

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 725**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 1/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2012 PCT/EP2012/052800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12110646**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2012 E 12706226 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2676118**

54 Título: **Procedimiento para la fijación de muestras tisulares**

30 Prioridad:

17.02.2011 US 201161463551 P
04.03.2011 US 201161464479 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2020

73 Titular/es:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US

72 Inventor/es:

OTTER, MICHAEL;
PIERSON THEISS, ABBEY;
CHAFIN, DAVID y
ROBERTS, ESTEBAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 791 725 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

Procedimiento para la fijación de muestras tisulares

Campo

5 La presente invención se refiere al procesamiento de muestras tisulares por fijación con aldehído, tal como fijación con formol de muestras tisulares para la posterior tinción y formación de imágenes de la muestra para su interpretación patológica.

Antecedentes

10 Se ha usado formol por el campo de la histología durante más de medio siglo. Cuando se usa a temperatura ambiente, el formol se difunde en una sección tisular y reticula proteínas y ácidos nucleicos, deteniendo de este modo el metabolismo, conservando las biomoléculas y preparando el tejido para la infiltración de parafina. En la
15 práctica, la fijación con formol se produce principalmente a temperatura ambiente o mayor. Algunos grupos realizan la fijación a temperaturas ligeramente elevadas, presumiblemente para incrementar la tasa de reticulación. Así como el calor incrementa la tasa de reticulación, el formol frío disminuye significativamente la tasa de reticulación. Por este motivo, los histólogos realizan típicamente la fijación tisular a temperatura ambiente o mayor. Algunos grupos han usado formaldehído frío, pero solo en situaciones especializadas y no para fijar tejidos. Por ejemplo, los grupos usan
20 formol frío para examinar gotas de lípidos u otras situaciones especiales.

25 Se observan varios efectos en tejidos que están subexpuestos o bien sobreexpuestos a formol. Si una muestra tisular no se trata con formol durante un período de tiempo suficientemente largo, la morfología tisular es típicamente muy mala cuando los tejidos se someten a procesamiento tisular estándar. Por ejemplo, en un tejido fijado inadecuadamente, la posterior exposición a etanol encoge las estructuras celulares y condensa los núcleos puesto que los tejidos no tendrán la oportunidad de formar una red reticulada apropiada. Cuando se tiñe tejido mal fijado, tal como con hematoxilina y eosina (HyE), se observan muchos espacios blancos entre las células y estructuras tisulares, núcleos condensados y pérdida de citoplasma, y las muestras aparecen rosadas y desequilibradas con la tinción con hematoxilina. Los tejidos que se han expuesto a formol demasiado tiempo típicamente no funcionan bien
30 para posteriores procedimientos inmunohistoquímicos, presumiblemente debido a la desnaturalización y degradación de ácidos nucleicos y/o proteínas. Como resultado, las condiciones de recuperación de antígenos óptimas para estos tejidos no funcionan apropiadamente y por lo tanto las muestras tisulares parecen estar poco teñidas.

35 El diagnóstico médico apropiado y la seguridad del paciente requieren fijar apropiadamente las muestras tisulares antes de la tinción. En consecuencia, se han establecido pautas por oncólogos e histopatólogos para la fijación apropiada de muestras tisulares. Por ejemplo, de acuerdo con la American Society of Clinical Oncology (ASCO), la pauta actual para el tiempo de fijación en solución de formol tamponado neutro para análisis inmunohistoquímico HER2 es de al menos 6 horas, preferentemente más, y hasta 72 horas. Sería ventajoso desarrollar un procedimiento
40 para fijar rápidamente muestras tisulares tanto para conservar mejor las moléculas biológicas y la morfología tisular antes de que se produzca una degradación significativa como para proporcionar resultados de prueba exactos a los profesionales médicos y pacientes tan rápido como sea posible.

45 Un procedimiento de este tipo es en particular importante para conservar señales de modificación postraducciona. La modificación postraducciona de proteínas desempeña un papel extremadamente importante en el metabolismo celular. Por ejemplo, la fosforilación de proteínas regula muchas funciones celulares tales como control del ciclo celular, replicación, transcripción y traducción. Otras modificaciones como la ubiquitinación pueden seleccionar esas proteínas para la degradación y tener profundos efectos sobre las funciones celulares. Desafortunadamente, cuando la célula pierde el control de algunas de estas modificaciones, surgen resultados de proliferación celular y cánceres.
50 De hecho, la mayoría de las vías del cáncer ahora están vinculadas integralmente con cascadas de fosforilación que finalmente hacen que las células se inmortalicen y se diagnostiquen como cancerosas. Será extremadamente importante que investigadores y empresas comprendan si existen determinadas modificaciones en los cánceres como forma de diagnosticar un tipo de cáncer particular y/o predecir el resultado del tratamiento.

55 Desafortunadamente, los procedimientos existentes actualmente, que requieren típicamente largos tiempos de fijación y procesamiento a temperatura ambiente, no son buenos para conservar las modificaciones de proteínas. El problema de perder señales de modificación de proteínas se ha abordado por muchos investigadores en el pasado, por ejemplo, deteniendo la acción de fosfatasas, por ejemplo, Millipore (cóctel inhibidor de cinasas) n.º cat. 20-116), Thermo Scientific (cóctel inhibidor de fosfatasas Halt) n.º cat. 78420), etc.

60 Otros en la industria han desarrollado procedimientos de congelación rápida para detener la acción de las enzimas de modificación (Lawson *et. al.* Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions, 2011, vol. 62, número 2, páginas 115-122). Los procedimientos de congelación rápida en general se aplican a los casos donde los órganos completos necesitan conservarse para la implantación e implican DMSO o glúcidos. Desafortunadamente, la congelación rápida puede ralentizar inicialmente la acción de dichas enzimas pero
65 no inhibe su acción tras el descongelado de la muestra. Todos estos enfoques tienen diversas limitaciones.

Los enfoques anteriores son principalmente útiles para inhibir las enzimas de modificación en líneas celulares o extractos tisulares debido a las malas propiedades de difusión o falta de eficacia de la mayoría de inhibidores de fosfatasas en tejidos sólidos. Los inhibidores moleculares más grandes tales como proteínas tendrán tasas de difusión extremadamente bajas. Las moléculas más pequeñas tales como ortovanadato tienen tasas de difusión mayores pero especificidad limitada y no son extremadamente eficaces frente a todas las fosfatasas. No existe un procedimiento universal y fácil de implementar disponible actualmente para detener la acción de enzimas de modificación eficazmente en muestras tisulares sólidas. Por tanto, es deseable en la técnica desarrollar procedimientos de fijación tisular novedosos que ofrezcan una calidad excelente para conservar la morfología tisular, estructura proteica y/o señales de modificación postraducciona.

Sumario

La presente invención se refiere en general a procedimientos para fijar tejidos. En modos de realización típicos, los procedimientos ofrecen una excelente calidad para conservar la morfología tisular, estructura proteica y/o señales de modificación postraducciona.

