

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 139**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/30** (2006.01)

**G01N 1/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2016 PCT/IB2016/054726**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025872**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2016 E 16775855 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 3218689**

54 Título: **Composición fijadora para muestras de material biológico**

30 Prioridad:

**13.08.2015 IT UB20153115**

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

**30.04.2019**

73 Titular/es:

**DIAPATH S.P.A. (100.0%)  
Via Pietro Savoldini, 71  
24057 Martinengo (BG), IT**

72 Inventor/es:

**LUPO, CARMELO**

74 Agente/Representante:

**TORNER LASALLE, Elisabet**

ES 2 711 139 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

Composición fijadora para muestras de material biológico

El objeto de la presente invención es una composición fijadora novedosa para muestras de material biológico.

5 Según es sabido, las muestras biológicas que son extraídas de manera concomitante en intervenciones de biopsia, cirugía o durante una autopsia, antes de ser analizadas al microscopio deben ser sometidas a una serie de tratamientos, que se indican, en general, mediante el término "procesamiento". La primera etapa del tratamiento de procesamiento, tras la extracción de una o más muestras de material biológico que han de ser analizadas, consiste en la denominada fijación. La etapa de fijación consiste en someter al tejido a agentes químicos y a veces a agentes físicos que desnaturalizan rápidamente las proteínas.

10 Los mejores fijadores son aquellos que precipitan las proteínas en la forma más fina, posiblemente en recintos ultramicroscópicos, de forma que no se modifique la morfología. Se deben preparar todos los fijadores como soluciones isotónicas a un pH neutro, con el fin de evitar fenómenos de reducción o aumento de volumen de las muestras, debido a una fatiga osmótica. La etapa de fijación de una muestra biológica es sumamente importante, dado que tiene el fin de interrumpir rápida y completamente los procedimientos autolíticos que se desencadenan en las células y en los tejidos cuando estos ya no son nutridos ni oxigenados. Además, permite conservar las muestras contra el ataque de mohos y de bacterias que pueden proliferar y, además, permite conservar la morfología estructural y ultraestructural del tejido y de las células de forma óptima. La elección del fijador más adecuado depende de diversos factores tales como, por ejemplo, el tamaño de la muestra, la naturaleza de las células que se desean conservar, el grado de conservación de la muestra que se desea alcanzar.

20 La fijación representa una etapa muy importante del procedimiento de procesamiento de una muestra biológica, de la cual depende el éxito de la preparación histológica correspondiente que ha de ser analizada. De hecho, la fijación permite mantener el marco estructural de los tejidos tan inalterado como sea posible.

25 Entre los diversos agentes fijadores más utilizados, tales como, por ejemplo, alcohol etílico y ácido acético, formaldehído o aldehído fórmico, de fórmula química  $\text{CH}_2\text{O}$ , es uno de los agentes fijadores más utilizados, gracias a sus características que lo hacen susceptible de actuar lentamente. El formaldehído, que es un gas incoloro, muy soluble en agua, pero también muy tóxico, utilizado en una solución acuosa (la mezcla de gas y de agua es denominada habitualmente formol), tiene un grado elevado de penetración, no provoca un endurecimiento excesivo de tejidos ni disuelve lípidos.

Como ya se ha mencionado, el formaldehído es un compuesto muy tóxico.

30 La normativa EU actual nº 605/2014 de 05.06.2014 introducida, en comparación con la anterior normativa, algunas modificaciones relativas a la toxicidad del formaldehído. En particular, según la normativa anteriormente en vigor, el formaldehído se definía como "Evidencia limitada de un efecto carcinógeno (Cat.3 - R40)", mientras que, en la actualidad, según la nueva normativa, del formaldehído se dice que "puede provocar cáncer (Cat.2 - R45)". Por consiguiente, en la actualidad el formaldehído está definido oficialmente como una sustancia carcinógena. Por lo tanto, es evidente que las precauciones ya utilizadas para su uso deben ser modificadas adicionalmente, mejoradas y estar encaminadas a reducir hasta cero los riesgos de contacto/inhalación por las personas que manipulan este producto.

40 El uso del formaldehído en un laboratorio normal y bien dotado no implica problemas particulares, dado que los operarios trabajan "bajo la campana de laboratorio", en concreto trabajan en una succión continua de posibles efluvios y vapores que pueden desarrollarse de los productos con los que entran en contacto. La cara del operario, al igual que protegida por gafas, está a menudo separada por un vidrio de la superficie de trabajo, que está, sin embargo, sometida a una succión adecuada, de forma que, en caso de desprendimientos de humo y/o de vapor, no entren de ninguna forma en contacto con el operario, sino que sean directamente aspirados y eliminados de forma adecuada.

45 El problema surge cuando se extrae la muestra de material biológico del organismo de origen y debe ser sumergida inmediatamente en la solución fijadora y, en concreto, en formaldehído o mejor en formol (es decir, en la solución acuosa de formaldehído). En este caso, y en concreto aún en el momento de la extracción de una muestra de material biológico, el operario no puede trabajar bajo la campana de laboratorio, sino que debe operar necesariamente en tales condiciones en las que existe un riesgo de inhalar y entrar en contacto directo con efluvios y/o vapores de formaldehído. De hecho, el operario, que será el cirujano que lleve a cabo la cirugía o el doctor que efectúe la exploración de la autopsia, o personas asignadas para la extracción de la muestra de material biológico, debe extraer necesariamente la muestra y colocarla en el interior de un recipiente de tamaño adecuado dependiendo del tamaño de la muestra biológica extraída, en el interior del cual hay una cantidad de formol de forma que cubra por completo la muestra. En caso de muestras de tamaño pequeño incluso el tamaño del recipiente y, por lo tanto, por consiguiente, la cantidad de formol, será pequeña, haciendo, de esta manera, que la exposición directa del operario al formol sea más rápida y menos perjudicial, aunque haya de seguir siendo evitada a toda costa.

En cambio, en caso de muestras de mayor tamaño (si se piensa, por ejemplo, en la extirpación de un órgano completo, o de la extracción de una sección significativa del intestino, la amputación de una extremidad), es evidente que el recipiente, en cuyo interior se tiene que colocar la muestra, debe tener un tamaño significativamente mayor y, por consiguiente, la cantidad de formol contenida en el mismo también será significativamente mayor que la que hay en recipientes de menor tamaño. Por lo tanto, el riesgo de exposición será proporcionalmente mayor para el operario que tendrá mayor probabilidad de entrar en contacto con una sustancia carcinógena y tóxica.

Por lo tanto, en el caso específico relacionado con el uso de formaldehído (o formol, solución al 37% de formaldehído en agua) para la etapa de fijación de las muestras de material biológico, es necesario encontrar una alternativa a la necesidad de sumergir o poner, de alguna manera, en contacto directo con el formaldehído inmediatamente tras la extracción, exponiendo, de esta manera, al operario al riesgo de contacto directo con el formaldehído, en particular una inhalación directa de los vapores de tal sustancia.

Se cree que tal requisito es aún más importante en el caso de muestras biológicas de gran tamaño, para las cuales la cantidad de formaldehído en la que se necesita sumergir la muestra es significativamente mayor.

Por lo tanto, parece evidente la necesidad de proporcionar una composición fijadora para muestras de material biológico que permita el aislamiento del formol (o solución acuosa de formaldehído), en el que es preciso sumergir la muestra extraída, del entorno externo y, por consiguiente, evitar su evaporación durante las operaciones de apertura del recipiente, la inmersión completa de la muestra extraída y el cierre subsiguiente del propio recipiente.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es una composición fijadora para muestras de material biológico que comprende, como componente esencial, formaldehído y parafina. La composición de la presente invención está definida en la reivindicación 1. La composición de la presente invención comprende formaldehído, agua y parafina — por ejemplo, en forma líquida oleosa e insoluble en agua, también denominada aceite de parafina o aceite de vaselina—. Por lo tanto, la composición según la invención consiste en los componentes esenciales de la misma, en una solución acuosa tamponada de formaldehído, también denominado habitualmente formol y parafina en forma líquida, también denominada aceite de parafina o aceite de vaselina. La solución acuosa de formaldehído y el aceite de parafina forman dos fases separadas.

En una realización, la composición de la invención comprende una solución acuosa tamponada de formaldehído, también denominado habitualmente formol, parafina en forma líquida y agar, también denominada agar-agar y/o agarosa.

En realizaciones adicionales, la composición puede comprender polivinilpirrolidona y/o 1-hexadecanol y/o bisulfito sódico.

En particular, la polivinilpirrolidona, que es utilizada de forma ventajosa como un espesante de fases hidrófilas, está presente en un intervalo entre 0,1-10% en peso total de la composición.

El alcohol cetílico, también denominado 1-hexadecanol o alcohol palmítico de fórmula básica  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{OH}$ , se utiliza de forma ventajosa según la presente invención, y está presente en un intervalo entre 0,1-10% en peso total de la composición.

El bisulfito sódico se utiliza de forma ventajosa para limitar adicionalmente la emisión de los vapores de formaldehído, y está presente en un intervalo entre 0,1-10% en peso total de la composición.

La parafina es el nombre actual dado a una mezcla de hidrocarburos sólidos, sobre todo alcanos, cuyas moléculas tienen cadenas con más de 20 átomos de carbono. Se obtiene del petróleo y se presenta como una masa cerosa, blanquecina insoluble en agua y en ácidos. Su número CAS es 92045-76-6. Sus usos principales son en la fabricación de velas, de lubricantes, de materiales aislantes eléctricos, para el papel cuché y para producir productos cosméticos, aceites, cremas para niños y gomas de mascar. La parafina, en su forma oleosa, también es denominada aceite de parafina o aceite mineral de parafina.

