

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 804**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08743909 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2130023**

54 Título: **Hematoxilina estabilizada**

30 Prioridad:

**15.03.2007 US 895007 P**

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

**24.07.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KOSMEDER, JEROME W.;  
BIENIARZ, CHRISTOPHER;  
TOWNE, PENNY y  
WILLOUGHBY KIVI, LINDA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 541 804 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

## Hematoxilina estabilizada

5 La presente invención se refiere a una composición y a un método para la tinción histoquímica de muestras biológicas. Más particularmente, la presente invención se refiere a una formulación de pigmento que se encuentra estabilizada frente a la degradación durante el tiempo, y a la utilización de la formulación para la tinción de muestras biológicas.

10 Varios protocolos de tinción histoquímica, incluyendo la tinción de hematoxilina y eosina (H-E) y la tinción de Papanicolaou (PAP), se basan en el pigmento hematoxilina para la tinción de muestras citológicas y de tejidos. En particular, la tinción con hematoxilina de los núcleos celulares es utilizada por los patólogos para detectar la presencia de células malignas y/o metastásicas en una muestra de biopsia tumoral.

15 La hematoxilina es un compuesto de origen natural que se encuentra en el duramen rojo de árboles del género *Hematoxylin*. La hematoxilina misma es incolora en solución acuosa y no es el ingrediente activo que tiñe componentes del tejido. Por el contrario, un producto de oxidación de la hematoxilina, la hemateína, se convierte en el componente de tinción activo de una solución de pigmento hematoxilina, particularmente con el acomplejamiento con un mordiente. La hemateína es producida de manera natural bajo exposición al aire y a la luz solar. El procedimiento natural se denomina "maduración" y puede requerir 3 o más meses proporcionar una solución adecuada para la tinción de las células.

25 Con el fin de acelerar la conversión de la hematoxilina en hemateína, puede utilizarse un oxidante químico. Desafortunadamente el procedimiento acelerado con frecuencia produce productos de reacción ineficaces, tales como oxihemateína y precipitados poliméricos complejos y proporciona además una solución que se degrada más rápidamente que una solución de tinción madurada naturalmente. La cantidad exacta de oxidante necesaria para oxidar cuantitativamente la hematoxilina en hemateína puede utilizarse para ayudar a evitar la sobreoxidación generadora de productos ineficaces, aunque más típicamente se utiliza una solución parcialmente oxidada en el caso de que no se lleve a cabo la tinción inmediatamente. En una solución parcialmente oxidada, la oxidación natural de la hematoxilina que queda tras una etapa de oxidación química continuará sustituyendo cualquier hemateína que sea consumida durante la tinción o que continúe oxidándose de manera natural generando productos ineficaces. Sin embargo, la concentración (y cantidad) de la hemateína puede cambiar durante el tiempo.

35 Debido a que la hemateína es el componente de tinción activo de una solución de hematoxilina, los cambios de su concentración (y/o la concentración de sus complejos de mordiente) durante el tiempo conduce a inconsistencias en la tinción. En un procedimiento de tinción manual, los cambios en el contenido de hemateína de una solución de hematoxilina pueden compensarse alterando el tiempo de contacto de una muestra biológica con la solución basándose en la inspección visual. Por ejemplo, una muestra aparentemente infrateñida puede simplemente volverse a introducir en la solución de hematoxilina durante un periodo de tiempo para incrementar la intensidad de la tinción. Sin embargo, en un procedimiento de tinción automatizado, la inspección "visual" y extensión del tiempo de exposición en respuesta a la infratinción puede requerir costosos equipos de obtención de imágenes y puede trastornar el procesamiento de otras muestras. Por lo tanto, existe una necesidad de una solución de hematoxilina en la que la concentración de hemateína disponible para la tinción sea mejor estabilizada durante el tiempo.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de hematoxilina estabilizada que incluye: un solvente, hematoxilina, una cantidad de un oxidante químico suficiente para convertir por lo menos una parte de la hematoxilina en hemateína, un mordiente y tanto ciclodextrina como hidroquinona. En una realización particular, la solución de hematoxilina estabilizada incluye hematoxilina, agua, un poliol, una cantidad de oxidante suficiente para convertir por lo menos una parte de la hematoxilina en hemateína, un mordiente y tanto ciclodextrina como hidroquinona.

La composición incluye: un solvente, hematoxilina, una cantidad de un compuesto químico y tanto ciclodextrina como hidroquinona. En una realización particular un y tanto ciclodextrina como hidroquinona.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método automatizado para la tinción histoquímica de una muestra biológica. El método incluye poner en contacto la muestra biológica con una composición de hematoxilina dada a conocer y puede incluir además poner en contacto la muestra con una o más composiciones de tinción adicionales, tales como una o más contratinciones. En una realización particular, el método incluye además poner en contacto la muestra con una composición de eosina. En otra realización particular el método está automatizado.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de hematoxilina estabilizada que puede utilizarse para la tinción histoquímica. El método incluye formar una solución de hemateína, añadir un mordiente a la solución de hemateína para formar una solución de tinción y añadir tanto ciclodextrina como hidroquinona a la solución de tinción para formar una composición de hematoxilina estabilizada. La solución de hemateína se forma disolviendo hematoxilina en un solvente y después añadiendo un oxidante químico para convertir por lo menos una parte de la hematoxilina en hemateína.

La fig. 1 es un diagrama de bloques que describe de manera general un protocolo de tinción de H-E automatizado en el que puede incorporarse la composición de hematoxilina dada a conocer.

La fig. 2 es un diagrama que muestra los resultados de estabilidad para varias realizaciones de la composición de hematoxilina dada a conocer.

La fig. 3 es otro diagrama que muestra los resultados de estabilidad para varias realizaciones de la composición de hematoxilina dada a conocer.