Más específicamente, el procedimiento de la presente invención se refiere a un procedimiento para fijación con aldehído, ejemplificado por fijación con formol, de una muestra tisular, que comprende aplicar, sumergir o poner en contacto de otro modo una solución de aldehído y una muestra tisular durante un primer período de tiempo y a una primera temperatura, y a continuación elevar la temperatura de la muestra tisular hasta una segunda temperatura mayor que la primera temperatura durante un segundo período de tiempo. El procedimiento de la presente invención se define en la reivindicación 1.

La solución de aldehído y la muestra tisular están típicamente en contacto entre sí a la primera temperatura durante un período de tiempo eficaz para permitir que la solución de aldehído se difunda sustancialmente por toda la sección transversal completa de la muestra tisular.

La segunda temperatura de muestra tisular es mayor que la primera temperatura. La elevación de la temperatura de la muestra tisular puede comprender elevar la temperatura de la muestra tisular rápidamente o incluso abruptamente hasta la segunda temperatura. La elevación de la temperatura de muestra se realiza para incrementar la reticulación conservando todavía la reactividad de muestra subyacente. De forma alternativa, la elevación de la muestra tisular hasta la segunda temperatura se puede lograr sumergiendo la muestra tisular en una solución a la segunda temperatura, en la que la solución puede ser la misma o una solución de aldehído diferente. La segunda temperatura típicamente es mayor que la ambiente, más típicamente es mayor que aproximadamente 22 °C, incluso más típicamente es de mayor que aproximadamente 22 °C a al menos aproximadamente 50 °C, e incluso más típicamente es de mayor que aproximadamente 22 °C a aproximadamente 45 °C. El segundo período de tiempo es eficaz para permitir que se produzca una reticulación sustancialmente completa de moléculas y estructuras endógenas. Aunque el segundo período de tiempo puede variar, típicamente varía de mayor que 15 minutos hasta al menos aproximadamente 5 horas, típicamente es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, e incluso más típicamente es de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas. La velocidad y los procedimientos usados para elevar las temperaturas se diseñan de tal modo que se logre una conservación óptima de las señales de modificación postraducciona.

Aunque el primer período de tiempo puede variar dependiendo del grosor tisular, para las pautas CAP de ASCO de hasta 4 mm de grosor, típicamente varía de aproximadamente 15 minutos hasta aproximadamente 4 horas, más típicamente de mayor que 15 minutos a aproximadamente 3 horas, e incluso más típicamente es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas. Se reconoce que para muestras más gruesas, el primer período de tiempo estará dictado por la tasa de difusión. La primera temperatura es de al menos -20 °C a aproximadamente 15 °C, típicamente es de al menos 0 °C a aproximadamente 15 °C, más típicamente de al menos 0 °C a aproximadamente 10 °C, e incluso más típicamente de aproximadamente 3 °C a aproximadamente 5 °C.

Determinados modos de realización del procedimiento comprenden aplicar una primera solución de aldehído a una primera temperatura a la muestra tisular, seguido de aplicar una segunda solución de aldehído a la muestra tisular. La segunda solución de aldehído puede ser diferente de la primera solución de aldehído. Por ejemplo, las soluciones pueden estar a diferentes concentraciones, o la segunda solución de aldehído puede comprender un aldehído diferente del primer aldehído. El aldehído es típicamente un aldehído de alquilo inferior, tal como formaldehído, glutaraldehído o combinaciones de los mismos.

Un modo de realización ejemplar divulgado de la presente invención comprende sumergir una muestra tisular en una solución de formol a una temperatura de desde igual a o mayor que 0 °C hasta no mayor que 5 °C durante un primer período de desde mayor que 15 minutos hasta aproximadamente 4 horas. La muestra tisular se sumerge a continuación en una solución de formol a una segunda temperatura mayor que aproximadamente 22 °C hasta al menos 45 °C durante un segundo período de tiempo de desde aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas. La solución de formol en general es de NBF al 10 %. Estas etapas de procesamiento típicamente están seguidas de una serie de lavados con alcohol, seguidas además de un lavado con solución limpiadora, tal como un

lavado con xileno, de desde mayor que 0 minutos hasta al menos aproximadamente 30 minutos, o a aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, o aproximadamente 4 horas. A continuación se aplica cera a la muestra tisular para formar un bloque impregnado de cera.

5 Como se entiende actualmente, nadie hasta la fecha ha usado un enfoque de fijador enfriado y calentado para incrementar la calidad de la fijación tisular. Sin estar vinculado a una teoría de funcionamiento, actualmente se cree que a temperatura reducida, se produce muy poca reticulación pero la solución fijadora sí penetra sustancialmente en toda la sección tisular. Adicionalmente, puede ser que los procesos metabólicos o enzimáticos se reduzcan drásticamente. Una vez se difunde, la temperatura se eleva rápidamente, donde la cinética de reticulación se
10 incrementa considerablemente. Usando este procedimiento, en algunos modos de realización, la morfología tisular de alta calidad y la tinción IHQ conocida en la técnica, se ha logrado en aproximadamente 4 horas en comparación con las 24 horas para protocolos a temperatura ambiente. Además, puesto que la solución fijadora se ha difundido sustancialmente en la muestra, se observa una conservación incluso más morfológica y antigénica. Este protocolo difiere de la técnica anterior al separar el procedimiento de fijación en una primera etapa de procedimiento que
15 permite la difusión de la solución fijadora en una muestra tisular pero minimiza la reticulación, y una segunda etapa de procedimiento que incrementa la tasa de reticulación, durante períodos de tiempo usados típicamente para fijar una muestra tisular en modos de realización de trabajo divulgados.

20 En modos de realización típicos, los procedimientos conservan significativamente las señales de modificación postraduccionales de proteínas en la muestra tisular, por ejemplo, conservando al menos un 30 %, 50 %, 70 % o 90 % de las señales de modificación postraduccionales. Los procedimientos de fijación tisular de la presente invención pueden detener significativamente las actividades enzimáticas destruyendo las señales de modificación postraduccionales, tales como detener las actividades enzimáticas de la fosfatasa.

25 En otro modo de realización típico, los procedimientos conservan significativamente las señales de proteínas en la muestra tisular, por ejemplo, conservando al menos un 30 %, 50 %, 70 % o 90 % de las señales de modificación postraduccionales. Los procedimientos de fijación tisular de la presente invención pueden detener significativamente las actividades enzimáticas que degradan proteínas, tal como detener las actividades enzimáticas de la proteasa.

30 En un modo de realización ejemplar, se usan muestras tisulares incluidas en parafina fijadas con formaldehído (FFPE). El presente procedimiento ofrece varias ventajas sobre los intentos existentes para conservar los estados de modificación del tejido FFPE. El procedimiento usa una solución de formol estándar que se usa ampliamente en la práctica de histología. El etapa en frío se puede llevar a cabo de una manera simple que consiste en formol frío seguido de formol calentado. La presente invención por primera vez en la técnica logra conservar estados de
35 modificación en tejido FFPE. La presente técnica es más rápida que los procedimientos de fijación existentes y puede reducir significativamente el tiempo de inmovilización para muestras tisulares y mejorar el flujo de información.

