

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 487**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2013 PCT/EP2013/054146**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13131816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2013 E 13712493 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2823282**

54 Título: **Agentes de fijación exentos de formalina para tinciones histológicas de muestras de tejidos**

30 Prioridad:

06.03.2012 DE 102012101896

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

05.03.2018

73 Titular/es:

**GERIGK, ROBERTO (100.0%)
Bräugasse 30a
84453 Mühldorf am Inn, DE**

72 Inventor/es:

GUDDO, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 657 487 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

Agentes de fijación exentos de formalina para tinciones histológicas de muestras de tejidos

- 5 El invento se refiere a una solución de fijación para la fijación de muestras de tejidos o respectivamente secciones de tejidos, que no habían sido fijadas con formalina. El presente invento se ha acreditado como especialmente ventajoso para tejidos sensibles, que son difícilmente cortables en el caso de una fijación con formalina, los cuales no sólo se puedan cortar en una mejor calidad, sin artefactos o aberraciones cromáticas, sino que tengan unas más altas brillantez y estabilidad del color en la tinción.
- 10 Para investigaciones histológicas en biología y medicina, unas muestras de tejidos usualmente extraídas recientemente de un organismo, o también unos órganos enteros o animales / cuerpos de animales / plantas, o respectivamente organismos enteros/as, se introducen en unas denominadas soluciones de fijación especiales (por infiltración), o respectivamente se empapan con la solución de fijación a través de un dispositivo de perfusión o
- 15 instilación. La fijación sirve para fijar (= establecer) el estado del tejido en el momento de la extracción, con el fin de investigar con microscopio y/o teñir directamente en un momento posterior precisamente este estado y luego diferenciar con microscopio las partes teñidas de células o tejidos con ayuda de sus propiedades químicas, y por consiguiente investigarlos, o respectivamente establecer unos diagnósticos.
- 20 Si una muestra de tejido se introduce en la solución de fijación, entonces se habla de una "fijación por inmersión", si la pieza de tejido o respectivamente el órgano u organismo entero se empapa a través de su sistema vascular con la solución de fijación, entonces se habla de una fijación por perfusión o instilación. El proceso de fijación es una reacción química del agente fijador propiamente dicho con las proteínas del tejido. De esta manera se hace estable una muestra, es decir que se evitan unos procesos de descomposición provocados por enzimas, bacterias u hongos.
- 25 Además de ello, el tejido se endurece, y en general tan sólo de este modo se traslada a un estado en el que se puede seccionar con un microtomo en láminas finas con un espesor de unos pocos μm .
- A continuación de la fijación, la muestra de tejido se puede empotrar por ejemplo en una parafina. Para esto, usualmente la muestra se deshidrata primeramente en una serie de alcoholes con concentraciones crecientes. De
- 30 seguido, se elimina el alcohol a través de un denominado intermedio, la muestra se empapa entonces en varias etapas con una parafina a través de xileno o de una sustancia sustitutiva del xileno, y finalmente se vierte en la parafina mediante un molde. Después de la solidificación de la parafina, el bloque de parafina así obtenido se elabora con un microtomo para dar unas secciones finas (por regla general con un espesor de entre 2 y 5 μm).
- 35 Un bloque de parafina se puede almacenar en las condiciones de temperatura ambiente o respectivamente de un modo ligeramente refrigerado, es decir que, por ejemplo, se pueden producir unas secciones individuales, y luego, el bloque se puede almacenar otra vez y se puede guardar para una posterior elaboración.
- En lugar de una parafina, para el empotramiento de muestras pueden pasar a emplearse también otros polímeros, tales como celoidina, un PEG de alto peso molecular, acrilatos y otros.
- 40 Tales secciones finas se extienden usualmente sobre un portaobjetos de vidrio y, a continuación, se tiñen de acuerdo con unas instrucciones especiales (unos/as denominados/as protocolos de tinción o prescripciones de tinción histológicos/as). Tan sólo mediante la tinción es posible distinguir con un microscopio unas diferencias en la estructura de los tejidos, diferenciar un tejido enfermo de otro sano, y llevar a cabo unas valoraciones diagnósticas,
- 45 puesto que los colorantes utilizados se fijan específicamente a determinadas estructuras o determinados componentes químicos de las estructuras tisulares, y por consiguiente tiñen a éstas específicamente, es decir en dependencia de su comportamiento químico. Así, p.ej. los núcleos celulares se pueden diferenciar manifiestamente con respecto del plasma celular, diferentes tipos de células se tiñen de diversa manera, al igual que las fibras u otros componentes tisulares. La imagen de conjunto de una tinción permite realizar entonces una valoración diagnóstica
- 50 del tejido investigado.
- El agente fijador más habitual en la histología es la formalina. Ella se empleó por primera vez por Isaak y Ferdinand Blum en el Forschungsinstitut Senckenberg en Fráncfort del Meno a principios de los años 1890 como un agente de fijación para muestras de tejidos, y desde el principio, ella se acreditó como esencialmente mejor apropiada que p.ej.
- 55 el espíritu alcohólico (etanol), la trementina u otras sustancias (compárese la cita bibliográfica I. Blum: 1893). Con mucha rapidez la formalina triunfó por medio de la medicina, y se ha impuesto finalmente en todo el mundo como el agente de fijación definitivo, puesto que es fácil de conseguir y manipular, y los resultados son comparables entre sí a lo largo de un amplio sector de aplicaciones.
- 60 Junto a la formalina, se han utilizado, y se utilizan todavía, en la histología también muchos otros agentes de fijación, que están constituidos sobre la base de metanol, etanol, ácido acético, cloroformo, hidrato de cloral, ácido pícrico, dicloruro de mercurio, dicromato de potasio, ácido crómico, tetróxido de osmio y diversas soluciones salinas y mezclas de sales. Sin embargo, todos estos agentes de fijación no son universales, sino que solamente son apropiados en cada caso específicamente para determinados tipos de tejidos, determinados planteamientos de
- 65 cuestiones y determinadas elaboraciones ulteriores. Existe una relación directa entre una fijación (un agente de fijación), la conservación del tejido y el resultado de la tinción, que se puede valorar finalmente en un microscopio.

Puesto que la fijación constituye por regla general en la mayoría de los casos una reacción química (véase a este respecto la obra "Histological Techniques, Laboratory Manual Columbia University", 1975), que influye sobre las propiedades químicas de los tejidos, desde hace mucho tiempo se sabe que determinados colorantes o respectivamente determinadas soluciones de colorantes son compatibles o respectivamente incompatibles solamente con determinados agentes de fijación o respectivamente procedimientos de fijación. Cuando se hubo realizado una fijación p.ej. con etanol o con unas mezclas de etanol y ácido acético, entonces fundamentalmente se pueden realizar solamente con dificultades unas diferenciaciones entre tejidos, tanto debido a que, en el caso de la fijación con etanol, las células y los tejidos se deshidrogenan fuertemente y se encogen, así como también porque p.ej. los colorantes sobre mordientes no proporcionan ningún resultado satisfactorio. Por otra parte, ciertas tinciones, p.ej. en el caso de la utilización de ácido pícrico, son esencialmente más brillantes e intensas en su manifestación que en el caso de la utilización de formalina como agente de fijación, de tal manera que en algunos protocolos de tinción se recomiendan también unos tratamientos previos con ácido pícrico de las secciones.

A pesar de que la formalina se distinguió al principio como un sobresaliente agente de fijación, con el paso del tiempo se puso de manifiesto que en los casos de numerosas técnicas de tinción se presentaron algunos problemas en la histología y patología. Puesto que el formaldehído, en solución y en contacto con el aire, se oxida para dar ácido fórmico, en unas muestras ricas en sangre se forman los denominados "pigmentos de formalina". Estos cristales, que son muy refringentes, se forman a partir de la reacción entre el ácido fórmico y la sangre, y son considerados en la histología y patología como unas aberraciones cromáticas perturbadoras. También ciertos estabilizadores contra la polimerización, que se añaden a la solución comercial de formalina, tales como metanol y butanol, pueden influir negativamente sobre los resultados de una tinción histológica, ya que - de un modo similar al etanol - actúan deshidrogenando y perturban ciertas uniones entre un colorante y un tejido.

También en una rama especial de la histología, la denominada inmunohistoquímica, la formalina desempeña un cometido primordial. Sin embargo, ella se utiliza en el presente caso por regla general no como "formalina al 4 %" sino como una "solución de paraformaldehído". El paraformaldehído (PFA) es la forma polimerizada de la formalina, que es obtenible comercialmente como un polvo y que se puede disolver completamente en una solución alcalina caliente.

La formalina (la solución acuosa del formaldehído gaseoso) tiene la propiedad de formar en solución acuosa cadenas de paraformaldehído, las cuales pueden precipitar. Por lo demás, el formaldehído se descompone bajo la acción de la luz, el calor y/o el oxígeno para dar ácido fórmico. En una solución acuosa de formalina tienen lugar unas ininterrumpidas reacciones de degradación y polimerización, como consecuencia de las cuales el formaldehído es degradado continuamente. Puesto que también hay reacciones regresivas (de despolimerización de las cadenas de PFA, así como reacciones en equilibrio), nunca se podrá indicar exactamente la proporción porcentual de formaldehído en una solución acuosa.

La "solución patrón", que se conoce bajo el nombre comercial de "formol", tiene una concentración de formaldehído de 35 - 37 %, en parte también de 37 - 38 %. El formol se ofrece en diferentes calidades: técnico, estabilizado y tamponado. En el presente caso, a esta solución saturada de formaldehído se le añaden ciertos aditivos: se estabiliza con metanol (para evitar la formación de PFA), se tampona con carbonato de calcio, bórax o con una mezcla de fosfatos (contra la disminución del valor del pH en el caso de una descomposición para dar ácido fórmico). A continuación, a partir de esta solución patrón se prepara una solución de formalina al 4 % mediante dilución (aproximadamente a 1 + 9), que precisamente conforme a ello no está diluida exactamente al 4 % sino más bien al 3,5 - 3,9 %. Algunos fabricantes ofrecen una formalina al 4 % como una formalina al 4 % "auténtica", es decir que la solución patrón no se diluye a 1 + 9, sino según unos tantos por cientos en masa reales.

A pesar de todo, el resultado sigue siendo una solución, en la que el contenido de formalina varía y disminuye sucesivamente. Para unos planteamientos histológicos "normales" esto es ampliamente no problemático, sin embargo, para unos planteamientos inmunohistoquímicos, esta fluctuante composición, que, además, a través de la formación de ácido fórmico puede tener también un valor del pH fluctuante, es desventajosa. También algunas tinciones histológicas son influidas negativamente por un valor del pH demasiado bajo de la formalina (p.ej. la diferenciación entre unas fibras musculares oxidativas y glucolíticas). Por lo tanto, para unos planteamientos IHC (acrónimo del alemán "immunhistochemische" = inmunohistoquímicos) se prepara una solución de fijación a base de paraformaldehído con unas concentraciones exactas de 4 %, 6 % u 8 %, que es ajustada mediante un tampón a un valor exacto del pH (p.ej. de 7,0, 7,2 u 7,4, lo que corresponde a un usual valor del pH de tejidos animales / humanos). No obstante, tales soluciones tamponadas de PFA son conservables solamente durante un breve período de tiempo, es decir que ellas tienen que ser consumidas en el transcurso de unos pocos días, puesto que en otro caso tienen lugar las mismas reacciones de descomposición y en equilibrio que en el caso de la solución normal de formalina. Para unos planteamientos IHC, en los cuales el grado de reticulación de las proteínas unas con otras desempeña un cometido importante, se utiliza por lo tanto un PFA tamponado, puesto que en este caso se consiguen unas condiciones de fijación y reacción más uniformes y comprensibles.

