

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 047**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/30** (2006.01)

**G01N 1/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2005 E 05824805 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1825246**

54 Título: **Método para la desparafinación de una muestra tisular a base de una microemulsión**

30 Prioridad:

**17.12.2004 US 636942 P**

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

**04.05.2015**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1910 E. INNOVATION PARK DRIVE  
TUCSON, ARIZONA 85755, US**

72 Inventor/es:

**KRAM, BRIAN;  
BIENIARZ, CHRISTOPHER y  
DRUMHELLER, PAUL D.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 535 047 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).

## DESCRIPCION

Método para la desparafinación de una muestra tisular a base de una microemulsión

Campo técnico

5 Las invenciones aquí descritas se dirigen al campo general de la patología anatómica, y en particular a la preparación de muestras biológicas, especialmente secciones tisulares, para la posterior tinción con composiciones químicas, inmunohistoquímicas o a base de hibridación *in situ*. Los métodos de preparación de tejidos y las composiciones permiten una desparafinación innovadora y un intercambio de fluidos dentro de los tejidos, preparándolos para una tinción posterior o potencialmente simultánea.

10 Fundamento de la invención

El análisis de muestras tisulares biológicas es una valiosa herramienta diagnóstica utilizada por los patólogos para diagnosticar muchas enfermedades como el cáncer y las enfermedades infecciosas, así como por el investigador médico para obtener información acerca de la estructura celular.

15 Para obtener información de una muestra tisular biológica normalmente es necesario realizar una serie de operaciones preliminares para preparar la muestra para el análisis. Mientras que existen muchas variaciones de los procedimientos para preparar las muestras tisulares, estas variaciones se pueden considerar refinamientos para adaptar el proceso a tejidos individuales o porque una técnica en particular se adapta mejor a la hora de identificar una sustancia química específica o un marcador biológico en la muestra tisular. Sin embargo, las técnicas de preparación básicas son esencialmente las mismas. Las muestras de tejido biológico pueden derivar de tejidos sólidos como de una biopsia tisular o bien pueden derivar de preparados a base de líquido de las suspensiones celulares como de un estudio citológico (por ejemplo, prueba de Papanicolau), de la médula ósea o de una suspensión celular.

25 Normalmente dichos procedimientos pueden incluir el tratamiento del tejido mediante su fijación, deshidratación, infiltración e impregnación en cera de parafina; la colocación del tejido sobre un portaobjetos de vidrio y luego la tinción de la muestra; el etiquetado del tejido mediante la detección de diversos constituyentes; el análisis de las secciones tisulares por medio de un microscopio electrónico o bien el crecimiento de células en placas de cultivo.

30 Dependiendo del análisis o de las pruebas que se vayan a efectuar, una muestra puede someterse a una serie de etapas o pasos preliminares o bien tratamientos o procedimientos antes de estar lista para analizar su contenido. Normalmente los procedimientos son complejos y requieren tiempo, e implican varias etapas sucesivas donde se utilizan materiales caros y/o tóxicos.

35 Por ejemplo, una muestra de tejido típica puede someterse a un examen microscópico óptico de manera que se pueda determinar la relación de las diversas células, unas con otras, o bien se puedan destapar posibles anomalías. Por tanto, la muestra tisular debe ser una tira extremadamente fina de tejido de manera que la luz pueda ser transmitida a través de ella. El grosor medio de la muestra tisular o del corte (al que a menudo se conoce como "sección") es aproximadamente de 2 a 10 micrómetros (1 micrómetro = 1/1000 de un milímetro). Normalmente, una muestra tisular está congelada o bien fijada a un material (un fijador), que no solamente mantiene la estructura celular sino que además interrumpe cualquier otra acción enzimática que pudiera dar lugar a la putrefacción o autólisis del tejido.

45 Después de la fijación la muestra tisular es deshidratada al retirar el agua de la muestra mediante el uso de fuertes concentraciones de alcohol miscible en agua, en particular etanol. Luego el alcohol es reemplazado por un material químico, normalmente un material no polar, que se mezcla con la cera de parafina o con alguna otra sustancia plástica impregnante que puede penetrar en la muestra tisular y darle una consistencia adecuada para la preparación de secciones finas sin que se produzca una desintegración o división. El proceso de retirar el agua o las soluciones acuosas, y sustituirla por un material no polar, como un disolvente orgánico no polar, se denomina "intercambio de solvente" porque implica la exposición secuencial del tejido a las soluciones de solvente de diversas proporciones de agua/alcohol/solvente orgánico no polar hasta que el agua del tejido es intercambiada por otro fluido (o en caso de tejido impregnado, una cera de parafina semisólida conocida frecuentemente como parafina). El intercambio de solvente se puede utilizar en otra dirección, es decir, es un proceso bidireccional; al igual que el proceso de retirada del agua y de su sustitución por un material no polar, y el proceso de retirada de material no polar y su sustitución por agua.

60 Luego se utiliza un micrótopo para realizar cortes finos de la muestra tisular impregnada de parafina. Los cortes pueden ser de 5 a 6 micrómetros de grosor mientras que el diámetro puede ser del orden de 5000 a 20000 micras. Las secciones cortadas se sumergen en un baño de agua para ablandarlas. Luego la sección se coloca sobre un portaobjetos de vidrio que suele medir unos 2,5 por 8 centímetros (1x3 pulgadas).