40 Otro modo de realización se refiere a un procedimiento de detección automática que comprende detectar en un sistema de detección automática la muestra tisular fijada de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

45 En resumen, el presente procedimiento ofrece al menos tres mejoras sobre los procedimientos existentes en la técnica. En primer lugar, al permitir que el formol penetre en la sección tisular en un entorno frío se pueden reducir significativamente las actividades enzimáticas. En segundo lugar, al incrementar la cinética de reticulación elevando rápidamente la temperatura de muestra tisular, los constituyentes celulares se "bloquean" en su lugar más rápidamente de lo que se observaría a temperatura ambiente. Esta combinación hace que esta técnica sea superior a los procedimientos existentes y, por primera vez, permite que los estados de modificación se conserven en tejidos FFPE. En tercer lugar, esto representa un procedimiento general que se cree que es aplicable a una amplia variedad
50 de estados de modificación y enzimas. Mientras que otros procedimientos seleccionan un conjunto específico de enzimas de modificación, este procedimiento inhabilita rápidamente todas las enzimas de modificación y, por lo tanto, conserva el estado celular general mucho mejor que los procedimientos a temperatura ambiente estándar de referencia. Puesto que la invención no se limita a un conjunto específico de biomoléculas o a biomoléculas que contienen modificaciones postraduccionales específicas, se cree que este procedimiento representa un
55 procedimiento general para la conservación de cualquier biomolécula o estado de modificación. Por tanto, la presente invención puede conservar con alta calidad cantidades de biomoléculas y biomoléculas que contienen modificaciones postraduccionales específicas.

60 Los anteriores y otros objetivos, rasgos característicos y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

65 Las FIGS. 1A-1D son imágenes de microscopio digital de muestras tisulares tratadas durante diferentes períodos de tiempo (0, 2, 4 y 24 horas, respectivamente) con ciclina D1, que ilustran el efecto que tiene el estado de fijación sobre la intensidad de los resultados de tinción obtenidos usando anticuerpos.

- Las FIGS. 2A-2D son imágenes de microscopio digital de muestras tisulares tratadas durante diferentes períodos de tiempo (0, 2, 4 y 24 horas, respectivamente) con bcl-2, que ilustran el efecto que tiene el estado de fijación sobre la intensidad de los resultados de tinción obtenidos usando anticuerpos.
- 5 Las FIGS. 3A-3F son imágenes de microscopio digital de muestras tisulares tratadas de acuerdo con diferentes protocolos de procesamiento que ilustran que las muestras tisulares con remojo previo durante 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos (A-C y D-F, respectivamente) con solución de formol tamponado neutralizado al 10 % incrementan la calidad de tinción cuando las muestras tisulares se tratan con bcl-2, diaminobencidina y un reactivo de hematoxilina; las FIGS. 3A-3C son imágenes obtenidas sin remojo previo y un tratamiento a 40 °C con solución de formol tamponado neutralizada al 10 %; las FIGS. 3D-3F son muestras tratadas con remojo previo de 2 horas a 4 °C, en solución de formol tamponado neutralizado al 10 % seguido de una fijación a 40 °C con solución de formol tamponado neutralizado al 10 %; y las FIGS. 3G y 3H son ampliaciones de las regiones indicadas en las FIGS. 3C y 3F, respectivamente.
- 15 Las FIGS. 4A-4B son otras imágenes de microscopio digital ampliadas de las regiones indicadas en las FIGS. 3C y 3F.
- La FIG. 5 es una representación gráfica de los resultados de morfología tisular obtenidos tratando muestras tisulares durante diferentes períodos de tiempo de 0,5-6 horas con solución de formol tamponado neutralizado al 10 % a 35 °C, 40 °C, 45 °C y 50 °C.
- 20 La FIG. 6 es una representación gráfica de los resultados de antigenicidad obtenidos por análisis inmunohistoquímico de bcl-2 usando muestras tisulares tratadas durante diferentes períodos de tiempo de 0,5-6 horas con solución de formol tamponado neutralizado al 10 % a 35 °C, 40 °C, 45 °C y 50 °C.
- 25 La FIG. 7 es una representación gráfica de los resultados de antigenicidad obtenidos por análisis inmunohistoquímico de bcl-2 usando muestras tisulares tratadas con y sin remojo previo y tratadas durante diferentes períodos de tiempo de 0,5-6 horas con solución de formol tamponado neutralizado al 10 % a 35 °C, 40 °C, 45 °C y 50 °C.
- 30 La FIG. 8 es una representación gráfica de los resultados de antigenicidad y morfología tisular de muestras tisulares procesadas con tiempos de remojo previo variables en comparación con controles sin remojo previo.
- 35 La FIG. 9 es una representación gráfica de los resultados de antigenicidad y morfología tisular de muestras tisulares procesadas con tiempos de remojo previo variables en comparación con controles sin remojo previo.
- La FIG. 10 es una representación gráfica de los resultados de antigenicidad y morfología tisular de muestras tisulares procesadas con tiempos de remojo previo variables en comparación con controles sin remojo previo.
- 40 Las FIGS. 11A-E son imágenes microscópicas de tinción para pAKT en xenoinjertos de Calu-3.
- Las FIGS. 12A-D son imágenes microscópicas de tinción para pAKT en xenoinjertos de Calu-3 con o sin tratamiento con fosfato.
- 45 Las FIGS. 13A-B son imágenes microscópicas de tinción para pAKT en mama humana con carcinoma ductal *in situ* (DCIS).
- Las FIGS. 14A-D son imágenes microscópicas de tinción para pAKT en xenoinjertos de Calu-3 bajo degradación térmica.
- 50 La FIG. 14E es una representación gráfica del análisis cuantitativo de la tinción positiva para pAKT en xenoinjertos de Calu-3 bajo diferentes condiciones de degradación térmica.
- 55 Las FIGS. 15A-E son imágenes microscópicas de tinción para pAKT en xenoinjertos de Calu-3 que muestran la degradación de la señal postraduccional después de que se retirara la muestra.
- Las FIGS. 16A-I son imágenes microscópicas de tinción para marcadores fosforilados en carcinoma de colon humano.
- 60 Las FIGS. 16J y K son representaciones gráficas del análisis cuantitativo de la tinción positiva para pAKT o pPRAS40 en células normales y de carcinoma bajo diferentes condiciones de fijación.
- 65 Las FIGS. 17A y B son imágenes microscópicas de tinción para la conservación de miARN en carcinoma ductal de mama humano *in situ* (DCIS).

Las FIGS. 18A y B son imágenes microscópicas de tinción para la conservación de ADN en carcinoma ductal de mama humano *in situ* (DCIS).

