos si no afectan a la capacidad de la composición para actuar como conservante. Si bien la composición inicialmente no contiene agua añadida, puede haber una cantidad minoritaria de agua presente debido a las propiedades higroscópicas de PEG y el metanol o a la posterior extracción de agua del tejido.

La composición de la presente invención se puede proporcionar en un soporte de tejido, que está preferentemente adaptado para sumergir el tejido y evitar que se derrame. El soporte puede tener un volumen total de 30 ml a 50 ml, que es suficientemente grande para sumergir una o más piezas de tejido del tamaño de un gramo en la composición (p. ej., al menos 50-90% del volumen total). Por ejemplo, se pueden utilizar un vial de vidrio o de plástico con un cierre unido o separado (p. ej., tapa o tapón ajustados); alternativamente, una bolsa de plástico con una porción sellable puede requerir la eliminación de los espacios vacíos para asegurar la inmersión. Se prefiere un tapón de rosca con una junta para evitar el derrame que se enrosca en un vial no opaco. Se pueden proporcionar volúmenes más grandes (p. ej., litros o galones) en una botella, cubo, o bombona con espita. El soporte puede estar provisto de un recipiente (p. ej., casete con bisagras, bolsa de malla, esponja porosa) que se puede colocar en el mismo y que rodea las piezas pequeñas de tejido y fomenta el intercambio con la disolución. El soporte se puede adaptar a tejidos sólidos, de manera que las piezas de los mismos estén sumergidas en la composición. Preferentemente, el tejido sólido está rodeado en todas las superficies reduciendo las bolsas de aire del soporte y/o teniendo un recipiente en el mismo.

Los soportes de tejido se pueden empaquetar entre media docena a un gran número de unidades (p. ej., 25 o 100) en una caja de cartón; el soporte y el recipiente se pueden empaquetar por separado en un kit de un solo uso para recoger el tejidos. Sería conveniente marcar cada soporte con un identificador individual (p. ej., impresión alfanumérica, código de barras) o una superficie grabable para personalizar el identificador (p. ej., información sobre la fuente de tejido o el análisis a realizar). A diferencia de los soportes para frotis de sangre o Papanicolaou o suspensiones de células individuales, se prefiere que no tengan un porta o un hisopo contenidos en el mismo, debido a que tendrían una utilidad limitada para los tejidos sólidos.

#### Procesamiento de tejidos

La fijación inicia el endurecimiento del espécimen de tejido, y conserva la morfología mediante la estabilización de las proteínas y la detención de la degradación. Sin fijación química, las enzimas endógenas catabolizarán y lisarán la célula, y se alterará morfología del tejido. Los indicios de que la fijación era inadecuada pueden incluir: disociación de las estructuras de tejido, burbujas/huecos en las secciones de tejido, tinción deficiente e irregular, células encogidas, aglutinación del citoplasma, condensación y cromatina nuclear menos clara, y autólisis/hemólisis de eritrocitos. La fijación con acetona se logra normalmente en cuestión de minutos en lugar de horas debido a que la larga exposición hace que el tejido se vuelva frágil y se encoja. En contraste con la fijación por medio de formalina, se cree que las cetonas y alcoholes fijan el tejido estabilizando físicamente las proteínas mediante coagulación o precipitación sin reaccionar químicamente con ellas (p. ej., grupos reactivos de entrecruzamiento mediado por aldehídos).

La deshidratación elimina el agua del espécimen de tejido para promover el endurecimiento. La sustitución del agua en el espécimen de tejido por un agente deshidratante también facilita la sustitución posterior del agente de deshidratación por el material utilizado para la impregnación. Este intercambio de disolvente/soluto se potencia mediante el uso de un disolvente volátil para la deshidratación. El fracaso al deshidratar el espécimen puede dar lugar a una impregnación inadecuada, una mala formación de cinta durante el corte, hendiduras en secciones de

tejido donde no se había eliminado el agua, disociación de estructuras, cristales de agua en secciones de tejido, y la mala tinción.

Opcionalmente, la grasa se elimina del espécimen de tejido con un disolvente debido a que la grasa deteriora el aclaramiento y la impregnación. La eliminación inadecuada de la grasa puede dar como resultado la difusión de artefactos de las secciones de tejido, arrugas de las secciones de tejido, y la mala tinción. También es opcional el aclaramiento del espécimen de tejido. Los extractos disolventes aclarantes se utilizan para deshidratar y/o desengrasar el espécimen de tejido si no son miscibles con el agente de impregnación. El tejido se puede "aclarar" y su opacidad se puede reducir por medio de extracción.

Por último, una vez que el espécimen de tejido se ha fijado y deshidratado adecuadamente, se endurece mediante impregnación con y/o inclusión en un agente tal como nitrocelulosa, plástico, resina, o cera. Se requiere el endurecimiento apropiado del espécimen de tejido con la conservación adecuada de la morfología antes de colocar el espécimen impregnado en un bloque y cortar secciones de diez micras o más delgadas con una cuchilla de micrótopo. Los materiales de impregnación preferidos son las fórmulas de cera comerciales, las mezclas de ceras de diferentes puntos de fusión (p. ej., aceite mineral líquido y parafina sólida), y medio PARAPLAST. La parafina se ha elegido para su uso en los ejemplos de la presente memoria porque es poco costosa, fácil de manejar, y se facilita el seccionamiento en cintas por la consistencia de las estructuras proporcionadas por este material.

Después de la impregnación, el espécimen de tejido se puede embeber para producir un bloque. El agente utilizado para embeber el espécimen de tejido es preferiblemente el mismo que el material utilizado para la impregnación, pero también se puede utilizar un agente de impregnación diferente. El espécimen de tejido en bloque se puede montar sobre un micrótopo para cortar secciones de entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 2  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ . Las secciones de tejido se pueden procesar adicionalmente para la tinción histoquímica, la unión de anticuerpos, la hibridación de ácidos nucleicos in situ, la amplificación, o una combinación de las mismas. Los especímenes de tejido se pueden examinar mediante microscopía, pero se pueden utilizar otras técnicas para examinar las propiedades celulares (p. ej., el flujo automatizado o citometría de barrido, detección o determinación de la secuencia de biopolímeros, autorradiografía, electroforesis de proteínas o ácidos nucleicos).

Para las secciones impregnadas con cera sobre portaobjetos de vidrio elaboradas mediante la presente invención, la cera se puede fundir y retirar antes de la tinción o inmunohistoquímica. La sección de tejido se rehidrata y después se analiza como se describe a continuación con tintes o anticuerpos. Una vez que se completa la tinción o se desarrolla la reacción histoquímica, el portaobjetos se puede cubrir con un cubreobjetos y observar al microscopio. Alternativamente, el espécimen teñido o decorado con anticuerpo se puede estudiar con un aparato para citometría. Los bloques de tejido se pueden almacenar para su posterior examen.