Mediante el intercambio de solvente se retira luego la cera de parafina o el impregnante, por ejemplo, exponiendo la muestra a un solvente de parafina como el xileno, tolueno o limoneno, retirando el solvente mediante alcohol, y retirando el alcohol mediante mezclas secuenciales de alcohol/agua o bien reduciendo las concentraciones alcohólicas, hasta que eventualmente el tejido sea de nuevo infiltrado por agua o soluciones acuosas. La infiltración de la muestra por agua permite la tinción de los constituyentes celulares mediante colorantes químicos e inmunoquímicos. Este proceso se conoce como proceso de desparafinación.

En los últimos años han mejorado ciertas etapas del proceso de desparafinación. Los disolventes tóxicos de parafina como el xileno o el tolueno son ahora sustituibles por solventes orgánicos no polares menos tóxicos como el aceite de terpeno (por ej. AmeriClear™ Baxter Healthcare Diagnostics, McGaw Park, IL), los hidrocarburos isoparafínicos como el MicroClear™ de Micron Diagnostics of Fairfax, VA, y el histoleno, un eliminador de parafina que es 96% d-limoneno (Fronine Pty Ltd, Riverstone, New South Wales, Australia). Han aparecido también métodos automatizados nuevos. Por ejemplo, Ventana Medical Systems. La patente americana nr. 6544798 describe un método automatizado para eliminar cera de parafina de las secciones tisulares usando solamente agua caliente con tensoactivo. El proceso se basa en la división física de la parafina licuada del tejido teniendo en cuenta la inmiscibilidad de la parafina licuada y el agua caliente. El proceso se utiliza ampliamente en la serie BENCHMARK® de pigmentos de tejido automatizados. Un método afín basado en el agua y en un tensoactivo emulsionante se conoce de la patente americana nr. 6649368.

La patente americana 6632598(Zhang y cols.) describe métodos y composiciones para desparafinar el tejido impregnado de parafina. El método implica poner en contacto la muestra impregnada de cera con una composición que elimina la parafina para solubilizar la cera que impregna la muestra antes del análisis histoquímico. Las composiciones que eliminan la parafina incluyen específicamente un solvente orgánico solubilizante de la parafina elegido del grupo formado por hidrocarburos aromáticos, terpenos e hidrocarburos isoparafínicos, un solvente orgánico polar, y un tensoactivo para solubilizar la cera asociada a la muestra. Las composiciones pueden comprender además agua. Una ventaja citada de las composiciones es que no requieren xileno, tolueno o disolventes de parafina no deseables. Sin embargo, las composiciones reales requieren todas, grandes cantidades de solvente polar orgánico, habitualmente un alcohol miscible en agua.

Existe la necesidad de unos mejores procesos de preparación de los tejidos que no requieran sustancias químicas tóxicas o peligrosas, y métodos que reduzcan el tiempo y las etapas implicadas en el tratamiento de muestras tisulares para hacerlas aceptables para los procedimientos de tinción del tejido.

#### Finalidad de la invención

La invención se dirige a un procedimiento de eliminación de un medio impregnado en parafina de una muestra biológica impregnada en parafina, que consiste en poner en contacto la muestra biológica impregnada de parafina con un tensoactivo que consta de una microemulsión desparafinante, un solvente orgánico no polar y agua, donde el tensoactivo es soluble tanto en agua como en el solvente orgánico no polar. Se transfiere con ello la parafina a la microemulsión y se elimina la microemulsión. Es preferible que el tensoactivo sea soluble individualmente tanto en el solvente orgánico no polar como en el agua.

#### Modos de llevar a cabo la invención

La invención se dirige a un procedimiento de eliminación de un medio impregnado en parafina de una muestra biológica impregnada en parafina, que consiste en poner en contacto la muestra biológica impregnada de parafina con un tensoactivo que consta de una microemulsión desparafinante, un solvente orgánico no polar y agua, donde el tensoactivo es soluble tanto en agua como en el solvente orgánico no polar. Se transfiere con ello la parafina a la microemulsión y se elimina la microemulsión. La composición de la microemulsión es una composición ternaria de tensoactivo, solvente orgánico no polar y agua. Se prefieren los tensoactivos no iónicos ya que no complican los posteriores procedimientos de tinción que utilizan colorantes iónicos. Una composición preferida equivale a 4:1:1 de tensoactivo: aceite: agua en peso.

A la etapa desparafinante puede seguir una etapa de intercambio de solventes. Sin embargo, la etapa de intercambio de solventes no es parte de la presente invención.

Normalmente una "microemulsión" está compuesta de aceite, agua, tensoactivo y co-tensoactivo. <sup>1-5</sup>Hoar y Schulman<sup>6</sup> fueron los primeros en introducir la palabra microemulsión, que ellos definían como una solución transparente obtenida al analizar una emulsión normal con alcoholes de cadena media. Los alcoholes de cadena corta a media se consideran generalmente co-tensoactivos en el sistema de la microemulsión. La presencia de tensoactivo y opcionalmente co-tensoactivo en el sistema hace que la tensión interfacial sea muy baja. Por lo tanto, la microemulsión es termodinámicamente estable y se forma de manera espontánea, con un diámetro de gota medio de 1 a 100µm<sup>7-9</sup>. Una "microemulsión de aceite en agua" es una microemulsión en la cual la concentración de agua excede la concentración de aceite sobre una base molar. Una "microemulsión desparafinante" es un subgrupo especial que comprende un sistema de aceite en agua que tiene una cantidad sustancial de tensoactivo estabilizante. El componente oleico de una microemulsión desparafinante es un solvente de parafina, lo que significa

que cuando la microemulsión entra en contacto con la parafina en una muestra biológica impregnada de parafina, la parafina es solubilizada por el aceite. En general se hace referencia al aceite como un solvente orgánico no polar, pero los términos se utilizan de forma intercambiable.