La descripción siguiente de varias realizaciones describe ejemplos no limitativos que ilustran adicionalmente la invención. Todos los títulos de las secciones contenidas en la presente memoria, incluyendo las que han aparecido anteriormente, no deben interpretarse como limitativas de la invención sino que, por el contrario, se proporcionan a fin de estructurar la descripción ilustrativa de la invención proporcionada por la memoria. Con el fin de ayudar al lector a entender las diversas realizaciones ilustradas, se proporcionan explicaciones de términos particulares utilizadas en la descripción, después de las cuales se proporciona una vista general de realizaciones particulares de la invención y ejemplos concretos.

#### I. Términos:

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los significados comúnmente entendidos por el experto en la materia a la que se refiere la invención dada a conocer.

Las formas singulares "un", "una" y "el" o "ella" incluye los referentes plurales, am neos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un compuesto del huésped" se refiere a uno o más compuestos del huésped, tales como 2 o más compuestos del huésped, 3 o más compuestos del huésped o incluso 4 o más compuestos del huésped.

El término "antioxidante" se refiere a un átomo o molécula que presenta un potencial de oxidación mayor que un segundo átomo o molécula, de manera que el antioxidante preferentemente se oxida en lugar del segundo átomo o molécula. Por ejemplo, un antioxidante puede presentar un potencial de oxidación mayor que el de la hemateína y de esta manera ayudar a evitar la oxidación de la hemateína en oxihemateína. Además, un antioxidante también puede actuar como agente reductor, por ejemplo un agente reductor que convierte la oxihemateína nuevamente en hemateína. Los antioxidantes pueden encontrarse presentes en las composiciones dadas a conocer a concentraciones comprendidas entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 1 M, por ejemplo entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 500 mM, tal como entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 150 mM.

La expresión "solvente acuoso" se refiere a una composición que presenta agua como el componente principal y que es líquida a temperatura ambiente. Las mezclas de agua y uno o más alcoholes o polioles inferiores que presentan un contenido de agua de 50% o superior en volumen son ejemplos de solventes acuosos.

La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra que se obtiene a partir de, o de otro modo se deriva, de una entidad biológica tal como un animal, por ejemplo una muestra obtenida de un ser humano o de un animal veterinario, tal como un perro, gato, caballo o vaca. Entre los ejemplos de muestras biológicas se incluyen muestras citológicas, muestras de tejidos y líquidos biológicos. Entre los ejemplos particulares no limitativos de muestras biológicas se incluyen sangre, orina, preeyaculado, aspirados de pezón, semen, leche, esputo, moco, líquido pleural, líquido pélvico, líquido sinovial, líquido ascites, lavados de cavidad corporal, cepillados oculares, raspados de piel, un hisopado bucal, un hisopado vaginal, una citología vaginal, un hisopado rectal, un aspirado, una biopsia con aguja, una sección de tejido obtenida, por ejemplo, mediante cirugía o autopsia, plasma, suero, líquido espinal, líquido linfático, sudor, lágrimas, saliva, tumores, órganos y muestras obtenidas de cultivos in vitro de células o tejidos. Típicamente la muestra es una muestra de biopsia que ha sido fijada, procesada para eliminar el agua e incluida en parafina u otra sustancia cerosa adecuada para cortar en secciones de tejido. Las muestras biológicas pueden montarse sobre sustratos tales como portaobjetos de microscopía para el tratamiento y/o el examen.

La expresión "composición de hematoxilina" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere genéricamente tanto a composiciones formadas mediante la disolución de hemateína (el producto de oxidación de la hematoxilina) directamente en un solvente como a composiciones formadas mediante la disolución de la hematoxilina en un solvente y dejando o estimulando la oxidación de la hematoxilina en hemateína. Aunque es más típico preparar las composiciones dadas a conocer mediante la disolución de la hematoxilina en un solvente y la conversión de la hematoxilina en hemateína (completa o parcialmente) mediante oxidación natural mediante contacto con aire u oxidación química acelerada, los beneficios de los efectos estabilizadores de los componentes de la composición dada a conocer también pueden utilizarse en combinación con composiciones de hemateína preparadas mediante la disolución directa de la hemateína en solvente. De esta manera, en algunas realizaciones, una "composición de hematoxilina" incluirá, por lo menos inicialmente, una cantidad reducida o nula de hematoxilina, y consistirá principalmente de hemateína. Los compuestos del huésped pueden incluirse a concentraciones comprendidas entre

aproximadamente 1 mM y aproximadamente 1 M, por ejemplo de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 500 mM, tal como de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM.

5 La ciclodextrina utilizada en la solución de la presente invención puede incluir  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina y  $\delta$ -ciclodextrina, y derivados de cada una de dichas clases de ciclodextrina. Entre los ejemplos particulares de derivados de la ciclodextrina se incluyen  $\alpha$ -ciclodextrina hidroxipropilada,  $\beta$ -ciclodextrina hidroxipropilada y  $\gamma$ -ciclodextrina hidroxipropilada,  $\alpha$ -ciclodextrina hidroxietilada,  $\beta$ -ciclodextrina hidroxietilada y  $\gamma$ -ciclodextrina hidroxietilada,  $\alpha$ -ciclodextrina hidroxiisopropilada,  $\beta$ -ciclodextrina hidroxiisopropilada y  $\gamma$ -ciclodextrina hidroxiisopropilada,  $\alpha$ -ciclodextrina carboximetilada,  $\beta$ -ciclodextrina carboximetilada y  $\gamma$ -ciclodextrina carboximetilada,  $\alpha$ -ciclodextrina carboxietilada,  $\beta$ -ciclodextrina carboxietilada y  $\gamma$ -ciclodextrina carboxietilada,  $\alpha$ -ciclodextrina octil-succinada,  $\beta$ -ciclodextrina octil-succinada y  $\gamma$ -ciclodextrina octil-succinada,  $\alpha$ -ciclodextrina acetilada,  $\beta$ -ciclodextrina acetilada y  $\gamma$ -ciclodextrina acetilada,  $\alpha$ -ciclodextrina sulfatada,  $\beta$ -ciclodextrina sulfatada y  $\gamma$ -ciclodextrina sulfatada. Entre otros ejemplos particulares de derivados de ciclodextrinas se incluyen los derivados de  $\beta$ -ciclodextrina siguientes: 2,3-dimetil-6-aminometil- $\beta$ -ciclodextrina, 6-azido- $\beta$ -ciclodextrina, 6-bromo- $\beta$ -ciclodextrina, 6A,6B-dibromo- $\beta$ -ciclodextrina, 6A,6B-diiodo- $\beta$ -ciclodextrina, 6-O-maltosil- $\beta$ -ciclodextrina, 6-yodo- $\beta$ -ciclodextrina, 6-tosil- $\beta$ -ciclodextrina, peracetil-maltosil- $\beta$ -ciclodextrina, 6-t-butilidimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina, 2,3-diacetil-6-butildimetil-silil- $\beta$ -ciclodextrina, 2,6-dibutil-3-acetil- $\beta$ -ciclodextrina, 2,6-dibutil- $\beta$ -ciclodextrina, 2,6-t-butil-dimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina y 2,6-di-O-metil-3-alil- $\beta$ -ciclodextrina. Una diversidad de ciclodextrinas y derivados de ciclodextrina pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo de CTD, Inc. (High Springs, FL) o pueden sintetizarse siguiendo procedimientos descritos de manera general en la literatura científica, por ejemplo en "Synthesis of Chemically Modified Cyclodextrins", Croft y Bartsch, Tetrahedron 39:1417-1474, 1983.