El aceite de parafina de tipo cosmético se utiliza en la fabricación de productos tales como cremas, lociones y jabones, mientras que el tipo farmacéutico, denominada a veces "aceite de vaselina" o "parafina líquida", es la forma más pura de aceite mineral y se utiliza para tratar enfermedades cutáneas, como un excipiente, laxativo y como vehículo para la administración intradérmica de fármacos. La Farmacopea Estadounidense (USP), la Farmacopea Europea y la FDA, instituciones que regulan de forma estricta la seguridad de todos los productos concebidos para su uso en seres humanos, establecieron los requisitos de pureza del aceite mineral del tipo farmacéutico, estableciendo que el aceite debe ser 99% puro y no debe contener impurezas químicas, incluyendo bacterias y metales pesados.

Desde hace años se utiliza aceite de parafina para tratar enfermedades cutáneas, tales como dermatitis atópica, debido a que no irrita la piel, es un emoliente eficaz y es uno de los ingredientes cosméticos conocidos más seguros, ya que es usado desde hace más de 100 años. El aceite del tipo farmacéutico es sometido a un procedimiento de purificación completa reduciendo al mínimo el riesgo de alergia o la sensibilización de la piel. Además, está libre de

compuestos aromáticos policíclicos tóxicos y de metales pesados, al igual que de microorganismos, destruidos mediante el propio procedimiento de fabricación.

5 Estudios clínicos han demostrado que el aceite mineral de parafina de tipo farmacéutico no ocluye los poros, es más estable en comparación con la mayoría de aceites vegetales y, gracias simplemente a su excelente inactividad química, reduce la probabilidad de las intolerancias cutáneas. Los aceites para niños que contienen parafina líquida están presentes de forma generalizada en el mercado. Este ingrediente es rechazado a menudo debido a que es un aceite de origen mineral. Pero la parafina líquida, mientras su pureza siga siendo elevada, es un ingrediente muy apreciado precisamente gracias a su estabilidad, consistencia, función de barrera y coste. Es prácticamente imposible obtener un ingrediente similar con características superiores.

10 Por lo tanto, la composición objeto de la invención comprende formaldehído en una solución acuosa (formol) y aceite de parafina en una relación de 40:60 hasta 95:5. Preferentemente, la relación entre formol y aceite de parafina es de 70:30.

15 En la práctica, según la presente invención, se añade la solución acuosa de formaldehído al aceite de parafina. De esta forma, gracias a sus características de inmiscibilidad en agua y a sus características de densidad y de peso específico, se vierte el aceite de parafina sobre la solución de formaldehído y crea un tipo de "tapón natural" que evita la evaporación de formaldehído y, por consiguiente, la dispersión de sus vapores en el entorno externo.

20 Por otra parte, el aceite de parafina de calidad farmacéutica y/o cosmética no interactúa de ninguna forma con las muestras de material biológico con las que hace contacto en el momento de su inmersión en la composición fijadora según la invención. Sin embargo, al contrario, existe la necesidad de recordar que solo la parafina es el material en el que se incorporan dichas muestras en una etapa subsiguiente de procesamiento definida "de inclusión", que sirve para fijar las muestras en un material sólido que permite el corte subsiguiente en el análisis en microtomo y microscopio.

25 Por consiguiente, el aceite de parafina utilizado en la composición según la invención es completamente compatible con la muestra biológica que ha de ser analizada, no provoca ningún deterioro sino que más bien permite y fomenta su conservación óptima.

30 En una realización alternativa de la presente invención, la composición comprende, además de formaldehído, agua y aceite de parafina, incluso agar o agarosa, en cantidades entre 0,005 y 0,5% con respecto al peso total de la composición. El agar-agar, también denominado agar, es un polisacárido utilizado como agente gelificante natural y derivado de algas rojas que pertenecen a distintos géneros. Desde un punto de vista químico, es un polímero constituido principalmente por unidades de D-galactosa.

35 La agarosa es un polisacárido purificado a partir del agar-agar que, como ya se ha mencionado, es una sustancia gelatinosa aislada a su vez por las algas. Es un polímero lineal y neutro formado por unidades de D-galactosa y de 3,6-anhidro-L-galactosa, enlazado alternativamente con uniones de glucósido. La agarosa es un azúcar soluble en agua a temperatura de ebullición, mientras que se convierte en sólido según se enfría formando un gel gracias a la formación de una matriz tridimensional constituida mediante uniones de hidrógeno entre las cadenas lineales.

40 Aún según la presente invención la composición comprende, en otra realización, además de formaldehído, agua y aceite de parafina, incluso alcohol de cetilo o alcohol de palmitilo o 1-hexadecanol, también en forma esterificada del mismo, éster de cetil-palmitato o palmitato cetílico, de fórmula básica  $C_{15}H_{31}COOC_{16}H_{33}$ , derivado por la extracción de grasas vegetales tales como, por ejemplo, aceite de palma y aceite de coco. El nombre alternativo de alcohol de palmitilo también es debido a esta fuente vegetal. En este caso, como en el caso de la composición en presencia de agar, la presencia de alcohol cetílico en la composición según la invención confiere una consistencia similar a un gel, garantiza la estabilidad de la emulsión en el tiempo, mejorando, de ese modo, el efecto impermeabilizante.

Aún según la invención, también puede haber presente agar, alcohol cetílico y palmitato cetílico en una mezcla mutua.

45 Según la presente invención, la composición de formol y de aceite de parafina es conformada en el interior del recipiente adecuado para la recogida de las muestras del material biológico extraído que ha de ser analizado, como una capa inferior constituida por la solución acuosa de formaldehído, posiblemente tamponada, y una capa superior inmiscible con la solución subyacente de formol, que evita el paso hacia fuera de vapores de formaldehído liberados en cuanto el operario abre el recipiente. La muestra recién extraída de material biológico es sumergida en la composición según la invención. El primer contacto entre la muestra y la composición se produce por la fase constituida por el aceite de parafina, a través de la cual pasa la muestra extraída para llegar a la fase acuosa de formol. De forma similar, cuando se extrae la muestra del recipiente, pasará a través de la fase constituida por el aceite de parafina.

55 Utilizando la composición según la presente invención cuando el operario, generalmente el cirujano que lleva a cabo la cirugía o el doctor que lleva a cabo la exploración de autopsia o personas asignadas para la extracción de la muestra de material biológico, abre el recipiente en el que se tiene que colocar la muestra, no entra en contacto con

ningún tipo de efluviio de formaldehído y/o de vapor, dado que la capa suprayacente de aceite de parafina evita que se liberen vapores de formaldehído y salgan del recipiente. Este aspecto representa una ventaja muy significativa en comparación con el uso de recipientes según la técnica anterior, que están llenos únicamente de formol, dado que evita que el operario entre en contacto con efluvios de una sustancia tóxica y reconocida como cancerígena. Tal ventaja se vuelve más evidente en caso de recipientes adecuados para alojar muestras biológicas de tamaño medio y grande. En este caso, de hecho, la cantidad de formol necesaria de forma que se sumerja completamente la muestra es notable y, por consiguiente, notable también es la cantidad de formaldehído que se evapora cuando se abre el recipiente y que puede ser respirada por el operario.

El propio recipiente, lleno de una composición que comprende aceite de parafina y formol, se encuentra dentro del alcance de protección de la presente invención, al igual que un procedimiento de procesamiento de las muestras de material biológico, permite el uso de la composición según la invención.

La preparación de la composición según la invención, en caso de que también comprenda agar, se realiza tratando el agar en agua con la solución tampón y añadiendo el aceite de parafina. De forma alternativa, se calienta la mezcla de agar, de agua y de tampón, obteniendo, de esta manera, un gel enfriado hasta temperaturas inferiores a 40°C y, subsiguientemente, añadido a aceite de parafina. La presencia de agar en la composición según la invención confiere una consistencia similar a un gel y garantiza la estabilidad de la emulsión en el tiempo.

Se describirá ahora la presente invención con más detalle en función de la parte experimental documentada a continuación en la presente memoria, dada únicamente a modo de ejemplo y no limitante de la invención. Se ha realizado un estudio comparativo entre la composición según la técnica conocida, proporcionada como un agente de carga de los recipientes para la recogida de muestras de material biológico según la presente invención, y una base de formaldehído únicamente en agua (denominada, de aquí en adelante, F) y la composición según la invención, que comprende formaldehído, agua y aceite de parafina (denominada FS).

Se ha llevado a cabo el estudio comparativo para evaluar posibles variables fijadoras de las dos composiciones según intervalos de tiempo definidos, en particular para evaluar las propiedades fijadoras de la composición según la técnica conocida en comparación con las de la composición según la invención.

COMPOSICIÓN SEGÚN LA TÉCNICA CONOCIDA (F): formol neutro tamponado

COMPOSICIÓN SEGÚN LA PRESENTE INVENCION (FS): formol neutro tamponado más aceite de parafina

Se ha llevado a cabo este estudio para evaluar las propiedades fijadoras de la composición según la invención (FS) en comparación con la fijación con el procedimiento tradicional (formol neutro tamponado F).

Ensayos comparativos de tipo 1

El ensayo proporcionado para un estudio comparativo entre las características de fijación de las dos composiciones enumeradas a continuación:

- fijación con formol neutro tamponado (composición) (F);
- fijación con la composición según la invención (formol neutro tamponado + aceite de parafina) (FS).

