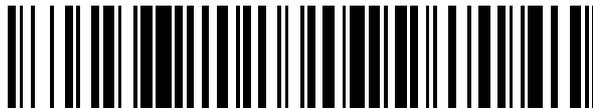


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 120**

21 Número de solicitud: 201300524

51 Int. Cl.:

**G01N 1/42** (2006.01)

**G01N 1/36** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**31.05.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**08.07.2015**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**PICAZO GONZÁLEZ, Rosa Ana;  
SÁNCHEZ PÉREZ, María De Los Ángeles;  
SÁNCHEZ MALDONADO, Belén;  
ENCINAS CEREZO, María Teresa;  
GILABERT SANTOS, Juan Antonio;  
ROS RODRÍGUEZ, José María;  
GARCÍA PALENCIA, María Pilar;  
MARTÍNEZ-MADRID, Carmen Belén;  
ARANDA ESPINOSA, Pedro y  
TINETTI PINTO, Paola Stefanía**

74 Agente/Representante:

**PLUMET ORTEGA, Joaquín**

54 Título: **Procedimiento de doble inclusión para el estudio histológico y/o de localización de marcadores moleculares en especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas**

57 Resumen:

Procedimiento de doble inclusión para el estudio histológico y/o de localización de marcadores moleculares en especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas.

La presente invención se refiere a un procedimiento de doble inclusión de especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas (70-300 µm) que permite mantener la disposición espacial tridimensional de las muestras para, posteriormente, realizar estudios histológicos, inmunohistoquímicos y/o de localización de marcadores moleculares. El procedimiento incluye la preparación de la muestra mediante lavados con solución tamponada; la fijación de la muestra durante 10-15 minutos, a temperatura de 2-8° C; la deshidratación de la muestra con concentraciones crecientes de etanol durante 10-15 minutos cada una, a una temperatura de 2-8° C, la preinclusión en agar y la inclusión en parafina, prescindiendo de la centrifugación de la muestra en todas las etapas del procedimiento. Así mismo, la invención incluye un kit con los elementos necesarios para desarrollar el procedimiento descrito en la invención.

**ES 2 540 120 A1**

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de doble inclusión para el estudio histológico y/o de localización de marcadores moleculares en especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuadra en el sector de la histotecnología. Más concretamente se refiere a un procedimiento de doble inclusión histológica, compuesto por un sistema de preagregación en matriz orgánica biocompatible y de inclusión en parafina, que permite la realización de análisis histológicos seriados, y de localización de marcadores moleculares, particularmente mediante inmunohistoquímica, en especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas.

15

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Las técnicas de doble inclusión de especímenes de pequeñas dimensiones para el análisis estructural o ultraestructural posterior son conocidas desde hace aproximadamente tres décadas. Los procedimientos utilizados habitualmente incluyen: la fijación de la muestra durante tiempos comprendidos entre doce y veinticuatro horas, seguida de centrifugación si se trata de células, y la preinclusión en agar, agarosa, gelatina o albúmina sérica bovina (BSA), antes o después de la centrifugación. Los procedimientos finalizan con la deshidratación en concentraciones crecientes de etanol en periodos de tiempo de una, o más horas (Harris M.J. (1974). *Cytotechnol. Bull.* 11:6-7; Moskaluk C.A., Stoler M.H. (2002). *Diag. Mol. Pathol.* 11: 234-23).

En fechas recientes, se han desarrollado metodologías dirigidas al análisis ultraestructural de especímenes pluricelulares por microscopía electrónica de transmisión, en las que se reduce a una hora el tiempo de exposición de las

muestras a las soluciones de fijación y se realiza una doble inclusión utilizando diferentes soportes. Como exponentes de esta aproximación, destacan los procedimientos descritos por diversos autores (Dvorak A.M., y cols. (1991). *American Journal of Pathology*, 138 (1): 69-82; Melo R.C.N., y cols., (2005). *Traffic* 6: 1047–1057; Melo R.C.N., y cols., (2007). *Micron* (38) 714–721), que comprenden la fijación de las células en suspensión durante una hora, la inclusión en agar, su centrifugación y la postfijación durante una a dos horas. Posteriormente, en el artículo de Taupin (Taupin, P (2008). *Annals of Microscopy* 8: 19-21), se describe un procedimiento para procesar células en suspensión para microscopía electrónica. Según este protocolo, las células se fijan en glutaraldehído durante una hora a temperatura ambiente, se incluyen en gelatina al 5% o en albúmina sérica bovina al 5% y posteriormente se entrecruzan con agentes fijadores (paraformaldehído y glutaraldehído) durante 1-1,5 horas a temperatura ambiente. Las piezas de gelatina o BSA se deshidratan en soluciones de etanol a concentración creciente (50%, 75%, 95% y 100%, durante 10, 20, 20 y 20 minutos, respectivamente) y finalmente se incluyen en araldita. Este último procedimiento pretende evitar la centrifugación de la muestra, obtener una pieza sólida para su estudio, mantener las células en suspensión y establecer un tiempo de fijación de la muestra mucho más corto de lo habitual.

En relación con la aplicación de métodos de doble inclusión al análisis estructural e inmunohistoquímico de especímenes de dimensiones microscópicas, éstos se han dirigido mayoritariamente a la investigación con células en cultivo. Entre los procedimientos, destaca el publicado por Gruber y cols. (Gruber HE, y cols., (2009). *Biotechnic & Histochemistry* 84 (6): 283-286), en el que se especifica que, cuando la muestra contiene pocos estratos celulares, se requieren periodos reducidos de exposición a la solución de fijación, de una hora, previa centrifugación de la muestra. Estos mismos autores, citan otros procedimientos que también implican un hora de fijación (Tapp, H. y cols., (2008) *Arthritis Research & Therapy* (10) 4 - R89).

En resumen, el estado actual de la técnica incluye la centrifugación de la muestra celular para obtener un *pellet*, la exposición del mismo a la solución de fijación durante al menos una hora, la preinclusión en una matriz de agregación que facilite el proceso de inclusión y manipulación macroscópica de la muestra, el corte histológico y el análisis posterior. Los procesos de centrifugación de la muestra y las condiciones de fijación son aspectos críticos de la metodología, que ejercen una influencia notable sobre el mantenimiento de la citoestructura y de las características antigénicas de las células, esenciales para el análisis histológico y la localización de marcadores moleculares, especialmente inmunohistoquímico, de las mismas.