5 Las FIGS. 19A, B y C son imágenes microscópicas de tinción para la conservación de Hif1 α en carcinoma de colon humano.

Descripción detallada

I. Abreviaturas, términos e introducción

10 A menos que se indique de otro modo, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Se pueden encontrar definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares.

20 Como se usa en el presente documento, los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Además, como se usa en el presente documento, el término "comprende" se usa en su definición y manera legalmente aceptada, y nada en el presente documento pretende cambiar dicho significado. Se debe entender además que todos los tamaños de nucleótidos o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos u otros compuestos son aproximados, y se proporcionan para su descripción. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en las pruebas de la presente divulgación, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

30 Para facilitar la revisión de los diversos ejemplos de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de abreviaturas y términos específicos:

HyE: tinción con hematoxilina y eosina.

35 **IHQ:** inmunohistoquímica.

ISH: hibridación *in situ*.

40 **NBF:** solución de formol tamponado neutralizado.

Aldehídos: para el propósito de la presente invención, el término "aldehídos" se refiere a un tipo de fijadores de reticulación que contienen aldehídos. Muchos ejemplos de fijadores de reticulación que contienen aldehídos son comunes en histología, incluyendo Bouin, glixal, cinc-formol, formol-ácido (AFA) y glutaraldehído.

45 **Alquilo:** una cadena alifática saturada.

Animal: organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma similar, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios, por ejemplo, humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos y vacas.

50 **Anticuerpo:** "anticuerpo" se refiere conjuntamente a inmunoglobulinas o moléculas de tipo inmunoglobulina (incluyendo, a modo de ejemplo y sin limitación, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, combinaciones de las mismas y moléculas similares producidas durante una respuesta inmunitaria en cualquier vertebrado, por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos, cabras, conejos y ratones) y fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a una molécula de interés (o un grupo de moléculas de interés altamente similares) hasta la exclusión sustancial de unión a otras moléculas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que tienen una constante de unión para la molécula de interés que es al menos 10^3 M^{-1} mayor, al menos 10^4 M^{-1} mayor o al menos 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión para otras moléculas en una muestra biológica).

60 Más en particular, "anticuerpo" se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o de cadena pesada que reconoce y se une específicamente a un epítopo de un antígeno. Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una ligera, de las que cada una tiene una región variable, denominada la región pesada variable (V_H) y la región ligera variable (V_L). En conjunto, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión del antígeno reconocido por el anticuerpo.

65

- 5 **Antígeno:** un compuesto, composición o sustancia que puede estar específicamente unida por los productos de inmunidad humoral o celular específica, tales como una molécula de anticuerpo o un receptor de linfocitos T. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, glúcidos (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos y hormonas, así como macromoléculas tales como
- 10 carbohidratos complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Las categorías comunes de antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y otros parásitos, antígenos tumorales, antígenos implicados en enfermedades autoinmunitarias, alergia y rechazo de injertos, toxinas y otros antígenos diversos. En un ejemplo, un antígeno es un antígeno de *Bacillus*, tal como γ PGA.
- 15 **Epítipo:** un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias peptídicas contiguas o no contiguas en una molécula que son antigénicas, es decir, que provocan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico particular.
- 20 **Formol:** soluciones comerciales de formaldehído en agua usadas comúnmente para la conservación de muestras biológicas. El formol usado como fijador típicamente es formol tamponado neutro (NBF) al 10 %, pero también se pueden usar otras concentraciones de solución. Por tanto, las concentraciones de fijación con formol útiles típicamente varían de mayor que un 0 % hasta al menos un 20 %, más típicamente de un 5 % hasta un 15 %, usando determinados modos de realización de trabajo divulgados de la presente invención una solución de NBF al 10 % para fijar muestras tisulares.
- 25 **Hapteno:** una molécula, típicamente una molécula pequeña, que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero típicamente no puede ser sustancialmente inmunógena, excepto en combinación con una molécula transportadora.
- 30 **Respuesta inmunitaria:** una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, linfocito T, macrófago o polimorfonucleocito, a un estímulo. Una respuesta inmunitaria puede incluir cualquier célula del cuerpo implicada en una respuesta de defensa del huésped, por ejemplo, una célula epitelial que secreta interferón o una citocina. Una respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a, una respuesta inmunitaria innata o inflamación.
- 35 **Aislado:** un microorganismo "aislado" (tal como un virus, bacteria, hongo o protozoo) se ha separado o purificado sustancialmente a partir de microorganismos de diferentes tipos, cepas o especies. Se pueden aislar microorganismos por una variedad de técnicas, incluyendo dilución en serie y cultivo.
- 40 Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína u orgánulo) se ha separado o purificado sustancialmente a partir de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce el componente de forma natural, tales como otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados por procedimientos de purificación estándar. El término también engloba ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos o proteínas químicamente sintetizados, o fragmentos de los mismos.
- 45 **Alquilo inferior:** una cadena alifática saturada que contiene 1-10 átomos de carbono.
- 50 **Mamífero:** este término incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De forma similar, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios.
- 55 **Molécula de interés o diana:** una molécula para la que se va a determinar la presencia, localización y/o concentración. Los ejemplos de moléculas de interés incluyen proteínas y secuencias de ácidos nucleicos.
- 60 **Anticuerpo monoclonal:** un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de las cadenas ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, preparando células formadoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células de bazo inmunitarias. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.
- 65 **Múltiple, multiplexado, multiplexación:** detectar múltiples dianas en una muestra de forma sustancialmente simultánea o secuencial, según se desee. La multiplexación puede incluir identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos en general, ADN, ARN, péptidos, proteínas, tanto individualmente como en cualquiera y todas las combinaciones.
- Neoplasia y tumor:** el proceso de crecimiento anómalo e incontrolado de células. La neoplasia es un ejemplo de un trastorno proliferativo. El producto de la neoplasia es una neoplasia (un tumor), que es un crecimiento anómalo de tejido que resulta de una división celular excesiva. Un tumor que no metastatiza se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o que puede metastatizar se denomina "maligno". Los ejemplos de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y

eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano (formas de escasa y de gran malignidad), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de las cadenas pesadas, síndrome mielodisplásico, tricoleucemia y mielodisplasia.

5 Los ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteógeno y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, liomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfocítica, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular tiroideo, carcinoma papilar tiroideo, feocromocitomas carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma del acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

Polipéptido: un polímero en el que los monómeros son residuos aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces amida. Cuando los aminoácidos son aminoácidos alfa, se puede usar el isómero óptico L o bien el isómero óptico D. Los términos "polipéptido" o "proteína" como se usa en el presente documento pretenden englobar cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glucoproteínas. El término "polipéptido" pretende cubrir específicamente proteínas naturales así como las que se producen de forma recombinante o sintética.