5 Una "composición intercambiable" es una composición de tensoactivo: agua, tensoactivo: aceite, o tensoactivo:aceite:agua, que consta opcionalmente de un co-tensoactivo capaz de eliminar el solvente orgánico no polar residual del portaobjetos desparafinado. Las composiciones preferidas de tensoactivo: agua equivalen aproximadamente a un 20% en peso de detergente no iónico en agua, como el Tomadol 1-73B (Tomah Inc., Milton, Wisconsin) y Tergitol 15-S-7(SigmaAldrich Inc., St. Louis, Missouri).

10 Otras composiciones de intercambio a base de tensoactivo: aceite tienen la capacidad de intercambiar el aceite por agua, o el agua por aceite. Varias composiciones se muestran en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Composición	Tipo de tensoactivo, cantidad	Cantidad de aceite
1	Tomadol 1-73B(4 gramos)	NORPAR15 (1 gramo)
2	Colamulse FE(4 gramos)	NORPAR15 (1 gramo)
3	Tomadol 1-5(4 gramos)	NORPAR15 (1 gramo)
4	Tomadol 91-6(4 gramos)	NORPAR15 (1 gramo)
5	Tergitol 15-S-7(4 gramos)	NORPAR15 (1 gramo)

15 Las composiciones de intercambio permiten un método de intercambio de aceite por agua en una muestra tisular que básicamente contiene aceite, que consiste en poner en contacto la muestra tisular con una composición de intercambio que comprende un tensoactivo en aceite, donde el tensoactivo es también soluble en agua. Sorprendentemente, las composiciones 1-5 también se utilizan de forma invertida, es decir, para intercambiar agua por aceite en una muestra tisular que predominantemente contiene agua.

20 Las muestras biológicas incluyen cualquier sección tisular, línea celular artificial impregnada en parafina, parafina/agar o bien otro medio a base de parafina. Los medios impregnados a base de parafina son bien conocidos por los expertos en histotecnología.

25 Se lleva a cabo una "prueba de solubilidad" con el objetivo de determinar la solubilidad del tensoactivo en solvente orgánico no polar añadiendo unos 0,5 gramos de tensoactivo a aproximadamente 10 gramos de solvente no polar y mezclando o agitando bien la mezcla durante unos 10 a 30 segundos; una mezcla transparente o translúcida indica miscibilidad mutua. Una "prueba de solubilidad" con el objetivo de determinar la solubilidad del tensoactivo en agua se realiza añadiendo unos 0,5 g de tensoactivo a unos 10 g de agua y mezclando o agitando bien la mezcla durante unos 10 a 30 segundos; una mezcla transparente o translúcida indica miscibilidad mutua. La viscosidad de las mezclas puede aumentar pero no afectar su claridad visual. La prueba de solubilidad se debería realizar a la temperatura de trabajo del proceso desparafinizante previsto, alrededor de unos 15 a 50°C. La solubilidad mutua del tensoactivo tanto en agua como en aceite se indica por medio de estas pruebas.

30 Un "solvente orgánico no polar" es un hidrocarburo no polar o una mezcla de hidrocarburos (por ejemplo, la obtenida de un destilado de petróleo) que tiene un punto de ebullición muy superior a la temperatura de 25°C, preferiblemente por encima de los 110°C, más preferiblemente entre 140°C y unos 250°C, es decir en fase líquida a las temperaturas empleadas con la presente invención (en general de 15 a 50°C) y que es capaz de disolver la parafina utilizada para impregnar las muestras biológicas. El solvente orgánico no polar puede ser una mezcla compleja de hidrocarburos alcanos ramificados y lineales de cadena larga, que por ejemplo contienen ésteres de ácidos grasos y glicoles superiores. La solubilidad de la parafina en el solvente a 25°C es al menos de 0,1 gramos de parafina por 1 litro de solvente, preferiblemente 0,1 gramos por 100 ml de solvente, más preferiblemente 0,1 gramos por 10 ml de solvente, y más preferiblemente capaz de disolver una cantidad de parafina igual a aproximadamente un 50% del solvente por peso de solución. El solvente orgánico no polar es además miscible con un co-tensoactivo orgánico polar cuando se utiliza en el procedimiento de la invención.