Las desventajas e insuficiencias de la formalina (al igual que las del PFA) se conocen desde hace mucho tiempo y residen no solamente en su olor picante y punzante, que llama la atención como perturbador y desagradable, sino que, según unos recientes reconocimientos, ellas también constituyen un significativo peligro para la salud. Dentro del marco de la ordenanza REACH, en la UE (ordenanza EG 1907/2006, con modificaciones en EG n° 1354/2007 y 1272/2008, convertida a la legislación alemana en la Ley de Sustancias Químicas del 2 de julio de 2008), se

establece y actualiza una lista de las sustancias químicas peligrosas, VHCC (acrónimo de "very high concern chemicals"), así como que se imponen condiciones acerca de cuándo y cómo se hayan de evitar en el futuro tales VHCC o respectivamente se deba de restringir o reemplazar su empleo.

Además se ha de indicar como una desventaja de las piezas de tejidos fijadas con formalina, el hecho de que las tales tienden a endurecerse después de un prolongado almacenamiento, lo que repercute negativamente sobre la cortabilidad y tingibilidad de los tejidos. Generalmente, algunos tejidos, que habían sido fijados en formalina, son quebradizos y agrietados, y apenas pueden ser cortados, o solamente con dificultades (p.ej. el hígado, el riñón, el bazo, la musculatura, el tejido nervioso, el cerebro).

Otro efecto negativo de la formalina es su contracción y el desprendimiento de grasas y glucógeno. En el caso de las fijaciones con formalina es normal que se produzca una contracción de hasta un 10 % del volumen del tejido. Esto conduce a grietas en el tejido y también a malinterpretaciones en lo que respecta a la extensión y el tamaño de determinadas estructuras.

La formalina así como también un PFA tamponado, considerados en total en la visión global de los agentes de fijación conocidos, no son los agentes de fijación que proporcionan los mejores resultados, sino que más bien lo es, aquél que a causa de la experiencia adquirida durante largos años, proporciona unos resultados comparables, y que se pueden utilizar y adquirir de manera barata.

Otra variante para investigar tejidos en un estado lo más fresco que sea posible, es la sección congelada. En el presente caso, la fijación del estado se efectúa mediante una inmediata congelación después de la toma de la muestra. En este caso, no se efectúa ninguna reticulación de las proteínas unas con otras. La muestra será estable solamente mientras que sea mantenida a una temperatura correspondiente baja. Además la congelación tiene que efectuarse bruscamente a unas temperaturas muy bajas (por regla general $< -78^{\circ}\text{C}$), puesto que en caso contrario la formación de cristales de agua podría destruir a las estructuras finas del tejido. La "sección congelada" es la denominada sección rápida y se produce por regla general solamente para unos usos especiales, en los que p.ej. falta tiempo para esperar a que tenga lugar una reacción de fijación química (p.ej. un diagnóstico rápido durante una operación quirúrgica), o cuando, de antemano, la tinción o respectivamente una detección inmunohistoquímica sería perturbada por la propia fijación. En estas circunstancias, con las desventajas de la sección congelada se puede tomar una decisión diagnóstica.

En general, subsiste no obstante la experiencia de que las tinciones en un tejido fresco son frecuentemente más intensas y fuertes, y que se tienen que reducir los períodos de tiempo de tinción. Esto se debe posiblemente a que la fijación de los colorantes frecuentemente no está vinculada a las modificaciones químicas debidas a la fijación, sino porque los colorantes se fijan ellos mismos a los componentes de los tejidos. La reacción de fijación química puede ser designada en el presente caso por lo tanto de manera generalizada como perturbadora para una tinción bien diferenciadora.

Como consecuencia de ello, la sección congelada sería la cualitativamente mejor vía para muchas tinciones, si no fuese tan difícil de manipular y conservar.

Las desventajas en el caso de las secciones congeladas son p.ej. el gasto técnico de la conservación (una inmediata congelación después de la extracción), el problema de la conservación a más largo plazo (la temperatura de almacenamiento no debe ser sobrepasada), las secciones que son relativamente gruesas (por regla general en torno a $10\text{ }\mu\text{m}$), la imposibilidad de descalcificar una sección congelada, etc. Por este motivo, la fijación de una muestra de tejido es una etapa necesaria para garantizar una conservación duradera y a más largo plazo.

Por estos motivos subsistía una considerable necesidad de poner a disposición otras alternativas, que permitan una mejor tingibilidad de las muestras de tejidos y secciones, y por consiguiente mejorar la investigación diagnóstica.

La puesta a disposición conforme al invento de un agente de fijación alternativo para muestras de tejidos de todos los tipos, en particular para la histología y la inmunohistoquímica tiene como trasfondo precisamente esta situación global, y se ha planteado la misión de garantizar que unas muestras de tejidos de todos los tipos sigan siendo accesibles a todas las técnicas de tinción al emplear la fijación conforme al invento.

Para ello, el invento pone a disposición una solución exenta de formalina, que es apropiada para fijar muestras de tejidos de todos los tipos y mejorar la tingibilidad de las muestras. La solución conforme al invento se distingue por el hecho de que mediante el ácido presente en la composición conforme al invento se puede liberar una concentración total de aldehído de por lo menos $0,5\text{ mol/l}$, pero en caso necesario también manifiestamente más.

Unas composiciones similares son ciertamente conocidas a partir del estado de la técnica (véase el documento de solicitud de patente europea EP 1 895 287 A2), pero éstas no tienen ningún efecto fijador.

La solución de fijación conforme al invento se define en la reivindicación 1. Unas formas de realización o utilidades preferidas se formulan en las reivindicaciones subordinadas.

En particular, la solución conforme al invento contiene

- por lo menos una poliamina, que se escoge entre el conjunto que se compone de urotropina, triazinas, mono-, di-, tri-, tetra-, penta- o hexametilol-melamina, dimetilol-dihidroxietilen-urea, tetrametilol-acetilen-diurea, dimetilol-propilen-urea, acetoguanamina o 5,5-dimetil-hidantoína y unas mezclas de las mismas, y
 - por lo menos un agente de acidificación, que se escoge entre el conjunto de los ácidos di- o plurivalentes libres que se compone de ácido oxálico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido mono-, di-, tri-cloroacético, ácido bórico, ácido fosfórico o unas mezclas de los mismos, caracterizado por que la poliamina reacciona con los protones liberados por el ácido y en este caso forma aldehídos. Se prefieren especialmente unas composiciones que forman p.ej. formaldehído, glioxal, glutaraldehído, etanal o propanal y que eventualmente están en la situación de liberar a éstos.

En la solución conforme al invento, la relación molar entre la concentración de los aldehídos que son máximamente liberables, expresada en moles, y la concentración de los protones que son máximamente liberables, expresada en moles, es de 1:0,7 hasta 1:1,5, de manera preferida de 1:0,7 hasta 1:0,9, de manera más preferida de 1:0,8 hasta 1:1, de manera más preferida de 1:0,9 hasta 1:1,2, de manera más preferida de 1:1 hasta 1:1,4 y/o de manera más preferida de 1:1,2 hasta 1:1,5, y ella se escoge por lo tanto de tal manera que entre el "aldehído máximamente liberable" y "los protones máximamente liberables a partir del ácido" se ajuste una relación de por lo menos 0,5 y de como máximo 2.

Además, la solución conforme al invento se distingue porque esta solución comprende por lo menos otro aldehído polifuncional, que se escoge entre el conjunto que se compone de citral, 3,7-dimetilocta-2,6-dienal, geranial, (E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, propanal, butanal, aldehído valerianico, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, (2E)-3-fenilprop-2-enal, benzaldehído, fenilmetanal, aldehído vanílico, 4-hidroxi-3-metoxifenilmetanal y unas mezclas de los mismos.

Estos compuestos son de manera preferida unos aldehídos, que poseen todavía uno o varios adicionales grupos funcionales químicos. Estos grupos funcionales químicos se pueden escoger entre el conjunto que se compone de los siguientes: - un grupo arilo, bien sea fenilo, naftilo, tienilo, indolilo, etc., unos grupos alquilo, alquenilo o alquinilo lineales o ramificados, así como también los correspondientes grupos halogenados; - unos grupos con oxígeno, hidroxilo, carbonilo, aldehído, halógenoformilo, ésteres de carbonato, carboxilato, carboxilo, éster, hidroxiperoxi, hidroxilo, éter; - unos grupos con nitrógeno, tales como p.ej. carboxamida, aminas, iminas, imidas, azidas, azo, cianatos, nitratos, nitrilo, nitroso-oxi, nitroso y piridilo; - unos grupos con azufre tales como p.ej. sulfhidrilo, sulfuros, disulfuros, sulfonilo, sulfonilo, sulfino, sulfatos, tiocianatos, carbono-tioilo; - unos grupos con fósforo tales como p.ej. fosfino, fosfono, fosfato.

Estos grupos pueden presentarse individualmente o múltiples veces, o también pueden presentarse en combinaciones unos con otros.

En el presente caso, p.ej. los aldehídos con una o varias funciones, que se escogen entre los conjuntos ya mencionados, son unos denominados aldehídos multifuncionales, puesto que ellos se pueden fijar mediante su función aldehído a diferentes lugares de la muestra a través de diferentes mecanismos químicos, y, a través de sus otras funciones químicas, que están unidas a ellos y que llevan consigo, ofrecen otros sitios de acoplamiento para los colorantes empleados, que son utilizados para la tinción de la muestra. Por lo tanto, mediante la adición de unos aldehídos polifuncionales, durante la etapa de la fijación del tejido, se fijan unos adicionales grupos funcionales químicos a la muestra de tejido.

Las funciones químicas de los aldehídos multifuncionales se escogen de tal manera que ciertos tipos de colorantes sean fijados mejor que otros, o también de tal manera que ciertos tipos de colorantes sean obstaculizados para fijarse a la muestra o sean debilitados. Por consiguiente, mediante la diferente afinidad de la muestra, que también se designa como un comportamiento químico diferenciado de los diferentes tejidos, se consigue una diferenciación espacial de la tinguibilidad de la muestra. El mecanismo de control conseguido de esta manera es una ventaja del invento, controlándose con él el contraste cromático de la muestra mediante la adición de los aldehídos multifuncionales, puesto que, mediante una fijación de estos grupos funcionales a la muestra de tejido, se ponen a disposición unos adicionales sitios de acoplamiento y sitios de reacción para las moléculas de los colorantes, de tal manera que una tinción óptima no solamente se pueda conseguir en un período de tiempo más breve, sino que en particular se pueda conseguir también una intensidad cromática más alta, un brillo y/o un contraste más altos.