25 El término "residuo" o "residuo aminoácido" incluye referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido.

Proteína: una molécula, en particular un polipéptido, compuesta de aminoácidos.

30 **Modificación postraduccional:** la modificación química de una proteína después de su traducción. Es una de las etapas posteriores en la biosíntesis de proteínas y, por tanto, en la expresión génica, para muchas proteínas. La modificación postraduccional de aminoácidos extiende el intervalo de funciones de la proteína uniéndola a otros grupos funcionales bioquímicos (tales como acetato, fosfato, diversos lípidos y carbohidratos), cambiando la naturaleza química de un aminoácido (por ejemplo, citrulinación), o haciendo cambios estructurales (por ejemplo, formación de puentes disulfuro). También, las enzimas pueden retirar aminoácidos del extremo amino de la proteína o cortar la cadena peptídica en el medio. Por ejemplo, la hormona peptídica insulina se corta dos veces después de que se forman los enlaces disulfuro, y se retira un propéptido de la mitad de la cadena; la proteína resultante consiste en dos cadenas polipeptídicas conectadas por enlaces disulfuro. También, la mayoría de los polipéptidos incipientes comienzan con el aminoácido metionina porque el codón de "iniciación" en el ARNm también codifica este aminoácido. Este aminoácido normalmente se elimina durante la modificación postraduccional.

Otras modificaciones, como la fosforilación, son parte de mecanismos comunes para controlar el comportamiento de una proteína, por ejemplo, activar o inactivar una enzima.

45 La conservación de las señales de modificación postraduccional se puede lograr usando los procedimientos divulgados en el presente documento. Los procedimientos conservan significativamente las señales de modificación postraduccional de proteínas en muestras tisulares, por ejemplo, conservando al menos un 50 %, 70 %, 90 % o 99 % de las señales de modificación postraduccional. En un modo de realización ejemplar, se usa la señal inmunohistoquímica de pAKT por las señales de modificación postraduccional como indicador que muestra la conservación de las señales de modificación postraduccional.

Proteasas: también conocidas como enzimas proteolíticas proteinasas o, son un gran grupo de enzimas. Las proteasas pertenecen a la clase de enzimas conocidas como hidrolasas, que catalizan la reacción de hidrólisis de diversos enlaces con la participación de una molécula de agua.

55 Las proteasas están implicadas en la digestión de cadenas proteicas largas en fragmentos cortos, dividiendo los enlaces peptídicos que unen los residuos aminoácidos. Algunas de ellas pueden separar los aminoácidos terminales de la cadena proteica (exopeptidasas, tales como aminopeptidasas, carboxipeptidasa A); las otras atacan enlaces peptídicos internos de una proteína (endopeptidasas, tales como tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína, elastasa).

60 Las proteasas se dividen en cuatro grupos principales de acuerdo con el carácter de su sitio activo catalítico y las condiciones de acción: serina proteinasas, cisteína (tiol) proteinasas, proteinasas aspárticas y metaloproteinasa. La unión de una proteasa a un determinado grupo depende de la estructura del sitio catalítico y el aminoácido (como uno de los constituyentes) esenciales para su actividad.

Muestra: una muestra biológica que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína, o combinaciones de los mismos, obtenida de un sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, sangre periférica, orina, saliva, biopsia tisular, pieza quirúrgica, muestras de amniocentesis y material de necropsia. En un ejemplo, una muestra incluye una biopsia de un adenocarcinoma, una muestra de tejido no canceroso y una muestra de tejido normal (de un sujeto no afectado con una enfermedad o trastorno conocido).

Resto de unión específica: un miembro de un par de unión específica. Los pares de unión específica son pares de moléculas que se caracterizan por que se unen entre sí hasta la exclusión sustancial de unión a otras moléculas (por ejemplo, los pares de unión específica pueden tener una constante de unión que es al menos 10^3 M^{-1} mayor, 10^4 M^{-1} mayor o 10^5 M^{-1} mayor que una constante de unión para cualquiera de los dos miembros del par de unión con otras moléculas en una muestra biológica). Los ejemplos particulares de restos de unión específica incluyen proteínas de unión específica (por ejemplo, anticuerpos, lectinas, avidinas tales como estreptavidinas y proteína A), secuencias de ácidos nucleicos y ácidos nucleicos de proteínas. Los restos de unión específica también pueden incluir las moléculas (o porciones de las mismas) que están unidas específicamente por dichas proteínas de unión específica.

II. Introducción

La fijación conserva una muestra biológica (tejido o células) para su posterior examen. Existen tres procedimientos principales para fijar una muestra tisular. La fijación térmica implica exponer una muestra a calor suficiente durante un tiempo suficiente para anular la actividad de las proteínas celulares y de este modo detener el metabolismo celular. La fijación térmica en general conserva la morfología celular pero no las estructuras proteicas.

La perfusión fija una muestra por flujo sanguíneo. Se inyecta un fijador en el corazón y se propaga a través de todo el cuerpo. Este procedimiento conserva la morfología, pero el sujeto muere y el procedimiento es costoso debido al volumen de fijador necesario.

La fijación química implica sumergir una muestra tisular en un volumen de fijador químico, típicamente al menos 20 veces el volumen del tejido que se va a fijar. El fijador se difunde a través de la muestra tisular y conserva las estructuras (tanto química como estructuralmente) lo más cerca posible del tejido vivo. Los fijadores de reticulación, típicamente aldehídos, crean enlaces químicos covalentes entre moléculas biológicas endógenas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, presentes en la muestra tisular. El formaldehído es el fijador más comúnmente usado en histología. Se puede usar formaldehído en diversas concentraciones para la fijación, pero se usa principalmente como formol tamponado neutro (NBF) al 10 %, que es formaldehído aproximadamente al 3,7 % en una solución salina tamponada con fosfato acuosa. El paraformaldehído es una forma polimerizada de formaldehído, que se despolimeriza para proporcionar formol cuando se calienta. El glutaraldehído funciona de manera similar al formaldehído, pero es una molécula más grande que tiene una tasa de difusión más lenta a través de las membranas. La fijación con glutaraldehído proporciona un producto fijado más rígido o estrechamente unido, provoca cambios rápidos e irreversibles, se fija rápido y bien a 4°C , proporciona un buen detalle global citoplásmico y nuclear, pero no es ideal para tinción inmunohistoquímica. Algunos protocolos de fijación usan una combinación de formaldehído y glutaraldehído.

III. Antecedentes del desarrollo

Es bien conocido que la cinética de fijación tisular se puede incrementar elevando la temperatura del formol. Sin embargo, los estudios iniciales realizados por los autores de la invención indicaron que colocar una muestra tisular directamente en el fijador de formol calentado provocó que el exterior del tejido se reticulara mucho antes de que el formol penetrara en el centro del tejido. El formol se difundió en tejido denso más lento que la cinética de reticulación a temperaturas elevadas. En este caso, las biomoléculas en el centro se calientan sin ninguna reticulación significativa y, por lo tanto, estas moléculas son más susceptibles de degradación y daño.