Características que han de ser sometidas a ensayo:

- dispersión de formol en el entorno;
- "ralentización" del tiempo de fijación;
- posibles interferencias debido a la adición de aceite de parafina.

Materiales y procedimientos:

- toma de muestras y fijación de tejido bovino hepático;
- etapas de fijación definidas en: 6 horas; 24 horas; 48 horas; 72 horas;
- procesamiento subsiguiente, antes de la fijación en las anteriores etapas enumeradas, de las muestras hepáticas con procesador Donatello en LaboPath;
- inclusión de las muestras en la unidad de control Canova en LaboPath;
- corte de secciones en parafina con el microtomo automático Galileo en LaboPath;

- examen al microscopio.

20/4/2015

Configuración de los recipientes

5 Se han utilizado ocho recipientes de 250 ml (llenados de antemano hasta 150 ml) que contienen formol neutro tamponado, un pH de 7,2-7,4 (composición según la técnica conocida, denominada composición F) (Fig. 1).

Se decidió añadir 20 ml de aceite de parafina en cada uno de cuatro de los ocho recipientes mencionados anteriormente, obteniendo, de ese modo, la composición según la presente invención (composición FS) (Fig. 2).

Muestras utilizadas

10 Tejido bovino hepático. Se han llevado a cabo 8 extracciones (una por cada recipiente), de forma que se trabaje por duplicado para evaluar posibles diferencias.

Tamaño de la muestra - (Fig. 3)

Longitud: 3 cm

15 Anchura: 2 cm

Grosor: 4 mm

Temporización

20 Se han sumergido simultáneamente las 8 muestras hepáticas en los recipientes que contienen formol neutro con un pH de 7,2-7,4 (Fig. 4) (composiciones F1, F2, F3, F4) y formol neutro con un pH de 7,2-7,4 + aceite de parafina (Fig. 5) (composiciones FS1, FS2, FS3, FS4) a las 10:15 del 20/04/2015. 1<sup>er</sup> procesamiento: 6 h tras la inmersión;

2<sup>o</sup> procesamiento: 24 h tras la inmersión;

25 3<sup>o</sup> procesamiento: 48 h tras la inmersión;

4<sup>o</sup> procesamiento: 72 h tras la inmersión.

Descripción del fenómeno

30 La muestra permanece en suspensión durante unos segundos al sumergir la muestra en el recipiente que contiene la composición FS según la invención. Durante esta operación, se humedece en aceite y, subsiguientemente, precipita espontáneamente hacia el fondo del recipiente. En esta etapa, puede observarse cómo se separa el aceite del tejido y regresa a la superficie.

El tejido es "aclorado" sacándole el aceite en la etapa de inmersión en formol. En esta etapa, se han respetado los tiempos de fijación enumerados anteriormente. La muestra de tejido es, de nuevo, "oleosa" tras el contacto con el aceite de parafina que se produce durante la extracción de la misma del recipiente.

35 Protocolo de procesamiento

Teniendo en cuenta los distintos tiempos de fijación en el interior de los recipientes, el procesamiento ha comenzado partiendo de agua.

El reactivo OTTIX PLUS es comercializado en la actualidad por Diapath S.p.A.

OTTIX PLUS es un reactivo listo para ser utilizado, no tóxico, libre de disolventes aromáticos.

40 Puede actuar de forma simultánea como un agente deshidratante y aclarante en todos los protocolos de anatomía patológica y es un sustituto tanto de alcoholes y de disolventes, tales como xileno y/o tolueno.

Permite llevar a cabo la tinción con resultados garantizados y equivalente al procedimiento tradicional de una forma completamente segura. Es clasificado como un dispositivo de diagnóstico *in vitro*.

Ottix Plus contiene:

- 45
- EXXSOL DSP 100/140 EN BRUTO
  - Etanol

## ES 2 711 139 T3

- Propan-2-ol

AGUA	→	10 min
ALCOHOL AL 70%	→	45 min
ALCOHOL AL 95%	→	1 h
ALCOHOL AL 99%	→	3 h
OTTIX PLUS	→	1 h
OTTIX PLUS	→	1 h
OTTIX PLUS	→	1 h
PARAFINA	→	1 h
PARAFINA	→	1 h y 30 min
PARAFINA	→	1 h y 30 min

### F1+FS1

5 El procesamiento comenzó a las 16:15 y tiene una duración de 11 h y una permanencia de 55 min en la última parafina.

21/04/2015

Tras el procesamiento, se incluyeron las muestras. (Figuras 6-10) Se cortaron secciones de 2  $\mu$  y de 3  $\mu$  que, colocadas sobre portaobjetos de microscopio, han sido secadas en un horno a 70 °C durante 30 min y tincionadas según el protocolo de tinción hematoxilina hematoxilina-eosina.

10 Protocolo de tinción con hematoxilina-eosina

Ottix Plus 10 min

Ottix Plus 10 min

15 Ottix Plus 5 min

Alcohol al 99% 10 min

Alcohol al 95% 5 min

20

Alcohol al 70% 3 min

Alcohol al 50% 3 min

25 Agua destilada 3 min

Hematoxilina de Mayer 5 minutos

Agua de grifo 5 minutos

30 Eosina 2 minutos

Agua de grifo 3 minutos

Agua destilada 1 min

35 Alcohol al 95% 3 min

Alcohol al 95% 3 min

Alcohol al 99% 5 min

40

Ottix Plus 3 minutos

Ottix Plus 5 min

Ottix Plus 5 min

- 5 En la sección de tejido presente en el portaobjetos de microscopio, después de haber llevado a cabo el protocolo mencionado anteriormente de tinción, se retira el tirante y se aplica el portaobjetos de microscopio.

Sigue la observación con un microscopio óptico.

F2+FS2

Tras la fijación (24 h), se procesaron las muestras de F2 y de FS2 siguiendo el mismo protocolo.

- 10 22/04/2015

Tras el procesamiento, se incluyeron las muestras. (Figuras 11-15)

Se cortaron secciones de 2  $\mu$  y de 3  $\mu$  que, colocadas sobre portaobjetos de microscopio, fueron secadas en un horno a 70 °C durante 30 min y tincionadas según el protocolo de tinción con hematoxilina-eosina en uso (Fig. 16)

Resultados

- 15 Fijación adecuada en ambas muestras.

F3+FS3

Tras la fijación (48 h), se procesaron las muestras de F3 y de FS3.

23/04/2015

Tras el procesamiento, se incluyeron las muestras en parafina. (Figuras 17-21)

- 20 Se cortaron secciones de 2  $\mu$  y de 3  $\mu$  que, colocadas sobre portaobjetos de microscopio, fueron secadas en un horno a 70 °C durante 30 min y tincionadas según el protocolo de tinción con hematoxilina-eosina (Fig. 22)

Resultados

Fijación adecuada en ambas muestras.

F4+FS4

- 25 Tras la fijación (72 h), se procesaron las muestras de F4 y de FS4 siguiendo el mismo protocolo.

24/04/2015

Tras el procesamiento, se incluyeron las muestras. (Figuras 23-27)

Se cortaron secciones de 2  $\mu$  y de 3  $\mu$  que, colocadas sobre portaobjetos de microscopio, fueron secadas en un horno a 70 °C durante 30 min y tincionadas según el protocolo de tinción con hematoxilina-eosina (Fig. 28)

- 30 Resultados

Fijación adecuada en ambas muestras.

Conclusiones

- 35 La fijación de los tejidos hepáticos, llevada a cabo con las dos composiciones (la composición F según la técnica conocida y la composición FS según la presente invención) objeto de los ensayos comparativos, ha sido sometida a ensayo según distintos tiempos de fijación: 6 h, 24 h, 48 h, 72 h.

En las muestras de tejido tratadas con las dos composiciones, se pueden apreciar diferencias macroscópicas en 6 horas: el tejido FS1 está menos fijado en el centro (fenómeno de fijación retrasado).

En las muestras de tejido tratadas con las dos composiciones en 24-48-72 horas, no son apreciables diferencias ni macroscópicas ni microscópicas.

- 40 En las muestras (FS1) fijadas en las primeras 6 horas, se emitió la hipótesis de que el aceite de parafina, por sus características intrínsecas de hidrofobicidad, podría retrasar la fijación estándar, que es de aproximadamente 1 mm/hora durante las primeras tres horas.

5 El fenómeno descrito anteriormente del “aclarado” espontáneo de la muestra quirúrgica posterior a su inmersión, tras permanecer brevemente en la fase oleosa, limpia *de facto* la “película” que se creía que podía aislar permanentemente la muestra del medio fijador. El distinto peso del aceite en comparación con la fase acuosa hace que las “gotitas” de aceite regresen progresivamente hasta la superficie, “liberando”, de esta manera, el tejido en el medio fijador en el que ha sido sumergido.

Esto influye la penetración del formol en las primeras 6 horas, mientras que el fenómeno de fijación retrasada en los subsiguientes ensayos (24-48-72 horas) resulta menos evidente.

10 Los ensayos llevados a cabo demostraron que la composición según la presente invención es inerte, no crea problemas a las muestras biológicas, no tiene distintas “fases de riesgo” o además de las del formol neutro tamponado según la técnica conocida.

Ensayos comparativos de tipo 2

Estudio comparativo entre formol neutro tamponado (composición F) y formol con la adición de mezcla de aceite de parafina - agar (composición FS-A). Evaluación de variables de fijación de las dos composiciones en distintos intervalos de tiempo.