De acuerdo con otra forma de realización, otra solución de fijación dentro del sentido de este invento contiene adicionalmente hexametilol-melamina, ácido bórico, hidróxido de sodio, fenil-metanal, Tween 20, siendo la hexametilol-melamina un compuesto desprendedor de formaldehído, y el fenil-metanal sirve como un aldehído polifuncional. La realización práctica para la preparación de esta composición se expone en los Ejemplos.

La concentración molar del aldehído que está disponible en conjunto en la solución conforme al invento, que se forma a partir de la poliamina en común con el ácido, o respectivamente que es producido por el aldehído polifuncional, se ajusta en la solución conforme al invento de manera preferida a por lo menos 0,5 mol/l, de manera

preferida a 0,6-0,69 mol/l, de manera más preferida a 0,7-0,79 mol/l, de manera más preferida a 0,8-0,89 mol/l, de manera más preferida a 0,9-0,99 mol/l, y de manera más preferida a 0,99-1,2 mol/l. Con una tal solución se garantiza una fijación óptima de las muestras de tejidos, que mejora la cortabilidad de la muestra así como que también tiene una influencia positiva sobre la tingibilidad.

Con el fin de evitar la desecación de la muestra, como un aditivo adicional se añade una sustancia química fuertemente higroscópica, que se escoge entre el conjunto que se compone de mono(propilenglicol), di(propilenglicol), un poli(propilenglicol), glicerol, pentaeritritol, sorbitol, etilenglicol, di(etilenglicol) y un poli(etilenglicol).

Con el fin de reducir la tensión superficial de la solución y mejorar las propiedades de deslizamiento, como un aditivo adicional se puede añadir un agente tensioactivo, que se escoge entre el conjunto que se compone de unos agentes tensioactivos etoxilados no iónicos con un alto y/o bajo valor de HLB, unos polisorbatos, en particular unos polisorbatos 20, 40, 60 u 80, saponinas, sales de metales alcalinos de decil-sulfatos, decil-sulfonatos, dodecil-sulfatos, dodecil-sulfonatos, dodecil-bencenosulfonatos, oleatos, estearatos, caprilatos y betainas.

Con el fin de poder adaptar la isotonia y la osmolaridad de la solución pueden pasar a emplearse también unas sales orgánicas o inorgánicas, que se escogen entre el conjunto que se compone de unos cloruros, sulfatos, acetatos, citratos, nitratos, succinatos y/o formiatos de litio, sodio, potasio, calcio o estroncio.

Para adaptar las propiedades de fluidez de la solución pueden pasar a emplearse también unos agentes espesantes orgánicos o inorgánicos, que se escogen entre el conjunto que se compone de los carbómeros, almidones y almidones modificados, agarosa, dextrosa, una metil-, etil- o propil-celulosa, ácido acrílico y PVA.

De acuerdo con otra forma de realización, la solución registrada se presenta en forma acuosa. Por añadidura - de acuerdo con otra forma de realización - los componentes de la solución registrada se ponen a disposición como una mezcla anhidra a base de unos componentes cristalinos y/o anhidros, en forma de un polvo soluble o como una tableta prensada soluble. Estos polvos o esta tableta se disuelven mediante la adición de agua u otro disolvente apropiado o una mezcla de éstos, con el fin de poner a disposición una solución de fijación presta para el uso.

Una ventaja de la solución conforme al invento es su estabilidad del valor del pH. La solución conforme al invento es estable en unos intervalos de valores del pH de 3-8, de manera preferida de pH 3-6. Esta estabilidad se consigue mediante el ajuste de la relación molar del grupo de amina a los grupos de ácido en una relación de aproximadamente 1:1. Siempre y cuando que en la solución esté presente una poliamina libre, ésta funcionará como un depósito y el valor del pH no podrá aumentar. Esta estabilidad del valor del pH se basa en la fuerte capacidad tamponadora de las poliaminas, que por regla general reaccionan de una manera algo alcalina. Mediante la reacción de la poliamina, p.ej. urotropina con el protón del ácido (p.ej. ácido cítrico), se forman un aldehído y la correspondiente sal de amonio. En el presente caso se ajusta un equilibrio, que es influenciado por la constante de disociación del ácido y por la constante de hidrólisis de la poliamina, y se ajusta en este caso el valor del pH a un determinado nivel - a aproximadamente pH 4 hasta pH 8. En el caso de la urotropina, 1 mol de urotropina puede consumir 6 moles de protones, con lo cual ya unas pequeñas cantidades de urotropina o de poliaminas pueden tamponar grandes cantidades de un ácido, y de este manera se mantiene el valor del pH de la solución en un valor constante.

Mediante esta estabilidad se pueden excluir casi absolutamente unas fluctuaciones del valor del pH. Así, p.ej. se puede evitar también una modificación del valor del pH por formación de ácido fórmico, y de esta manera, en el caso del empleo de la solución conforme al invento, tampoco se encuentra ningún "pigmento de formalina". Por lo tanto, afortunadamente, tampoco son necesarios unos aditivos conocidos por un experto en la especialidad destinados a la estabilización de soluciones, los cuales podrían perturbar a unas tinciones, tales como p.ej. metanol y butanol.

Otra ventaja de la solución conforme al invento son el brillo cromático y la intensidad cromática de las muestras fijadas con la solución conforme al invento. Así, los Ejemplos de realización 4-5 muestran para las fijaciones llevadas a cabo ejemplificativamente un manifiesto mejoramiento de la conservación morfológica y la cortabilidad de las muestras fijadas. Además, en el caso de las tinciones llevadas a cabo, a saber con Hematoxilina & Eosina, Masson Goldner Trichrom, MSB-Lendrum y Azan según Geidies, que se describen en los Ejemplos 4 y 5, se pone de manifiesto que mediante el empleo de la solución conforme al invento para la fijación se consigue un manifiesto mejoramiento de la tingibilidad en general, y en particular de la saturación cromática y del brillo cromático. Además de esto, numerosos tejidos que son difíciles de tratar, tales como p.ej. el cerebro, la piel y los testículos, pueden ser seccionados y teñidos manifiestamente mejor con la nueva fijación.

Se supone, pero sin introducir ninguna limitación por medio de esta suposición, que el mejoramiento de la tingibilidad, ya en el caso de una pequeña adición de los aldehídos multifuncionales tales como p.ej. citral, 3,7-dimetilocta-2,6-dienal, geranial, (E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, propanal, butanal, aldehído valeriano, pentanal, hexanal, heptanal, (2E)-3-fenilprop-2-enal, benzaldehído, fenilmetanal, aldehído vanílico, 4-hidroxi-3-metoxifenilmetanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal y unas mezclas de los mismos, se ha de atribuir a que éstos se acumulan en la reacción en equilibrio.

En la solución registrada tiene lugar una tal reacción en equilibrio, en la cual la poliamina se transforma con los protones, que son liberados por el ácido, p.ej. en un aldehído. Los aldehídos multifuncionales adicionales añadidos se acumulan por el lado del aldehído y pueden ser incorporados entonces también en la muestra. Los grupos multifuncionales de estos aldehídos sirven en este caso como unos adicionales sitios de acoplamiento para colorantes, los cuales pueden ser fijados a estos sitios a través de enlaces polares, puentes de hidrógeno o incluso enlaces covalentes, y de esta manera ellos mejoran las reacciones cromáticas de las tinciones histológicas y/o inmunohistoquímicas empleadas.

Afortunadamente, se ha puesto de manifiesto que mediante la utilización de la solución registrada se pueden eludir o evitar también ciertos problemas, que son conocidos en el caso de otras fijaciones exentas de formalina.

Se ha de citar, por ejemplo, la fijación HOPE (acrónimo de "Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection efecto de Effect" = protección de un disolvente orgánico mediada por un tampón de Hepes y ácido glutámico), que es apropiada en particular para unos planteamientos de biología molecular, puesto que mediante este agente de fijación los ácidos nucleicos y las estructuras de antígenos se conservan especialmente bien. No obstante, esta fijación solamente se puede llevar a cabo en unos equipos costosos y con un proceso de elaboración costoso, de tal manera que ella se adecua solamente difícilmente para la rutina diaria.

Otro agente de fijación exento de formalina es ofrecido por la entidad Anatech como "Prefer-Fixativ". Éste contiene glioxal, etanol y un tampón; en el presente caso solamente existen unos pocos valores empíricos en el uso histológico. Sin embargo, ya la presencia de un alcohol en la solución lo excluye para numerosas tinciones.

Otro producto procede de la entidad Sigma y es comercializado bajo la denominación Accustain. También en este caso, el etanol es el componente fundamental del agente de fijación.

Actualmente, para ninguno de los agentes de fijación alternativos existe un examen exhaustivo ni una evaluación científica de los resultados de las tinciones histológicas. Los requisitos planteados a un agente de fijación exento de formalina son en este caso, fundamentalmente, una comparabilidad de los resultados con los resultados anteriores de las muestras fijadas con formalina, así como una idéntica o mejorada manipulación en el uso rutinario, unas idénticas o similares duraciones de la fijación y unas idénticas o mejores propiedades de tinción.

La solución conforme al invento cumple estos requisitos y permite por primera vez la fijación y tinción de unas muestras de tejidos fijadas sin formalina mediando conservación e incluso un manifiesto mejoramiento de la saturación cromática, del brillo cromático y de la intensidad cromática en los procedimientos que se mencionan seguidamente:

a) tinción con Hematoxilina & Eosina, mediando utilización de diversas soluciones de hematoxilina (según Mayer, Gill, Harris, Weigert, Verhöff, Hansen, etc.) y soluciones de eosina (en forma acuosa, alcohólica o metanólica con diversas concentraciones y adiciones de ácido acético o de otros aditivos que disminuyen el valor del pH).

b) tinción tricrómica tal como por ejemplo según Masson, Masson-Goldner, Azan, Crossmon, Mallory, Cason y otros protocolos de tinción, que generan una tinción en una, dos, tres o múltiples etapas a través de unas tinciones de núcleos, plasma y fibras.

c) tinciones de conjunto y tinciones especiales tri-, tetra-, penta- y policromáticas, tales como por ejemplo Movat Pentachrom, tinción cuádruple de Mollier, van Gieson, Hansen, Weigert y otras tinciones para la tinción física y química de estructuras tisulares especiales.

d) tinciones especiales o respectivamente detecciones especiales de fibras, componentes de tejidos, núcleos de células, componentes plasmáticos y propiedades químicas, tales como p.ej. tinciones Elastica, detecciones de aldehídos, detecciones de hierro, otras detecciones de metales, detecciones de amiloides, tinciones de grasas, representación de mucopolisacáridos, tinciones de plata y tonificaciones doradas, tinciones selectivas de núcleos, tinciones citológicas y hematológicas, detecciones de calcio, tinciones de huesos y cartílagos, tinciones de nervios, etc.

Para todos los procedimientos de tinción mencionados se ha de exponer que, subsiguientemente a la fijación, los fragmentos de tejidos introducidos en el agente de fijación o los fragmentos de tejidos empapados con el agente de fijación, los órganos o los organismos enteros son sometidos a una elaboración ulterior clásica, usual en el laboratorio, es decir que ellos son deshidratados y a continuación pueden ser infiltrados con parafina o con otros medios de empotramiento (celoidina, acrilatos) y pueden ser elaborados para dar bloques de muestras, que finalmente pueden ser seccionados con un microtomo.