En consecuencia, algunos modos de realización divulgados de la presente invención separan la difusión del fijador de la reticulación no deseada en primer lugar remojando previamente muestras tisulares en fijador frío, tal como formol. A continuación, después de que el fijador haya penetrado en el tejido, la temperatura del fijador se puede incrementar para incrementar la cinética de reticulación. Esto parece producir una muestra fijada más uniformemente que conserva las biomoléculas. Se han realizado una serie de experimentos de fijación de muestra tisular usando solo formol calentado o muestras en primer lugar "remojadas previamente" a temperatura fría, por ejemplo, de -20°C a 10°C , de -10°C a 5°C , de 0°C a 5°C , o 4°C en formol, seguido de someter la misma muestra a formol calentado.

Como parte de la presente invención, las soluciones de temperatura menor que pueden permitir eficazmente la difusión de fijador en el tejido de interés podrían ser más eficaces para conservar las modificaciones postraduccionales. Se podría considerar cualquier adición a formol que reduzca el punto de congelación y de este modo permita que el fijador se use a menos de 0°C . Por ejemplo, la adición de concentraciones altas de sales típicamente reduce el punto de congelación en varios grados. Se podría prever la adición de sales directamente a la solución de formol, manteniendo de este modo la concentración de formaldehído relativamente sin cambios. Además, las soluciones compuestas de glicoles o soluciones de tipo anticongelación también serían eficaces. Estas

soluciones pueden descender el punto de congelación a tan solo -20 °C. Los ejemplos de diferentes tipos de aditivos químicos son conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, diversas sales y glicoles.

5 Las muestras remojadas previamente parecen proporcionar una morfología tisular superior en el centro de las muestras así como una mejor conservación de antígeno.

IV. Etapas de procedimiento

10 Determinados modos de realización divulgados de la presente invención se refieren a un procedimiento de fijación tisular de múltiples etapas, típicamente dos etapas, para infundir/difundir una muestra tisular con un fijador de aldehído, tal como formol y/o glutaraldehído. Durante una primera etapa, una muestra tisular se trata con una solución fijadora bajo condiciones que permiten que el fijador se difunda sustancialmente en toda la sección transversal de la muestra. Esta primera etapa se realiza usando una composición fijadora durante un primer período de tiempo, y a una primera temperatura, que logra una infusión/difusión tisular sustancialmente completa. La
15 segunda etapa es someter la muestra tisular a una composición fijadora a una segunda temperatura mayor para permitir que se produzca la reticulación a la tasa más rápida posible sin comprometer las características tisulares, tales como antigenicidad y morfología. Cada una de estas etapas de procesamiento se analiza con más detalle a continuación.

20 El procedimiento de preparación tisular inicialmente implica la difusión de la solución fijadora en toda la muestra. Esto se logra típicamente sumergiendo la muestra tisular en una composición fijadora deseada a una primera temperatura deseada. Algún período de tiempo después de esta etapa inicial, la muestra tisular se retira de la solución fijadora a la primera temperatura y se sumerge en una solución fijadora a una segunda temperatura mayor que la primera temperatura. Esta segunda etapa se realiza durante un segundo período de tiempo deseado. La
25 primera y segunda soluciones fijadoras pueden ser la misma solución fijadora, por ejemplo NBF, o una solución fijadora diferente. Aún como otro ejemplo, se pueden usar fijadores de aldehído completamente diferentes, tales como formaldehído y glutaraldehído, para las diferentes etapas. Y, en lugar de retirar la muestra de la solución fijadora a la primera temperatura, la temperatura del fijador se puede incrementar rápidamente hasta una segunda temperatura, tal como usando calentamiento por microondas. Una o ambas de estas etapas pueden ir acompañadas de agitación mecánica de la solución fijadora y/o pueden ir acompañadas de aplicación de ultrasonidos a la muestra.
30

En un modo de realización ejemplar, la invención descrita en el presente documento usa formol como fijador de elección, pero no se requiere necesariamente. El formol contiene formaldehído al 3,7 % en un tampón fosfato y se neutraliza alrededor de pH 7,0. Sin embargo, se pueden usar muchas variaciones de fijadores de reticulación, que
35 contienen aldehídos conocidos en la técnica de histología, en la presente invención, incluyendo, pero sin limitarse a, Bouin, glioxal, cinc-formol, formol-ácido (AFA) y glutaraldehído, etc.

La muestra tisular se somete a continuación a una serie de inmersiones en alcohol, típicamente usando concentraciones de alcohol crecientes que varían de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 100 %, para
40 deshidratar la muestra. El alcohol en general es un alcohol, en particular metanol y/o etanol. Los modos de realización de trabajo particulares de la presente invención han usado etanol al 70 %, 95 % y 100 % para estas etapas de deshidratación en serie.

45 Después de la última etapa de tratamiento con alcohol, la muestra se sumerge a continuación en otro disolvente orgánico, comúnmente denominado solución limpiadora. La solución limpiadora (1) retira el alcohol residual y (2) hace que la muestra sea más hidrófoba para una etapa de encerado posterior. El disolvente limpiador típicamente es un disolvente orgánico aromático, tal como xileno. Se forman bloques de cera aplicando una cera, típicamente una parafina, a la muestra. A continuación se cortan secciones del bloque de cera.

50 Para el siguiente análisis de las etapas de procesamiento, un experto en la técnica apreciará que se pueden considerar diversos factores para deducir las condiciones de procesamiento óptimas para una muestra tisular particular. Estos factores incluyen: grosor de muestra, que típicamente varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm de espesor, más típicamente de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 8 mm de espesor, e incluso más típicamente de aproximadamente 4 mm a aproximadamente 6 mm de espesor; volumen de
55 solución fijadora con respecto a masa de muestra tisular, que típicamente es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 50:1 de volumen con respecto a masa; composición fijadora; temperatura; y tiempo de inmersión de muestra en la composición fijadora.

60 La descripción preferente del primer y segundo tiempo de remojo en el fijador de reticulación se basa en las pautas CAP de ASCO donde el grosor tisular preferente es de hasta aproximadamente 4 mm. El grosor de tejido puede ser menos o más de 4 mm, incluso hasta órganos completos. Puesto que la invención se basa en una primera etapa de difusión, las secciones tisulares más gruesas requerirían un primer tiempo en fijador frío mayor que las 1-5 horas preferentes y hasta 12 horas o más. Además, cualquier experto en la técnica podría entender que el segundo tiempo en solución fijadora podría ser mayor que el procedimiento preferente de 1-5 horas y hasta 8 horas o más. Por
65 ejemplo, una muestra tisular de 6 mm de espesor podría tener un primer tiempo preferente en solución fijadora de 4 horas y un segundo tiempo en solución fijadora de 4 horas o más. También se entiende en la técnica que algunos

tipos tisulares y algunos órganos tisulares pueden tener tiempos ligeramente diferentes que el procedimiento preferente de la invención.