### **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un procedimiento de doble inclusión para el estudio histológico y/o de localización de marcadores moleculares de especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas, que permite mantener la disposición espacial tridimensional de las muestras. Entre los estudios de localización de marcadores moleculares, destacan especialmente los análisis inmunohistoquímicos.

En la presente memoria descriptiva, se entiende por “especimen” la entidad biológica que se adopta como muestra, así como el agregado de células del mismo tipo o de tipos diferentes, que puede proceder de cultivos celulares, cultivos bacterianos, aspirados celulares, entre otros, que se considera como muestra.

Asimismo, se entiende por “marcador molecular” toda biomolécula que se puede asociar o correlacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son los péptidos y las proteínas (por ejemplo, antígenos e isoenzimas) y los ácidos nucleicos (por ejemplo, genes conocidos o fragmentos de secuencia y/o función desconocida).

El término “inmunohistoquímica”, tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a los métodos que se basan en la utilización de anticuerpos mono o policlonales, previamente marcados mediante un enlace químico con una enzima, que no afectan a la capacidad del anticuerpo para formar un  
5 complejo con un antígeno, con utilidad en la detección de antígenos celulares.

El procedimiento de la invención incluye la preagregación de muestras pluricelulares de dimensiones microscópicas en matriz de agar, optimizado para la inclusión en parafina y los cortes histológicos seriados. En los  
10 laboratorios de histotecnología, la preinclusión en agar de células procedentes de cultivos celulares se realiza después de la obtención de un *pellet* por centrifugación, lo que acarrea el inconveniente de alterar la disposición original de las células del cultivo. En el procedimiento de la invención se ha eliminado el paso de centrifugación y se realiza directamente  
15 la inclusión en agar, lo que permite mantener la estructura original de la muestra, para su valoración morfológica posterior en las secciones histológicas.

Otro aspecto de la invención se refiere al periodo de tiempo durante el que se realiza la fijación de la muestra, que se ha reducido a entre 10 y 15 minutos,  
20 siendo de preferencia de 15 minutos. También se refiere a la temperatura a la que se realiza la fijación, puesto que se han obtenido mejores resultados a temperaturas entre 2 y 8°C.

Por otro lado, la invención incluye periodos de deshidratación de la muestra más reducidos de los que se utilizan habitualmente según el estado de la técnica, dado que el procedimiento que aquí se describe incluye periodos de deshidratación de 10 o 15 minutos, preferentemente de 10 minutos, con cada una de las concentraciones de etanol que se utilizan que, en una realización  
25 preferida, son 3 concentraciones en orden creciente. Así mismo, la deshidratación se realiza preferentemente a una temperatura de entre 2 y 8°C.  
30

En una realización preferida, el procedimiento comprende los siguientes pasos:

- 5 a) preparación de la muestra mediante lavados con solución tamponada y sin centrifugación previa;
- b) fijación de la muestra con un agente fijador durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 15 minutos, a temperatura de 2-8°C;
- c) deshidratación de la muestra con concentraciones crecientes de etanol durante 10-15 minutos cada una, a una temperatura de 2-8°C;
- 10 d) preinclusión de la muestra en agar sin centrifugación, transfiriendo dicha muestra desde la solución de etanol de deshidratación a una base de agar preparada previamente y en estado de gelificación por descenso térmico;
- e) inclusión en parafina.

15

Por otra parte, en el proceso de validación, se examinó la influencia de las condiciones del procedimiento sobre el mantenimiento de la estructura de los especímenes mediante el análisis histológico y de la integridad antigénica de los mismos, puesto que una de las aplicaciones del procedimiento comprende la realización posterior de técnicas de inmunolocalización de proteínas. El procedimiento es adecuado para la realización posterior de numerosas técnicas de inmunohistoquímica, como son la inmunolocalización de antígenos proteicos, o de ácidos nucleicos, entre otros marcadores moleculares. Algunas de estas técnicas implican la incorporación de métodos previos de desenmascaramiento antigénico, que se han desarrollado sin dificultades, con un rendimiento final adecuado en los procedimientos de inmunolocalización.

25

Además de las aplicaciones inmunohistoquímicas, este procedimiento puede ser utilizado para el procesamiento y análisis simultáneo de múltiples marcadores moleculares (tanto péptidos como ácidos nucleicos) en especímenes de dimensiones comprendidas entre 70 y 300 µm y origen

30

diverso. Como ejemplos, se pueden citar los procedentes de embriones no humanos en estadios preimplantacionales, cuerpos embrioides no humanos o neuroesferas, derivados de diferenciación de células pluripotentes no humanas, fases larvarias o adultas de parásitos, cultivos bacterianos, 5 agregados de células procedentes de cultivos celulares o de aspirados celulares y/o modelos animales microscópicos, entre otros.

El procedimiento de la invención, permite proporcionar a las muestras de dimensiones microscópicas un tamaño que facilita su visualización 10 macroscópica y su manipulación, por medio de la preinclusión o preagregación de las mismas en una matriz biocompatible, que resiste sin alteraciones el proceso de inclusión en parafina.

En este sentido, se puede preagregar un número elevado de muestras en 15 cada bloque de preinclusión y posterior inclusión, lo que permite el análisis estructural y de marcadores moleculares simultáneo en grupo (i.e. por grupo experimental o tratamiento).

Además, las muestras experimentales pueden situarse en el mismo plano 20 dentro del bloque de inclusión, con el fin de que aparezcan en grupo en los cortes histológicos posteriores.

La eliminación del proceso de centrifugación de la muestra, la reducción del tiempo de exposición a la solución de fijación y el llevar a cabo el 25 procedimiento de fijación y deshidratación a temperatura de refrigeración, permiten obtener muestras con una adecuada citoestructura para el análisis histológico y que mantienen las características antigénicas que permiten la realización de estudios de inmunolocalización de marcadores múltiples, así como de otros análisis de marcadores moleculares.

30 Durante el desarrollo del procedimiento, se determinó que las exposiciones a la solución de fijación, durante periodos de tiempo iguales o superiores a 20

minutos, tenían como consecuencia la alteración de las características citológicas, con una elevada incidencia de crenación celular y retracción de las estructuras tridimensionales, con pérdida de uniones intercelulares(figura 1C, D)y alteración en la antigenicidad celular, que se constató posteriormente  
5 al realizar técnicas de inmunolocalización de diversos marcadores de rutina.