#### Análisis celular y molecular

La tinción con hematoxilina-eosina se utiliza comúnmente para la citología y la histología, y ésta puede ser utilizada por los patólogos como patrón para la comparación. Pero se pueden utilizar otros colorantes y tintes. Las enzimas endógenas para el tejido, o utilizadas como marcas para anticuerpos y otros agentes de unión de afinidad, se pueden localizar in situ mediante una elección apropiada del sustrato. La enzima y el sustrato reaccionan para formar un producto detectable.

La unión anticuerpo-antígeno y ligando-receptor es la base para la detección específica de la secuencia de proteínas. Las proteínas se pueden separar y aislar hasta una pureza al menos parcial mediante cromatografía o electroforesis. Se pueden detectar mediante la unión específica a una matriz, transferencia Western, inmunoprecipitación (IP), análisis de inmuoabsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), e inmunohistoquímica (IHC).

Las secciones de tejido conservadas mediante el presente proceso se pueden someter a inmunohistoquímica. El antígeno se conserva mediante la presente invención y las condiciones de procesamiento de tejido se eligen apropiadamente. Se bloquean los sitios de unión inespecífica, el antígeno se une al anticuerpo específico (es decir, el anticuerpo primario) y se elimina el anticuerpo no unido. Si se marca con una sonda o un radical generador de señal, el anticuerpo primario puede ser detectado directamente, pero se prefiere anclar la sonda a una proteína (p. ej., un anticuerpo secundario) que se une específicamente al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se puede originar contra la región constante de la cadena pesada o ligera del anticuerpo primario. Esto amplifica la señal generada por el producto conjugado de antígeno-anticuerpo debido a que cada anticuerpo primario se unirá a muchos anticuerpos secundarios. Alternativamente, la amplificación puede ocurrir a través de otras interacciones específicas tales como biotina-estreptavidina. La unión del anticuerpo se lleva a cabo en un volumen pequeño para reducir el uso de reactivos costosos y mantener una alta tasa de unión; la evaporación de este pequeño volumen se reduce mediante incubación en una cámara húmeda. El radical generador de señal es preferiblemente una enzima que no se encuentra presente de otro modo en el tejido: por ejemplo, se pueden unir fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante al anticuerpo secundario o conjugar con estreptavidina. Los sustratos están disponibles para estas enzimas que generan un producto cromogénico, fluorescente o luminiscente que puede ser detectado visualmente.

Se puede utilizar el patrón de tinción para el antígeno para localizar la expresión del antígeno en el contexto de las estructuras celulares reveladas mediante contratinción. La expresión del antígeno se puede utilizar para identificar el tipo de célula o tejido, la fase de desarrollo, los marcadores de pronóstico de tumores, los procesos metabólicos degenerativos, o la infección por un patógeno.

5 La unión antígeno-anticuerpo también puede ser visualizada con sondas radiactivas fluorescentes, o de metal coloidales mediante autorradiografía, microscopía de epifluorescencia, o microscopía electrónica, respectivamente. Alternativamente, el antígeno se puede extraer de las secciones de tejido y detectar o examinar directamente. Por ejemplo, en lugar de la inmunohistoquímica, el antígeno se puede extraer, separar sobre un gel de poliacrilamida nativo o desnaturalizante, y detectar mediante transferencia Western.

10 Se pueden utilizar sondas similares para detectar ácidos nucleicos en la sección de tejido mediante hibridación in situ para identificar mutaciones genéticas o transcritos. Alternativamente, el ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN) se puede extraer de las secciones de tejido y detectar directamente o examinar de otro modo, o amplificar antes del análisis genético adicional.

15 La presente invención es compatible con la preparación de ácidos nucleicos (p. ej., ADN o ARN) a partir de tejido antes o después del procesamiento. Véanse Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, New York, NY: Greene, 2002) y Sambrook y Russell (Molecular Cloning, 3<sup>a</sup> edición, Woodbury, NY: CSHL, 2001) para las técnicas de biología molecular.

20 Las composiciones y los procedimientos de la presente invención conservan el material para su análisis genético y permiten la conservación y/o el almacenamiento de tejido a temperatura ambiente. De este modo, es posible el estudio genético de tejidos recogidos rutinariamente en el laboratorio de patología. Las observaciones citológicas se pueden correlacionar con la información genética analizando de células clasificadas por tinción o unión de anticuerpos, y preparando ácidos nucleicos a partir de ellas para su análisis genético. De un modo similar, las observaciones histológicas se pueden correlacionar con la información genética analizando una sección mediante tinción o la unión de anticuerpos, y preparando ácidos nucleicos a partir de una sección adyacente para su análisis genético. Los detalles anatómicos se pueden observar mediante reconstrucción de secciones seriadas. Por ejemplo, se pueden comparar regiones enfermas y normales de la misma sección para detectar diferencias genéticas (p. ej., reordenaciones cromosómicas, mutaciones, niveles de transcripción), se pueden caracterizar el historias o el progreso de la enfermedad mediante la comparación de las diferencias genéticas en muestras tomadas en varios momentos, y se puede evaluar la evolución del tumor siguiendo la acumulación de diferencias genéticas de cáncer primario a metástasis.

Las mutaciones pueden ser de la línea germinal y utilizarse para trazar la predisposición genética a la enfermedad, o las mutaciones pueden ser somáticas y utilizarse para determinar alteraciones genéticas en la patogénesis de la enfermedad. La enfermedad puede ser un trastorno metabólico o neurológico, un tumor maligno, un defecto de desarrollo, o estar causada por un agente infeccioso.

35 Para el análisis genético, se eliminan las anomalías del ADN inducidas por formaldehído y se potencia la extracción de ácido nucleico a partir de material de archivo. El estudio del ARN a partir de tejido conservado y/o almacenado abre muchas vías que antes no estaban disponibles para aplicaciones de diagnóstico e investigación. Los conservantes de ARN convencionales que inhiben o inactivan las ribonucleasas (p. ej., cloruro o sulfato de amonio, β-mercaptoetanol, pirocarbonato de dietilo, tiocianato de guanidina, inhibidor de la ribonucleasa placentaria, urea) no se requieren para conservar el tejido fresco de acuerdo con la presente invención, pero se pueden utilizar durante la extracción y el aislamiento de ARN a partir de tejido conservado. Se pueden utilizar N-lauril sarcosina y/u otros detergentes (p. ej., TRITON X-100) para lisar las membranas celulares y disociar los complejos de ribonucleoproteína. El ARN se hace precipitar con cloruro de litio, pero se puede minimizar la pérdida de ARN menor de 5,8S mediante precipitación preferente con isopropanol y alto contenido de sales. Se encuentran disponibles kits comerciales para la extracción y el aislamiento del ARN (p. ej., Ambion, BD Biosciences Clontech, Invitrogen, Promega, Stratagene). Las técnicas de aislamiento de ARN son descritas por Chirgwin et al. (Biochemistry, 18:294-299, 1979); Chomczynski y Sacchi (Anal. Biochem., 162:156-159, 1987), y en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.843.155, 5.010.183, 5.234.809, y 5.346.994. El tejido sólido se puede congelar y triturar hasta un polvo con un mortero y una mano de mortero, homogeneizar en un equipo DOUNCE o POLYTRON, someter a vórtice, someter a sonicación, mediante el uso de molinos de cuentas o criogénicos, o una combinación de los mismos. Las preparaciones de ADN o ARN brutas o solo parcialmente purificadas se pueden analizar genéticamente.