El invento mejora en el presente caso las propiedades plásticas del material fijado, de tal manera que en el caso de la elaboración para dar unas secciones finas, no se presenten en absoluto unas aberraciones cromáticas de sección o se presenten solamente en pequeña medida, puesto que, por una parte, no se presenta ningún endurecimiento del tejido debido a una "fijación excesiva" y por otra parte los tejidos no se contraen tan fuertemente como es usual en el caso de las fijaciones con formalina.

En este caso, en consecuencia se pone de manifiesto que los fragmentos de tejidos tratados con el invento pueden ser elaborados de manera comparable, parcialmente incluso más fácilmente que las muestras de tejidos fijadas con formalina. Por consiguiente, otra ventaja de la solución conforme al invento reside en el hecho de que las muestras de tejidos que habían sido fijadas con esta solución tienen unas sobresalientes propiedades de seccionamiento, y en el caso de aquellos tejidos que, cuando habían sido fijados con unas soluciones que contenían formaldehído, eran difíciles de seccionar (p.ej. el tejido cerebral), se llega a unos manifiestos mejoramientos de las propiedades de seccionamiento.

De esta manera se introducen menos aberraciones cromáticas en la sección histológica, lo que hace posible un mejoramiento esencial de la investigación microscópica de la muestra, y por consiguiente se facilita considerablemente el diagnóstico de unas anomalías y notoriedades histológicas.

En consecuencia, las tinciones no solamente son idénticas, sino que son esencialmente más intensas y mejor diferenciables, que unas tinciones en las muestras fijadas con formalina, puesto que las diferencias de color en la sección histológica son más nítidas e intensas, que en el caso de las muestras fijadas con formalina, los colores por sí mismos son más brillantes y selectivos para unas diferencias en el comportamiento químico de los tejidos.

Además es ventajosa la conservación de los tejidos. Apenas aparecen contracciones, y si es que sí, entonces en una medida manifiestamente más pequeña que en el caso de las fijaciones con formalina. Los núcleos celulares conservan su forma redonda y pueden ser teñidos muy bien con unos usuales colorantes de núcleos. Se puede observar una sobresaliente conservación hasta en las estructuras más finas, lo que iguala incluso la conservación de las fijaciones con los agentes de fijación que contienen un material sublimado y ácido pícrico.

Es ventajosa además la sencilla manipulación. Las rutinas de laboratorio establecidas no tienen que ser modificadas puesto que los períodos de tiempo de fijación y el uso pueden seguir siendo idénticos. Las muestras de tejidos son introducidas con el invento en los recipientes para muestras y permanecen allí hasta su elaboración ulterior. Los períodos de tiempo de fijación corresponden a los de la formalina. Unos más largos períodos de tiempo de fijación no son problemáticos, o respectivamente incluso ventajosos. En ningún caso, sin embargo se observa una fijación excesiva indeseada de los tejidos en el caso del tratamiento con la solución conforme al invento. Además, la solución registrada es inocua desde el punto de vista de la legislación de sustancias peligrosas y materiales peligrosos, y puede ser manipulada también en el caso de la evacuación, como un residuo químico inocuo.

Por lo demás, el invento se refiere también al uso de la solución como un agente conservante para preparados macroscópicos, en ciertos casos también para cuerpos enteros de animales o cadáveres, tales como los que se utilizan en la anatomía. Además de esto, él se usa también para la fijación y la conservación duradera de un material de muestra biológica en museos de ciencias naturales, en colecciones zoológicas o botánicas, en colecciones de investigación y en colecciones didácticas.

El invento se refiere también al uso del agente de fijación para tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos compatibles con una parafina, al igual que para unos anticuerpos que son apropiados para secciones congeladas o preparados de materiales sintéticos.

Descripción de las Figuras:

La Figura 1: muestra una yuxtaposición de los resultados de una tinción con AZAN en una muestra de tejido, a saber del cerebelo de una rata, habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 1A con formalina al 4 %, de acuerdo con un procedimiento patrón, y habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 1B en un procedimiento idéntico pero con la solución conforme al invento. Se puede reconocer manifiestamente que la Figura 1B tiene menos grietas, muestra una mejor conservación del preparado y de las neuronas, así como que la muestra adopta una tinción más intensa.

La Figura 2: muestra una yuxtaposición de los resultados de una tinción con HEMATOXILINA & EOSINA (H&E) en una muestra de tejido, a saber de un testículo de rata, habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 2A con formalina al 4 %, de acuerdo con un procedimiento patrón, y habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 2B en un procedimiento idéntico pero con la solución conforme al invento. Se puede reconocer manifiestamente que la Figura 2B tiene unas estructuras delimitadas más nítidamente, que las estructuras finas están mejor conservadas así como que la muestra adopta una tinción más intensa.

La Figura 3: muestra una yuxtaposición de los resultados de una tinción con MSB LENDRUM en una muestra de tejido, a saber de un testículo de rata, habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 3A con formalina al 4 %, de acuerdo con un procedimiento patrón, y habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 3B en un procedimiento idéntico pero con la solución conforme al invento. Se puede reconocer manifiestamente que en la Figura 3B la diferenciación de las estructuras finas resalta más así como que la muestra adopta una tinción más intensa.

La Figura 4: muestra una yuxtaposición de los resultados de tinción de una tinción con MOVAT en una muestra de tejido, a saber de un pulmón de rata, habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 4A con formalina al 4 %, de acuerdo con un procedimiento patrón, y habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 4B en un procedimiento idéntico pero con la solución conforme al invento. Se puede reconocer manifiestamente que la Figura 4B tiene unas estructuras diferenciadas más nítidamente, las estructuras finas (los bronquios y los alveolos) están mejor conservadas así como que la muestra adopta una tinción más intensa.

La Figura 5: muestra una yuxtaposición de los resultados de una tinción con MASSON TRICHROM en una muestra de tejido, a saber de una lengua de rata, habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 5A con formalina al 4 %, de acuerdo con un procedimiento patrón, y habiéndose fijado la muestra utilizada para la Figura 5B en un procedimiento idéntico pero con la solución conforme al invento. Se puede reconocer manifiestamente que la Figura 5B tiene una diferenciación más nítida de las estructuras finas, la tinción da lugar a unos núcleos celulares teñidos más intensamente y la muestra adopta en conjunto una tinción más intensa.

Ejemplos

Ejemplo 1: Composición y componentes de un agente de fijación

POS.	PRODUCTO	%	G/L	Intervalo de utilización
1	urotropina	4	40	hasta 20 %
2	ácido cítrico	5,43	54,29	hasta 35 %
3	TWEEN 80	1,43 X 10E-2	0,143	hasta 5 %
4	mono(propilenglicol)	2,86	28,57	hasta 20 %
5	(2E)-3-fenilprop-2-enal	4,29 X 10E-2	0,429	hasta 5 %
6	SPAN 80	0,71 X 10E-2	0,07	hasta 5 %
7	H ₂ O o un disolvente apropiado	87,65	876,5	rellenar hasta 100 %
	TOTAL		1.000	

Ejemplo 1.1.: Cálculo de las relaciones molares del agente de fijación para la fijación de tejidos

En el caso de una composición de acuerdo con el Ejemplo 1 con los componentes urotropina y ácido cítrico, la relación molar se calcula de la siguiente manera:

La urotropina libera hasta 6 moles de formaldehído a partir de 1 mol de urotropina. El ácido cítrico: libera hasta 3 moles de protones por 1 mol de ácido cítrico. 1 mol de ácido cítrico (anhidro) = 192,124 g/mol => 192,124 g; además 1 mol de urotropina corresponde a = 140,19 g/mol => 140,19 g.

Una solución, que contiene 4 % de urotropina y 5,5 % de ácido cítrico (tal como se ha propuesto en este Ejemplo 1), alcanza por consiguiente una concentración molar de urotropina de 0,28 M y puede formar hasta como máximo 1,71 M de formaldehído. Por añadidura, la concentración molar de ácido cítrico es 0,28 M y puede formar hasta como máximo 0,85 M de protones.

Esto significa que en la solución del Ejemplo 1 pueden formarse 0,85 moles de formaldehído a partir de HMTA, y que además un exceso de HMTA permanece en la solución. La relación molar entre el aldehído liberable en total, y los protones que son liberables en total desde el ácido, es en este caso de aproximadamente 2:1, debiéndose de tener en cuenta que la urotropina está presente en un exceso.

En el caso de una reacción en equilibrio, en la que se pueden formar 0,85 moles de formaldehído, la solución funciona sobresalientemente como una solución de fijación para la histología (véase el Ejemplo 5, así como las Figuras 1 hasta 5).

1.2. Cálculo comparativo: con el ejemplo de otra solución usual:

Una solución conocida, que contiene 1 % de hexametilentetraamina (HMTA) y 1 % de ácido cítrico, según un correspondiente cálculo tal como en el Ejemplo 1.1. tiene una concentración molar de HMTA de 0,07 M, y puede formar como máximo 0,42 M de formaldehído. La concentración molar de ácido cítrico se sitúa en el presente caso en 0,052 M y puede formar hasta como máximo 0,156 M de protones.

Esto significa que en el caso de esta solución conocida se puede se pueden formar como máximo 0,156 moles de formaldehído a partir de HMTA, y que en la solución permanece un exceso de HMTA. La relación molar entre el aldehído liberable en total y los protones liberable en total a partir del ácido, es en el presente caso de aproximadamente 2,6:1.

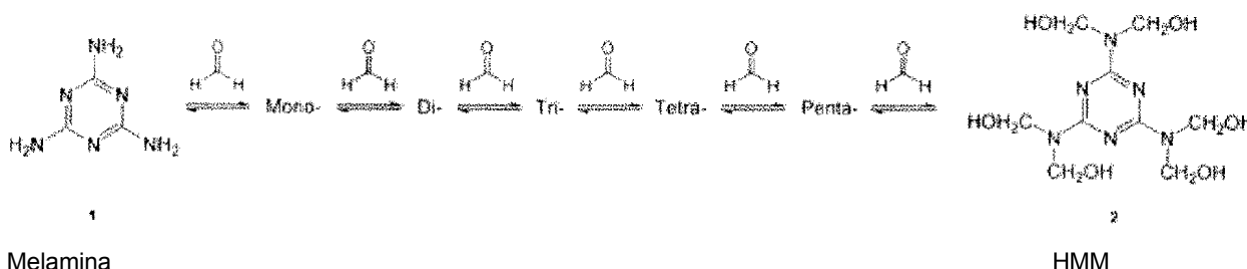
Cuando se hubieron formado como máximo 0,156 moles de formaldehído, la solución NO funciona como una solución de fijación para la histología, puesto que aparecen todos los efectos secundarios conocidos - tal como ya se

ha descrito más arriba en el texto, tales como también contracciones y modificaciones morfológicas hasta llegarse a una degeneración incipiente del tejido. Los valores mencionados fueron confirmados experimentalmente para HMTA y ácido cítrico.