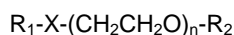
35 Ejemplos de solventes orgánicos no polares incluyen los hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, terpenos, otros aceites y destilados de petróleo. Los solventes orgánicos no polares preferidos tienen pocos o ningún efecto tóxico. Además los solventes preferidos son aquellos que no han sido clasificados por la Agencia de Protección Ambiental como residuos peligrosos. Un solvente solubilizante de parafina preferido tiene además un punto de inflamación superior a unos 60°C, lo que minimiza su inflamabilidad. Además un solvente preferido carece de toxicidad, efectos cancerígenos y corrosividad. Un hidrocarburo isoparafínico es un ejemplo de un solvente preferido capaz de solubilizar la parafina, en parte debido a su falta de toxicidad, efecto cancerígeno, corrosividad e inflamabilidad.<sup>10</sup> Las isoparafinas preferidas son hidrocarburos alifáticos ramificados con una longitud del esqueleto de carbonos que oscila entre aproximadamente 10 C y 15 C, o bien mezclas de los mismos. Una mezcla de hidrocarburos de isoparafina preferidos tiene un punto de inflamación de unos 74°C. Otro solvente preferido solubilizante en parafina es una mezcla de cadenas de hidrocarburos C10 a C50, lineales o ramificadas, que tienen

un margen de destilación entre un punto de ebullición de 150°C a 250°C, y tiene la fórmula general de  $C_nH_{(2n+m)}$  donde  $n=10-50$  y  $m=0-4$ .

5 Los solventes orgánicos no polares especialmente preferidos incluyen NORPAR 15, alcoholes minerales o LIQUID  
COVERSLIP™ de Ventana. NORPAR 15 es un fluido hidrocarbonado de parafina normal (>95%)(ExxonMobil Chem-  
ical) que comprende C15 lineal, con baja volatilidad y un elevado punto de ebullición. Los alcoholes minerales que  
incluyen hidrocarburos alifáticos ramificados y lineales de cadena corta son otros solventes orgánicos solubilizantes  
10 de la parafina preferidos. Un terpeno preferido es el limoneno. Otros terpenos que se pueden utilizar incluyen terpi-  
nas, terpinenos y terpineoles. Un solvente menos preferido es un solvente hidrocarbonado aromático como un al-  
quilbenceno, por ejemplo, el tolueno o un dialquilbenceno como el xileno. El tolueno y el xileno son poco preferidos  
debido a su toxicidad y a que se consideran residuos peligrosos. Además, tal como se ha comentado antes, incluso  
cuando se utilizan el xileno o el tolueno en configuraciones de la invención, se eliminan los lavados de alcohol poste-  
riores y son reemplazados por una solución de lavado acuosa no peligrosa.

15 Un “co-tensoactivo orgánico polar” o bien “co-tensoactivo” comprende solventes orgánicos polares que son indivi-  
dualmente solubles en agua y en aceite, e incluye cetonas y alcoholes inferiores, que incluyen polialcoholes, dioles y  
glicoles y éteres inferiores. Los alcoholes y dioles preferidos son los alcoholes y dioles C2 a C8. Los más preferidos  
son el etanol, etilenglicol, propanol, isopropanol, butanol, tert butanol, propilenglicol, hexanodiol, octanodiol y mez-  
20 clas de los mismos. Un solvente de cetona preferido es la cetona C3 a C5. Los solventes de cetona preferidos son la  
acetona y el metiletilcetona. Los éteres preferidos son los éteres C2 a C6. Los co-tensoactivos orgánicos polares  
especialmente preferidos se eligen del grupo formado por metanol, etanol, isopropanol, butanol, tert-butanol, alcohol  
alílico, acetona, etilenglicol, propilenglicol, hexanodiol, octanodiol y mezclas de los mismos. El acetonitrilo, dimetilsul-  
fóxido y la dimetilformamida son co-tensoactivos orgánicos polares menos preferidos. Además, el co-tensoactivo  
orgánico polar puede ser una mezcla de solventes orgánicos polares. El co-tensoactivo es preferiblemente soluble  
25 tanto en aceite como en agua.

Un “tensoactivo” consta de un compuesto con una estructura molecular que comprende una parte hidrofílica que es  
miscible con agua, y una parte lipofílica que es miscible con el solvente orgánico no polar. Los tensoactivos que se  
30 pueden usar en composiciones de la invención incluyen tensoactivos no iónicos a base de polietilenglicol de la fór-  
mula



Donde  $R_1$  es un hidrocarburo alcano ramificado o lineal de cadena larga entre C4 y C20; X es un grupo de enlace  
que comprende un éter, éster, carbonato, bencilo o sorbitol; n está entre 5 y 30; y  $R_2$  es un hidrógeno.  $R_1$  puede  
35 comprender alternativamente óxido de polipropileno, polisiloxano, o un fluoroalcano.  $R_2$  puede comprender alternati-  
vamente un hidrocarburo alcano ramificado o lineal entre C1 y C20, un ácido alquilcarboxílico, un sulfonato de alqui-  
lo, una alquilamina, un óxido de alquilamina, una alquilamina cuaternaria, óxido de polipropileno, polisiloxano o un  
fluoroalcano.

40 Los tensoactivos preferidos de esta fórmula son individualmente solubles tanto en solventes orgánicos no polares  
como en agua. Ejemplos de tensoactivos no iónicos preferidos incluyen los condensados de óxido de etileno de  
alcoholes grasos lineales (por ejemplo, vendidos bajo el nombre comercial de Tomadol™), condensados de óxido de  
etileno de alcoholes grasos ramificados (por ejemplo, vendidos bajo el nombre comercial de Tomadol™, Tomady-  
45 ne™, Tergitol™, Merspol™), y condensados de óxido de etileno de ácidos grasos lineales (por ejemplo, vendidos bajo  
el nombre comercial de Colamulse™), y mezclas de los mismos. Los tensoactivos especialmente preferidos incluyen  
los Tomadol 1-5, 91-6, 1-7, 23-6,5, 91-8, 900 y 1-73B (Tomah Inc.; Milton, Wisconsin); Tomadyne dL (Tomah Inc.;  
Milton, Wisconsin); Tergitol 15-S-7 y 15-S-9 (SigmaAldrich Inc., St. Louis, Missouri); Merspol SH y OJ (SigmaAldrich  
Inc., St. Louis, Missouri); polietilenglicol400 laurato (“Colamulse FE”); Colonial Inc., South Pittsburg, Tennessee); y  
éter tridecano hexaetilenglicol (SigmaAldrich Inc., St. Louis, Missouri).