55 El ARN se puede aislar y purificar al menos parcialmente en disolución o mediante la unión a un sustrato sólido (p. ej., arcilla, sílice, membrana de filtro, cuenta paramagnética, celulosa en suspensión o en forma de lámina). Por ejemplo, el ARN se puede separar del ADN, las proteínas, y otras biomoléculas mediante la unión a oligo (dT), precipitación diferencial, electroforesis, sedimentación a través de una almohadilla, flotación de empuje en un gradiente, o similares. Se recomienda la inactivación de ribonucleasas en disoluciones u otros reactivos con pirocarbonato de dietilo (DEPC).

La cantidad de ARN extraído de tejido se puede medir mediante absorbancia de UV (un coeficiente de extinción de 1 DO<sub>280</sub>/cm es 40 µg/ml de ARN) o unión estequiométrica a colorantes. La contaminación se puede evaluar mediante

absorbancia de UV: la razón  $DO_{260}/DO_{280}$  debe estar de entre 1,8 a 2,0 para el ARN sustancialmente puro, aunque la fuente del tejido puede influir en que la proporción sea mayor de dos. La fuerte estructura secundaria de ARN hace que sea difícil visualizar la migración en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (EtBr) después de la electroforesis no desnaturalizante: de una única especie de ARN separada en condiciones nativas pueden resultar múltiples bandas o un frotis. Por lo tanto, se prefiere la electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (p. ej., aldehídos, formamida, urea) para evaluar la integridad de ARN. El ARN total de un eucariota migrará en condiciones desnaturalizantes en forma de bandas definidas de ARN ribosómico (ARNr) 28S y 18S a una proporción de 2:1 y un frotis de ARN mensajero (ARNm) de aproximadamente 6 Kb a aproximadamente 0,5 kb. La banda ARNr 28S debe ser aproximadamente dos veces más intensa que la banda ARNr 18S; el frotis de ARNm debe ser más intenso entre 2,0 Kb y 1,5 Kb. Solamente se debe visualizar el frotis de ARNm para determinar ARN poliadenilado (poliA<sup>+</sup>). La densitometría de las bandas de ARNr puede cuantificar el grado de degradación. Alternativamente, el ARNm se puede someter a una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) con cebadores para amplificar una escala de productos de diferentes tamaños. Los productos más grandes se deben reducir antes que los productos más pequeños, ya que se espera que el ARN más largo se degrade más rápidamente que el ARN más corto.

El ARN extraído de tejido conservado de acuerdo con la presente invención se puede manipular mediante ingeniería genética y/o analizar. Por ejemplo, el ARN se puede amplificar mediante mecanismos conocidos (p. ej., transcripción directa por medio de una ARN polimerasa dependiente de ARN, transcripción del ADN de doble hebra que contiene un promotor reconocido por una ARN polimerasa dependiente de ADN, replicación mediante una replicasa dependiente de ARN). El ARN se puede someter a transcripción inversa a ADNc: el ADNc se puede amplificar después mediante mecanismos conocidos (p. ej., reacción en cadena de polimerasa o PCR, reacción en cadena de la ligasa o LCR, transcripción mediada por la transcripción o TMA, transcripción o replicación). Si se produce un ADN de doble cadena correspondiente al ARN, a continuación, ya sea el ARN o el ARNc se pueden transcribir utilizando promotores o cebadores en los extremos de un sustrato de ADN. La captura de ácido nucleico diana sobre un sustrato sólido es posible antes, durante, o después de la hibridación para localizar o concentrar el ARN, el ARNc o el ADN correspondiente.

La hibridación restrictiva es la base para la identificación específica de la secuencia de ácidos nucleicos. El ADN se puede detectar mediante transferencia de Southern; el ARN puede ser detectado mediante transferencia Northern. En disolución, el ADN o ARN se pueden detectar mediante protección con nucleasa. Los ácidos nucleicos se pueden separar y aislar hasta una pureza al menos parcial mediante cromatografía o electroforesis.

Se pueden utilizar análisis múltiplex para controlar la expresión de genes diferentes al mismo tiempo en paralelo. Tales análisis múltiplex se pueden realizar usando sondas complementarias al ácido nucleico diana (p. ej., ARN, ARNc o ADN correspondiente, ADN de una sola o cadena o doble) dispuesto sobre un sustrato (p. ej., cuentas, fibras, membranas, o chips). Se puede aplicar una sonda en una matriz o la sonda se puede sintetizar in situ sobre un sustrato plano; la sonda también se puede anclar a cuentas o fibras individuales como una biblioteca ordenada. Los métodos de disolución simultánea tales como la RT-PCR relativa en tiempo real, el análisis de protección con ribonucleasa multisonda o la amplificación de pares multicebadores asocian cada transcrito con una longitud diferente de un producto detectado que se resuelve mediante separación basándose en el peso molecular. Los perfiles de expresión génica o la identificación de secuencias se pueden realizar utilizando matrices o análisis en serie de tecnología de expresión génica (SAGE).

Las secuencias de aminoácidos podrían ser determinadas mediante degradación de Edman, electroforesis en gel o cromatografía, o espectrometría de masas (p. ej., ionización por desorción láser asistida por matriz o ionización por electropulverización acoplada a tiempo de vuelo; triple cuadrupolo, cuadrupolo-TOF, o detección mediante trampa de iones) de tejido conservado y/o almacenado. Las secuencias de nucleótidos se podrían determinar mediante procedimientos de Maxam-Gilbert, Sanger, o secuenciación mediante hibridación (SBH) realizados sobre ácidos nucleicos (o productos amplificados de los mismos) de tejido conservado y/o almacenado. Sin embargo, las técnicas antes mencionadas pueden detectar y/o identificar antígenos y ácidos nucleicos sin determinar necesariamente sus secuencias.