5 **Ejemplo 2: Composición y componentes de otra forma de realización preferida**

PRODUCTO	%	G/L	Intervalo de utilización
Hexametilol-melamina	6	60	0-20 %
Ácido bórico	3	30	0-35 %
Hidróxido de sodio	0,4	4	0-5 %
Di(propilenglicol)	2,86	28,57	0-20 %
Fenilmetanal	0,01	0,1	0-5 %
Polisorbatos 20	0,01	0,1	0-5 %
H ₂ O o un disolvente apropiado	87,65	876,5	10-99 %
TOTAL		1.000	

La hexametilol-melamina, en lo sucesivo llamada HMM, entra en la siguiente reacción de equilibrio:



Esta reacción transcurre de la mejor manera a un pH de 6-8, por lo que de acuerdo con la presente forma de realización se utiliza un ácido débil, a saber ácido bórico. El valor del pH se ajusta con hidróxido de sodio. Por cada mol de HMM se pueden liberar -> 6 moles de formaldehído. A partir de esto resulta por cálculo:

1 mol de HMM	270 g
1 mol de formaldehído	30 g
1 mol de HMM contiene 6 moles de aldehído o	180 g

Como consecuencia de ello, para obtener una solución con un contenido de formaldehído liberable en total de 4 %/l se necesitan 40 g de formaldehído liberable o 60 g de HMM.

A partir del ácido bórico se separan 3 protones. El ácido bórico es representable por la fórmula H₃BO₃, y tiene una masa molecular de 61,83 g. Para recibir 6 moles de protones se necesitan por lo tanto 27,5 g, y calculado con un cierto exceso, 30 g de ácido bórico, referidos a 1.000 ml de solución.

En el caso de la presente composición se ajusta una relación del aldehído liberable en total / protones liberables en total de 1:1.

Ejemplo 3: Otras formas de realización alternativas

De acuerdo con los cálculos expuestos más arriba en el Ejemplo 1.1. y también en el Ejemplo 2 se pueden preparar otras composiciones alternativas. Los componentes alternativos empleables se exponen en la siguiente Tabla.

Cada combinación de las sustancias indicadas bajo la posición 1 es preparable con las sustancias de la posición 2. Eventualmente, se añaden a la combinación las sustancias de la posición 5, p.ej. con el fin de ajustar la proporción del aldehído liberable en total. Conforme al invento, una solución constituida por estas combinaciones debe de tener por lo menos 0,5 mol/l de aldehído liberable en total. Las sustancias alternativas de las posiciones 3 y 4 así como 6 y 7 son opcionales y son combinables según sea necesario.

POSICIÓN referida a la Tabla en el Ejemplo 1	COMPONENTES ALTERNATIVOS
1	urotropina, triazinas, dimetilol, dihidroietilen-urea, tetrametilol-acetilen-diurea, mono-, di-, tri-, tetra-, penta- o hexametilol-melamina, dimetilol-propilen-urea, acetoguanamina o 5,5-dimetil-hidantoína o unas mezclas de las mismas
2	ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido mono-, di-, tri-cloroacético, ácido úrico, ácido cítrico, ácido bórico, ácido fosfórico o unas mezclas de los mismos
3	TWEEN 80, unos polisorbatos 20, 40, 60 u 80, compuestos alcalinos, lauril-sulfatos; dodecilsulfatos, dodecil-sulfonatos, dodecil-bencenosulfonatos; ácidos grasos etoxilados; agentes tensioactivos iónicos y no iónicos con un alto valor de HLB (valor de HLB (acrónimo del inglés: "hydrophilic-lipophilic-balance"), éste describe en la química las proporciones hidrófila y lipófila de unos agentes tensioactivos que son predominantemente no iónicos y fue propuesto en 1954 por W. C. Griffin. Los agentes tensioactivos con un alto valor de HLB producen una buena mojadura de las superficies hidrófilas), o de unas mezclas de los mismos
4	mono-, di-, u otros poli(propilenglicoles); glicerol; mono-, di- u otros poli(etilenglicoles); sorbitol, pentaeritritol, un PEG de bajo peso molecular, un PEG de alto peso molecular y unas mezclas de los mismos
5	citral, 3,7-dimetil-octa-2,6-dienal, geranial, (E)-3,7-dimetil-octa-2,6-dienal, propanal, butanal, aldehído valerianico, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, (2E)-3-fenilprop-2-enal, benzaldehído, fenilmetanal, aldehído vanílico, 4-hidroxi-3-metoxi-fenilmetanal y unas mezclas de los mismos
6	SPAWN 80, polisorbatos, lauril-sulfatos, ácidos grasos etoxilados, agentes tensioactivos iónicos, no iónicos con un bajo valor HLB o unas mezclas de éstos
7	H ₂ O; alcoholes; acetonas, dimetil-sulfóxido; alquil-carbonatos; disolventes orgánicos polares y unas mezclas de éstos

Ejemplo 4: Procedimiento para la preparación de muestras histológicas destinadas a una investigación con microscopio

5 De acuerdo con el procedimiento conforme al invento, la muestra de tejido debería ser introducida tan fresca como sea posible en la solución de fijación, p.ej. en la solución de acuerdo con el Ejemplo 1. Por lo general es usual que la cantidad de la solución de fijación corresponda a un múltiplo de veinte veces el volumen de la muestra y que el período de tiempo de fijación sea dependiente del tamaño de la muestra. Según sea el tamaño, las muestras han de permanecer durante 12 a 36 horas, unas muestras mayores también durante 72 horas o más largo tiempo en la solución de fijación. Se parte de una distancia de difusión o respectivamente de una velocidad de penetración de 1 mm en 2-4 horas.

15 Con el fin de empotrar la muestra a continuación en una parafina o en otros medios de inclusión, es necesario realizar una deshidratación completa de la muestra. Primeramente, la muestra se retira de la solución de fijación, se lava en agua fluyente y se sumerge en una serie de alcoholes con una concentración creciente. Las etapas entre los escalones de concentración son en el presente caso p.ej. 30 - 50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 96 - 100. Como alcoholes se utilizan usualmente etanol o isopropanol. A continuación de la deshidratación, la muestra se sumerge en un disolvente orgánico apropiado, que es miscible tanto con un alcohol, así como también con el medio de empotramiento, luego sigue la infiltración con el medio de empotramiento propiamente dicho (una parafina) en varias etapas, en cada caso durante varias horas (dependiendo del tamaño de la muestra). Finalmente, la muestra se vierte con una pequeña cantidad de parafina en un molde apropiado. Después de que se haya solidificado el bloque, se retira el bloque desde el molde y luego éste se puede seccionar. Con un microtomo apropiado se producen unas secciones con un espesor de 4-6 µm y éstas se extienden sobre unos portaobjetos de vidrio.

25 Los portaobjetos de vidrio con las secciones de parafina se pueden almacenar durante un prolongado período de tiempo. Por regla general, sin embargo, se efectúa una elaboración ulterior directa, a saber una tinción. En el presente caso, se debe retirar de nuevo primeramente la parafina, y la sección de tejido propiamente dicha se tiene que regar. Se aplica el procedimiento anteriormente descrito en un orden de sucesión inverso, es decir desprender la parafina con xileno, a continuación con un alcohol al 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, o un orden de sucesión similar, hasta llegar al agua. Tan solamente entonces comienza la tinción, pudiendo suprimirse las etapas hasta llegar al riego completo en el caso de los colorantes, que se presentan en una solución alcohólica, y los portaobjetos se pueden sumergir directamente en la solución de tinción alcohólica.

Ejemplo 5: Valoración de la conservación morfológica, le cortabilidad y la tingibilidad de los preparados de parafina

Con ayuda de unas tinciones histológicas clásicas se pudo llevar a cabo una evaluación diagnóstica de unas muestras de secciones. Las secciones se confeccionaron a partir de unos tejidos, que previamente se habían fijado o bien en la solución del Ejemplo 1 o en formalina al 4 %. La evaluación cualitativa se efectuó en cuatro tinciones escogidas a modo de ejemplo (1) Hematoxilina & Eosina (HE), (2) Azan según Geidies, (3) Masson Goldner Trichrom y (4) MSB Lendrum. La evaluación diagnóstica histológica detecta los parámetros de *conservación morfológica y tingibilidad* de las secciones. La evaluación del parámetro *cortabilidad* se efectuó durante el proceso de seccionamiento en diversos tejidos.

Tinciones empleadas ejemplificativamente

HEMATOXILINA & EOSINA: La clásica tinción con H & E utiliza los colorantes hematoxilina, en la composición según Mayer, y eosina. Ambos colorantes son ofrecidos en solución acuosa (la eosina eventualmente también como una solución alcohólica) con un valor del pH definido o respectivamente con una adición definida de un ácido y proporcionan un característico cuadro de tinción. Los núcleos celulares se tiñen en el presente caso por regla general de un color azul-violeta. En este caso, el colorante hematoxilina, que es ofrecido como un complejo con alumbre, reacciona con la cromatina de los núcleos celulares. Con el fin de obtener un barniz estable, insoluble en agua y en alcoholes, este compuesto se sumerge a continuación en agua del grifo o en una solución salina mezclada con iones metálicos monovalentes. La solución de eosina se ajusta en forma acuosa a un valor del pH de aproximadamente 4,0, lo que conduce a una característica imagen teñida de color anaranjado brillante. La eosina se fija con diversa intensidad a diferentes estructuras tisulares y celulares, y permite por consiguiente una buena diferenciación de la sección histológica.

MASSON GOLDNER TRICHROM: Las tinciones con Masson Goldner Trichrom así como con Crossmon son asimismo unas tinciones histológicas clásicas, que trabajan como una tinción tricrómica con tres (o respectivamente cuatro) colorantes. Los núcleos son teñidos también en el presente caso con hematoxilina, pero no con un complejo con alumbre, sino a través de un complejo con hierro. Esto no conduce a un núcleo celular teñido de violeta azulado sino a un núcleo celular de color negro parduzco, que se puede diferenciar muy nítidamente frente a unos componentes de tejidos teñidos de azul de metileno. Como segundo colorante se utiliza una mezcla a base de fucsina ácida, Ponceau y azofloxina, que se une de diferentes maneras a diversas zonas de tejidos y permite identificar un plasma celular y otras estructuras intracelulares. Este complejo de colorantes reacciona directamente con las respectivas estructuras tisulares. Otro colorante, el anaranjado G, es un denominado colorante sobre mordiente, que tan sólo en presencia de un ión metálico divalente, tal como es puesto a disposición p.ej. por el ácido fósforo-wolfrámico o el ácido fósforo-molibdico forma un barniz insoluble en agua y alcohol con determinadas estructuras tisulares. Con este colorante se pueden representar sobre todo eritrocitos y músculos, y éstos pueden ser diferenciados nítidamente con respecto de otros tejidos. También un material queratinoso es teñido manifiestamente por el anaranjado G. Como cuarto colorante se utiliza alternativamente azul de anilina o verde luminoso. En el presente caso se trata de unos clásicos colorantes para fibras, que se unen sobre todo con colágenos y estructuras intercelulares. Asimismo, un material cartilaginoso y óseo se une - según sea su comportamiento químico - con estos colorantes. Unas diferentes intensidades de los colores azul o respectivamente verde permiten finalmente realizar declaraciones diagnósticas acerca de la composición de las fibras, proporcionando el azul de anilina por regla general la imagen más diferenciada.