Desde un punto de vista genérico, el procedimiento proporciona de forma consistente las ventajas y beneficios del empleo de las técnicas denominadas de “doble inclusión” en agar y parafina para el estudio histológico que se  
10 realizan ocasionalmente en los laboratorios de histología con varios fines:

\* Orientación de muestras de pequeñas dimensiones para facilitar la sección adecuada: en ocasiones las muestras quirúrgicas remitidas a los laboratorios de anatomía patológica para su diagnóstico son de pequeño tamaño, lo que  
15 dificulta la realización de una orientación adecuada de la misma para realizar las secciones. La muestra de tejido es colocada y orientada en la posición deseada y se deposita sobre ella el agar en estado líquido (caliente), permitiendo su solidificación posterior a temperatura ambiente.

20 \* Preparación de agregados de células procedentes de cultivos o de aspirados celulares para su procesado histológico rutinario.

\* Preparación de *microarrays* a partir de líneas celulares: los *microarrays* de tejidos permiten realizar técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y de  
25 hibridación *in situ* para la detección de marcadores en un número elevado de muestras procedentes de diferentes tejidos en una sola vez.

\* Posibilidad de predeterminar la ubicación exacta de un espécimen microscópico y de proporcionar coordenadas de emplazamiento exacto, para  
30 los protocolos de microscopía motorizada bidimensional.

Además, el procedimiento de la invención aporta otras ventajas:

\* Permite el análisis histológico y de marcadores moleculares (particularmente el inmunohistoquímico), de estructuras multicelulares tridimensionales de dimensiones microscópicas, manteniendo al máximo la citoestructura y la antigenicidad celular.

\* Permite el análisis histológico y de marcadores moleculares (especialmente el inmunohistoquímico), de un número elevado de muestras de forma simultánea.

10

\* Permite realizar un *screening* antigénico múltiple, para cada espécimen o grupo de muestras. Esto representa ventajas aplicativas directas respecto a las técnicas de inmunofluorescencia confocal, en las que pueden localizarse simultáneamente un número limitado de antígenos.

15

\* Permite realizar *screening* de expresión génica múltiple, mediante hibridación *in situ* sobre cortes histológicos de muestras multicelulares fijadas e incluidas en parafina, según procedimientos de localización ya establecidos en el estado de la técnica.

20

El procedimiento descrito es susceptible de ser integrado, incluyendo la metodología y las soluciones y reactivos, en un kit que comprenda los elementos necesarios para su uso en el procesamiento de especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas mediante doble inclusión. El kit puede incluir tampones, enzimas, agentes para prevenir la contaminación, etc., así como anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos u otras moléculas y reactivos para el análisis de marcadores moleculares o el análisis inmunohistoquímico. El kit también puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para la realización del procedimiento de la invención.

25

Los campos de conocimiento en los que el procedimiento tiene gran interés son: la biología celular, la parasitología, la embriología en diversas especies,

30

la acuicultura, la investigación sobre impacto medioambiental de contaminantes químicos, el diagnóstico anatomopatológico cuando las biopsias son de reducidas dimensiones, la investigación sobre patologías de base genética y su diagnóstico en embriones preimplantacionales no humanos, los sistemas de inducción y diferenciación de células pluripotentes no humanas, el análisis de marcadores múltiples en modelos animales de dimensiones reducidas o microscópicas, las acciones de fármacos, agentes tóxicos y contaminantes medioambientales en la expresión de proteínas en organismos pluricelulares microscópicos, entre muchas otras.

10

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

I. En la **figura 1**, se presentan microfotografías correspondientes a cortes histológicos, de agregados celulares, procesados de acuerdo con el procedimiento descrito y sometidos al proceso de fijación, durante 15 (A, B), 20 (C) y 30 minutos (D), posteriormente teñidos con hematoxilina y eosina.

15

II. En la **figura 2**, se presentan imágenes correspondientes a las etapas del procedimiento, para el procesado de agregados de células ováricas de la especie ovina (120-200  $\mu\text{m}$ ). Los procedimientos de lavado, fijación y deshidratación de los agregados celulares (A, B) así como la preagregación en matriz de agar (C, D), se llevaron a cabo bajo microscopio estereoscópico (Microscopio estereoscópico Nikon SMZ800, 10X6.3).

20

25

III. En la **figura 3**, se presentan imágenes que muestran la apariencia de los mini-bloques de agar, que contienen grupos numerosos de agregados celulares, después del proceso de inclusión en parafina (A) y en el bloque completo, preparados para el corte en microtomo (B). Los cortes de 3  $\mu\text{m}$ , se

30

5 dispusieron sobre portaobjetos para el análisis histológico o inmunohistoquímico (C). El procedimiento permite la inmunolocalización de un elevado número de marcadores, de forma simultánea en tantos especímenes, como sea necesario (D). La tinción con hematoxilina-eosina, permitió evaluar las características citológicas de las estructuras pluricelulares, durante la puesta a punto del procedimiento completo (E).

10 IV. En la **figura 4**, se presentan microfotografías, que muestran la inmunolocalización del antígeno de proliferación celular Ki67 (A-C) y del enzima caspasa 3-activa (D-F), implicada en el inicio del proceso de apoptosis celular. Los anticuerpos primarios utilizados en la inmunolocalización de estos antígenos fueron anti-Ki67 (Leica Biosystems, Ref. KI67-MM1-L-CE) y anti caspasa 3-activa (R&D, ref. AF835). Imágenes obtenidas al  
15 microscopio óptico (Microscopio Olympus BX40), con un programa de análisis de imagen.

## 20 MODO DE REALIZACIÓN

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen únicamente con fines ilustrativos que no deben interpretarse como limitativos de la invención.

25

**Ejemplo 1.-** Análisis estructural de agregados celulares generados a partir del cultivo de células ováricas de la especie ovina.

30

Se utilizó un cultivo de células de tejido ovárico de la especie ovina. Las células se obtuvieron de ovarios de cordera prepúber, mediante un procedimiento de aislamiento enzimático con colagenasa, seguido de disgregación mecánica. De la suspensión celular resultante, se cultivaron 500.000 células vivas por 1.9 cm<sup>2</sup> de superficie de crecimiento, en placas de

cultivo de 24 pocillos (Nunclon Delta Surface, Nunc, Thermo Fisher Scientific ref. 142475), con medio M199 (Sigma Aldrich Química ref.M7528), suplementado con antibiótico y antimicótico, albúmina sérica bovina, insulina, transferrina y selenio, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación, durante 4  
5 semanas. Durante este periodo, se efectuó un punto de muestreo semanal, para el análisis histológico. Los agregados celulares alcanzaban, en promedio, diámetros de 70-120 µm en la primera semana de cultivo, 120-200 µm en la segunda semana, y 200-300 µm en la tercera y cuarta semanas de cultivo.