Los siguientes ejemplos demuestran la utilidad y corroboran la eficacia de la invención. En los ejemplos comparativos, se muestran las ventajas de la invención en comparación con la técnica anterior. Se pretende que estos ejemplos ilustren solamente la invención, y no se pretende que restrinjan o limiten de otro modo su práctica.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Extracción de ADN

Se extrajo el ADN a partir de secciones de tejido después de la conservación en diferentes disoluciones (p. ej., polietilenglicol 300 al 10% y metanol al 90%) utilizando un kit de aislamiento de ADN genómico AquaPure (Bio-Rad Laboratories) de la siguiente manera:

Se colocaron 20 mg de tejido de hígado de ratón recién picado o el mismo tejido conservado en PEG al 10%/metanol al 90% en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contenía 300 µl disolución de lisis. Se añadieron

1,5 µl de disolución de Proteinasa K (20 mg/ml) al producto lisado y se mezclaron mediante inversión seguido de incubación durante la noche a 55°C. Al producto lisado, se le añadieron 1,5 µl de disolución de ARNasa A (4 mg/ml), se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 60 min. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se añadieron 100 µl de disolución de precipitación de proteína. Las muestras se sometieron a vórtice durante 20 segundos y después se centrifugaron a 16.000 g durante 3 min. El sobrenadante que contenía ADN se transfirió a un tubo nuevo y se hizo precipitar con 300 µl de isopropanol al 100%. Las muestras se mezclaron y se centrifugaron a 16.000 g durante un minuto. El sedimento de ADN se lavó utilizando etanol al 70% seguido de secado al aire durante 15 min. El ADN se disolvió en 100 µl de disolución de hidratación de ADN y la concentración se determinó mediante espectrofotometría UV.

10 Se digirieron 10 mg de ADN utilizando las endonucleasas de restricción Taq I, EcoRI o BamHI. Se utilizaron cinco unidades de enzima por microgramo de ADN en la digestión durante la noche utilizando tampón para enzima de restricción apropiado en un volumen total de 200 µl. Se hicieron correr 20 µl sobre gel de agarosa al 0,8% para determinar si el ADN se había digerido. Resultados de ADN:

1. El tejido conservado proporcionó una cantidad de ADN similar a la del tejido fresco.

15 2. Cuando el tejido se conservó en formalina, se extrajo aproximadamente 30% menos de ADN en comparación con la extracción del tejido fresco o tejido conservado en PEG al 10%/metanol al 90%.

3. El ADN genómico extraído del tejido conservado en PEG al 10%/metanol al 90% pudo ser digerido con enzimas de restricción comunes y fue comparable en calidad al ADN de tejido fresco o fijado con formalina.

#### Ejemplo 2: Extracción de ARN

20 Se extrajo ARN de secciones de tejido después de su conservación en diferentes disoluciones (p. ej., polietilenglicol 300 al 10% y metanol al 90%) utilizando un kit de aislamiento de ARN Trizol (Gibco BRL) de la siguiente manera:

Se colocaron 50 mg de tejido fresco o el mismo tejido conservado en PEG al 10%/metanol al 90% en aproximadamente un ml de reactivo Trizol y se desorganizaron utilizando un homogeneizador Polytron. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se añadieron 0,2 ml de cloroformo seguido de mezclado a mano durante 15 segundos. Las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min a 5°C. La fase acuosa se retiró y se precipitó utilizando 0,5 ml de alcohol isopropílico. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se enfriaron a 5°C y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min. El sedimento de ARN se lavó en etanol al 70%, se secó al aire durante 15 min, y se disolvió en 100 µl de H<sub>2</sub>O libre de ribonucleasa. La cantidad de ARN extraído se determinó mediante espectrofotometría UV. Su calidad se evaluó mediante la separación del ARN sobre un gel de agarosa desnaturalizante y comparando las intensidades de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S.

#### Ejemplo 3: Detección de antígeno en secciones de tejido

Como se ilustra en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408, la inmunohistoquímica se puede realizar sobre secciones de tejido después haber procesado los tejidos frescos. En comparación, inmunohistoquímica se realizó después de la conservación en diferentes disoluciones (p. ej., polietilenglicol 300 al 10% y metanol al 90%) y después se procesó de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408. Los resultados se compararon con el tejido conservado procesado mediante métodos convencionales.

Se estudiaron leiomioma uterino, melanoma maligno, pielonefritis de riñón, e hígado normal. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: marcadores epiteliales (p. ej., citoqueratina de amplio espectro, citoqueratina 7, antígeno de la membrana epitelial); marcadores de melanocitos (p. ej., proteína S100, Melan A, tirosinasa, HMB-45); antígenos nucleares (p. ej., receptores de estrógeno y progesterona, Ki-67); antígenos de leucocitos (p. ej., CD45, CD68, CD31), marcadores musculares (p. ej., desmina, cladesmon, actina de músculo); marcadores endoteliales (p. ej., antígeno relacionado con el Factor VIII, CD31); y antígenos hepatocelulares y de células renales. Para todos los tejidos, los resultados de la inmunohistoquímica fueron similares a los de los fijadas en formalina, excepto por una reactividad más débil con el anticuerpo contra el antígeno hepatocelular.

Procedimiento inmunohistoquímico (las etapas 12 a 18 se llevaron a cabo en un aparato Dako Autostainer):

1. Las secciones en parafina se cortaron a 3 micras.

2. La parafina se fundió mediante la colocación de los portaobjetos en un horno a 58°C (o preferiblemente en un horno a 37°C) durante 30 min.

50 3. Se eliminó la cera de los portaobjetos en xileno durante 10 min.

4. Los portaobjetos se rehidrataron en una serie decreciente de disoluciones de etanol (es decir, dos baños de absoluto, dos baños de 95%, y un baño de 90%) durante un minuto cada uno.

5. La peroxidasa endógena se bloqueó con una disolución de peróxido de hidrógeno al 6% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 10 min.

6. Los portaobjetos se enjuagaron sumergiéndolos en agua del grifo durante un minuto.

7. Las rejillas de portaobjetos se colocaron en un baño de PBS sumergidas durante un minuto.

8. Preparar la recuperación diana (RD), añadiendo 20 ml de recuperación diana (DAKO S1699) más 180 ml de dH<sub>2</sub>O en una fuente de tinción de color verde. Añadir dH<sub>2</sub>O al vaporizador y abrir el vapor. Colocar la fuente de tinción que contiene la disolución de recuperación diana en el interior del vaporizador y dejar que se caliente durante 30 minutos. La disolución RD debe calentarse a 90°C.

9. Sacar la fuente de tinción del vaporizador y colocar los portaobjetos dentro de la fuente (utilizar guantes) y aplicar vapor de agua durante 20 minutos.