50 Las microemulsiones desparafinantes utilizadas en el procedimiento de la invención comprenden tensoactivo, aceite  
y agua, donde el porcentaje de tensoactivo oscila entre un 5% y un 90%, el porcentaje en peso de aceite entre un  
5% y aproximadamente un 90% y el porcentaje en peso del agua entre un 0% y aproximadamente un 90%. Una  
configuración preferida comprende la Composición A (Tomadol 96-1, NORPAR 15 y agua en una proporción 4:1:1,  
55 respectivamente, en peso, o bien porcentajes en peso respectivos del 67%/16,5%/16,5%).

Las composiciones de intercambio constan de tensoactivo, aceite y agua, y opcionalmente un co-tensoactivo, donde  
el porcentaje en peso del tensoactivo se sitúa entre el 5% y el 95%, el porcentaje en peso del aceite entre el 0% y el  
95%, el porcentaje en peso del agua entre el 0% y aproximadamente un 95%, y el porcentaje en peso del co-  
60 tensoactivo entre un 0% y aproximadamente un 50%. Una configuración preferida comprende la Composición B  
(Tomadyne dL: NORPAR 15: agua) en una proporción de 5:1:5 en peso (o bien porcentajes en peso respectivos del  
45,5%/9%/45,5%). Otra composición preferida es la Composición C (Tomadol 1-73B: NORPAR 15: agua: isopropanol)  
en una proporción de 4:1:1:0,5 en peso (o porcentajes en peso respectivos del 62%/15%/15%/8%).

65 Los ejemplos siguientes son ilustraciones de las configuraciones de las invenciones aquí comentadas, y en ningún  
caso se deberían aplicar para limitar las reivindicaciones adjuntas.

**Ejemplo 1: Desparafinado en una etapa con composición A desparafinante**

5 Varias muestras de tejido impregnado en parafina (secciones de 4 micras de distintos bloques impregnados de parafina colocadas en portaobjetos de microscopio Superfrost Plus™ (Erie Scientific, Portsmouth, NH) se desparafinaban conforme al siguiente protocolo. La composición A se preparaba pesando 4 gramos de 91-6 tensoactivo, añadiendo 1 gramo de NORPAR 15, mezclando, luego añadiendo 1 gramo de agua y mezclando de nuevo hasta conseguir una solución transparente. Cada portaobjeto se cargaba luego en un dispositivo automatizado DISCOVERY® (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y la temperatura se programaba a 45°C. La composición A desparafinante se ponía en contacto con la sección del tejido aplicando manualmente 1,0 ml de la microemulsión para cubrir básicamente el tejido y toda la superficie del vidrio sin rebosar el borde del portaobjetos. El portaobjetos y la muestra se incubaban a una temperatura durante cuatro minutos. El portaobjetos se lavaba luego dos veces con EZ Prep™(PN 950-102, Ventana), un tampón que contiene tensoactivo, para eliminar la microemulsión. Los portaobjetos se lavaban luego bajo el agua del grifo y se colocaba un cubreobjetos de vidrio para la inspección visual. El portaobjetos se mantenía en alto bajo la iluminación de la sala y se observaba si quedaba parafina. Además la inspección visual se realizaba con aumento de campo claro así como con luz polarizada, que es especialmente eficaz para visualizar la parafina residual. Ocasionalmente se observaban restos de aceite en los portaobjetos con ciertas muestras en bloque de parafina, debido a las impurezas existentes en la parafina. Ese aceite residual no se observaba al incrementar la temperatura a 45°C o bien aumentar el número de aplicaciones de la microemulsión. En lugar de colocar manualmente el volumen de 1,0 ml de la composición, se concibe que este material se pudiera añadir a los tubos existentes de cualquier número de sistemas automatizados de dispensado.