A. Procesamiento de difusión del fijador

5 La primera etapa del procedimiento es someter una muestra tisular a una composición fijadora bajo condiciones eficaces para permitir una difusión sustancialmente completa de la composición a través de sustancialmente toda la sección transversal de la muestra. Un intervalo de temperatura eficaz para la primera etapa es de mayor que -20 °C a al menos 15 °C, preferentemente mayor que 0 °C a una temperatura superior más típicamente de 10 °C, e incluso más típicamente de aproximadamente 3 °C a aproximadamente 5 °C. Para modos de realización de trabajo, la temperatura típicamente fue de aproximadamente 4 °C.

15 A medida que la temperatura se incrementa, la tasa de reticulación se incrementa. Y esta primera etapa de procesamiento intenta equilibrar las propiedades beneficiosas asociadas con la difusión sustancialmente completa de la composición fijadora a través de toda la sección transversal de la muestra tisular mientras se minimizan los efectos asociados con la reticulación de inicialización. Sin embargo, la difusión también se incrementa con el incremento en la temperatura y, por lo tanto, para una muestra dada, se ha descubierto que maximizar la tasa de difusión mientras que se minimiza cualquier efecto perjudicial asociado con un incremento en la tasa de reticulación parece que incrementa los beneficios.

20 La difusión de la composición fijadora en la muestra tisular se continúa durante un período de tiempo eficaz para la difusión de la composición a través de sustancialmente toda la sección transversal de la muestra. El período de tiempo para la primera etapa de procesamiento varía de aproximadamente 15 minutos hasta aproximadamente 4 horas, lo más típicamente de mayor que 15 minutos a aproximadamente 3 horas, obteniéndose típicamente buenos resultados realizando la etapa de difusión de la composición fijadora durante aproximadamente 1,5 horas a aproximadamente 2 horas. El incremento en el tiempo de difusión hasta 4 horas o más en general tuvo poco efecto beneficioso.

30 La temperatura asociada con la segunda etapa de procesamiento es típicamente mayor que la ambiente, tal como mayor que aproximadamente 22 °C. Para modos de realización de trabajo, la temperatura típicamente fue mayor que la ambiente hasta al menos 55 °C, más típicamente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 45 °C, ya que este intervalo de temperatura incrementa la cinética de reticulación lo suficiente para permitir reticulación tisular relativamente rápida. Sin embargo, si la temperatura se incrementa por encima de aproximadamente 50 °C, la muestra en general comienza a degradarse, lo que puede tener un efecto perjudicial en determinadas reacciones histológicas posteriores. Por tanto, la temperatura superior y el período de tiempo se seleccionan para permitir que las etapas de procedimiento de formación de imágenes posteriores, tales como hibridación *in situ*, IHQ y/o HyE, procedan eficazmente. El período de tiempo para la segunda etapa de procesamiento varía de mayor que 15 minutos hasta al menos aproximadamente 5 horas, más típicamente es de al menos aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, y más típicamente es de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas. Determinados modos de realización de trabajo divulgados han realizado la segunda etapa de procesamiento durante 1,5 horas a 45 °C.

B. Análisis de los dibujos

45 Las FIGS. 1 A-1D (ciclina D1) y 2A-2D (bcl-2) son de una serie de portaobjetos de control donde las muestras tisulares se sumergieron en formol a temperatura ambiente durante 0, 2, 4 y 24 horas, respectivamente. El estándar industrial requiere al menos 6 horas, y más típicamente al menos 8 horas, hasta 72 horas de tiempo de fijación en formol a temperatura ambiente. Las imágenes de control proporcionadas por las FIGS. 1A-1C ilustran que fijando mal la muestra tisular, es decir, los tiempos de procesamiento de 0, 2 y 4 horas, no se tiñen bien usando los protocolos de tinción inmunohistoquímica de ciclina D1. Los portaobjetos de control 2A-2C ilustran que fijando mal la muestra tisular, es decir, los tiempos de procesamiento de 0, 2 y 4 horas, no se tiñen bien usando los protocolos de tinción de inmunohistoquímica de bcl-2. Sin embargo, como se esperaría en base a estándares conocidos, el incremento en el tiempo de fijación a 24 horas, FIGS. 1D y 2D, proporciona muestras tisulares teñidas aceptablemente.

55 Las FIGS. 3A-3H ilustra los efectos del uso del procesamiento de remojo previo para la tinción de bcl-2. Las FIGS. 3A-3C son imágenes de muestras tisulares procesadas sin remojo previo y sumergidas en una solución de NBF al 10 % a 40 °C durante 10 minutos, 20 minutos y 60 minutos, respectivamente. Las FIGS. 3D-3F son imágenes de muestras tisulares procesadas con un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C, seguido de inmersión en una solución de NBF al 10 % a 40 °C durante 10 minutos, 20 minutos y 60 minutos, respectivamente. La FIG. 3G es una ampliación de una región de la FIG. 3C y la FIG. 3H es una ampliación de una región de la FIG. 3F. La FIG. 3A ilustra un resultado poco teñido de un procesamiento sin remojo previo y con solución de NBF al 10 % a 40 °C de a 10 minutos. El grado de tinción se incrementa con el incremento en el tiempo de procesamiento para los resultados de 30 minutos y 60 minutos proporcionados por las FIGS. 3B y 3C, respectivamente. Las FIGS. 3D-3F también ilustran que el remojo previo proporciona una potenciación en los resultados de tinción. Sin embargo, quizás incluso más importante es la uniformidad de la tinción tisular que resulta de aplicar los diferentes protocolos de procesamiento. Las FIGS. 3A-3C se tiñen de manera irregular desde la

porción externa a la porción interna de la muestra en relación con sus homólogos de tiempo que se sometieron a un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C. Además, cada una de las muestras remojadas previamente también tuvo una potenciación en la tinción.

5 Las FIGS. 3G y 3H son de áreas representativas de las FIGS. 3C y 3F, respectivamente, de centros germinales de una muestra de amígdala humana. La FIG. 3C muestra que la muestra tisular no está tan bien teñida como el área representativa de la FIG. 3F que se sometió a un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C. La FIG. 3G se puntuó 2+ y la 3H se puntuó 3+. Y, la FIG. 3H incluye linfocitos inmaduros en el medio del portaobjetos que se han teñido, proporcionando una clara indicación de que la sensibilidad del protocolo de tinción se incrementa sustancialmente usando el remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C. La FIG. 3G no permite la visualización de estos linfocitos.