10

1.- Preparación de la muestra, previa al inicio del procedimiento.

En cada punto de muestreo, en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar, se retiró el medio de cultivo de un número representativo de pocillos  
15 (n = 4 a 6 pocillos de cultivo), cada uno de los cuales contenía, en promedio, entre 65 a 75 agregados celulares. Seguidamente, se realizó un doble lavado con solución tampón fosfato (500 µl de DPBS Sigma Aldrich Química, ref. D8537) atemperada a 37°C. A partir de este paso, los cambios de las soluciones de fijación y de etanol, se efectuaron bajo microscopio  
20 estereoscópico (Nikon SMZ 800; figura 2), con el fin de evitar la aspiración y eliminación de agregados celulares en cada pipeteo.

2.- Fijación.

25 El sistema de fijación comprendió los siguientes pasos. Se dispensaron 500 µl de solución de paraformaldehído (Sigma Aldrich Química, ref. P6148) al 4% en PBS (DPBS Sigma Aldrich Química, ref. D8537) a pH 7,4, en cada pocillo de cultivo. Las muestras se dividieron en 2 grupos, de manera que la mitad de ellas se mantuvo durante 10 minutos y la otra mitad durante 15 minutos en  
30 paraformaldehído a temperatura de 2-8°C. Finalizado este periodo, se retiró la solución de fijación y se realizó un doble lavado de 5 minutos, con solución tampón fosfato (DPBS) a 2-8°C.

3.- Deshidratación en concentración creciente de etanol.

5 3.1.- En la mitad de las muestras, de cada pocillo de cultivo, se retiró la solución tampón fosfato utilizada en el paso 1 y, a intervalos de 10 minutos, se dispensaron y reemplazaron, sucesivamente, 500 µl de etanol (Absoluto Merck Millipore, ref. 1009832500) al 30%, al 50% y al 70%, en agua ultra pura (MilliQ). Todo el proceso de deshidratación, se llevó a cabo a 2-8°C.

10 3.2.- La otra mitad de las muestras se deshidrató siguiendo la pauta descrita en el apartado 3.1., pero manteniendo las muestras durante 15 minutos en cada concentración de etanol.

4.-Preinclusión en solución de agar.

15

El proceso de preinclusión, comprendió los pasos que se describen a continuación:

20 4.1.- Preparación de la solución de agar: se preparó una solución de agar para cultivo bacteriológico (Oxoid Ltd. Hampshire, Inglaterra, ref. LP001), al 1,5 % en agua destilada. La mezcla se mantuvo en agitación sobre una placa térmica hasta alcanzar los 85°C, temperatura aproximada de fusión del agar, evitando la ebullición. Su utilización comenzó cuando la solución estuvo completamente transparente. La solución se mantuvo en estado de agitación  
25 suave y permanente durante el tiempo en el que tuvo lugar el proceso de preinclusión, a una temperatura comprendida entre 82 y 100°C.

30 4.2.- Preparación del molde de preinclusión y transferencia de las muestras: se preparó, como soporte plástico, un molde de polipropileno de 5 mm de diámetro y 3 mm de profundidad. Se cubrió por completo la base del molde con un volumen de 40 µl de solución de agar, evitando la formación de burbujas. Se transfirieron las muestras desde la solución de etanol al 70%, a

la base de agar, coincidiendo con el inicio de la gelificación del mismo por descenso térmico (figura 2C, D), empleando para ello micropipetas capilares adaptadas a una jeringa. A continuación, bajo microscopio estereoscópico, se retiró el exceso de etanol acompañante de las muestras, con micropipetas capilares adaptadas a una jeringa y con hilos de papel absorbente Whatmann. Bajo microscopio estereoscópico, los agregados celulares fueron desplazados y ordenados en la zona central del lecho de agar en gelificación, o recién gelificado con ayuda de agujas de 25 G X 16 mm, evitando rasgar el agar. Finalmente, se depositó un volumen adicional de solución de agar (60-70 µl), que fundió con la base y cubrió por completo las muestras (figura 1F). El proceso de gelificación se completó introduciendo los moldes en la nevera a 2-8°C durante 4 horas. Seguidamente, las muestras se mantuvieron en el molde de polipropileno, en etanol al 70% a 2-8°C, hasta la inclusión en parafina, que tuvo lugar en un tiempo máximo de 24 horas.

15

4.3.- Transferencia de los bloques de agar a *cassettes* de inclusión: finalizado el proceso de gelificación, se extrajeron los bloques de agar de los moldes, con ayuda de una aguja de 25 G X 16 mm, evitando rasgar el agar. Se transfirieron a *cassettes* de inclusión de rejilla con tapa (TESPA, Giessen, ref. 35396 Alemania), debidamente identificados, que se mantuvieron en etanol al 70% hasta su inclusión en parafina.

20

#### 5.- Procesado de las muestras para el análisis histológico.

25 5.1.- Inclusión en parafina, preparación de bloques y realización de cortes histológicos.

5.1.1.- Inclusión en parafina: los *cassettes* con las muestras embebidas en agar, fueron incluidos en parafina sintética plastificada con un punto de fusión de 56°C (Histo-Comp, Casa Álvarez, Madrid, España), en un procesador de tejidos de vacío automatizado (Leica ASP 300), mediante un programa que comprende los siguientes pasos:

30

- 5
- \* <sup>(1)</sup>Etanol 70°: 45 minutos
  - \* Etanol 80°: 45 minutos
  - \* Etanol 96°: 2 x 45 minutos
  - \* Etanol 100°: 2 x 60 minutos
  - \* <sup>(2)</sup>Histo Clear: 2 x 45 minutos
  - \* Histo Clear: 60 minutos
  - \* Parafina: 180 minutos
  - \* Parafina: 180 minutos

- 10
- (1). Etanol Quimivita SA Barcelona Ref. AL110PHF.0N005L
  - (2). Histo Clear. National Diagnostics, USA Ref. HS-202.