10. Después de aplicar el vapor, dejar que los portaobjetos se enfríen en el mismo recipiente durante 30 minutos.

11. Los portaobjetos se colocaron en tampón de PBS a temperatura ambiente (alternativamente, los portaobjetos se pueden almacenar en el tampón durante 2 min a 18 horas y después continuar la tinción).

12. Las secciones de tejido se incubaron con (a) una Disolución de Avidina (DAKO X0590) durante 10 min. A continuación, la Disolución de Avidina se aclaró y las secciones de tejido se incubaron con (b) Disolución de Biotina (DAKO X0590) durante 10 min. La Disolución de Biotina se debe lavar antes de la aplicación de la primera etapa del procedimiento de tinción.

13. Se añadió anticuerpo primario específico a cada portaobjetos y después se incubó durante 30 min en una cámara húmeda.

14. Los portaobjetos se devolvieron a la rejilla y la rejilla se sumergió en un baño de PBS durante 2 min. El exceso de PBS de cada portaobjetos se secó. Se añadió la disolución de unión (Dako LSAB + Kit, anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra biotinilados) y se incubó durante 25 min en una cámara húmeda.

15. Lo portaobjetos se devolvieron a la rejilla y la rejilla se sumergió en un baño de PBS durante 2 min.

16. El exceso de PBS de cada portaobjetos se secó. Se añadió el producto conjugado de estreptavidina-peroxidasa y se incubó durante 25 min en una cámara húmeda.

17. La rejilla se sumergió en un baño de PBS durante 2 min y a continuación se hicieron reaccionar los portaobjetos con cromógeno DAB (Dako K3468). Los portaobjetos se enjuagaron en PBS de nueva aportación durante 4 min.

18. Los portaobjetos se secaron y se contratiñeron con hematoxilina. NOTA: Para los antígenos nucleares, secar el exceso de PBS de los portaobjetos y aplicar sulfato cúprico al 1% durante 5 min. Los portaobjetos se enjuagaron con agua del grifo durante 2 min y a continuación se colocaron en Fast Green al 0,2% durante uno o un par de segundos.

19. Los portaobjetos se deshidrataron a través de una serie de disoluciones de alcohol y después se limpiaron en xileno y se cubrieron con un cubreobjetos.

#### Ejemplo 4: Comparación de composiciones químicas diferentes

Una composición preferida es una disolución no acuosa con polietilenglicol 300 al 10% (PEG) y metanol al 90%. Dada la necesidad de una composición conservante que sea apta de análisis tanto morfológicos como genéticos, debido a que la morfología y el ARN se conservan en la misma muestra de tejido, se evaluó una variedad de disoluciones para determinar su capacidad para conservar a temperatura ambiente tanto las características del tejido sólido fresco como su compatibilidad con el procesamiento de tejidos de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408 y los métodos convencionales.

El ARN se degradó completamente después de que el tejido fresco se pusiera en contacto durante 15 minutos, con formalina (es decir, formaldehído al 10% en un tampón acuoso), glutaraldehído, o metacam (es decir, metanol al 60%, cloroformo al 30%, y ácido acético al 10%). Después de la fijación del tejido fresco en isopropanol (45%, 55% o 100%) durante una hora, el ARN se degradó parcialmente. El tejido fresco fijado durante 24 horas en acetona o etanol contenía ARN, pero produjo resultados inconsistentes. Por otro lado, el ARN se protegió de la degradación durante hasta tres semanas a temperatura ambiente si el tejido fresco había estado en contacto con PEG o metanol.

La morfología del tejido fresco conservado en PEG al 10% y metanol al 90% tuvo de la misma calidad que el tejido fijado con formalina. Del un modo similar, la inmunohistoquímica llevada a cabo sobre tejido fresco conservado en PEG al 10% y metanol al 90% tuvo la misma calidad que el tejido fijado con formalina. La morfología se mantuvo durante al menos siete días a temperatura ambiente. El ARN se protegió a temperatura ambiente durante hasta tres semanas; ARN se protegido a 4°C durante al menos tres semanas; ARN se protegido a 37C durante al menos tres días.

Tabla 1. Conservación de ARN a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C)

Tiempo de conservación		15 min	1 hr	4 hr	8 hr	24 hr	48 hr	1 sem	2 sem	3 sem
1	PEG	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2	Metanol	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3	Etanol*	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4	Acetona*	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5	Xileno	++	+	0	0	0	0	0	0	0
6	Isopropanol	++	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Isopropanol al 55%	++	0	0	0	0	0	0	0	0
8	isopropanol al 40%	++	0	0	0	0	0	0	0	0
9	formalina al 10%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Cloroformo	+	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Glutaraldehído	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	Metacam	0	0	0	0	0	0	0	0	0
++ Sin degradación de bandas de ARN ribosómico 28S y 18S + Degradación de bandas de ARN ribosómico 28S y 18S y/o intensidad de la banda inferior 0 No hay bandas * Resultados inconsistentes, quizá debido al contenido de agua del tejido										

Para la conservación de un tejido, la concentración de polietilenglicol 300 (PEG) está entre 10% y 15% y la concentración de metanol (MeOH) está entre 85% y 90%. Aquí, el tejido (p. ej., riñón, hígado, piel, útero) se puso en contacto con la disolución a aproximadamente 25°C durante una hora a siete días. El mantenimiento de la morfología (HISTO) se evaluó después del procesamiento convencional del tejido (TissueTek programado como se muestra en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408) o el procesamiento de tejido de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408; mientras la protección de ARN (ARN) se evaluó después del procesamiento del tejido de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408. El tejido se procesó manualmente para evitar la contaminación con ribonucleasa u otras enzimas degradativas. La histomorfología satisfactorio se indicada por (+) y la morfología subóptima (es decir, la fragmentación de la sección, tinción irregular cono colorante, la variabilidad en inmunohistoquímica) se indica por (+/-). La calidad del ARN se indica por ++, + y 0 (véase la leyenda de la Tabla 1).

Tabla 2. Concentraciones variables de PEG y metanol

Tiempo de conservación			1 hr		24 hr		72 hr		1 sem	
	PEG	MeOH	ARN	HISTO	ARN	HISTO	ARN	HISTO	ARN	HISTO
A	0	100	++	(+/-)	++	(+)	++	(+)	++	(+)
B	10	90	++	(+)	++	(+)	++	(+)	++	(+)
C	20	80	++	(+)	++	(+)	+	(+)	++	(+)
D	30	70	++	(+)	+	(+)	0	(+)	0	(+)
E	40	60	+	(+)	+	(+)	0	(+)	0	(+)
F	50	50	+	(+/-)	+	(+)	0	(+)	0	(+)

Tanto la Tabla 2 como la Figura 1 muestran que PEG al 10% y metanol al 90% proporcionan una composición que conserva tanto la morfología como el ARN. La razón entre las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S, así como el frotis de ARNm de elevado peso molecular, confirmaron la calidad del ARN extraído. Una composición de metanol sola conservó el ARN, pero el endurecimiento del tejido por el contacto con metanol al 100% durante un largo período de tiempo fue un obstáculo para el análisis histológico. En el otro extremo, las altas concentraciones de PEG conservaron el ARN pero no conservaron la morfología. Las composiciones de la invención, sin embargo, conservaron tanto la morfología como el contenido de ARN de los tejidos.