**Ejemplo 2: Desparafinado en dos etapas con composición B de intercambio**

25 Varias muestras de tejido impregnado en parafina de aproximadamente 4 micras de grosor cada una, de distintos bloques impregnados de parafina colocados sobre portaobjetos Superfrost Plus™ se desparafinaban conforme al siguiente protocolo. Los portaobjetos se cargaban primero en un dispositivo automatizado DISCOVERY® (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) y la temperatura se programaba a 45°C. En primer lugar se aplicaba automáticamente el LIQUID COVERSLIP™ (Ventana) usando el instrumento DISCOVERY. El LIQUID COVERSLIP se incubaba sobre la sección tisular para disolver la parafina durante dos minutos a temperatura. Luego la sección se lavaba con DISCOVERY EZ Prep™(Ventana), un tampón que contiene tensoactivo, para eliminar la mayor parte de LIQUID COVERSLIP. La composición de intercambio B (Tomadyne dL:NORPAR 15:agua) en una proporción en peso de 5:1:5, respectivamente, se preparaba pesando 5 gramos de tensoactivo Tomadyne dL, añadiendo 1 gramo de NORPAR 15, mezclando, luego añadiendo 5 gramos de agua a la mezcla para obtener una solución transparente. La composición B de intercambio se ponía en contacto luego con la sección de tejido desparafinado aplicando manualmente 1,0 ml de la microemulsión, para cubrir sustancialmente el tejido y la superficie de vidrio sin salirse del borde del portaobjetos. El portaobjetos y la muestra se incubaban a temperatura durante dos minutos. El portaobjetos se lavaba luego dos veces con EZ Prep, para retirar la microemulsión. Se analizaba el portaobjetos por si quedaba cera o aceite residual, tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Los portaobjetos no presentaban prácticamente residuos.

**Ejemplo 3: Desparafinado en dos etapas con composición C de intercambio**

45 Varias muestras de tejido impregnado en parafina de aproximadamente 4 micras de grosor colocadas sobre portaobjetos de microscopio Superfrost Plus™ se desparafinaban conforme al siguiente protocolo. Se aplicaban manualmente 2 ml de NORPAR 15 sobre la sección tisular para disolver la parafina durante cuatro minutos a 25°C. Luego el portaobjetos se colocaba sobre una toalla absorbente para eliminar el exceso de NORPAR15. La composición de intercambio C (Tomadol 1-73B: NORPAR 15:agua:isopropanol en una proporción en peso de 4:1:1:0:5, respectivamente), se preparaba disolviendo 4 gramos de Tomadol 1-73B en 1 gramo de NORPAR 15, añadiendo 1 gramo de agua a la mezcla para obtener una solución transparente, y añadiendo 0,5 gramos de isopropanol a la mezcla para obtener una solución transparente. La composición C de intercambio se ponía en contacto luego con la sección de tejido desparafinado aplicando manualmente la microemulsión, para cubrir sustancialmente el tejido sin salirse del borde del portaobjetos, es decir aproximadamente 2 ml. El portaobjetos y la muestra se incubaban a 25°C durante cuatro minutos. El portaobjetos se lavaba luego agua del grifo suavemente a 25°C para eliminar la microemulsión; no se observaba formación de gel. El portaobjetos y la muestra se secaban al aire y se observaba como se había eliminado la cera de parafina y los residuos de aceite.

**Ejemplo 4: Composiciones adicionales de intercambio D-I**

60 Se preparaba una composición D de intercambio (Tergitol 15-S-7:NORPAR 15:agua:isopropanol) en una proporción de 4:1:1:0,25, respectivamente, disolviendo 4 gramos de Tergitol 15-S-7 en 1 gramo de NORPAR15, añadiendo 1 gramo de agua a la mezcla para obtener una solución transparente, y añadiendo 0,25 gramos de isopropanol a la mezcla para obtener una solución transparente.

65 Se preparaba una composición E de intercambio (Colamulse FE:NORPAR 15:agua:isopropanol) en una proporción de 4:1:1:0,25, respectivamente, disolviendo 4 gramos de Colamulse FE en 1 gramo de NORPAR15, añadiendo 1

gramo de agua a la mezcla para obtener una solución transparente, y añadiendo 0,25 gramos de isopropanol a la mezcla para obtener una solución transparente.

5 Se preparaba una composición F de intercambio (Tomadol 900:NORPAR 15:agua:isopropanol) en una proporción de 4:1:1:0,5, respectivamente, disolviendo 4 gramos de Tomadol 900 en 1 gramo de NORPAR15, añadiendo 1 gramo de agua a la mezcla para obtener una solución transparente, y añadiendo 0,5 gramos de isopropanol a la mezcla para obtener una solución transparente.

10 Se preparaba una composición G de intercambio (Tergitol 15-S9:NORPAR 15:agua:isopropanol) en una proporción de 4:1:1:1,25, respectivamente, disolviendo 4 gramos de Tergitol 15-S9 en 1 gramo de NORPAR15, añadiendo 1 gramo de agua a la mezcla para obtener una solución transparente, y añadiendo 1,25 gramos de isopropanol a la mezcla para obtener una solución transparente.

15 Se preparaba una composición H de intercambio (Tomadol 91-6:NORPAR 15:agua:isopropanol) en una proporción de 4:1:1:0,5, respectivamente, disolviendo 4 gramos de Tomadol 91-6 en 1 gramo de NORPAR15, añadiendo 1 gramo de agua a la mezcla para obtener una solución transparente, y añadiendo 0,5 gramos de isopropanol a la mezcla para obtener una solución transparente.

20 Se preparaba una composición I de intercambio (Tomadol 23-6,5:NORPAR 15:agua:isopropanol) en una proporción de 4:1:1:1, respectivamente, disolviendo 4 gramos de Tomadol 23-6 en 1 gramo de NORPAR15, añadiendo 1 gramo de agua a la mezcla para obtener una solución transparente, y añadiendo 1 gramo de isopropanol a la mezcla para obtener una solución transparente.