15

5.1.2.- Preparación de bloques: una vez finalizado el proceso de inclusión, se procedió a la realización manual de los bloques en una unidad formadora de bloques (Leica EG1140H), constituida por un dispensador de parafina y una placa fría para la solidificación de los mismos. Para llevar a cabo este procedimiento, se introdujeron los *cassettes* en el depósito de parafina caliente y se retiró su tapa. Se seleccionaron y utilizaron moldes de dimensiones adecuadas, organizando de forma estandarizada los agregados de agar para su correcta identificación sobre una base de parafina solidificada por contacto con la superficie fría. El molde se cubrió por completo con parafina líquida y la base del *cassette* se utilizó como soporte del bloque, que se colocó en una placa fría (Leica EG1130) donde, una vez solidificada la parafina, fue desmoldado (figura 3).

25

30

5.1.3.- Cortes histológicos en microtomo: se realizaron secciones seriadas de los bloques, de 3-4  $\mu\text{m}$  de grosor, empleando para ello un microtomo de rotación motorizado (Leica RM2255). Los cortes se depositaron en un baño María termostático a 38°C para permitir que la parafina se extendiera y, posteriormente, se recuperaron en portaobjetos ionizados (SuperFrost<sup>®</sup> Plus, Menzel GMBH & Co, Alemania), para la realización de técnicas histológicas y de inmunohistoquímica (figuras 3, 4). Con el fin de

visualizar y seleccionar las muestras para el estudio inmunohistoquímico, se realizó la observación directa al microscopio estereoscópico de los cortes en un portaobjetos sin teñir, lo que permitió identificar los agregados celulares inmersos en el agar. Cada 20 secciones, se obtuvo una para la tinción

5 rutinaria con hematoxilina-eosina (figura 3D, E). Los portaobjetos con las secciones recuperadas del baño María se mantuvieron en una estufa a 38°C durante 24 horas, para el secado de los mismos previo a la realización de las técnicas de análisis.

10 5.1.4.- Demarcación de la muestra sobre el portaobjetos: antes del inicio de las técnicas de análisis histológico e inmunohistoquímico, previo al desparafinado de los cortes, las muestras se rodearon con una marca practicada con un lápiz de punta de diamante, lo que permitió su localización una vez eliminado el agar y la parafina, ya que a partir de ese momento no

15 eran visibles macroscópicamente.

#### 5.2.- Tinción histológica.

Se realizó en un teñidor lineal automatizado (Leica ST4040), e incluyó

20 los siguientes pasos:

- Desparafinado en <sup>(1)</sup>Xilol (3 x 10 minutos)
- Etanol 100°: 10 minutos
- Etanol 96°: 10 minutos

25

- Etanol 70°: 10 minutos
- Lavado en agua: 10 minutos
- Tinción con <sup>(2)</sup>hematoxilina de Harris: 10 minutos
- Lavado en agua: 10 minutos
- Tinción con <sup>(3)</sup>eosina: 1 minuto

30

- Etanol 70°: 1 minuto
- Etanol 96°: 1 minuto
- Etanol 100°: 1 minuto

- Aclarado en xilol (3 x 1 minuto)
- Montaje de las muestras con cubreobjetos empleando una resina sintética (<sup>(4)</sup>DPX)

- 5           (1) Xilol. Panreac Química, Barcelona Ref. 211769.1714  
              (2) Hematoxilina. Panreac Química, Barcelona Ref. UN 2024  
              (3) Eosina. Panreac Química, Barcelona Ref. 251299.1608  
              (4) DPX. Casa Álvarez, Madrid ref. 10-8500

- 10   Una vez solidificado el medio de montaje, se observaron las preparaciones histológicas al microscopio óptico (Microscopio Olympus BX40). Se evaluaron las características morfológicas de los agregados celulares, la afinidad y capacidad tintorial de las células, así como cuantas alteraciones se pudieron observar derivadas de un inadecuado procesamiento (crenación celular,  
15   depósitos citoplasmáticos anormales, vacuolización, tinción excesiva de la cromatina, entre otras).

- Ejemplo 2.-** Inmunolocalización del antígeno marcador de células en proliferación Ki67 en estructuras pseudofoliculares derivadas *in vitro* del  
20   cocultivo de folículos primordiales ováricos con células del estroma-intersticiales.

- El análisis se llevó a cabo sobre estructuras pluricelulares, denominadas pseudofolículos ováricos en desarrollo *in vitro*, que se mantuvieron en cultivo  
25   en medio definido, a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Estas estructuras adoptaban una morfología tridimensional aproximadamente esférica, con diámetros comprendidos entre las 70 y 280 µm a lo largo del periodo de cultivo.

- 30   La preparación de las muestras y los procedimientos de fijación, deshidratación, preagregación en matriz de agar, inclusión en parafina, preparación de bloques y cortes, se llevaron a cabo tal como se ha detallado

en el apartado 5 del ejemplo 1, utilizando tiempos de fijación de las muestras de 15 minutos y periodos de deshidratación de las mismas de 10 minutos con cada concentración de etanol.

5 Sobre cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$ , se llevó a cabo la inmunolocalización del antígeno de células en proliferación Ki67. Para ello, se utilizó un anticuerpo monoclonal (Anti-Ki67, Leica Biosystems, Ref. KI67-MM1-L-CE) siguiendo el procedimiento de análisis inmunohistoquímico que se detalla a continuación. Se empleó una técnica validada por investigadores de este grupo, en el  
10 laboratorio de Histología y Anatomía Patológica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid, empleando un kit comercial (Novolink Polymer Detection System<sup>®</sup> Novocastra, Leica Microsystems, Barcelona Ref.: RE-7140-K), que incluye los siguientes reactivos:

15

1.- *Peroxidase Block*: solución de bloqueo de la peroxidasa endógena, a base de peróxido de hidrógeno al 3%.

2.- *Protein Block*: solución de bloqueo compuesta por caseína al 0,4% en solución salina con tampón fosfato, estabilizantes, agente tensioactivo y  
20 Bronidox L al 0,2% como conservante.

3.- *Post Primary Block*: solución de bloqueo y potenciador de la penetración del polímero, que contiene suero animal al 10% (v/v) en solución salina tamponada con tris y ProClin<sup>™</sup> 950 al 0,09%.