15 Polimerización del aceite de parafina. Gelificación del aceite de parafina utilizando agar al 0,1 y 0,2%.

El fin de estos ensayos comparativos adicionales es evaluar los siguientes aspectos:

20 • posibilidad de proporcionar a la capa de aceite una “estructura”, de forma que se reduzca el contacto con la muestra biológica sumergida en el recipiente, para evitar fenómenos de fijación retrasada (hipofijación consiguiente si la muestra solo fue sumergida durante 6 h)

• posibilidad de minimizar adicionalmente la evaporación y la percepción del fuerte olor típico del formol.

Este estudio se lleva a cabo para evaluar las propiedades fijadoras del formol, con la adición de una mezcla de aceite de parafina - agar (composición según la presente invención), en comparación con la fijación mediante un procedimiento tradicional (formol neutro tamponado, composición según la técnica conocida).

25 Ensayos comparativos de tipo 1

El ensayo permitió un estudio comparativo entre las características de fijación de las dos composiciones y, precisamente:

30 • fijación con formol neutro tamponado (composición F según la técnica conocida);  
• composición fijadora alternativa (formol neutro tamponado + mezcla de aceite de parafina - agar, composición FS-A según la presente invención).

Características que han de ser objeto de ensayo:

35 • Dispersión de formol en el entorno;  
• “ralentización” del tiempo de fijación;  
• posibles interferencias debido a la adición de la mezcla de aceite de parafina - agar.

Materiales y procedimientos:

40 • Toma de muestras y fijación de tejido porcino hepático;  
• etapas de fijación definidas en: 6 horas;  
• procesamiento subsiguiente, antes de la fijación, de las muestras hepáticas con procesador Donatello;  
45 • inclusión de muestras en la unidad de control Canova;  
• corte de secciones en parafina con el microtomo automático Galileo;  
• examen al microscopio.

50 Configuración de recipientes:

Se han utilizado tres recipientes de 150 ml (llenados de antemano hasta 90 ml) que contienen formol neutro tamponado (según la técnica conocida), con un pH de 7,2-7,4. (Figuras 29-31)

Se decidió añadir la mezcla de aceite de parafina - agar en dos recipientes en distintas cantidades, variando la relación con el formol y manteniendo el mismo volumen final (90 ml) de llenado

- 5
- 40 ml de formol + 50 ml de mezcla de aceite-agar (Fig. 30);
  - 50 ml de formol + 40 ml de mezcla de aceite-agar (Fig. 31).

Muestras utilizadas

10 Tejido porcino hepático, se han llevado a cabo 3 extracciones (una por cada recipiente), de forma que se pueda trabajar por triplicado para evaluar posibles diferencias.

Tamaño de la muestra: (Fig. 32)

Longitud: 2 cm;

15 Anchura: 1,5 cm;

Grosor: 4 mm.

Temporización

20 Se sumergieron simultáneamente 3 muestras hepáticas en los recipientes que contienen 90 ml de formol neutro con un pH de 7,2-7,4, 50 ml de formol neutro con un pH de 7,2-7,4 + 40 ml de mezcla de aceite de parafina - agar y 40 ml de formol neutro con un pH de 7,2-7,4 + 50 ml de mezcla de aceite de parafina - agar (Fig. 33).

Procesamiento: tras 6 h desde la inmersión

Descripción del fenómeno

25 La muestra permanece en suspensión al sumergir la muestra en el recipiente con la mezcla de aceite-agar y es necesario, con la ayuda de las pinzas, empujar la muestra hacia el fondo del recipiente. En esta etapa, la muestra se humedece en aceite de parafina - agar, pero, una vez se encuentra en el fondo del recipiente, puede observarse cómo se separa la composición del tejido y regresa a la superficie.

El tejido es "aclorado" quitándole la mezcla de aceite-agar en la etapa de inmersión en formol. En esta etapa, se han respetado los tiempos de fijación enumerados anteriormente. La muestra de tejido es, de nuevo, "oleosa" tras el contacto con el aceite de parafina durante la extracción de la misma del recipiente.

30 Nota: La muestra de tejido hepático (Fig. 37, recipientes 2 y 3 desde la izquierda) es "oleosa" tras el contacto con el aceite de parafina acaecido durante la extracción de la misma del recipiente.

Protocolo de procesamiento:

Teniendo en cuenta los tiempos de fijación en el interior de los recipientes, la etapa de procesamiento ha comenzado partiendo de agua.

AGUA	→	10 min
OTTIX SHAPER	→	1 h
OTTIX PLUS	→	1 h
OTTIX PLUS	→	1 h y 30 min
OTTIX PLUS	→	1 h y 30 min
OTTIX PLUS	→	2 h
PARAFINA	→	1 h y 30 min
PARAFINA	→	2 h
PARAFINA	→	2 h

35 El procesamiento tiene una duración de 12 h y 40 min de permanencia en la última parafina.

17/07/2015

Tras el procesamiento, se incluyeron las muestras. (Figuras 38-45)

Se cortaron secciones de 2  $\mu$  que, colocadas sobre portaobjetos de microscopio, fueron secadas en un horno a 70 °C durante 30 min y tincionadas según el protocolo de tinción con hematoxilina-eosina. (Figuras 46-47)

5 Conclusiones

La fijación de los tejidos hepáticos llevada a cabo con las dos composiciones objeto de los ensayos comparativos, formol (según la técnica conocida) y formol + mezcla de aceite de parafina - agar (según la presente invención), fue sometida a ensayo con tiempos de fijación de 6 h (tiempo crítico destacado en los anteriores ensayos únicamente con aceite de parafina - formol).

10 En este caso, en las muestras de tejido fijadas con las dos mezclas en 6 horas, no se aprecian diferencias macroscópicas y microscópicas.

Por consiguiente, se halló particularmente útil la composición según la presente invención de formol, aceite de parafina y agar para ser utilizada en los procesamientos de fijación de muestras de material biológico que requieren breves tiempos de fijación, de aproximadamente 6 horas.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición líquida que comprende una capa superior y una capa inferior, comprendiendo la capa superior aceite de parafina y la capa inferior constituida por una solución acuosa de formaldehído, siendo inmisible la capa superior con la solución subyacente de formaldehído.
- 5 2. Una composición según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha solución acuosa es tamponada.
3. Una composición según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una solución acuosa tamponada de formaldehído, parafina en forma líquida, agar y/o agarosa.
4. Una composición según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una solución acuosa tamponada de formaldehído, parafina en forma líquida, alcohol cetílico.
- 10 5. Una composición según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende una solución acuosa tamponada de formaldehído, parafina en forma líquida, palmitato de cetilo.
6. Una composición según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho formaldehído en solución acuosa y dicha parafina en forma líquida tienen una relación de 70:30 hasta 95:5.
- 15 7. Una composición según la reivindicación 6, caracterizada porque dicha relación entre formaldehído en solución acuosa y dicha parafina en forma líquida es de 90:10.
8. Una composición según la reivindicación 3, caracterizada porque dicho agar y/o dicha agarosa se encuentra en cantidades entre 0,1 y 0,2% con respecto al peso total de la composición.
9. Un recipiente para la recogida de muestras de material biológico caracterizado porque es desechable y llenado de antemano con la composición de la reivindicación 1.
- 20 10. Un recipiente para la recogida de muestras de material biológico caracterizado porque es desechable y llenado de antemano con la composición de la reivindicación 3.
11. El uso de la composición de la reivindicación 1 para la conservación de muestras de material biológico.

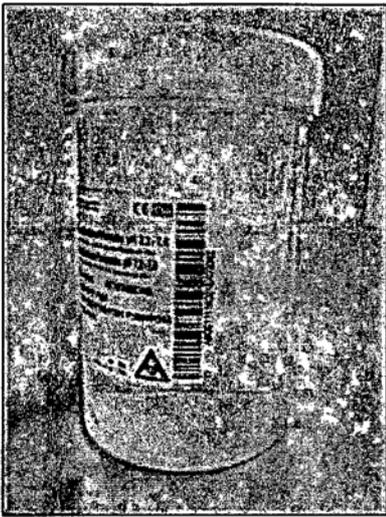


Fig.1

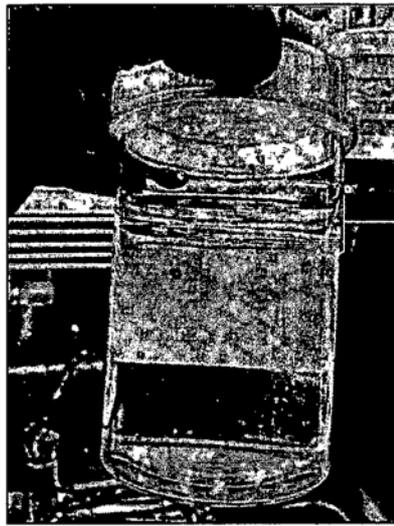
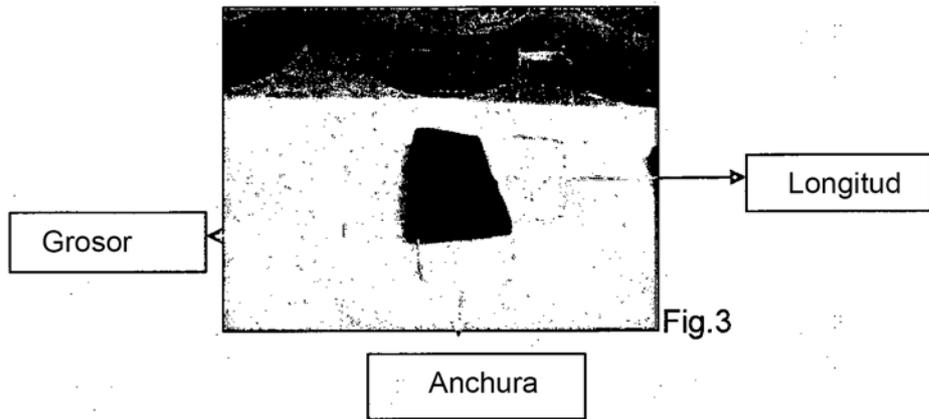