25 La expresión "alcohol inferior" se refiere a un compuesto que presenta la fórmula R-OH, en la que R es un grupo alquilo que presenta entre 1 y 5 átomos de carbono, tal como un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo sec-butilo, un grupo t-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, o un grupo neopentilo. Entre los ejemplos de alcoholes inferiores se incluyen metanol, etanol e isopropanol.

30 El término "oxidante" se refiere a un átomo o molécula que presenta un mayor potencial de reducción que una segunda molécula, por ejemplo un mayor potencial de reducción que la hematoxilina, de manera que reaccionará y oxidará la hematoxilina a hemateína. Entre los oxidantes se incluyen el oxígeno molecular natural presente en la atmósfera, que se difunde y oxida la hematoxilina, y un "oxidante químico", que se combina activamente con la hematoxilina (típicamente en solución) para convertir por lo menos una parte de la hematoxilina en hemateína. Entre los ejemplos de oxidantes químicos útiles se incluyen uno o más de entre una sal yodato (tal como yodato sódico y yodato potásico), óxido mercúrico, una sal permanganato (tal como permanganato potásico), una sal peryodato (tal como peryodato sódico y peryodato potásico) y un peróxido (tal como peróxido de hidrógeno). En realizaciones particulares, el oxidante químico comprende yodato sódico.

40 El término "mordiente" se refiere a una especie de metal iónico con el que un pigmento (tal como hemateína) puede formar un complejo (tal como un complejo catiónico) que sirve para ligar el pigmento (tal como hemateína) a componentes celulares particulares, tales como ADN nuclear, mielina, y fibras de elastina y colágeno, estriaciones musculares y mitocondrias. Entre los ejemplos de mordientes se incluyen el aluminio (por ejemplo en forma de alúmina, tal como sulfato de aluminio, sulfato de aluminio-potasio o sulfato de aluminio-amonio), hierro, tungsteno, circonio, bismuto, molibdeno (ácido fosfomolibdico y ácido molibdico) y vanadio (vanadato).

45 La expresión "antioxidante soluble en agua" se refiere a un antioxidante que presenta una solubilidad en agua a 25°C que resulta suficiente para proporcionar una concentración del antioxidante de por lo menos 1 mM, tal como superior a 5 mM, superior a 10 mM o incluso superior a 50 mM.

## 50 II. Descripción general

Se da a conocer una composición de hematoxilina estabilizada, la cual puede utilizarse para la tinción de una muestra biológica, y en particular para la tinción de los núcleos de las células en la muestra biológica. La composición de la invención incluye el mordiente hemateína (tal como hemalum) estabilizado con tanto ciclodextrina como hidroquinona. Las composiciones de hematoxilina de la invención muestran una estabilidad mejorada respecto a la similar hematoxilina hemalum) estabilizada con tanto ciclodextrina como hidroquinona. Las composiciones no incluyen ciclodextrina ni hidroquinona.

60 De manera similar, se encuentra contemplada la utilización de antioxidantes y compuestos del huésped para incrementar la estabilidad de otras composiciones de pigmento histoquímicas y su utilización en métodos de tinción histoquímica. Además, en el caso de la hematoxilina, una composición de hematoxilina dada a conocer aparentemente también presenta una concentración de pigmento efectiva más elevada que permite una tinción más oscura de muestras biológicas en una cantidad de tiempo predeterminada, lo que resulta especialmente ventajoso en un método de tinción automatizado en el que la muestra biológica se monte sobre un portaobjetos de microscopía, e incluso más ventajosamente en el caso de que el portaobjetos se procese en una posición horizontal. 65 Todas las composiciones de hematoxilina conocidas y todos los métodos de tinción histoquímica que utilizan hematoxilina como parte del procedimiento de tinción pueden beneficiarse de la aplicación de las enseñanzas de la

presente exposición. Además, los beneficios pueden extenderse a "tinciones especiales" y a la aplicación automatizada de dichas tinciones especiales a muestras biológicas (tales como el NexES™ Special Stainer (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ)).

- 5 En una realización, la composición dada a conocer incluye dos o más antioxidantes diferentes, tales como dos o más antioxidantes solubles en agua. En otras realizaciones todavía más particulares, la composición incluye uno o más compuestos del huésped y uno o más antioxidantes.