4.- *Novolink<sup>™</sup> Polymer*: conjugado polimérico de IgG antimurina de  
25 conejo con peroxidasa de rábano (cada uno a una concentración de 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), que contiene suero animal al 10% (v/v) en solución salina tamponada con Tris y ProClin<sup>™</sup> 950 al 0,09%.

5.- *DAB Chromogen*: 3,3'-diaminobenzidina al 1,74% peso/volumen, en solución estabilizante

30 6.- *Novolink<sup>™</sup> DAB Substrate Buffer (Polymer)*: solución tamponada con peróxido de hidrógeno al 0,05% y conservante.

7.- *Hematoxylin*: hematoxilina al 0,02%.

Los pasos que comprende la técnica son los siguientes:

- 1.- Desparafinado y rehidratación de las secciones (según se describe en el apartado 5.2.).
- 5 2.- Lavado en agua corriente (10 minutos).
- 3.- Desenmascaramiento antigénico por calor con olla a presión en tampón citrato 10 mM pH 6.0 durante 2 minutos.
- 4.- Enfriamiento de las secciones y lavado en agua desionizada.
- 5.- Bloqueo de la peroxidasa endógena con Peroxidase Block (5 minutos).
- 10 6.- Lavado en <sup>(1)</sup>TBS (2 x 5 minutos).
- 7.- Incubación con Protein Block (5 minutos).
- 8.- Lavado en TBS (2 x 5 minutos).
- 9.- Incubación con anti-Ki67 (1:150 en TBS con Protein Block (50%(v/v)) durante 1 hora a temperatura de laboratorio, en oscuridad.
- 15 10.- Lavado en TBS (2 x 5 minutos).
- 11.- Incubación con Post Primary Block (30 minutos).
- 12.- Lavado en TBS (2 x 5 minutos).
- 13.- Incubación con NovoLink™ Polymer durante 30 minutos.
- 20 14.- Lavado en TBS (2 x 5 minutos).
- 15.- Revelado con solución de trabajo DAB (5 minutos).
- 16.- Lavado en agua (5 minutos).
- 17.- Contrastar con Hematoxilina (3 minutos).
- 18.- Lavado en agua (5 minutos).
- 25 19.- Deshidratación, aclarado y montaje con DPX.

(1)TBS: solución tampón tris.

Los cortes se examinaron al microscopio óptico, con el fin de constatar la inmunolocalización del antígeno Ki67 y de realizar el análisis de imagen que permitía cuantificar las células en proliferación en los diferentes puntos temporales de evaluación (figura 4A-C).

**Ejemplo 3.-** Inmunolocalización del enzima caspasa 3- activa, marcador de células que han iniciado el proceso de apoptosis, en estructuras pseudofoliculares derivadas *in vitro* del cocultivo de folículos primordiales ováricos con células del estroma-intersticiales.

5

El análisis se llevó a cabo sobre pseudofolículos ováricos en desarrollo *in vitro*, en las condiciones descritas en el ejemplo 2. Como se ha descrito anteriormente, estas estructuras adoptaban una morfología tridimensional aproximadamente esférica, con diámetros comprendidos entre las 70 y 280  $\mu\text{m}$  a lo largo del periodo de cultivo.

10

La preparación de las muestras y los procedimientos de fijación, deshidratación, preagregación en matriz de agar, inclusión en parafina, preparación de bloques y cortes, se llevaron a cabo tal como se ha detallado en el ejemplo 2.

15

Sobre cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$ , se llevó a cabo la inmunolocalización del enzima caspasa 3-activa, que incrementa su expresión y síntesis al inicio del proceso de apoptosis celular. Para ello, se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido en conejo (Anti-caspasa 3-activa, RYD Systems, Ref. AF835) siguiendo el procedimiento de análisis inmunohistoquímico que se ha detallado en el ejemplo 2.

20

Los cortes se examinaron al microscopio óptico, con el fin de constatar la inmunolocalización del enzima caspasa 3-activa y de realizar el análisis de imagen que permitía cuantificar las células que habían iniciado el proceso de apoptosis en los diferentes puntos temporales de evaluación (figura 4D-F).

25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de doble inclusión para el estudio histológico y/o de localización de marcadores moleculares de especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas que comprende los siguientes pasos:
- 5
- a) preparación de la muestra mediante lavados con solución tamponada y sin centrifugación previa;
  - b) fijación de la muestra con un agente fijador durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 15 minutos, a temperatura de 2-8°C;
  - 10 c) deshidratación de la muestra con concentraciones crecientes de etanol durante 10-15 minutos cada una, a una temperatura de 2-8°C;
  - d) preinclusión de la muestra en agar sin centrifugación, transfiriendo dicha muestra desde la solución de etanol de deshidratación hasta una base de agar preparada previamente y en estado de gelificación por descenso térmico;
  - 15 e) inclusión en parafina.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 que incluye un paso adicional f) de análisis histológico y/o de localización de marcadores moleculares.
- 20
3. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que los análisis son inmunohistoquímicos.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que los especímenes pluricelulares tienen dimensiones comprendidas entre 70 y 300  $\mu\text{m}$ .
- 25
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el tiempo de fijación de la muestra es de 15 minutos.
- 30

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el tiempo de deshidratación de la muestras es de 10 minutos con cada concentración de etanol.
- 5 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la deshidratación de la muestra se realiza con 3 concentraciones crecientes de etanol.
- 10 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que los especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas se seleccionan del grupo que comprende: embriones no humanos, cuerpos embrioides no humanos, neuroesferas, derivados de diferenciación de células pluripotentes no humanas, fases larvarias o adultas de parásitos, cultivos bacterianos, agregados de células procedentes de cultivos celulares o de aspirados celulares y/o modelos animales microscópicos.
- 15