Fig.2

20 ml de  
aceite de  
parafina



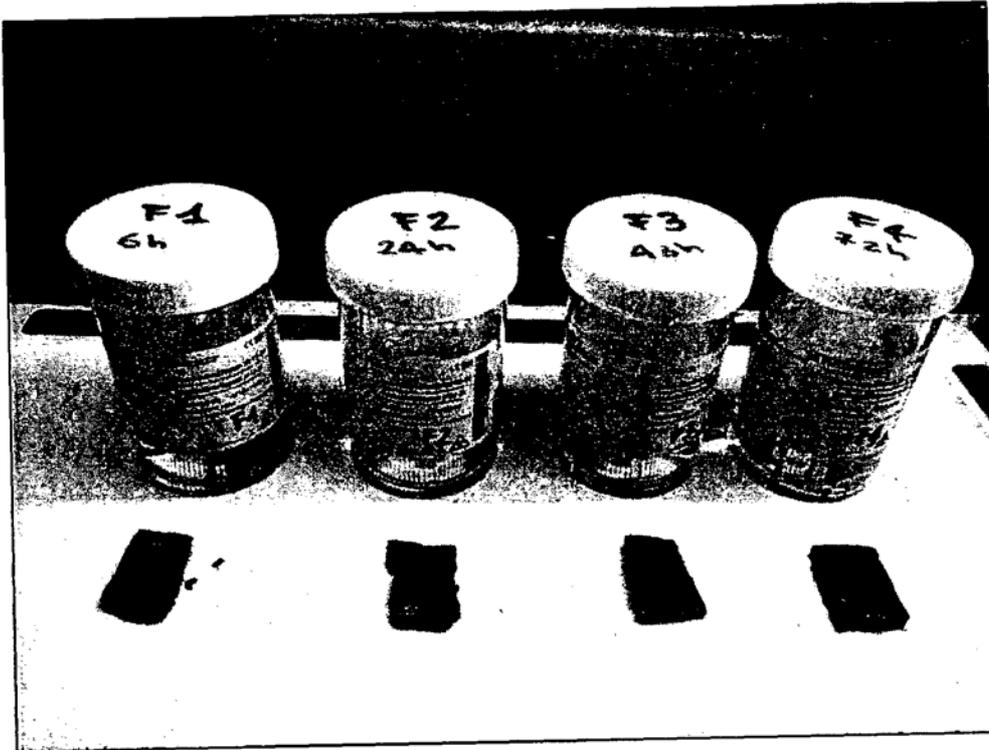


Fig.4

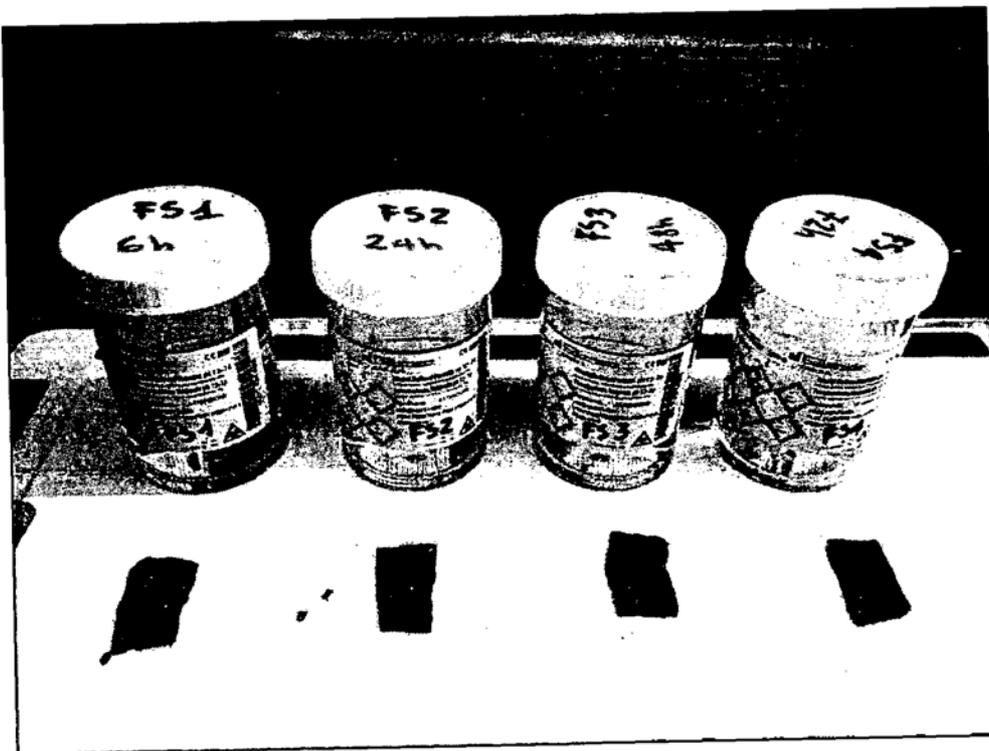


Fig.5

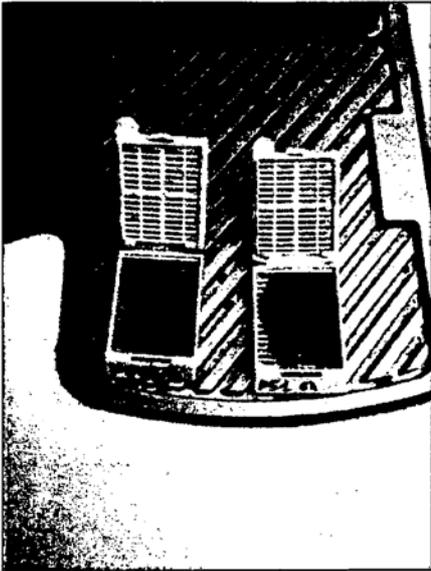
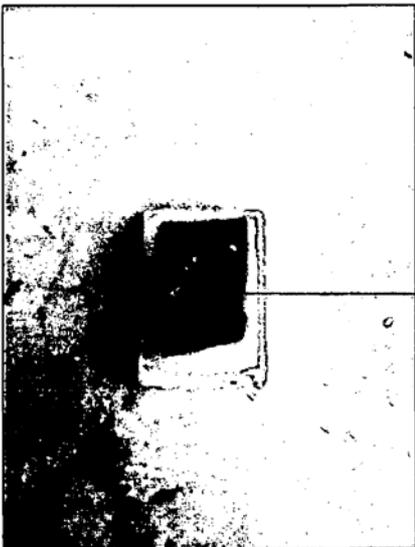


Fig.6



Fig.7



Área  
hipofijada

Fig. 8

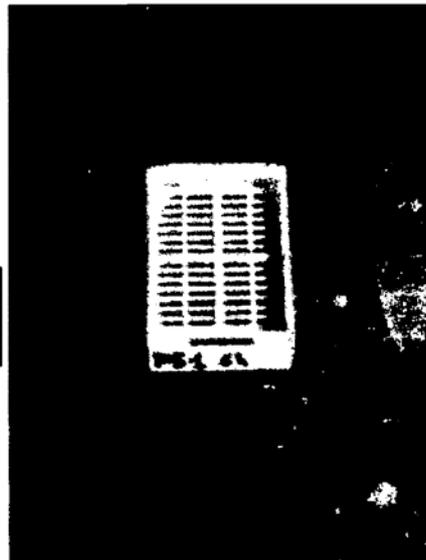
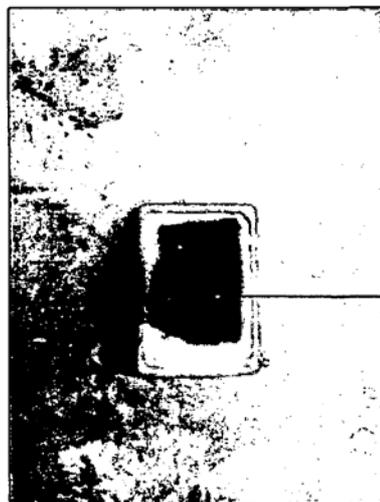