La conservación de tejidos con composiciones de la invención no requirió una temperatura reducida. La conservación y el almacenamiento fueron posibles a temperatura ambiente (p. ej., aproximadamente 25°C). Por lo tanto, las no son necesarias instalaciones de refrigeración o congelación durante el transporte o el almacenamiento de los especímenes de tejido.

#### 5 Ejemplo 5: Comparación con RNAlater

El RNAlater (Ambion) ha sido descrito por Florell et al. como conservante "tanto de la integridad del tejido para el diagnóstico patológico, como del ARN para análisis moleculares" (Mod. Pathol., 14:116-128, 2001). Aunque la composición química de RNAlater es diferente de la de la invención, se utilizaron el procesamiento convencional de tejidos o el procesamiento de tejidos de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.207.408 para determinar si se conservaba la morfología.

Se conservó hígado de ratón en PEG al 10% y metanol al 90% o RNAlater durante 48 horas, 72 horas o una semana. La Figura 2 muestra que si bien se conservó la morfología en el tejido incubado en PEG al 10% y metanol al 90%, el RNAlater no conservó la morfología a temperatura ambiente. Después de solo 48 horas de incubación de tejido en RNAlater a aproximadamente 25°C, se produjo una disgregación de la membrana nuclear y una condensación de la cromatina nuclear. Hubo una pérdida progresiva de características morfológicas en la incubación prolongada en RNAlater. Sin embargo, la incubación del tejido en PEG al 10% y metanol al 90% a temperatura ambiente conservó las características morfológicas consistentemente durante al menos tres semanas.

#### Ejemplo 6: Estudios de tejidos ratón y humano

En este estudio se utilizaron muestras tanto de ratón como de ser humano. En la fase inicial, se utilizó tejido de hígado de ratón para determinar el efecto de UMFIX (es decir, polietilenglicol 300 al 10% y metanol al 90%) sobre las macromoléculas. El hígado de ratón se extirpó de ratones hembra C57BL/6 de tres meses de edad. Se sumergieron inmediatamente cubos de tejido que pesaban aproximadamente 50 mg en UMFIX o formalina tamponada con fosfato al 10%. Se congelaron instantáneamente cubos de tamaño similar en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -75°C para que sirvieran como especímenes de control.

En la última fase del estudio, se utilizaron tejidos humanos, tanto para análisis moleculares como para la determinación del efecto de UMFIX sobre la histomorfología, así como sobre las propiedades histoquímicas e inmunohistoquímicas. Se recogieron tejidos humanos (p. ej., suprarrenal, mama, colon, ojo, esófago, riñón, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, músculo esquelético, páncreas, paratiroides, parótida, próstata, piel, intestino delgado, bazo, tiroides, amígdala, y útero) de uno a treinta minutos después de la cirugía en la Universidad de Miami, Jackson Memorial Medical Center. Las muestras representativas se tomaron principalmente de los especímenes extirpados quirúrgicamente, grandes. Los especímenes quirúrgicos principales se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% y se procesaron durante la noche utilizando técnicas convencionales. Se fijaron bloques de tejido paralelos en UMFIX y formalina tamponada neutra al 10%, y se procesaron de acuerdo con una técnica de procesamiento rápido en condiciones libres de ARNasa controladas (Morales et al. Arch. Pathol. Lab. Med. 126:583-590, 2002). Las secciones adyacentes también se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los tejidos de ratón y humanos se almacenaron en UMFIX tanto a 4°C como a la temperatura ambiente (22°C) durante períodos de tiempo que oscilaban de una hora a ocho semanas.

#### PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real

La PCR se llevó a cabo utilizando cebadores G3PDH de ratón (Clontech, Palo Alto, CA) utilizando 0,5 µg de ADN aislado tratado con ARNasa y Qiagen Taq PCR Mastermix (Qiagen, Valencia, CA). Alternativamente, se utilizó el mismo cebador con Qiagen Quantitect Cybergreen Mastermix y un iCycler de Bio-Rad (Hercules, CA). Las condiciones para la PCR del ADN fueron: 95°C durante 15 min; 35 ciclos a 94°C durante 45 seg, 60°C durante 45 seg, 72°C durante dos minutos; y mantenimiento durante 7 min a 72°C. Además, se utilizaron cebadores G3PDH de ratón (Biosource, Camarillo, CA) con 0,5 µg de ARN tratado con ADNasa para la RT-PCR en tiempo real utilizando Qiagen Quantitect Cybergreen Mastermix o Qiagen Quantitect Probe Mastermix en un Bio-Rad iCycler. Las condiciones para la PCR fueron una transcripción inversa inicial durante 30 min a 50°C seguida de activación con Taq a 95°C durante 20 min seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min.

#### Perfiles de expresión

El ARN total se extrajo a partir de tejidos tratados con UMFIX antes y después del procesamiento y la inclusión en parafina, y después se utilizó para micromatrices de ADNc basas en nailon de genes relacionados con la apoptosis (SA-002-12, Superarray, Bethesda, MD) siguiendo el protocolo del fabricante. Los resultados densitométricos de rayos X se obtuvieron con un Chemimager 5500 Gel Documentation System (Alpha Innotech, San Leandro, CA). Los datos se analizaron utilizando el programa Génesis (Génesis, Graz, Austria). El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa Statistica (StatSoft, Tulsa, OK).