10 En algunas realizaciones, el solvente es un solvente acuoso y el antioxidante es un antioxidante soluble en agua. Entre los ejemplos de antioxidantes solubles en agua se incluyen hidroquinonas, galatos de n-alquilo (tales como galatos de n-propilo, n-octilo y n-dodecilo), azúcares reductibles tales como sorbitol y manitol, benzoatos e hidroxibenzoatos, sulfitos y metabisulfitos, determinados ácidos tales como ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido eritórbito, ácido ascórbico, ácido úrico, ácido tánico y sales de dichos ácidos (tales como sales de  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ), quelantes tales como EDTA que eliminan metales que funcionan como oxidantes e hidrato de cloral. En realizaciones particulares, el antioxidante soluble en agua incluye uno o más de entre hidroquinona y galato de n-propilo.

20 Para la composición pueden utilizarse diversos solventes, aunque típicamente el solvente comprende uno o más de entre agua, un alcohol inferior tal como etanol, y un poliol. En realizaciones particulares, el solvente comprende un solvente acuoso en el que el solvente acuoso comprende agua y un poliol. Entre los ejemplos particulares de polioles útiles se incluyen glicerol, etilenglicol, propilenglicol, poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol). Las composiciones de solvente acuoso típicamente comprenden entre 5% y 45% en volumen de uno o más de entre etilenglicol y propilenglicol, y más típicamente entre 10% y 30% en volumen de uno o más de entre etilenglicol y propilenglicol.

25 La cantidad de oxidante químico utilizada en algunas realizaciones de la composición puede resultar suficiente para oxidar completamente (tal como de manera sustancialmente cuantitativa) la hematoxilina en hemateína, o suficiente para sólo oxidar parcialmente la hematoxilina en hemateína. En realizaciones particulares se oxida más de la mitad de la hematoxilina en hemateína con el oxidante químico, y en otras, menos de la mitad de la hematoxilina se oxida en hemateína con el oxidante químico. Por ejemplo, puede oxidarse entre 1% y 50% de la hematoxilina en hemateína con el oxidante químico, aunque más típicamente se oxida entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30% de la hematoxilina en hemateína con el oxidante químico. En ejemplos particulares, la proporción molar de hematoxilina a oxidante utilizada en la composición es de entre 6:1 y 1:1. Debe entenderse que aunque el oxidante químico se considera parte de la composición, se convierte en sus productos de reducción tras la reacción con la hematoxilina, quedando los productos de reacción en la composición.

40 El mordiente de la composición puede ser cualquier mordiente, tal como uno o más de entre un mordiente de aluminio, un mordiente de hierro, un mordiente de bismuto, un mordiente de cobre, un mordiente de molibdeno, un mordiente de vanadio y un mordiente de circonio. En algunas realizaciones, el mordiente comprende una alúmina, y en realizaciones más particulares, el mordiente comprende sulfato de aluminio. El mordiente puede encontrarse presente en la composición a una concentración superior a la concentración de la hemateína en la composición (determinable mediante refractometría, cromatografía de capa delgada o espectroscopía) o puede encontrarse presente en la composición a una concentración inferior a la concentración de la hemateína en la composición. Alternativamente, en algunas realizaciones la proporción molar de hematoxilina a mordiente en la composición es de entre 2:1 y 1:100, y en realizaciones particulares, la proporción molar de hematoxilina a mordiente en la composición es de entre 1:5 y 1:20.

50 En algunas realizaciones, la composición incluye además un ácido, tal como ácido acético. En otras realizaciones, no se añade ningún ácido y la ausencia del ácido inesperadamente todavía proporciona una composición de hematoxilina estabilizada y efectiva. En otras realizaciones, la composición incluye además un tampón para controlar el pH, por ejemplo un tampón para controlar el pH a un pH de entre 1 y 4, tal como un pH de aproximadamente 2,5.

55 En algunas realizaciones particulares, la composición comprende una mezcla de agua y etilenglicol tal como el solvente, yodato sódico tal como el oxidante, sulfato de aluminio como mordiente, ciclodextrina como compuesto del huésped e hidroquinona como antioxidante soluble en agua. En realizaciones todavía más particulares, la mezcla de agua y etilenglicol comprende entre 10% y 40% en volumen de etilenglicol y entre 60% y 90% de agua. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método automatizado para la tinción histoquímica de una muestra biológica, incluyendo el método la puesta en contacto de la muestra biológica con una composición de hematoxilina dada a conocer y puede incluir además poner en contacto la muestra con una contratinción. En algunas realizaciones, la puesta en contacto de la muestra con una contratinción comprende poner en contacto la muestra con uno o más de entre eosina Y, naranja G, verde pálido SF amarillento, marrón de Bismarck, verde rápido FCF, OA-6, EA25, EA36, EA50 y EA65. Las fórmulas y métodos para preparar dichas contratinciones pueden encontrarse en, por ejemplo, StainsFile (un recurso de Internet para histotecnólogos mantenido por Bryan Llewellyn); Kiernan, "Histological and Histochemical methods: Theory and Practice", 3a ed., Butterworth Heinemann, Oxford, Reino Unido, y en Horobin y Kiernan, "Conn's biological stains: a handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine", 10a ed., Oxford: BIOS, ISBN 1859960995, 2002. En otras realizaciones, la puesta en

contacto de la muestra con la composición de hematoxilina comprende un protocolo progresivo de tinción de hematoxilina. En otras, la puesta en contacto de la muestra con la composición de hematoxilina comprende un protocolo de tinción regresiva de hematoxilina. El método puede llevarse a cabo en una muestra biológica soportada sobre un sustrato, tal como un portaobjetos de microscopía. En realizaciones particulares, el método se utiliza para teñir una sección de tejido o una muestra citológica montada sobre un portaobjetos de microscopía. En realizaciones particulares que incluyen además una etapa de contratinción, el método puede ser un método de tinción de H-E o un método de tinción PAP, y más particularmente un método de tinción H-E o PAP automatizado.