Fig.9



Área hipofijada

Fig.10

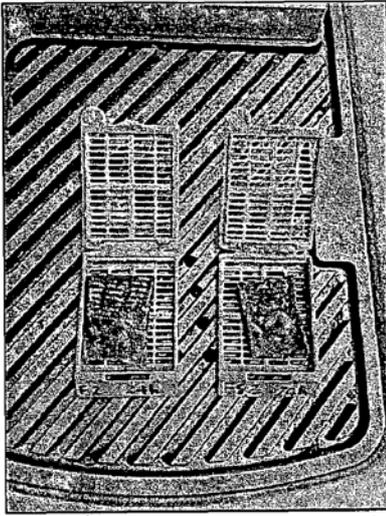


Fig. 11

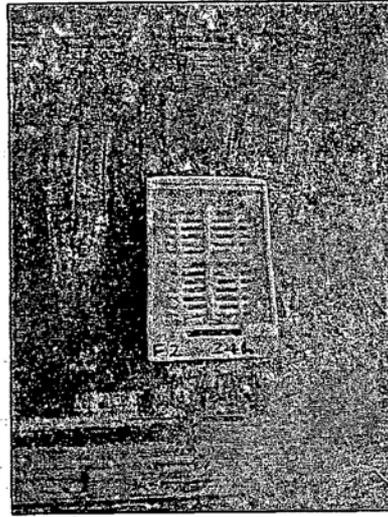


Fig. 12

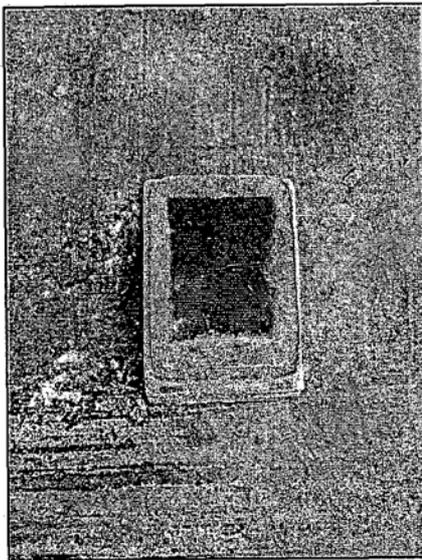


Fig. 13

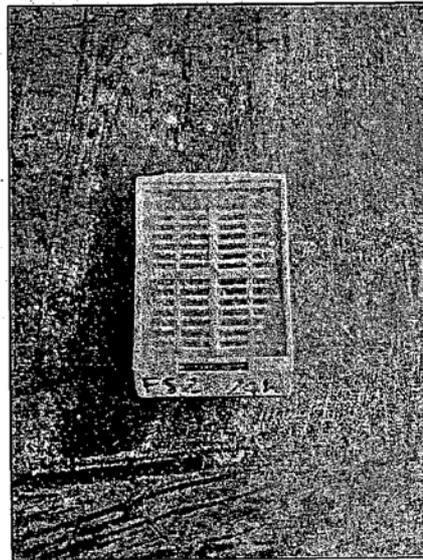


Fig. 14

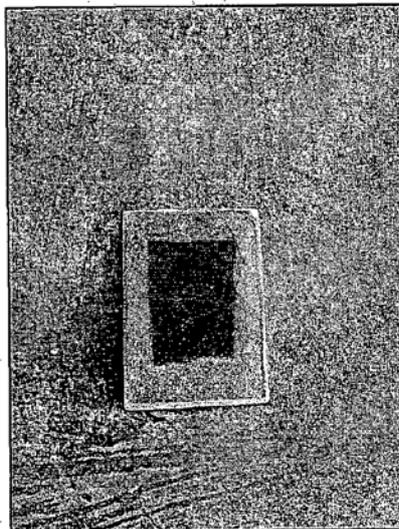


Fig. 15

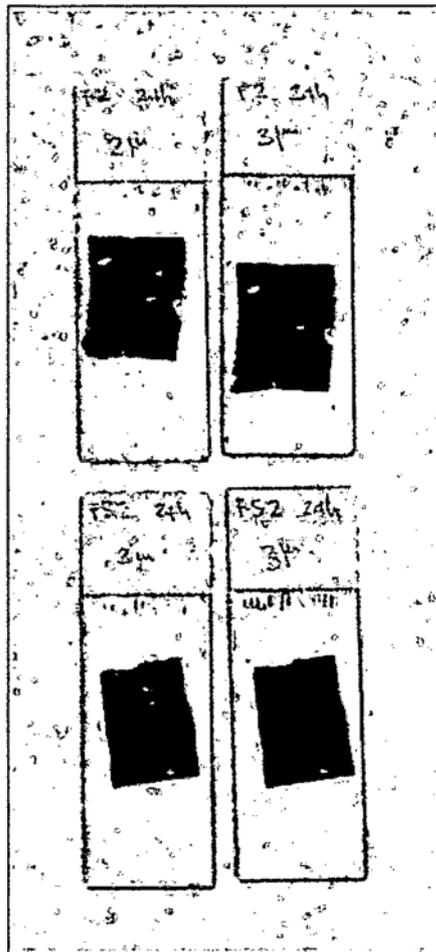


Fig.16

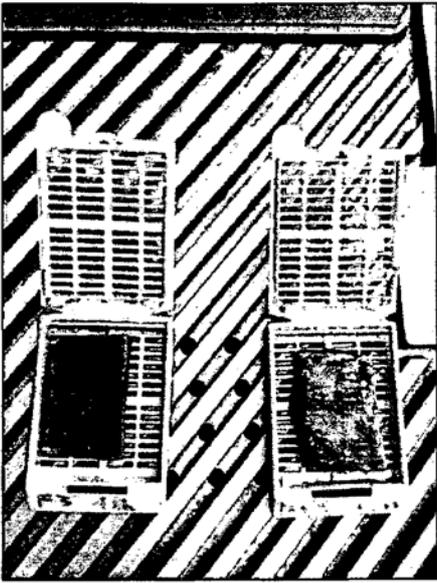


Fig.17

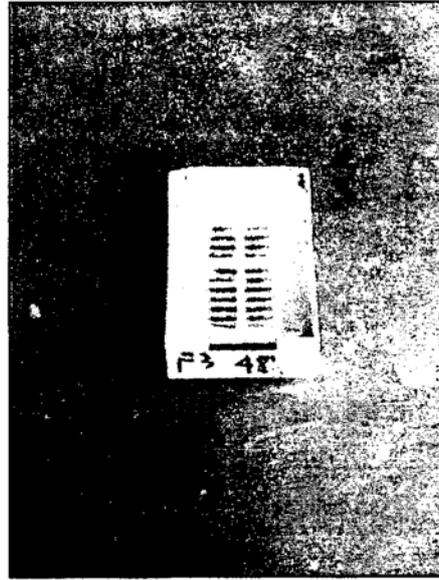


Fig.18

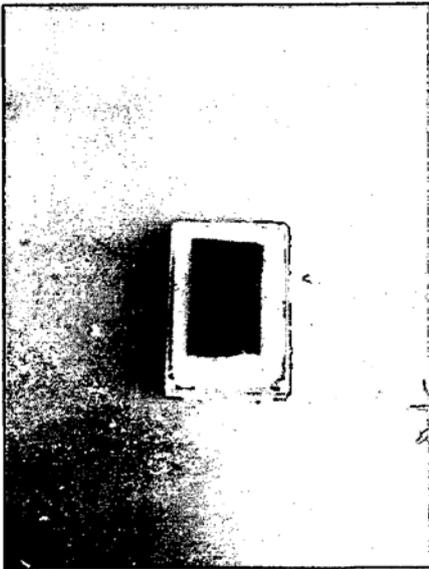


Fig.19

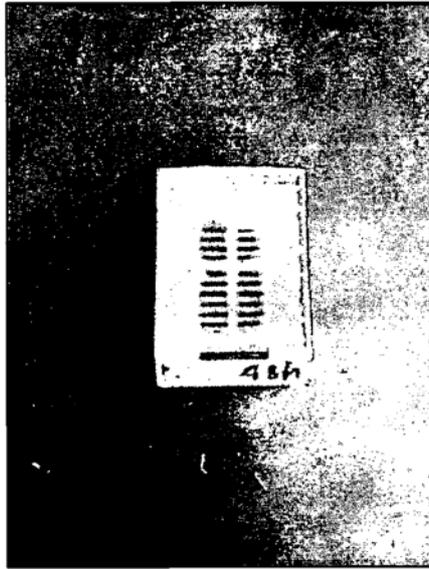


Fig.20