MSB-LENDRUM: La tinción con MSB-Lendrum es un tinción emparentada con la tinción con Masson Goldner Trichrom, en la que sin embargo, en lugar de fucsina ácida-azofloxina-Ponceau y en lugar de anaranjado G se ofrecen los colorantes amarillo de Martius y Ponceau cristal. Como resultado se observa una imagen comparable, pero todavía más diferenciada, siendo especialmente valioso el poder expresivo de la tinción con MSB sobre todo para estructuras tisulares, puesto que en el presente caso las fibras musculares, la disposición de las fibras y las paredes vasculares interiores se diferencian mejor que en el caso de la tinción tricrómica previamente mencionada.

AZAN SEGÚN GEIDIES: La tinción con AZAN pertenece asimismo a la serie de la tinción tricrómica clásica. La variante original según Heidenhain se utiliza en el tratamiento previo de las secciones con alcohol de anilina y carmín azoico para la tinción de los núcleos, con ácido fósforo-wolfrámico para mordentar y con una mezcla de colorantes a base de azul de anilina y anaranjado G, y dura varias horas. La variante modificada según Geidies, por el contrario prescinde del alcohol de anilina, y utiliza rojo nuclear en lugar de carmín azoico, y acorta drásticamente los períodos de tiempo de mordentado. El resultado de la tinción es tan parecido, que la coloración clásica con AZAN puede ser ampliamente reemplazada. Los resultados se pueden comparar esencialmente con los de las tinciones con Masson-Goldner y MSB-Lendrum. Los núcleos celulares son teñidos intensamente de color rojo por el rojo nuclear, que es ofrecido en una solución de sulfato de aluminio, y se destacan bien desde el fondo continuo de color azul. El azul de anilina y el anaranjado G producen la tinción de contraste o respectivamente de fondo (azul), y una tinción bien diferenciada de los eritrocitos (de color anaranjado) y del plasma muscular (asimismo de color anaranjado intenso). Además, la creatina y los epitelios callosos se tiñen asimismo manifiestamente de color naranja. La sustancia de base y las fibras obtienen diferentes grados de azul mediante el azul de anilina. El resultado de la tinción con azul de anilina es influenciado en conjunto muy fuertemente por la duración del mordentado.

5.1. Conservación morfológica

Para la valoración de la conservación morfológica en el plano de la microscopía óptica se pueden aprovechar los siguientes parámetros, (A) fragmentación del tejido (formación de grietas) así como (B) representación de los núcleos celulares (Nuldei) y (C) de los cuerpos celulares (Somata).

La fragmentación del tejido por la formación de grietas individuales o de redes de grietas ensanchadas resulta a partir de una deficiente fijación y se manifiesta en el caso del estiramiento de la sección de tejido sobre el baño de agua caliente o respectivamente sobre la plancha de calentamiento así como durante el proceso de tinción. Con arreglo al estiramiento térmico de la parafina y, por consiguiente, también de la sección de tejido empapada y envuelta por la parafina se llega a una carga física de la asociación entre la parafina y el tejido, que en el caso de una deficiente fijación puede dar lugar a una rotura del tejido. Las fuerzas de tracción y tensión que se presentan durante la desparafinación y la tinción se aplican especialmente a estos sitios del tejido que ya han sido perjudicados durante el estiramiento, y los amplían, o rompen el tejido en su totalidad. La tendencia a la formación de grietas es proporcional a la propiedad adhesiva del portaobjetos utilizado. La valoración se efectúa entre (ninguna fragmentación del tejido, 1) así como entre (núcleos celulares y cuerpos celulares en su forma natural, 1) y (tejido destruido y desprendido por la formación de grietas, 4) así como (núcleos celulares angulosos y fuertemente desplomados, cuerpos celulares contraídos masivamente con una fuerte "formación de halos", 4).

Criterios generales

Fragmentación	Valoración	Núcleos celulares	Valoración	Cuerpos celulares	Valoración
Ninguna fragmentación	1	naturales	1	naturales	1
Ligera fragmentación	2	ligeramente angulosos	2	contracción mínima	2
Moderada fragmentación	3	moderadamente angulosos	3	contracción moderada	3
Extrema fragmentación; el tejido está destruido en una gran superficie	4	núcleos celulares angulosos y fuertemente desplomados	4	contracción masiva y/o formación de halos	4

5.2. Cortabilidad

Otro criterio en la elaboración histológica de muestras de tejidos es la denominada cortabilidad del tejido. Las diversas propiedades de los agentes de fijación dan como resultado - en la mayoría de los casos en dependencia del período de tiempo de incubación - una diversa cortabilidad o respectivamente capacidad de carga del tejido. Un tejido puede volverse por fijación frágil y quebradizo (ninguna cortabilidad, 4), o sino flexible y resistente (alta cortabilidad, 1). Deben de considerarse en la valoración diversas propiedades tisulares de diferentes tipos de tejidos.

Criterios generales

Cortabilidad	Valoración
Alta cortabilidad	1
Notable cortabilidad	2
Deficiente cortabilidad	3
Ninguna cortabilidad	4

5.3. Tingibilidad

Las tinciones histológicas de secciones de tejidos permiten, en dependencia de las combinaciones de colorantes utilizadas, frecuentemente numerosas diferenciaciones entre células individuales pero también entre tipos de tejidos. Este diagnóstico diferencial histológico usado en el diagnóstico humano y veterinario pero también en la investigación médica, zoológica y botánica, se basa en la diferenciación de los tipos de núcleos celulares pero en particular también en la diferenciación de precipitados cromáticos sobre células o respectivamente tejidos. Una saturación cromática lo más alta que sea posible, un precipitado cromático de color uniforme, una buena contrastación (entre el núcleo celular y el cuerpo celular) así como un alto brillo cromático son por lo tanto unos requisitos planteados a una tinción no solamente deseables, sino también imperativamente necesarios.

Ciertas reacciones químicas entre el agente de fijación y el tejido influyen no solamente sobre la cortabilidad y la capacidad de carga del tejido sino también sobre su tingibilidad. Diversos agentes de fijación pueden mejorar o sino también disminuir la tingibilidad de una sección de tejido en dependencia del período de tiempo de incubación. Para determinar la tingibilidad de ciertos tejidos se consultan los siguientes criterios: 1. Saturación cromática, 2. Precipitado cromático uniforme, 3. Contraste entre el núcleo celular y el cuerpo celular y 4. Brillo cromático. Las tinciones individuales tienen que ser valoradas por separado una de otra, puesto que las tinciones, o respectivamente sus componentes reaccionan diferentemente sobre la influencia de los agentes de fijación.

Criterios generales

1. Saturación cromática	Valoración
Muy buena saturación cromática	1
Buena saturación cromática	2
Moderada saturación cromática	3
Deficiente saturación cromática	4
2. Precipitado cromático	Valoración
Precipitado cromático uniforme sin ninguna sobresaturación	1
Precipitado cromático con pequeñas fluctuaciones	2
Precipitado cromático parcialmente irregular	3
Precipitado cromático totalmente irregular	4
3. Contraste (núcleo celular / cuerpo celular)	Valoración
Muy buen contraste (generalmente una buena diferenciabilidad de los componentes del núcleo y/o de las membranas del núcleo)	1
Buen contraste (en su mayor parte una buena diferenciabilidad de los componentes del núcleo y/o de las membranas del núcleo)	2
Moderado contraste (poca diferenciabilidad de los componentes del núcleo y/o de las membranas del núcleo)	3
Mal contraste (ninguna diferenciabilidad de los componentes del núcleo y/o de las membranas del núcleo)	4

4. Brillo cromático	Valoración
Muy alto brillo cromático	1
Alto brillo cromático	2
Bajo brillo cromático	3
Muy bajo brillo cromático	4

5

5.4. Evaluación / resultado

10 El catálogo de criterios descrito constituye la base para la subsiguiente representación tabular de los resultados. Se produjeron muestras de secciones de los siguientes tejidos después de un período de tiempo de fijación de 24 horas en la solución de acuerdo con el Ejemplo 1 o en formalina al 4 %: cerebro, corazón, pulmón, riñón, piel y testículos. Éstas se tiñeron entonces simultáneamente con HE, Azan según Geidies, Masson Goldner Trichrom y MSB Lendrum.

15

1. Conservación morfológica:

Criterio	Solución de acuerdo con el Ejemplo 1	Formalina
Fragmentación	1	3
Núcleos celulares	2	2
Cuerpos celulares	2	2

2. Cortabilidad:

Tipo de tejido	Solución de acuerdo con el Ejemplo 1	Formalina
Cerebro	1	2
Corazón	2	2
Pulmón	2	3
Riñón	2	3
Piel	1	2
Testículos	1	2

3.a Tingibilidad (H & E):

Criterio	Solución de acuerdo con el Ejemplo 1	Formalina
1. Saturación cromática	1	2
2. Precipitado de color	2	3
3. Contraste	1	2
4. Brillo cromático	1	2

20

3.b Tingibilidad (Azan según Geidies):

Criterio	Solución de acuerdo con el Ejemplo 1	Formalina
1. Saturación cromática	1	2
2. Precipitado de color	2	2
3. Contraste	2	2
4. Brillo cromático	1	3

3.c Tingibilidad (Masson Goldner Trichrom):

Criterio	Solución de acuerdo con el Ejemplo 1	Formalina
1. Saturación cromática	1	2
2. Precipitado de color	2	3
3. Contraste	1	2
4. Brillo cromático	1	3

5

3.d Tingibilidad (MSB Lendrum):

Criterio	Solución de acuerdo con el Ejemplo 1	Formalina
1. Saturación cromática	1	3
2. Precipitado de color	2	3
3. Contraste	2	4
4. Brillo cromático	2	4

REIVINDICACIONES

1. Un agente de fijación para muestras de tejidos que contiene

- 5 - por lo menos una poliamina, que se escoge entre el conjunto que se compone de urotropina, dimetilol-dihidroxietilen-urea, mono-, di-, tri-, tetra-, penta- o hexametilmelamina, tetrametilol-acetilen-diurea, dimetilol-propilen-urea, acetoguanamina o 5,5-dimetil-hidantoína y unas mezclas de las mismas, y
 10 - por lo menos un agente de acidificación, que se escoge entre el conjunto de los ácidos mono-, di- o plurivalentes libres que se compone de ácido oxálico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido mono-, di-, tricloroacético, ácido bórico, ácido fosfórico o unas mezclas de los mismos, **caracterizado por que**

la poliamina reacciona con los protones liberados por el ácido y en este caso forma o libera unos aldehídos, y la relación molar entre la concentración del aldehído por mol de amina a la concentración molar de los protones por mol de ácido se sitúa en un intervalo de 1:0,7 hasta 1:1,5.

2. El agente de fijación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el agente de fijación comprende por lo menos otro aldehído polifuncional, que se escoge entre el conjunto que se compone de citral, 3,7-dimetilocta-2,6-dienal, geranial, (E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, propanal, butanal, aldehído valerianico, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, (2E)-3-fenilprop-2-enal, benzaldehído, fenilmetanal, aldehído vanílico, 4-hidroxi-3-metoxifenilmetanal y unas mezclas de los mismos.