En un aspecto adicional, se da a conocer un método para preparar una composición de hematoxilina estabilizada para la tinción histoquímica de una muestra biológica. En una realización, el método para preparar una solución de hematoxilina estabilizada incluye formar una solución de hemateína, añadir un mordiente a la solución de hemateína para formar una solución de tinción y añadir tanto ciclodextrina como hidroquinona a la solución de tinción para formar la composición de hematoxilina estabilizada. La formación de la solución de hemateína comprende disolver hematoxilina en un solvente y añadir una cantidad de un oxidante químico suficiente para convertir por lo menos una parte de la hematoxilina en hemateína. En realizaciones particulares el solvente utilizado para disolver la hematoxilina comprende una composición acuosa, tal como una composición que incluye agua y un poliol. Entre los polioles útiles, tal como se ha indicado anteriormente, se incluyen glicerol, etilenglicol y propilenglicol.

### III. EJEMPLOS

Aunque el método y la composición de la exposición pueden aplicarse a cualquier procedimiento de tinción histológica (manual o automatizado) o a cualquier instrumento de tinción de portaobjetos, la composición de hematoxilina dada a conocer resulta particularmente útil incorporada en el procedimiento de tinción de H-E automatizado que se ha desarrollado para la utilización en el sistema de procesamiento de portaobjetos de alto volumen que se describe en las publicaciones de patente US nº 2004/0002163 y nº 2005/0186114. Brevemente, el sistema de procesamiento de portaobjetos automatizado que se escribe en las solicitudes anteriormente indicadas es un sistema de procesamiento de portaobjetos de alto volumen que envía bandejas que contienen una pluralidad de portaobjetos en posiciones sustancialmente horizontales (para minimizar la contaminación cruzada) entre estaciones de trabajo que llevan a cabo diversas operaciones de procesamiento de los portaobjetos. Pueden aplicarse reactivos nuevos a cada portaobjetos durante el procesamiento y la contaminación cruzada de los portaobjetos con reactivos puede eliminarse sustancialmente debido a que los portaobjetos se tratan separadamente de manera espaciada en la bandeja. En una configuración, el sistema incluye un calefactor radiante, una estación de trabajo desparafinadora/teñidora/intercambiadora de solvente combinada, un horno de convección y un aplicador de cubreobjetos. Una bandeja de portaobjetos que porta las muestras de tejido incluidas en parafina puede calentarse bajo el calefactor radiante del sistema para extender la parafina en las muestras para una más fácil eliminación y también para adherir las muestras a los portaobjetos. A continuación puede transportarse la bandeja hasta la estación de trabajo multifuncional desparafinadora/teñidora/intercambiadora de solvente, en donde los portaobjetos pueden desparafinarse, teñirse e intercambiarse el solvente. Seguidamente una bandeja de portaobjetos teñidos que está lista para la adición del cubreobjetos puede enviarse al aplicador de cubreobjetos del sistema, en donde se añaden los cubreobjetos a los portaobjetos. Tras la adición de los cubres a los portaobjetos, la bandeja puede transportarse al horno de convección para curar los cubreobjetos sobre los portaobjetos teñidos. Los reactivos para el sistema pueden proporcionarse en recipientes de bolsa interior que se cargan en el módulo de líquidos del sistema. El teñidor de alto volumen indicado inmediatamente antes se encuentra disponible comercialmente de Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ.

Aunque el sistema de tinción indicado inmediatamente antes puede configurarse para llevar a cabo cualquier procedimiento de tinción histológica, el sistema se configuró para llevar a cabo una tinción de H-E progresiva utilizando las composiciones de hematoxilina dadas a conocer que se describen en detalle posteriormente. Se muestra en la fig. 1 un esquema que muestra el procedimiento global, que incluye: una etapa de horneado para adherir las muestras a los portaobjetos, una etapa de desparafinación para eliminar la parafina de las muestras incluidas en parafina, una etapa de tinción de hematoxilina (que puede utilizar las composiciones de hematoxilina dadas a conocer), una etapa de azulado que eleva el pH y torna la hematoxilina a un color azul, proporcionando un mejor contraste con la eosina añadida después, una etapa de tinción de eosina, una etapa de diferenciación que se utiliza para eliminar el exceso de eosina y para tornar la eosina a diversos tonos de rojo a rosa, una etapa de deshidratación para eliminar el agua de la muestra utilizando etanol al 100%, una etapa en la que los portaobjetos se exponen a una temperatura elevada y a un flujo de aire para eliminar el etanol, una etapa de adición de cubre en la que se dispensa limoneno en la muestra, y una etapa de curado.

Se investigaron varias composiciones de hematoxilina en un intento por proporcionar una composición estable que también proporcionase una tinción nuclear más intensa (en virtud de que presentase una concentración inicial de hemateína efectiva más alta). Tradicionalmente se preparan soluciones que presentan concentraciones más altas de hemateína y que en consecuencia pueden teñir los núcleos más intensamente y se utilizan en los primeros días debido a que dichas soluciones formarán cantidades abundantes de precipitado. Se añadieron antioxidantes solubles en agua (en el presente ejemplo, hidroquinona y galato de n-propilo) a una diversidad de formulaciones de hematoxilina, individualmente o en combinación, con el fin de determinar si los antioxidantes podrían estabilizar la hemateína frente a la degradación oxidativa y precipitación, y se utilizó la  $\beta$ -ciclodextrina para determinar si la

adición de un compuesto del huésped podía enlentecer adicionalmente la oxidación natural de la hemateína y la formación resultante de precipitado.