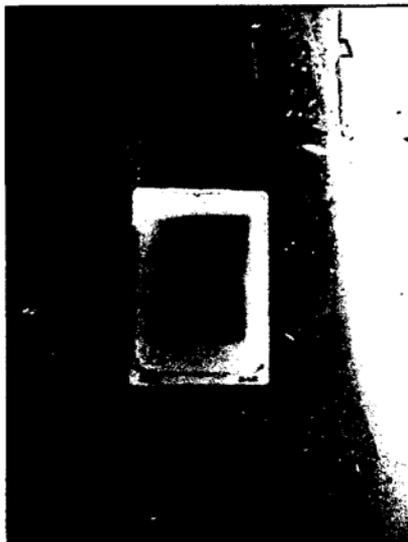


Fig.21

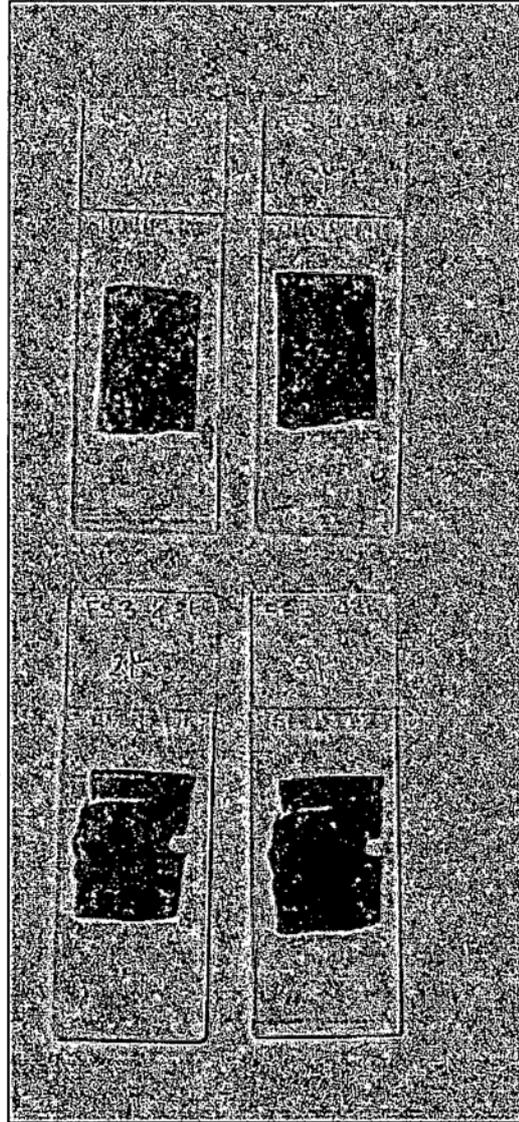


Fig.22

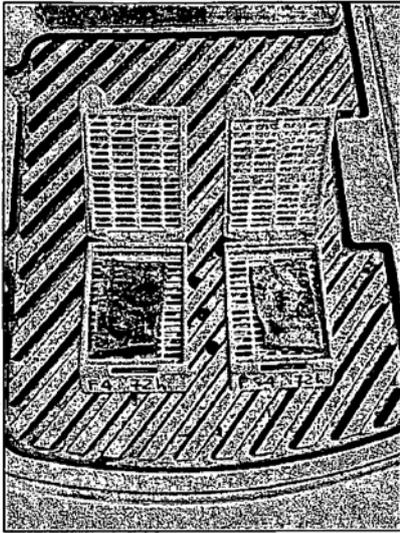


Fig.23

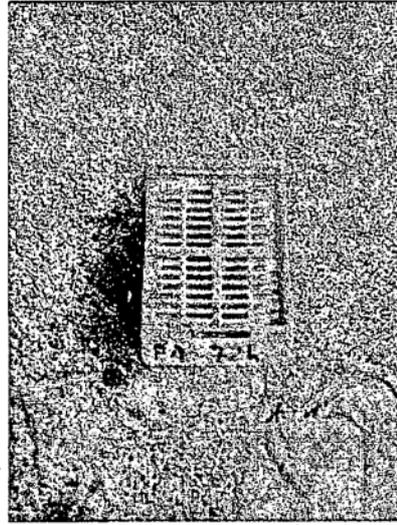


Fig.24

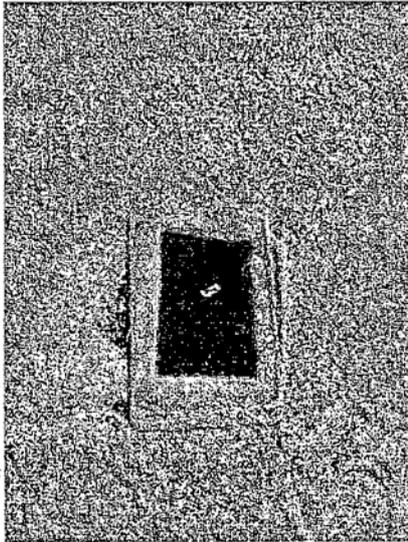


Fig.25

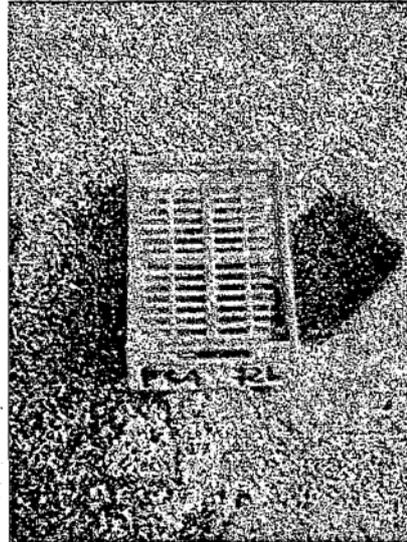


Fig.26

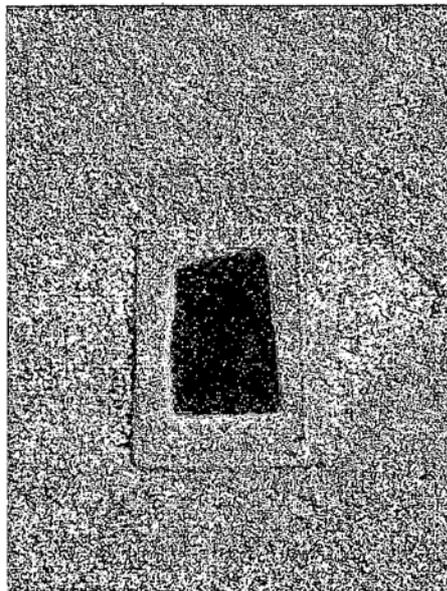


Fig.27

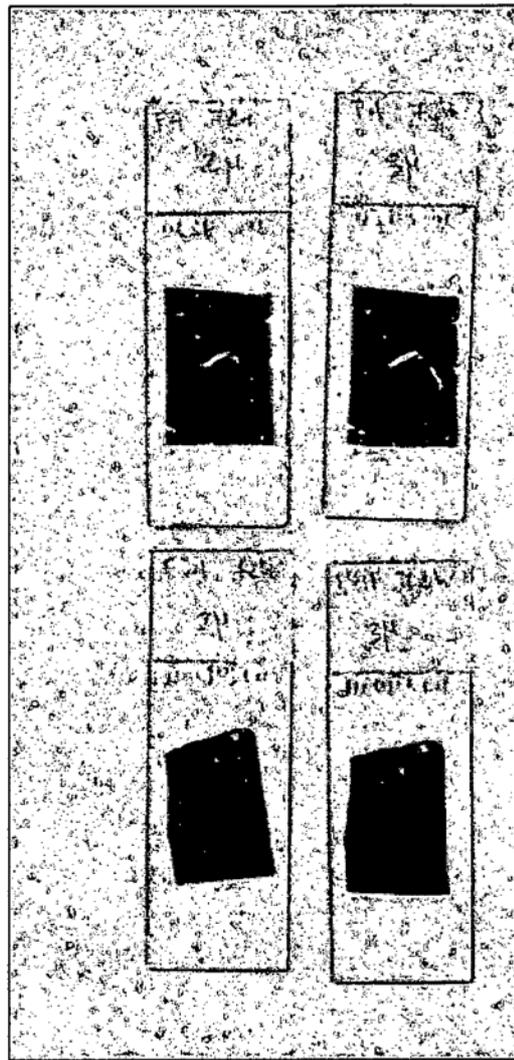


Fig.28



Fig.29

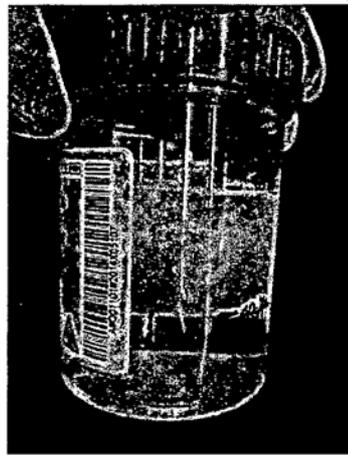


Fig.30

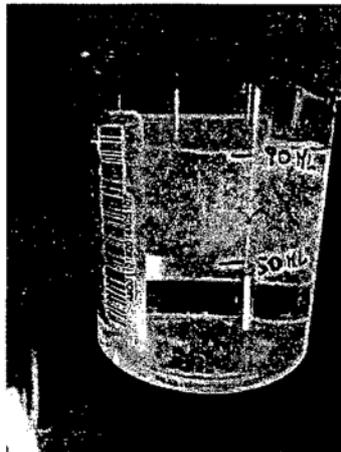
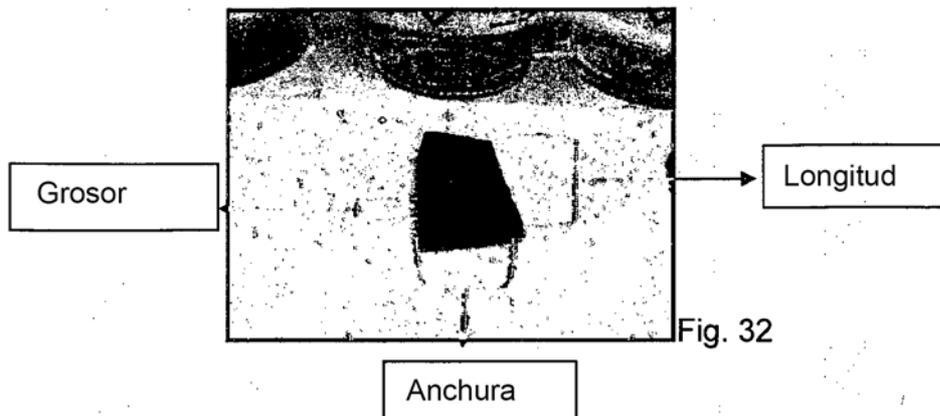