3. El agente de fijación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la concentración molar del aldehído que está a disposición en conjunto en la solución es de por lo menos 0,5 mol/l.

4. El agente de fijación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** él se presenta en una solución acuosa.

5. El agente de fijación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** él se ajusta a un intervalo de valores del pH de 3-8.

6. El agente de fijación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** contiene un compuesto fuertemente hidrófilo, que se escoge entre el conjunto que se compone de mono(propilenglicol), di(propilenglicol), un poli(propilenglicol), glicerol, pentaeritritol, sorbitol, etilenglicol, di(etilenglicol) y un poli(etilenglicol).

7. El agente de fijación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** contiene un agente tensioactivo que se escoge entre el conjunto que se compone de unos agentes tensioactivos no iónicos etoxilados con un alto y/o bajo valor de HLB, unos polisorbatos en particular un polisorbato 20, 40, 60 u 80, saponinas, sales de metales alcalinos de decil-sulfatos, decil-sulfonatos, dodecil-sulfatos, dodecil-sulfonatos, dodecil-bencenosulfonatos, oleatos, estearatos, capratos, caprilatos y betaínas.

8. El agente de fijación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** él se presenta como una mezcla anhidra de unos componentes cristalinos o anhidros, que se añaden a un disolvente apropiado en forma de un polvo soluble o como una tableta prensada soluble.

9. Un procedimiento para la tinción de unas muestras de tejidos fijadas, exentas de formalina, **caracterizado por que**

- 50 - en una primera etapa se fija la muestra de tejido con el agente de fijación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 8,
 - en una segunda etapa la muestra de tejido se prepara para la tinción y opcionalmente se corta,
 - en una tercera etapa se tiñe la muestra de tejido, y
 55 - se evalúa con un microscopio.

10. Utilización de un agente de fijación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 8 para la preparación y fijación de unas muestras de tejidos para unas tinciones histológicas o inmunohistoquímicas de la muestra de tejido.