## Aislamiento y detección de proteínas (Transferencia Western)

La proteína total se extrajo utilizando un protocolo convencional. En resumen, las muestras de hígado de ratón se homogeneizaron en 20 µl de reactivo T-PER por mg de tejido (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La concentración de proteínas se midió utilizando un análisis de proteínas Coomassie (Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como patrón. Para los geles 2D, se utilizó un extracto de proteína de acuerdo con las instrucciones del kit ReadyPrep™ 2-D Starter (Bio-Rad). En resumen, se incubaron tiras de 11,0 cm de IPG (pH 3-10) durante la noche a temperatura ambiente con 250 µg de proteína en 185 µl de tampón de rehidratación que contenía 10 ml de urea 8 M, CHAPS al 2%, ditiotretitol 50 mM (0,2% p/v), anfolitos Bio-Lyte® 3/10 y azul de bromofenol. Las tiras rehidratadas se transfirieron después a una Immuno-electrophoresis Focusing Chamber (Bio-Rad) y se ejecutaron de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (5,3 horas a 30.000 volt/h). Después las tiras se equilibraron 10 min en una mezcla de urea 6 M, SDS al 2%, Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), glicerol al 20%, y DTT al 2% (p/v), y después 10 minutos en el mismo tampón sin DTT pero con yodoacetamida añadida. Las tiras se pusieron a continuación sobre Geles Criterion de 11,0 cm y se sometieron a electroforesis en el Criterion System (Bio-Rad) a V<sub>1</sub> 200 constante durante 65 min utilizando tampón de migración 1X Tris/glicina/SDS. Los geles se lavaron a continuación en metanol al 10% y ácido acético al 7% durante 30 min y se tiñeron durante la noche utilizando colorante Sypro-Rubi Protein (Bio-Rad). Después de un lavado de 10 min en metanol al 10% y ácido acético al 7%, los geles se enjuagaron en ddH<sub>2</sub>O y se analizaron utilizando un Chemimager 5500 Gel Documentation System (Alpha Innotech) equipado con una cámara CCD. Las imágenes tiff se analizaron para determinar el emparejamiento de manchas automático utilizando el programa PDQuest (Bio-Rad). Alternativamente, la proteína se aisló homogeneizando el tejido y añadiendo 4,1 ml de tampón de lisis hirviendo (Tris 10 mM, pH 7,4, ortovanadato de sodio 1 mM, SDS al 1%) durante 15-20 seg. A continuación, se añadieron 0,9 ml de 6X tampón para muestra de electroforesis (Tris 360 mM, pH 6,8, DTT 600 mM, SDS al 12%, glicerol al 60%, azul de bromofenol al 0,018%) y se mezclaron bien. Las muestras se calentaron de nuevo a 95°C durante 30 segundos en un bloque térmico.

La transferencia de Western se realizó por medio de un Becton Dickinson Powerblot Service. Los anticuerpos se seleccionaron basándose en su actividad para unirse a proteínas de diferentes localizaciones celulares y diferentes pesos moleculares. Los anticuerpos eran contra caveolina 1, caseína quinasa II alfa, beta-catenina, Bcl-2, Adaptina beta, GDNFR-alfa, PKC alfa, PAF53, NF-kappa B (p65), fosfolipasa C gamma (BD, Lexington, KY). Para el estudio de la conservación de la fosforilación de la proteína fosforilada, se seleccionaron cinco proteínas (caveolina, ERK1, GSK-3 beta, p38 alfa/SAPK2a, Stat1). Se utilizaron anticuerpos contra los estados nativos y fosforilados de estas cinco proteínas. Además, se ejecutaron otros 13 anticuerpos como control. En resumen, se cargaron 66 µg de proteína en cada pocillo a lo largo de toda la anchura de la SDS-PAGE de gradiente 4-15% (Bio-Rad Criterion IPG Well Comb). El gel se ejecutó durante 1,5 horas a 150 V y después se transfirió a membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) durante 2 horas a 200 mA utilizando un aparato de transferencia electroforética en húmedo Hoefer TE (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Después de la transferencia la membrana se sumergió durante una hora con tampón de bloqueo de gelatina. A continuación, la membrana se sujetó con un colector de transferencia Western que aísla 40 canales a través de la membrana. En cada canal, se añadió una mezcla de anticuerpo primario y se incubó durante 1 hora a 37°C. La transferencia se retiró del colector, se lavó y se incubó durante 45 min a 37°C con anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón de cabra conjugado con colorante fluorescente Alexa680 (Molecular Probes, Eugene, Oregón). La membrana se lavo, se seca, y se escaneó utilizando el Odyssey Infrared Imaging System (LICOR, Lincoln, NE).

## Resultados

La calidad y la cantidad del ARN de hígado de ratón extraído de los tejidos congelados y conservados con UMFIX fueron comparables, mientras que los tejidos fijados con formalina produjeron un ARN significativamente degradado como se indica por la ausencia de bandas de ARN ribosómico 28S y 18S, como se ha mostrado anteriormente. Aunque el ARN extraído a partir de tejido fijado con formalina estaba significativamente degradado, se pudo utilizar para amplificar productos pequeños mediante RT-PCR. Pero se necesitó significativamente más ARN de tejido hepático fijado durante una o 24 h en formalina para la RT-PCR cuantitativa en comparación con el ARN de hígado de ratón fresco o de tejido hepático expuesto a UMFIX durante una o 24 hr. Como se mostró con el ADN extraído de tejido, la calidad del ARN no cambió sustancialmente por una exposición más larga a UMFIX pero fue significativamente diferente para un tiempo más largo de la fijación con formalina. Después de un día en UMFIX, el ARN de alto peso molecular se extrajo de 25/35 muestras. Se logró un éxito similar después de 2 a 7 días (19/22 muestras) y de 8 a 30 días (16/18 muestras).

El tejido hepático conservado en UMFIX endurecido e impregnado por la técnica de procesamiento rápido en condiciones sin ARNasa controladas e incluido en parafina produjo un ARN intacto comparable al del tejido congelado fresco. Esto se confirmó observando la razón entre las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S en la electroforesis en gel de agarosa, así como utilizando un Agilent RNA 6000 Nanochip para la cuantificación. Además, el tejido humano (p. ej., carcinoma metastásico cerebral) que se había expuesto a UMFIX, procesado mediante la técnica de procesamiento rápido, e incluido en parafina produjo ARN no degradado después de un día, cuatro semanas y ocho semanas de almacenamiento a temperatura ambiente. Los perfiles de expresión del ARN extraído de muestras frescas y tejidos conservados con UMFIX e incluidos en parafina después de un día, cuatro semanas y ocho semanas de almacenamiento a temperatura ambiente mostraron patrones e intensidades comparables para 94 genes relacionados con la apoptosis. Los niveles de expresión utilizando una micromatriz de ADNc fueron similares

en diferentes momentos después del procesamiento hasta 8 semanas (coeficiente de Pearson  $r > 0,85$ ,  $p < 0,05$ ). La pequeña diferencia entre los resultados se atribuyó a la heterogeneidad del tejido.