FIGURA 1



FIGURA 2



FIGURA 3

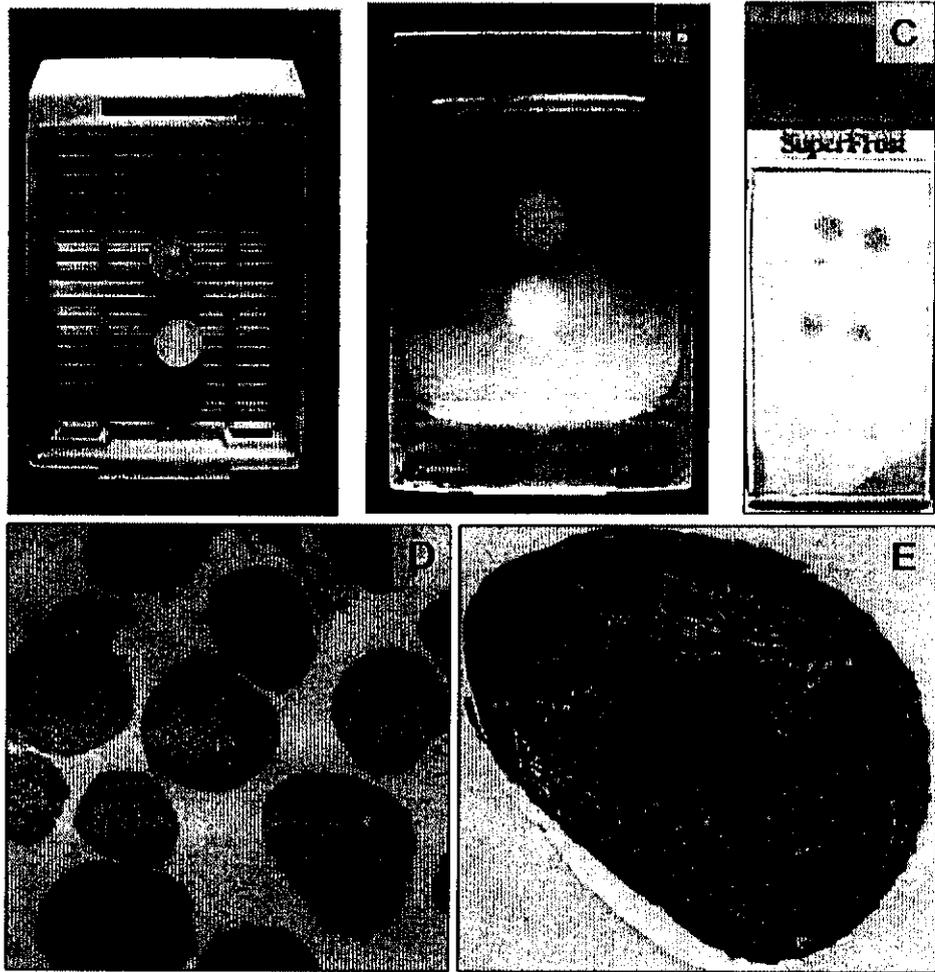
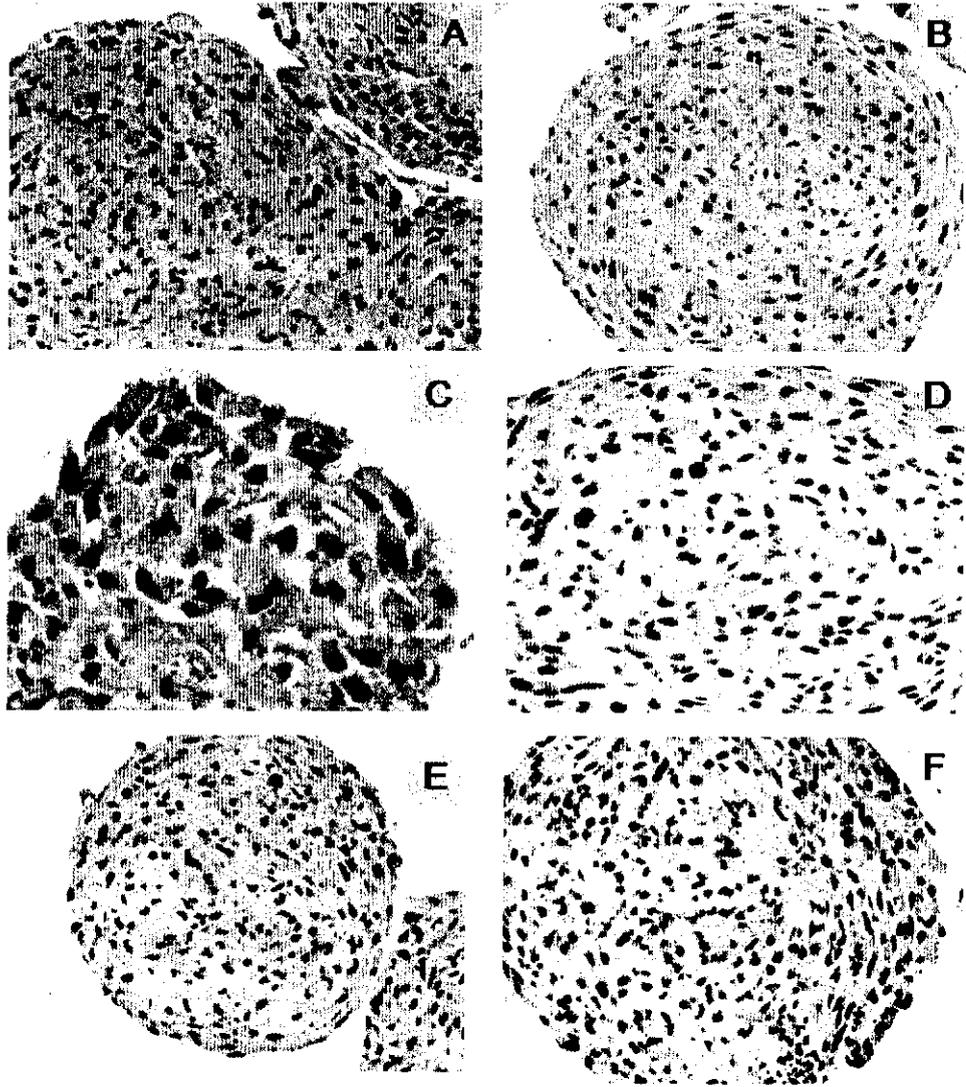