En todos los casos se prepararon las formulaciones de hematoxilina de la manera siguiente:

- 5 1) Se mezcló agua desionizada y etilenglicol (al 25% en volumen, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o propilenglicol (al 25% en volumen, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para formar un solvente para la composición.
- 2) A continuación se añadió al solvente pigmento hematoxilina (Dudley Chemical Corp., Lakewood, NJ) a la concentración indicada en las figs. 2 y 3, formando una solución de hematoxilina.
- 10 3) Se añadió yodato sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a las concentraciones indicadas en las figs. 2 y 3 y se dejó que oxidase la hematoxilina en hemateína, formando de esta manera una solución de hemateína que presentaba una concentración molar inicial de hemateína aproximadamente igual a la concentración molar de la hematoxilina menos la concentración molar del yodato sódico.
- 15 4) Se añadió octadecahidrato de sulfato de aluminio (JT Baker, Phillipsburg, NJ) a la solución de hemateína a la concentración indicada en las figs. 2 y 3 para formar una solución de hemalum.
- 5) A continuación se añadieron combinaciones de hidroquinona, galato de n-propilo e hidrato de  $\beta$ -ciclodextrina (todos disponibles de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a las concentraciones indicadas en las figs. 2 y 3, formando las composiciones sometidas a ensayo.
- 20 6) Se introdujeron las composiciones en recipientes de bolsa interior separadas que se utilizaron para el almacenamiento a bordo de reactivos en el sistema de tinción automatizado descrito anteriormente.

No se añadió ácido a las composiciones utilizadas en los presentes ejemplos.

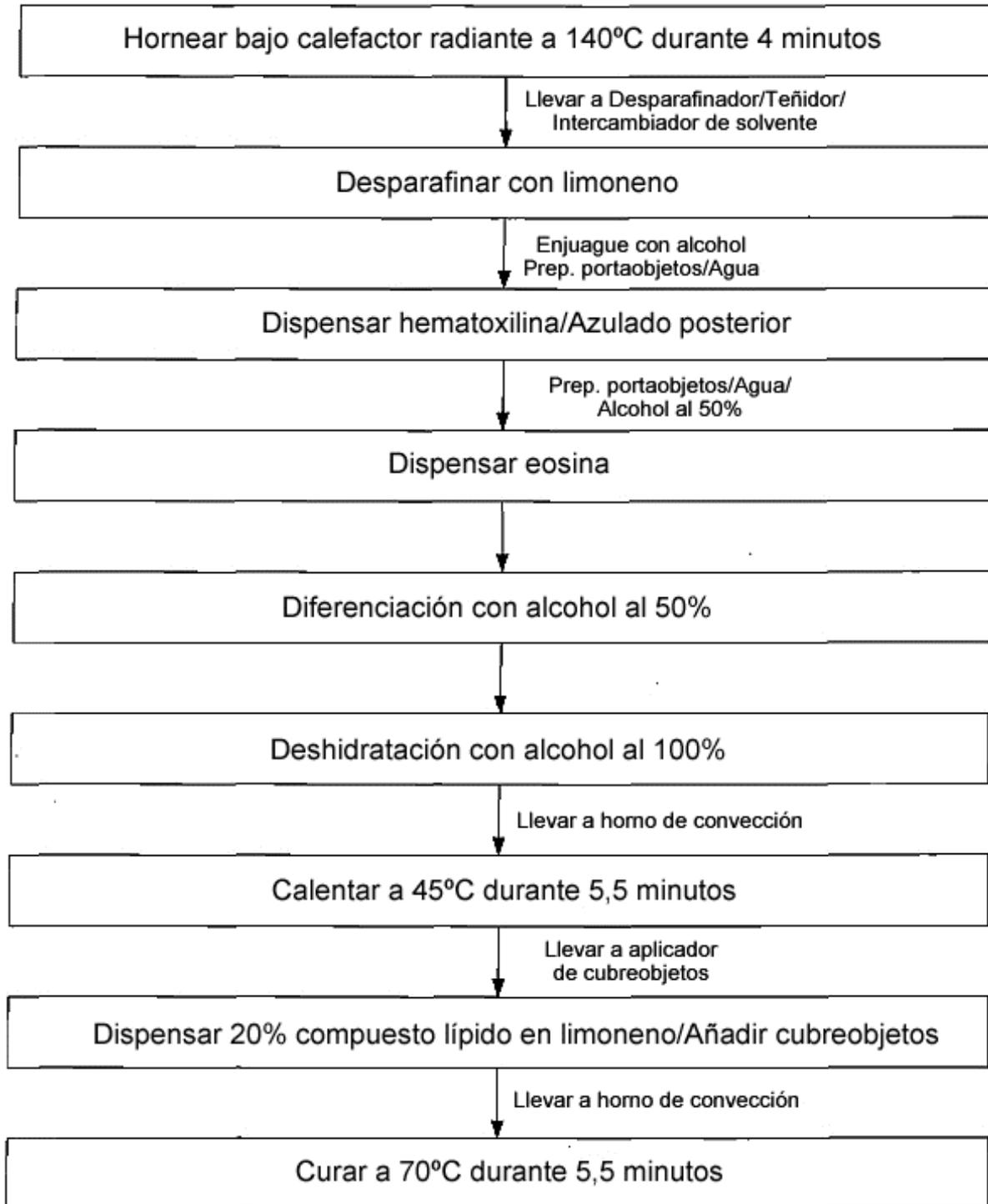
25 Las figs. 2 y 3 resumen 8 composiciones diferentes y los resultados de ensayo de la estabilidad a varias temperaturas se basaron en la observación de los precipitados en los recipientes de bolsa interior. En todos los casos, la adición de uno o más antioxidantes y el compuesto del huésped mejoraron la estabilidad en comparación con una solución de hematoxilina "no estabilizada" equivalente sin un antioxidante y/o compuesto del huésped añadido, en el que la hematoxilina no estabilizada muestra precipitados en todo el recipiente tras una semana a una temperatura de entre 2°C y 8°C, tras 4 semanas a temperatura ambiente y a 30°C y tras 2 semanas a 45°C.