El hígado de ratón conservado en UMFIX durante una hora reveló un patrón en el gel bidimensional de manchas de proteínas idéntico al obtenido con las muestras frescas. En contraste con las manchas distintivas observadas con las muestras conservadas con UMFIX, los extractos de proteína de tejido fijado con formalina produjeron un frotis sin ninguna mancha distintiva. Por otra parte, no se pudo observar similitud entre las muestras frescas y las muestras expuestas a formalina mediante el programa PDQuest, a pesar de relajar los criterios de coincidencia. La evaluación del número y la localización de las manchas en los geles ayudada por el programa PDQuest mostró una homología considerable entre las muestras con UMFIX y los extractos de proteínas del tejido fresco. Los mismos descubrimientos se observaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE); se observaron bandas distintivas con las muestras frescas y conservadas UMFIX mientras que las muestras fijadas con formalina produjeron un frotis borroso. De un modo similar, las transferencias Western de PAGE mostraron fuertes bandas distintivas para las muestras conservadas con UMFIX en comparación con las muestras fijadas con formalina. Los anticuerpos se eligieron basándose en su peso molecular y su localización celular. Los 10 anticuerpos sometidos a ensayo y los 12 de control reaccionaron con las muestras fijadas durante 1 hora en UMFIX: 20 de esos anticuerpos también tuvieron bandas fuertes detectables en las muestras fijadas hasta 24 hr. Por el contrario, solo seis fueron anticuerpos reactivos en muestras fijadas en formalina, con una intensidad considerablemente inferior.

De las cinco proteínas seleccionadas para los estudios de fosforilación, los resultados de la transferencia Western fueron similares entre las muestras frescas y conservadas con UMFIX durante una hora. Dos de las proteínas se perdieron después de 24 horas de fijación. En las muestras fijadas con formalina, se detectaron solo una muestra nativa y una fosforilada en una hora y no se obtuvieron resultados de las muestras tratadas 24 h.

Todas las modificaciones y sustituciones que caigan dentro del significado de las reivindicaciones y el intervalo de sus equivalentes legales han de incluirse dentro de su alcance. Una reivindicación que utiliza la transición "que comprende" permite la inclusión de otros elementos que están dentro del alcance de la reivindicación; la invención también se describe mediante tales reivindicaciones usando la frase de transición "que consiste esencialmente en" (es decir, que permite la inclusión de otros elementos que están dentro del alcance de la reivindicación si no afectan materialmente al funcionamiento de la invención) y la transición "que consiste" (es decir, que permite solamente los elementos enumerados en la reivindicación distintos de impurezas o actividades irrelevantes que se asocian normalmente con la invención) en lugar del término "que comprende". Cualquiera de las tres transiciones se puede utilizar para reivindicar la invención.

Se debe entender que un elemento descrito en esta memoria descriptiva no debe interpretarse como una limitación de la invención reivindicada a menos que se cite explícitamente en las reivindicaciones. Por lo tanto, las reivindicaciones son la base para determinar el alcance de la protección legal concedida en lugar de una limitación de la memoria descriptiva que se lee en las reivindicaciones.

Por otra parte, no se pretende ninguna relación especial entre dos o más limitaciones de una reivindicación a menos que dicha relación se cite de manera explícita en la reivindicación (p. ej., la disposición de los componentes en una reivindicación del producto o el orden de las etapas en una reivindicación del método no son una limitación de la reivindicación a menos que se establezca de ese modo explícitamente).

Las realizaciones descritas deben considerarse solo como ilustrativas, no restrictivas, puesto que el alcance de la protección legal proporcionada para la invención estará indicada por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por esta memoria descriptiva.

# REIVINDICACIONES

1. Una composición para la conservación y/o el almacenamiento de un tejido, en donde el tejido comprende antígeno y ácido nucleico, para mantener la morfología para la histología, en donde la composición es una disolución no acuosa que comprende polietilenglicol (PEG) al 10-15% y metanol al 85-90%; en donde el PEG tiene un peso molecular menor de 600 daltons.
2. La composición de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la disolución no acuosa consiste en polietilenglicol (PEG) al 10-15% y metanol al 85-90%.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la disolución no acuosa comprende polietilenglicol (PEG) a aproximadamente 10% y metanol a aproximadamente 90%.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la disolución no acuosa consiste en polietilenglicol (PEG) a aproximadamente 10% y metanol a aproximadamente 90%.
5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el PEG tiene un peso molecular de 400 daltons o menos.
6. El uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para conservar y/o almacenar al menos un tejido.
7. Un método para elaborar la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende mezclar PEG y metanol.
8. Un soporte de tejido que contiene la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y adaptado para contener al menos un tejido.
9. Un método de conservación de un tejido que comprende poner en contacto al menos el tejido con la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
10. Un método de almacenamiento de tejido que comprende poner en contacto tejido conservado al menos parcialmente con la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
11. Un método de procesamiento de tejido conservado y/o almacenado utilizando la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el análisis genético que comprende extraer ácido nucleico de al menos una porción del tejido.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el ácido nucleico es ARN.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el ácido nucleico es ADN.
14. Un método de procesamiento de tejido conservado y/o almacenado con la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para análisis inmunológico que comprende extraer antígeno de al menos una porción del tejido.

Fig. 1A

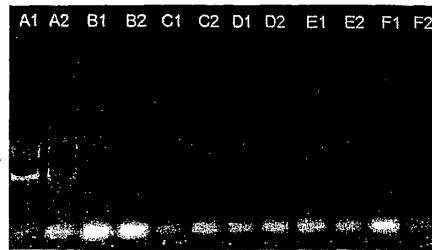


Fig. 1B



Fig. 2A

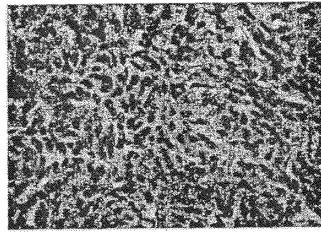


Fig. 2B

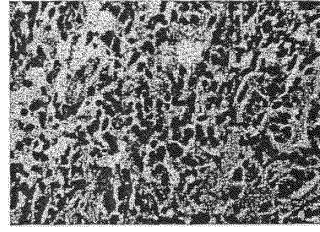


Fig. 2C

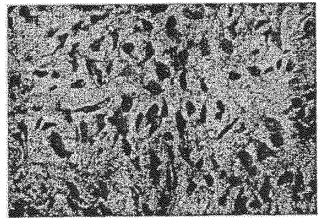


Fig. 2D

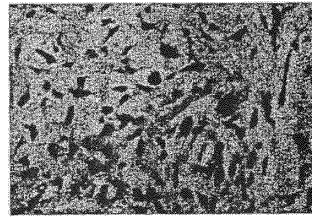


Fig. 2E

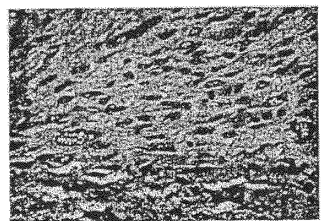


Fig. 2F