FIGURA 4





- ②1 N.º solicitud: 201300524  
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2013  
③2 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YANG H., <i>et al.</i> Identification and expression of the amphioxus Cks1 gene. Cell biology international England Jul 2005 VOL: 29 No: 7 Págs: 593-597 ISSN 1065-6995 (Impreso) Doi: pubmed:15979902. Ver último párrafo de "Materiales y métodos".	1-8
A	HASHIMOTO, N., <i>et al.</i> Developmental role of the gastropod shell plate and co-option of the signaling pathway in the evolution of the operculum. Developmental Biology, Academic Press, 05.04.2012 VOL: 366 No: 2 Págs: 367-373 ISSN 0012-1606 Doi: doi:10.1016/j.ydbio.2012.04.010. Ver segundo apartado de "Materiales y métodos".	1-8
A	SCARPELLI, E. M., <i>et al.</i> Intraalveolar bubbles and bubble films: III. Vulnerability and preservation in the laboratory. The Anatomical record UNITED STATES Ago 1997 VOL: 248 No: 4 Págs: 498-520 ISSN 0003-276X (Impreso) Doi: pubmed:9268140. Ver todo el documento, especialmente resumen y apartado "Métodos".	1-8
A	US 2012129169 A1 (GIOVANNI BUSSOLATI et al.) 24.05.2012, todo el documento.	1-8
A	TORII S., <i>et al.</i> Localization of Kex2-like processing endoproteases, furin and PC4, within mouse testis by in situ hybridization. FEBS letters Netherlands 18.01.1993 VOL: 316 No: 1 Págs: 12-16 ISSN 0014-5793 (Impreso) Doi: pubmed:8422932. Ver segundo párrafo de "Materiales y métodos".	1-8
A	PICCHIETTI S., <i>et al.</i> Early treatment with Lactobacillus delbrueckii strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval Dicentrarchus labrax (L.). Fish & shellfish immunology England Marzo 2009 VOL: 26 No: 3 Págs: 368-376 ISSN 1095-9947 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.fsi.2008.10.008 pubmed:18996487. Ver tercer apartado de "Materiales y métodos".	1-8

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
14.07.2014

Examinador  
B. Pérez Esteban

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N1/42** (2006.01)

**G01N1/36** (2006.01)

**G01N33/483** (2006.01)

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

G01N

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

EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, Google Académico.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.07.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-8	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-8	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	YANG H., <i>et al.</i> Cell biology international England Jul 2005 VOL: 29 No: 7 Págs: 593-597 ISSN 1065-6995 (Impreso) Doi: pubmed:15979902.	Julio 2005
D02	HASHIMOTO, N., <i>et al.</i> Developmental Biology, Academic Press, 05.04.2012 VOL: 366 No: 2 Págs: 367-373 ISSN 0012-1606 Doi: doi:10.1016/j.ydbio.2012.04.010.	05.04.2012
D03	SCARPELLI, E. M., <i>et al.</i> The Anatomical record UNITED STATES Ago 1997 VOL: 248 No: 4 Págs: 498-520 ISSN 0003-276X (Impreso) Doi: pubmed:9268140.	Agosto 1997
D04	US 2012129169 A1 (GIOVANNI BUSSOLATI et al.)	24.05.2012
D05	TORII S., <i>et al.</i> FEBS letters Netherlands 18.01.1993 VOL: 316 No: 1 Págs: 12-16 ISSN 0014-5793 (Impreso) Doi: pubmed:8422932.	18.01.1993
D06	PICCHIETTI S., <i>et al.</i> Fish & shellfish immunology England Marzo 2009 VOL: 26 No: 3 Págs: 368-376 ISSN 1095-9947 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.fsi.2008.10.008 pubmed:18996487.	Marzo 2009

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica un procedimiento de doble inclusión para el estudio histológico y/o de marcadores moleculares de especímenes pluricelulares de dimensiones microscópicas (entre 70 y 300  $\mu$ m), que comprende los pasos de preparación de la muestra mediante lavados con solución tamponada, y sin centrifugación previa, la fijación de la muestra durante 10-15 minutos a temperatura de 2-8°C, la deshidratación de la muestra con 3 concentraciones crecientes de etanol (10 minutos con cada una), a temperatura de 2-8°C, la preinclusión de la muestra en agar en estado de gelificación mediante descenso térmico (y sin centrifugación), y la posterior inclusión en parafina.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue el procedimiento de la solicitud tal y como está reivindicado, ni se han encontrado documentos que, solos o en combinación con otros, pudieran conducir al experto en la materia al procedimiento de la invención, por lo que las reivindicaciones 1 a 8 de la solicitud tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente.

Se citan en este informe algunos documentos del campo técnico de la solicitud que se consideran cercanos a la misma, pero que no afectan su novedad ni su actividad inventiva.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se divulga un procedimiento de identificación y expresión génica en un anfiexo (*Branchiostoma*), en el que larvas y embriones se fijan con paraformaldehído en frío (4°C durante 90 minutos, tiempo mayor que el reivindicado en la presente solicitud), se deshidratan en concentraciones seriadas de etanol, y se conservan en etanol 70% a -20°C hasta su preinclusión en agar y su posterior inclusión en parafina. No se indican ni la temperatura ni los tiempos de deshidratación en etanol.

En los documentos D02 y D03 se describen también procedimientos de doble inclusión en agar y parafina. A diferencia del procedimiento de la solicitud, en D02 y D03 la inclusión en agar se realiza tras la fijación de las muestras (en paraformaldehído y glutaraldehído, respectivamente). Las muestras incluidas en agar se deshidratan con concentraciones crecientes de etanol, y finalmente se incluyen en parafina. En ninguno de estos dos documentos se indican los tiempos de cada etapa, ni que ninguna de las etapas se realice en frío.

El documento D04 describe un procedimiento de fijación de muestras de tejido orgánico en formalina, a una temperatura de entre 2 y 5°C durante un tiempo de 2 a 34 horas, y un tratamiento posterior con etanol en frío (2-5°C) durante 2-4 horas. A pesar de que este documento coincide con la solicitud en que estos dos pasos se realizan en frío, los tiempos de tratamiento son mayores en D04 que en la solicitud, y, además, en este documento del estado de la técnica no se incluyen las etapas de preinclusión en agar ni de inclusión en parafina.

Los procedimientos divulgados en los documentos D05 y D06 incluyen también etapas en frío de fijación y deshidratación en gradiente de etanol, previas a la inclusión de las muestras en parafina. Sin embargo, los métodos no contemplan la preinclusión en agar, y los tiempos de fijación y deshidratación, o bien no se mencionan, o bien son mayores que los reivindicados en la solicitud.

Por tanto, no se considera que la información divulgada en los documentos D01 a D06, ni su combinación, pudiera llevar de forma evidente al experto en la materia al procedimiento de la solicitud, por lo que las reivindicaciones 1 a 8 de la presente solicitud cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva, según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes, respectivamente, a la luz de lo divulgado en estos documentos.