30 También se llevó a cabo un ensayo de estabilidad de larga duración que incluyó la utilización de composiciones almacenadas para la tinción manual de portaobjetos multitejido. Se introdujeron en recipientes de múltiples bolsas interiores cada uno de dos lotes de una solución acuosa de hematoxilina que incluía etilenglicol al 25% (v/v), hematoxilina 20 mM, yodato sódico 3,3 mM, octadecahidrato de sulfato de aluminio 20 mM, hidroquinona 85 mM e hidrato de  $\beta$ -ciclodextrina 10 mM con un pH de aproximadamente 2,6. Un recipiente de cada lote se dejó bajo condiciones ambientales; un recipiente de cada lote se sometió a un ciclo de congelación-descongelación, un recipiente de cada lote se sometió a condiciones de estrés durante el transporte de 45°C a temperatura ambiente y un recipiente de cada lote se sometió a condiciones de estrés durante el transporte de temperatura entre 2°C y 8°C y la temperatura ambiente. A intervalos de un mes se inspeccionó cada uno de los recipientes para la presencia de precipitados y se extrajo una alícuota y se comprobó su pH. A continuación se utilizó la alícuota para teñir manualmente un portaobjetos de microscopía que portaba múltiples secciones de tejido (hígado, riñón, colon, piel y una amígdala, nódulo linfático o bazo). Tras un total de 13 meses de ensayos mensuales, las soluciones en la totalidad de los diferentes recipientes consistentemente mostró la ausencia de precipitados, el pH de cada una de las soluciones en los diferentes recipientes permaneció consistentemente estable y las soluciones de hematoxilina en los diferentes recipientes proporcionó consistentemente una tinción nuclear aceptable de las secciones de tejido tras el procedimiento manual de tinción.