Fig.31



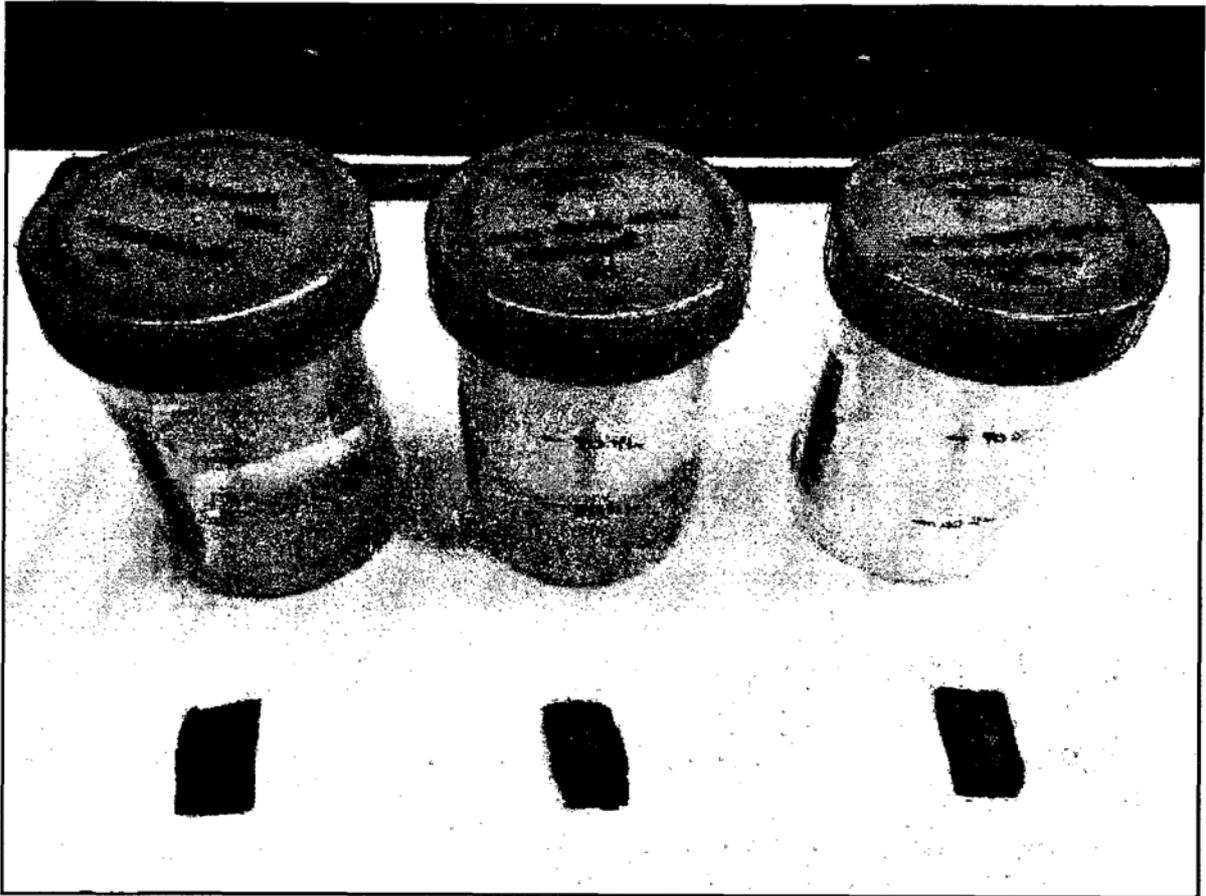


Fig. 33



Fig. 34



Fig. 35



Fig. 36



Fig.37

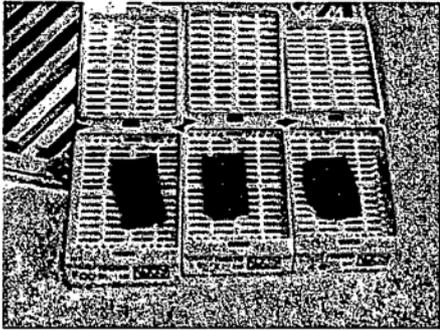


Fig.38

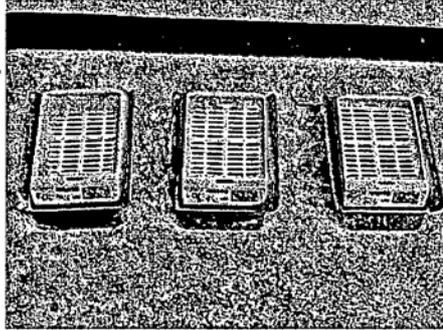


Fig.39

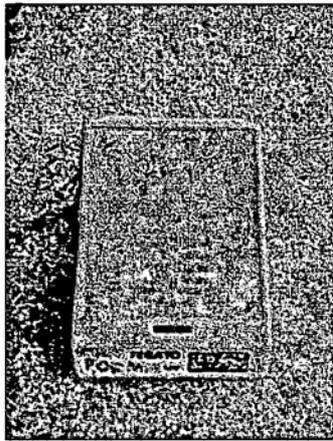


Fig.40

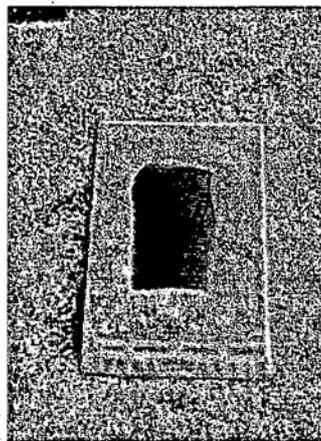


Fig.41

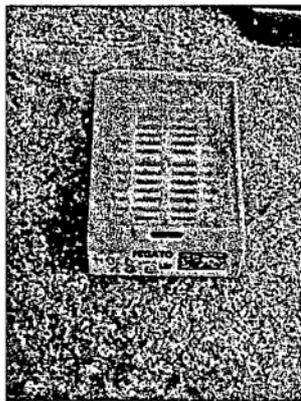


Fig.42

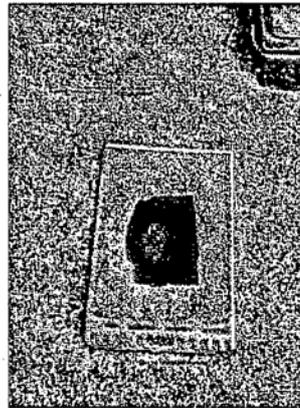


Fig.43

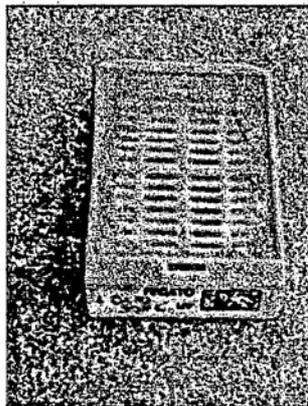


Fig.44

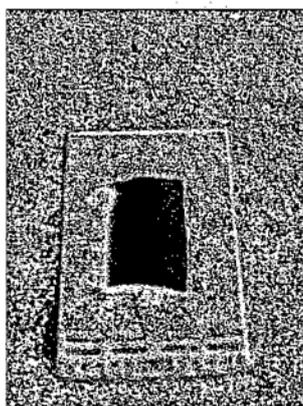


Fig.45



Fig.46

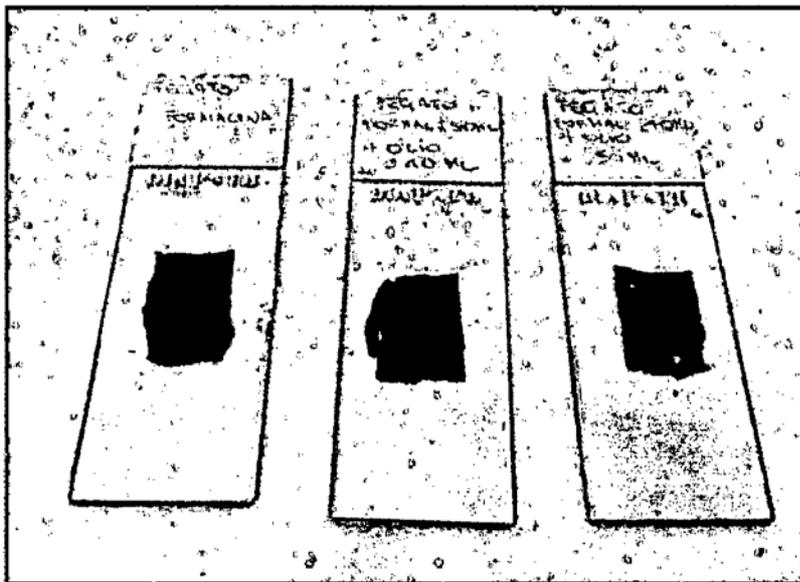


Fig.47

Resultados:

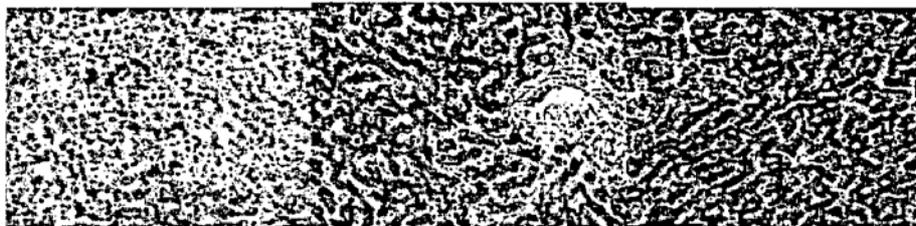


Fig.48

Tejido en 90 ml de formol

50 ml de formol + 40 ml de mezcla

40 ml de formol + 50 ml de mezcla