**Ejemplo 5: Desparafinado en dos etapas con composiciones de intercambio D-I**

25 El desparafinado de las muestras tisulares impregnadas de parafina usando NORPAR15 seguido de las composiciones D a I del ejemplo 4 se llevaba a cabo usando el protocolo del ejemplo 3. Todas las composiciones de intercambio no presentaban formación de gel en el lavado con agua del grifo y se demostraba que en todas las composiciones de intercambio se había producido la retirada de la parafina de los portaobjetos y no existía aceite residual.

30 **Ejemplo 6: Desparafinado en dos etapas con composiciones de intercambio J & K**

35 Las muestras de tejido impregnadas de parafina que tienen un grosor de 4 micras colocadas sobre los portaobjetos del microscopio Superfrost Plus se desparafinaban de acuerdo con el siguiente protocolo. El portaobjetos se cargaba primero en un dispositivo automatizado DISCOVERY® y la temperatura se programaba a 55°C. En primer lugar se aplicaba automáticamente el LIQUID COVERSLIP™ (Ventana) usando el instrumento DISCOVERY. El LIQUID COVERSLIP se incubaba sobre la sección tisular para disolver la parafina durante dos minutos a temperatura. Luego la sección se lavaba con TAMPÓN DE REACCIÓN™ (Ventana), para eliminar la mayor parte de LIQUID COVERSLIP. 40 Se preparaban dos composiciones de intercambio J(Tomadol 1-73B:agua) y K(Tergitol 15-S-7-agua) en una proporción en peso de tensoactivo: agua de 1:4, respectivamente, disolviendo los tensoactivos respectivos en el agua y agitando hasta obtener una solución transparente. Ambas composiciones individualmente se ponían luego en contacto con la sección tisular desparafinada aplicando 1,0 ml de tensoactivo: agua: mezcla. El portaobjetos y la muestra se incubaban a temperatura durante dos minutos para eliminar el LIQUID COVERSLIP residual. El portaobjetos se lavaba luego dos veces con "DUAL RINSE" automatizado estándar de TAMPÓN DE REACCIÓN para eliminar la 45 mezcla tensoactivo; agua. En el momento de la inspección no se observaban restos de aceite ni parafina residual.

**Ejemplo 7: Composiciones de intercambio adicionales L-P**

50 Los ejemplos siguientes de composiciones de intercambio aceite-agua y agua-aceite se presentan a modo de ilustración. Estos ejemplos son capaces de realizar un intercambio en ambos sentidos, es decir, intercambio de aceite-agua y de agua-aceite.

La composición L de intercambio se preparaba mezclando Tomadol 1-73B (4 gramos) y NORPAR15(1 gramo) hasta obtener mezcla transparente.

55 La composición M de intercambio se preparaba mezclando Colamulse FE (4 gramos) y NORPAR15(1 gramo) hasta obtener mezcla transparente.

La composición N de intercambio se preparaba mezclando Tomadol 1-5 (4 gramos) y NORPAR15(1 gramo) hasta obtener mezcla transparente.

La composición O de intercambio se preparaba mezclando Tomadol 91-6 (4 gramos) y NORPAR15(1 gramo) hasta obtener mezcla transparente.

60 La composición P de intercambio se preparaba mezclando Tergitol 15-S-7 (4 gramos) y NORPAR15(1 gramo) hasta obtener mezcla transparente.

**Ejemplo 8: Intercambio de aceite por agua**

65 Se examinaban las composiciones de intercambio del ejemplo 7 analizando su capacidad para intercambiar aceite por agua, sin el uso de soluciones alcohólicas intermedias. Aproximadamente se colocaban 0,5 ml de LIQUID CO-

5  
10  
15  
20  
25  
30

VERSLIP en portaobjetos Superfrost Plus, que no contenían muestras tisulares, para cubrir básicamente las superficies de los portaobjetos. Se retiraba el aceite en exceso inclinando los portaobjetos y colocándolos sobre una toalla absorbente. Aproximadamente se aplicaba 1 ml de composiciones de intercambio L-P a los portaobjetos, individualmente, para cubrir la superficie de cada portaobjeto sin que ésta rebosara por el borde. Los portaobjetos se incubaban a 25°C durante 4 minutos. Las composiciones en exceso se eliminaban inclinando los portaobjetos y colocándolos sobre una toalla absorbente. Los portaobjetos se sumergían individualmente en unos 250 ml de agua, a 25°C durante 4 minutos; no se observaba ninguna formación de gel. Se retiraban los portaobjetos, se tapaban y se examinaban bajo luz polarizada 40x. Las composiciones no presentaban restos de aceite. En cambio un portaobjetos que se había sometido a un intercambio sin el uso de las composiciones de intercambio L-P, es decir se cubría el portaobjetos con unos 0,5 ml de LIQUID COVERSLIP, se colocaba sobre una toalla absorbente, se sumergía en 250 ml de agua a 25°C durante 4 min, se retiraban y se tapaba, mostraba unas gotitas aceitosas significativas en la película atrapada entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