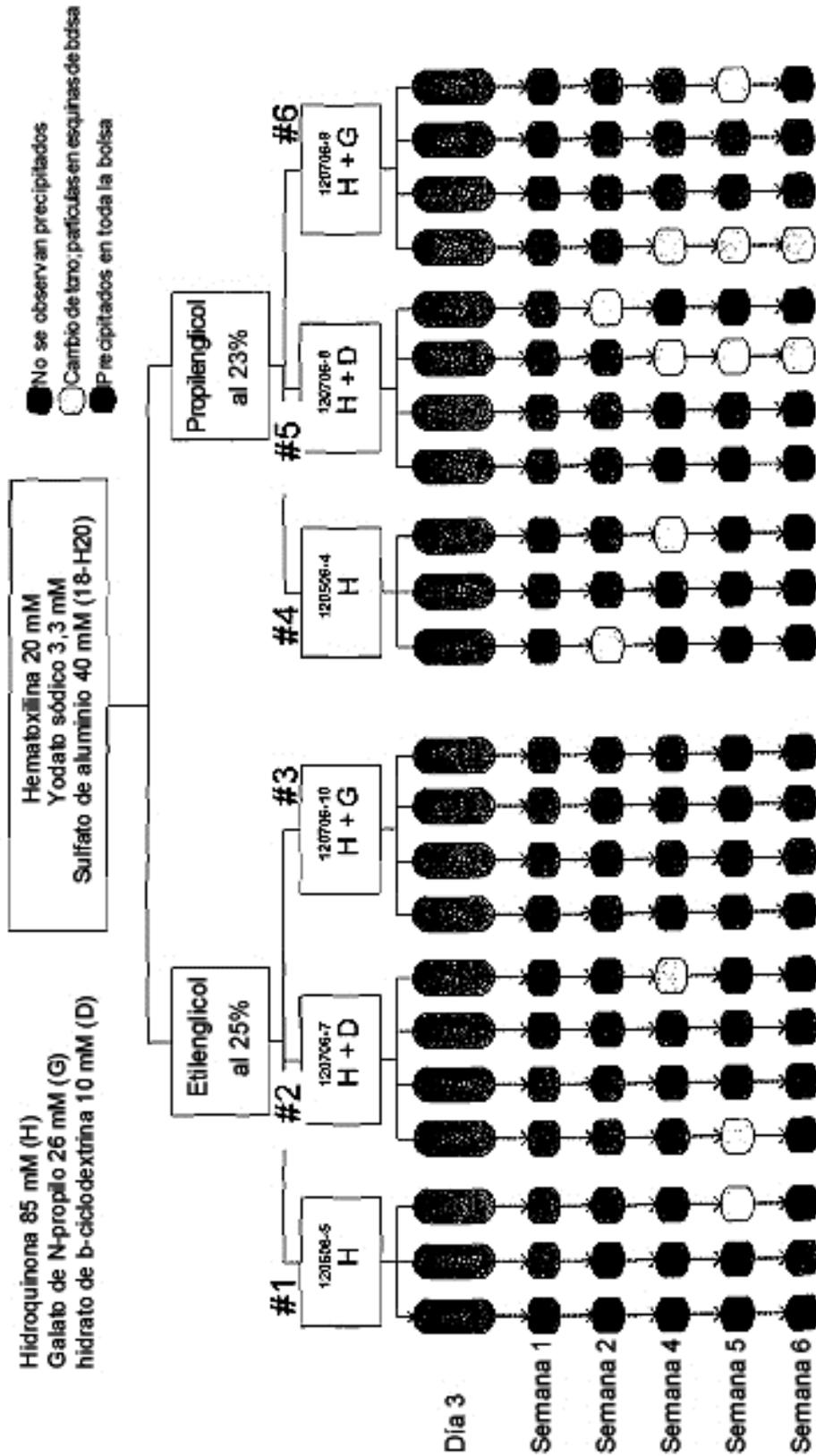
**REIVINDICACIONES**

1. Composición de hematoxilina estabilizada para la tinción de una muestra de tejido o citológica, que comprende:
- 5 un solvente,  
hematoxilina,  
una cantidad de un oxidante químico suficiente para convertir por lo menos una parte de la hematoxilina en hemateína,  
un mordiente, y
- 10 tanto ciclodextrina como hidroquinona.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el solvente comprende uno o más de entre agua, un alcohol inferior y un poliol.
- 15 3. Composición según la reivindicación 2, en la que el poliol comprende uno o más de entre glicerol, etilenglicol, propilenglicol, poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol).
4. Composición según la reivindicación 3, en la que uno o más de entre etilenglicol y propilenglicol comprende entre 10% y 30% en volumen de una composición de solvente acuoso.
- 20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el oxidante químico es uno o más de entre yodato sódico, óxido mercurico, permanganato potásico, peryodato potásico y peróxido de hidrógeno.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el mordiente comprende uno o más de entre un mordiente de aluminio, un mordiente de hierro, un mordiente de bismuto, un mordiente de cobre, un mordiente de molibdeno, un mordiente de vanadio y un mordiente de circonio, en la que el mordiente de aluminio es alúmina o sulfato de aluminio.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un ácido, en la que el ácido comprende ácido acético.
- 30 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:  
una mezcla de agua y etilenglicol como el solvente,  
yodato sódico como el oxidante, y
- 35 sulfato de aluminio como el mordiente,  
en la que la proporción molar de hematoxilina a oxidante en la composición es de entre 6:1 y 1:1, y  
en la que la proporción molar de hematoxilina a mordiente en la composición es de entre 2:1 y 1:100.
9. Método para preparar una composición de hematoxilina estabilizada para la tinción histoquímica de una muestra de tejido o citológica, que comprende:
- 40 formar una solución de hemateína,  
añadir un mordiente a la solución de hemateína para formar una solución de tinción, y  
añadir tanto ciclodextrina como hidroquinona a la solución de tinción para formar la composición de hematoxilina estabilizada,
- 45 en la que la formación de la solución de hemateína comprende:  
disolver hematoxilina en un solvente, y  
añadir una cantidad de un oxidante químico suficiente para convertir por lo menos una parte de la hematoxilina en hemateína.
- 50 10. Método según la reivindicación 9,  
en el que el solvente comprende agua y un poliol,  
en el que el poliol es uno o más de entre glicerol, etilenglicol y propilenglicol, y  
en el que uno o más de entre etilenglicol y propilenglicol comprende entre 10% y 30% en volumen de una composición de solvente acuoso.
- 55 11. Método según la reivindicación 9 o 10, en el que el mordiente comprende uno o más de entre un mordiente de aluminio, un mordiente de hierro, un mordiente de bismuto, un mordiente de cobre, un mordiente de molibdeno, un mordiente de vanadio y un mordiente de circonio, en el que el mordiente de aluminio es alúmina o sulfato de aluminio.
- 60 12. Método automatizado para la tinción histoquímica de una muestra de tejido o citológica, que comprende poner en contacto la muestra con una composición de hematoxilina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra se soporta sobre un sustrato.
- 65

13. Método según la reivindicación 12, que comprende además poner en contacto la muestra con una contratinción, en el que la puesta en contacto de la muestra con una composición de hematoxilina comprende un protocolo de tinción de hematoxilina progresiva o regresiva, el sustrato comprende un portaobjetos de microscopía, y
- 5 la contratinción comprende uno o más de entre eosina Y, naranja G, verde pálido SF amarillento, marrón de Bismarck, verde rápido FCF, OA-6, EA25, EA36, EA50 y EA65.

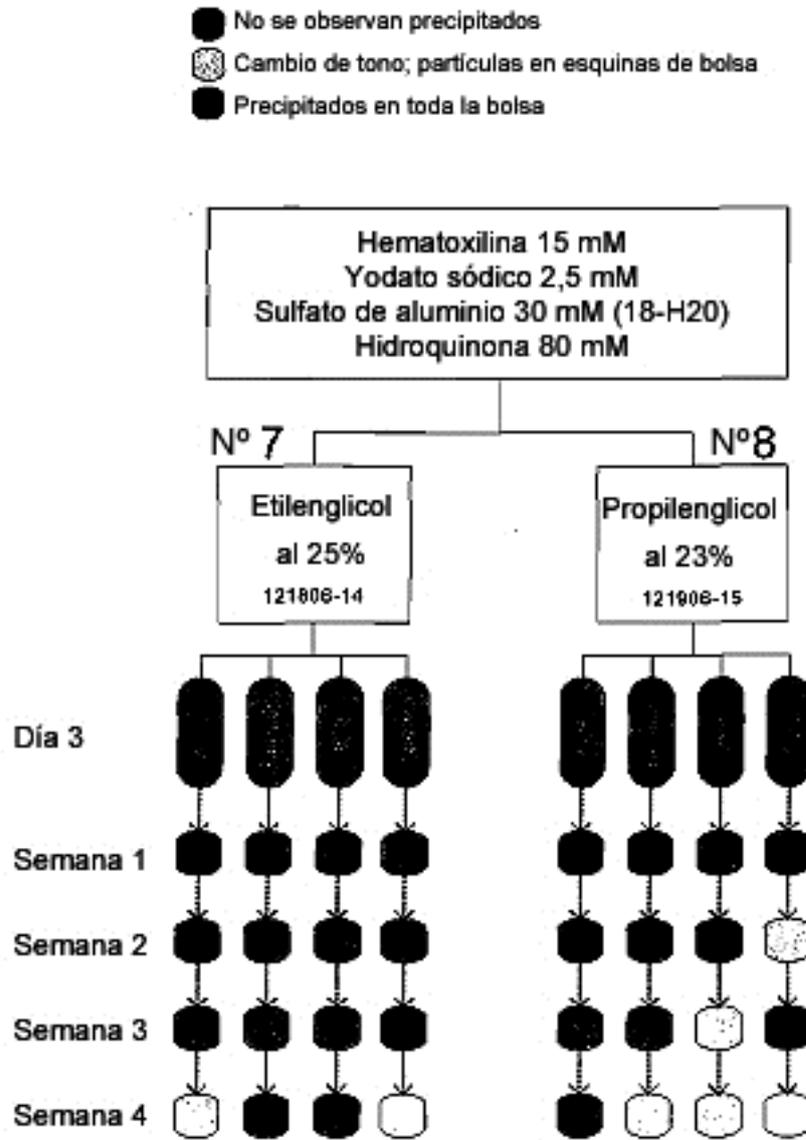


**FIG. 1**



Datos basados en la inspección visual de precipitados en la bolsa interior

**FIG. 2**



**FIG. 3**