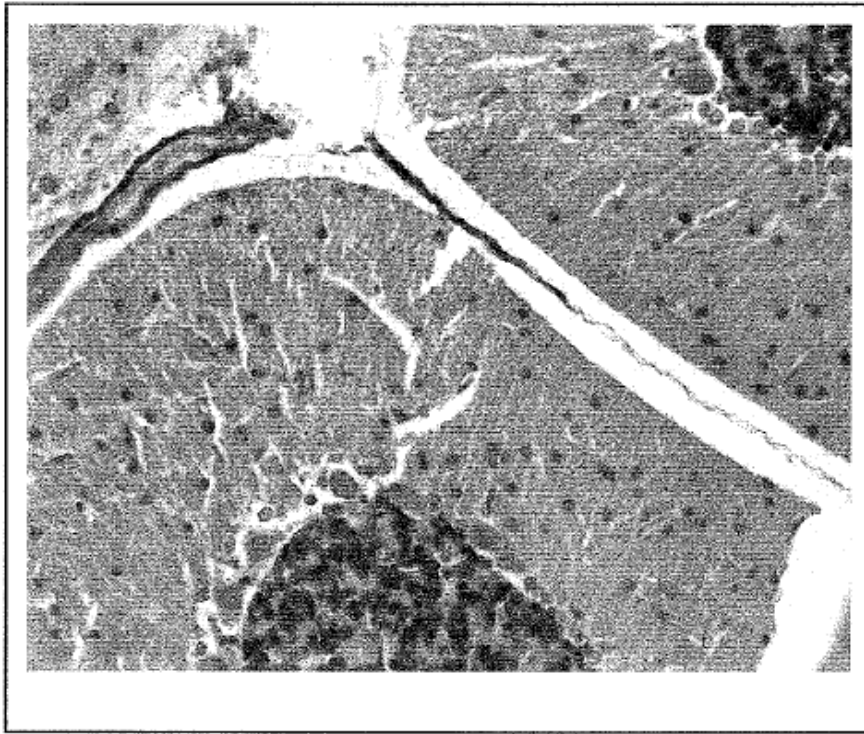


FIG. 1 A

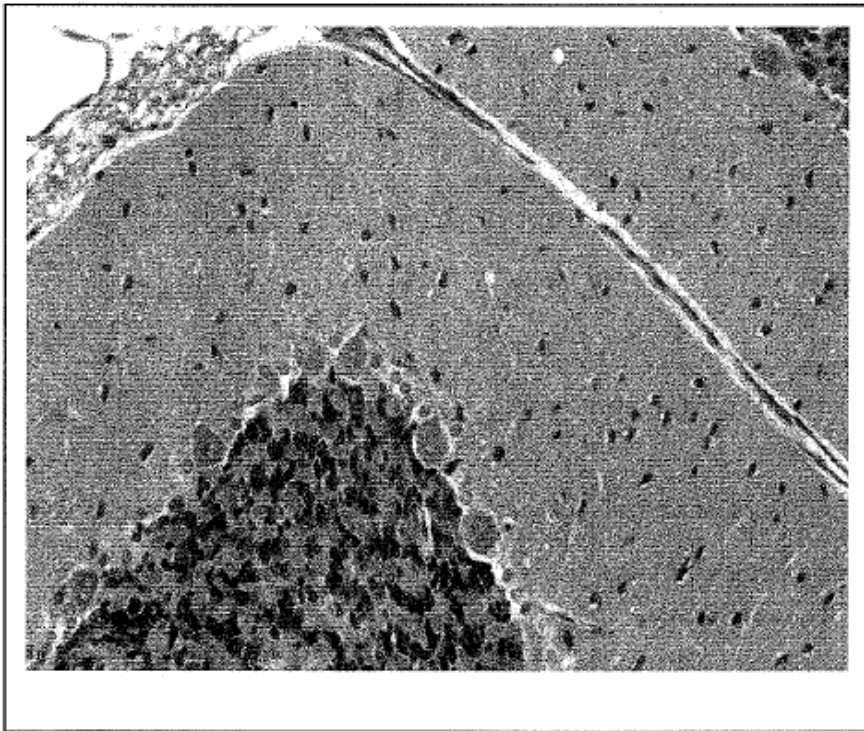


FIG. 1 B

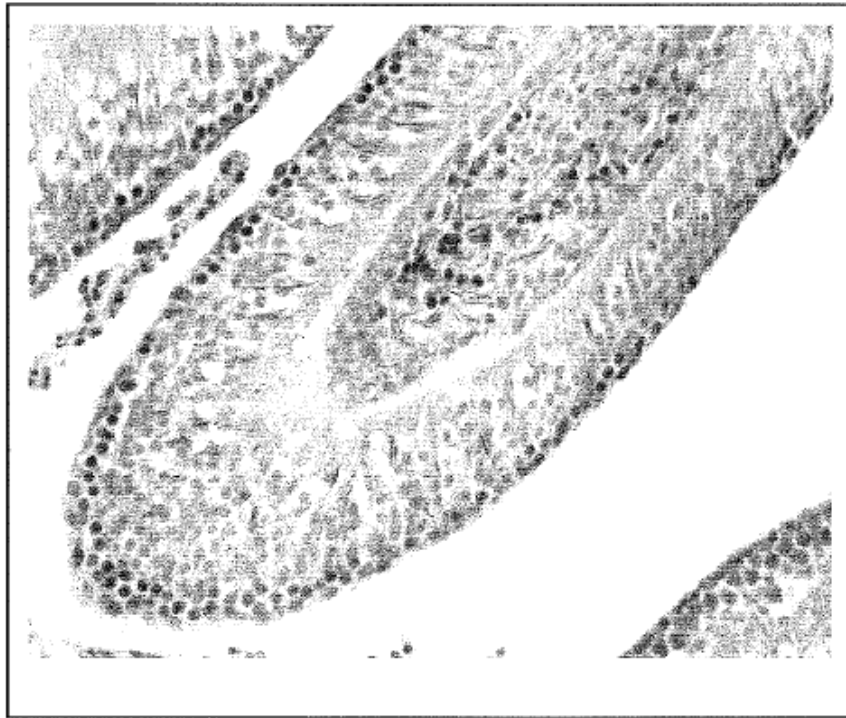


FIG. 2 A

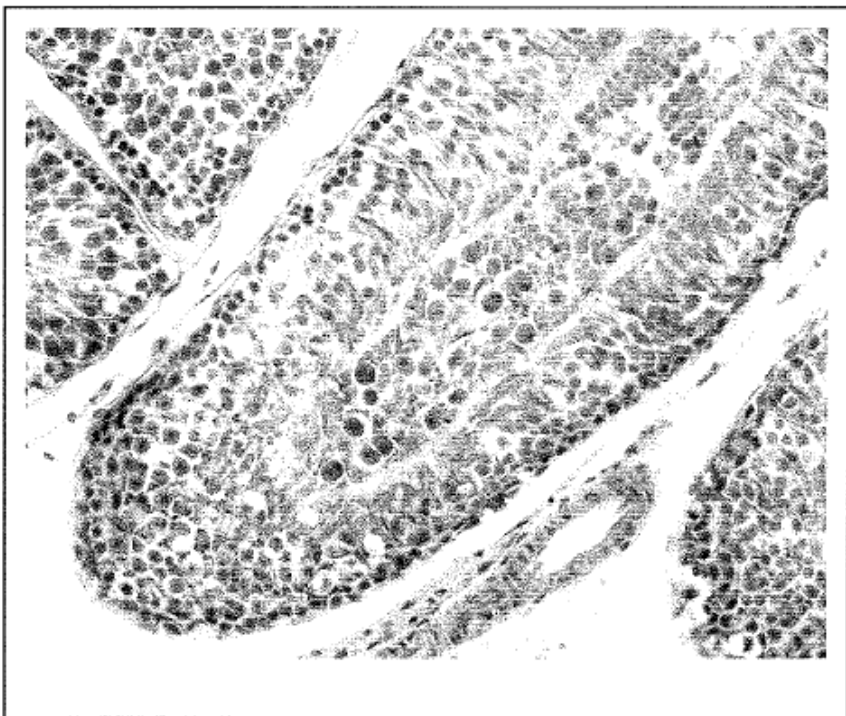


FIG. 2 B

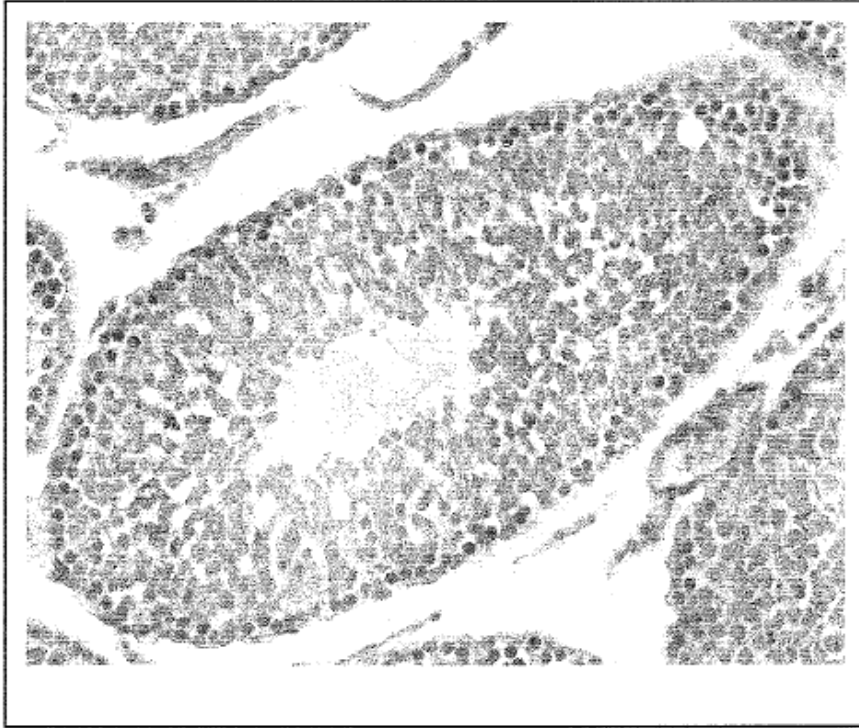


FIG. 3 A

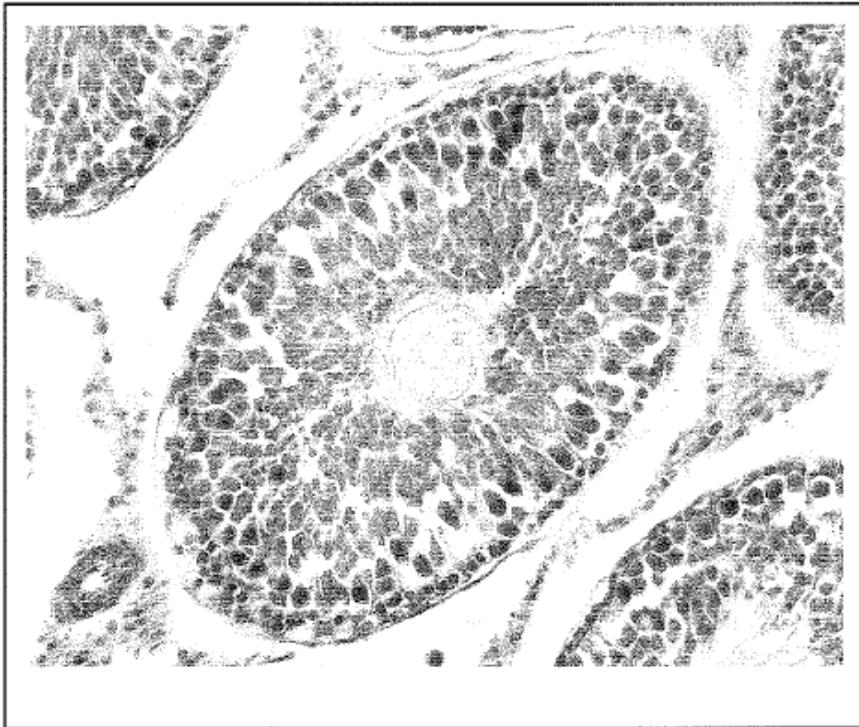


FIG. 3 B

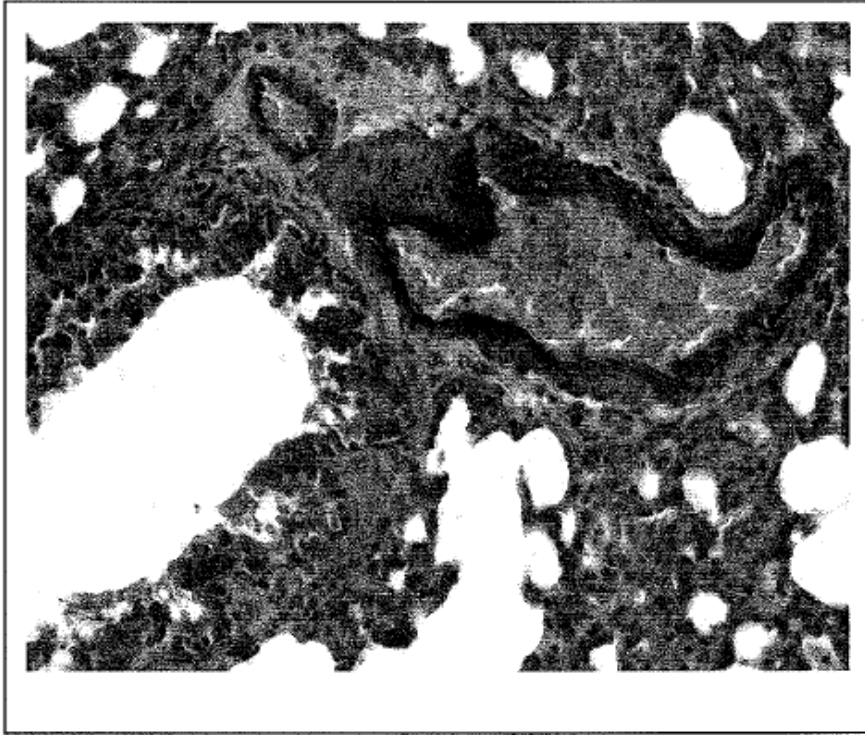


FIG. 4 A

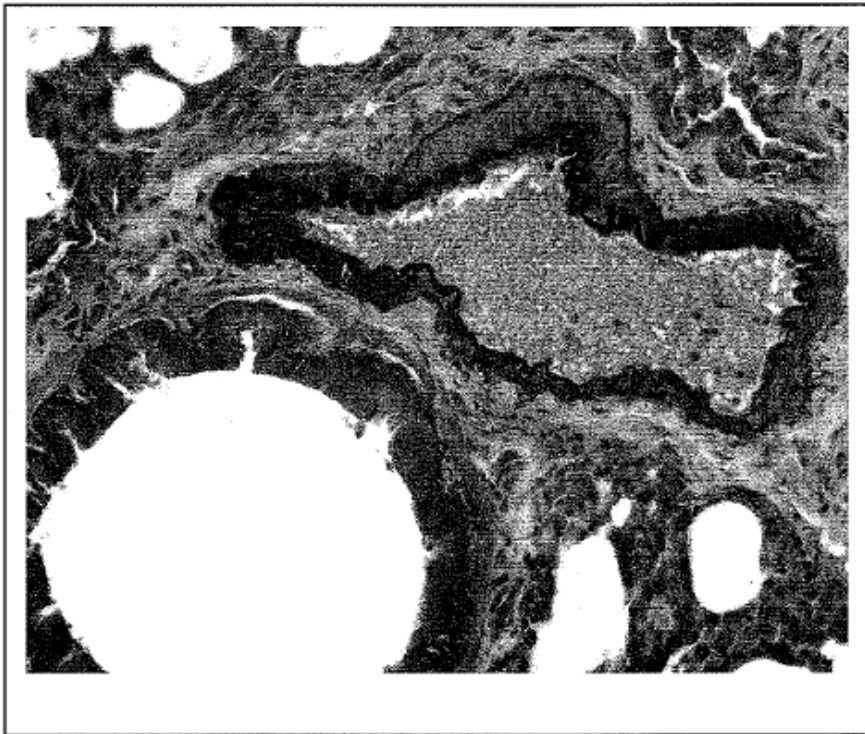


FIG. 4 B

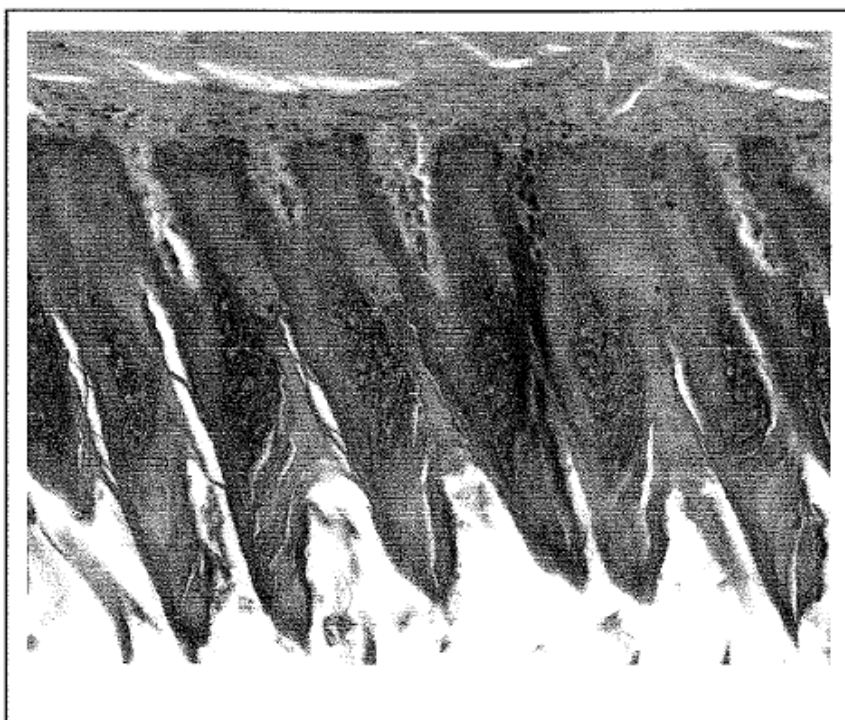


FIG. 5 A

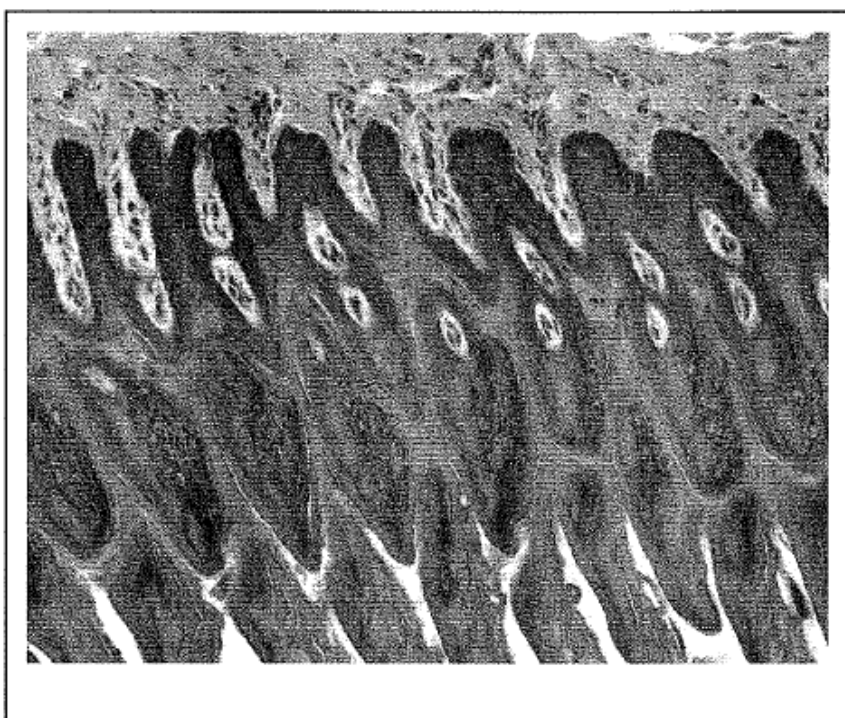


FIG. 5 B