#### 15 **Ejemplo 9: Intercambio de agua por aceite**

20  
25  
30

Se examinaban las composiciones de intercambio del ejemplo 7 analizando su capacidad para intercambiar agua por aceite, sin el uso de soluciones alcohólicas intermedias. Aproximadamente se colocaban 0,5 ml de agua en portaobjetos Superfrost Plus, que no contenían muestras tisulares, para cubrir básicamente las superficies de los portaobjetos. Se retiraba el agua en exceso inclinando los portaobjetos y colocándolos sobre una toalla absorbente. Aproximadamente se aplicaba 1 ml de composiciones de intercambio L-P a los portaobjetos, individualmente, para cubrir la superficie de cada portaobjeto sin que ésta rebosara por el borde. Los portaobjetos se incubaban a 25°C durante 4 minutos. Las composiciones de intercambio en exceso se eliminaban inclinando los portaobjetos y colocándolos sobre una toalla absorbente. Los portaobjetos se sumergían individualmente en unos 40 ml de LIQUID COVERSLIP, a 25°C durante 4 minutos; no se observaba ninguna o prácticamente ninguna formación de gel. Se retiraban los portaobjetos, se tapaban y se examinaban bajo luz polarizada 40x. Las composiciones mostraban únicamente pequeñas trazas de agua residual en la película de líquido atrapada entre el portaobjetos y el cubreobjetos. En cambio un portaobjetos que se había sometido a un intercambio sin el uso de las composiciones de intercambio L-P, es decir se cubría el portaobjetos con unos 0,5 ml de agua, se colocaba sobre una toalla absorbente, se sumergía en 40 ml de LIQUID COVERSLIP a 25°C durante 4 min, se retiraba y se tapaba, mostraba unas gotitas de agua significativas en la película atrapada entre el portaobjetos y el cubreobjetos

#### Bibliografía citada

- 35  
40  
45  
50
- 1 Attwood D: Microemulsions, in Kreuter H(ed): Colloidal Drug Delivery Systems. New York, Marcel Decker, 1994, p.31
  - 2 Ogino K, Abe M: Microemulsion formation with some typical surfactants, in Matijevic E(ed): Surface and Colloid Science. New York, Plenum Press, 1993, p 85
  - 3 Paul BK, Moulik SP: Microemulsions: An overview. J. Disp Sci 18(4):301, 1997
  - 4 Tenjarla SN: Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. Critical Reviews™ in therapeutic Drug Carrier Systems 16:461-521, 1999
  - 5 Jayakrishnan A, Kalaiarasi K, Shah DO: Microemulsions: Evolving technologies for cosmetic application. J. Soc Cosmetic Chem 34:335, 1983
  - 6 Hoar TP, Schulman JH: Transparent water-in-oil dispersions: The oleophatic hydromicelle, Nature 102, 152, 1943
  - 7 Prince: Microemulsions, in theory and Practice. New York, Academic Press, 197
  - 8 Prince : Microemulsions. J. Soc. Cosmetic Chem 21:193, 1970
  - 9 Baviere, et al: The influence of alcohol son microemulsión composition. J colloid Interf Sci 81:266, 1981
  - 10 Mullin et al. "Toxicology update isoparaffinic hydrocarbons: a summary of physical properties, toxicity studies and human exposure data". J.App. Toxicol. 10; 135-42(1990)

#### 55 Aplicabilidad industrial

Las invenciones mencionadas son aplicables al mundo industrial para la preparación y tinción de tejido de un paciente que se sospecha que padece una enfermedad, para posteriores análisis microscópicos y evaluación por parte del patólogo o bien otro médico especialista en la determinación de una posible enfermedad.



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de retirada del medio impregnado en parafina de una muestra biológica impregnada en parafina que comprende:
- poner en contacto la muestra biológica impregnada de parafina con una microemulsión desparafinante que comprende tensoactivo, solvente orgánico no polar y agua, en la que el tensoactivo es soluble tanto en agua como en el solvente orgánico no polar, transfiriendo la parafina a la microemulsión; y
- 10 Separar la microemulsión.
2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que el tensoactivo es un tensoactivo no iónico
3. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que el tensoactivo se elige del grupo que consta esencialmente de alcoholes alquilo etoxilados y ácidos alquilcarboxílicos etoxilados.
- 15 4. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que la retirada de la microemulsión implica su lavado.
5. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que el tensoactivo tiene la fórmula estructural siguiente:
- 20  $R_1-X-(CH_2CH_2O)_n-R_2$
- donde  $R_1$  es un hidrocarburo alcano ramificado o lineal de cadena larga de C5 a C30; X es un grupo de enlace que comprende un éter, éster, carbonato, bencilo o sorbitol; n se encuentra entre 5 y 20 y  $R_2$  es un hidrógeno.
- 25 6. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que el tensoactivo se elige del grupo compuesto por condensados de óxido de etileno de alcoholes grasos lineales o ramificados; polietilenglicol 400 laurato; y éter tridecano hexaetilenglicol.
7. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que dicho solvente orgánico no polar se elige del grupo formado por terpenos, alquilbencenos, solventes aromáticos, aceites de parafina normales y aceites de parafina ramificados.
- 30 8. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que el solvente orgánico no polar comprende un fluido hidrocarbonado de parafina de cadena lineal C15.
9. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que la microemulsión desparafinante tiene un porcentaje de agua frente a tensoactivo de 0:1 hasta 10:1 en peso.
- 35 10. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que la microemulsión desparafinante tiene un porcentaje entre 0:1 y 10:1 en peso de agua frente a solvente orgánico no polar.
- 40 11. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el que la microemulsión desparafinante comprende un tensoactivo en un porcentaje en peso entre un 5% y un 90%, aceite en un porcentaje en peso entre un 5% y un 90% y agua en un porcentaje en peso entre un 0% y un 90%.
- 45