15 Las FIGS. 4A y 4B son imágenes potenciadas de las FIGS. 3G y 3H. Las flechas de la FIG. 4B ilustran el detalle potenciado que resulta de imágenes producidas usando un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C para estos modos de realización ejemplares. La morfología tisular también es mejor para las muestras tisulares producidas usando un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C. Esto se puede observar viendo el lado izquierdo de las imágenes y el interior de las imágenes. Para muestras tisulares que no se sometieron a un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C, el formol no se ha difundido hacia el interior, por lo que la morfología de la muestra (FIG. 4A) no está tan conservada como la morfología de la muestra tisular (FIG. 4B) producida usando un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C. Si se permite que se produzca la difusión antes de una etapa de procesamiento con incremento en la temperatura aplicada posterior, los productos químicos y la estructura de la muestra se conservan mucho mejor. El espacio en blanco en una imagen ilustra regiones que están mal fijadas. Cuando una muestra tisular de este tipo se deshidrata posteriormente, el tejido se encoge y produce un mayor volumen de área blanca, lo que es indicativo de una mala fijación.

20 La FIG. 5 es una representación gráfica de los resultados de morfología tisular obtenidos por tinción HyE de muestras tisulares tratadas en primer lugar con un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C, seguido de diferentes períodos de tiempo de 0,5 a 6 horas con solución de formol tamponado neutralizado al 10 % a 35 °C, 40 °C, 45 °C y 50 °C en relación con controles a temperatura ambiente. El portaobjetos a temperatura ambiente de 24 horas es el estándar deseado con el que se comparan los protocolos de procesamiento. La FIG. 5 resume los resultados de varios ensayos que se centraron en determinar el mejor segundo remojo a mayor temperatura que proporcionó una morfología tisular superior. Mientras que la FIG. 5 ilustra los resultados obtenidos usando una temperatura de procesamiento de reticulación de hasta 50 °C, también se han intentado temperaturas de procesamiento mucho mayores. A continuación, cada muestra tisular se evaluó subjetivamente. Una celda gris claro indica un resultado indeseable; una celda gris medio indica un resultado intermedio, pero no el mejor; y una celda gris oscuro indica que la muestra tisular fue comparable al resultado a temperatura ambiente de 24 horas. Cuanto mayor es la temperatura, menos tiempo se requiere para lograr la morfología tisular deseable. Un experto en la técnica apreciará que se proporcionan buenas muestras tisulares por tratamientos de solo 2 a 6 horas con una temperatura de procesamiento de reticulación de formol de hasta 50 °C.

45 La FIG. 6 es una representación gráfica de los resultados inmunohistoquímicos de bcl-2 obtenidos usando tinción con diaminobencidina de muestras tisulares tratadas en primer lugar con un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C, seguido de diferentes períodos de tiempo de 0,5 a 6 horas con solución de formol tamponado neutralizado al 10 % a 35 °C, 40 °C, 45 °C y 50 °C en relación con controles a temperatura ambiente. De nuevo, las celdas gris oscuro para resultados con incremento en la temperatura son resultados comparables a los resultados a temperatura ambiente de 24 horas. Para determinar la morfología tisular y la tinción HyE, las temperaturas y tiempos para el etapa de procesamiento con incremento en la temperatura no importan tanto, hasta que se use una temperatura de hasta 65 °C. Después de esa temperatura, la morfología tisular se ve afectada de forma perjudicial. Sin embargo, como se indica en la FIG. 6, la tinción IHQ es más sensible a la temperatura seleccionada para el etapa de procesamiento de temperatura superior. Sin estar limitado a una teoría particular de funcionamiento, puede ser que las temperaturas mayores desnaturalicen las proteínas, los anticuerpos no reconocen el epítipo en la proteína tampoco o en absoluto, y por lo tanto resulta una tinción IHQ degradada. Por tanto, se puede seleccionar mejor un protocolo particular considerando los efectos sobre la morfología tisular, técnicas IHQ y de hibridación *in situ*.

55 La FIG. 7 ilustra los resultados de antigenicidad de la tinción IHQ para la prueba sin remojo previo en comparación con un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C. En general, el calentamiento es potencialmente dañino para una muestra tisular. Esto se puede observar para los resultados de la prueba sin remojo previo. Cualquier calentamiento a 45 °C y 50 °C de una muestra no sometida a un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C tuvo un fuerte impacto negativo en los resultados de tinción de antigenicidad. Por el contrario, para muestras que se sometieron a un remojo previo de 2 horas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C, calentar la muestra tisular a 45 °C y 50 °C durante tan solo 0,5 horas hasta 1 a 2 horas produjo un resultado de imagen que fue comparable a un procedimiento a temperatura ambiente de 24 horas.

65 Las FIGS. 8-10 ilustran los resultados de antigenicidad y morfología tisular obtenidos considerando diferentes

5 tiempos de remojo previo para muestras tratadas en solución de fijación con formol al 10 % a 4 °C durante el tiempo indicado en la parte superior del gráfico, seguido de fijación tisular a 45 °C para los períodos de tiempo indicados en cada celda. Las FIGS. 8-10 ilustran que un remojo previo de solo 1 hora tiene un beneficio sustancial para los resultados de antigenicidad, pero que puede ser preferente un remojo de 2-4 horas para resultados de morfología tisular óptimos.

10 Las FIGS. 11A-E ilustran la conservación de la modificación postraduccional por imágenes microscópicas de tinción para pAKT en xenoinjertos de Calu-3 con diferentes protocolos de fijación. Se cortaron tumores de xenoinjerto de Calu-3 recién obtenidos en dos porciones aproximadamente iguales y se trataron con NBF al 10 % (formol) a t.a. o bien NBF al 10 % a 4 °C. Se colocaron las muestras tumorales tratadas con formol a t.a. directamente en la solución en los 5 minutos posteriores a la extracción tumoral. A continuación se retiraron las muestras del formol a intervalos de tiempo de 0 (A), 2 (B), 4 (C) o 24 (D) horas después de la inmersión. Se colocó una muestra tumoral directamente en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales (protocolo de fijación de temperatura doble). Significativamente se retiene más pAKT indicado por la tinción de anticuerpo anti-pAKT en el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) protocolo (E) que los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas (D) con 2+2 (E)).

20 Las FIGS. 12A-D ilustran las señales observadas en las FIGS. 11A-E son, de hecho, la conservación de la modificación postraduccional por tinción para pAKT en xenoinjertos de Calu-3 con (B y D) o sin tratamiento con fosfato (A y C). La tinción específica por el anticuerpo se anuló cuando se trataron muestras con fosfato (B y D), lo que indica que el anticuerpo está reconociendo el resto fosfo y es específico.

25 Las FIGS. 13A-B ilustran la conservación de la modificación postraduccional con el presente procedimiento de fijación de temperatura doble (2+2; B) por tinción de pAKT con anticuerpo anti-pAKT en mama humana con carcinoma ductal *in situ* (DCIS). Se retiene significativamente más pAKT en el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2; B) que los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas (A) con 2+2). Además, la tinción parece mucho más específica para las membranas en la presente muestra del protocolo de fijación de temperatura doble.

30 Las FIGS. 14A-D ilustran la conservación de la modificación postraduccional con el presente procedimiento de fijación de temperatura doble (2+3,5; B) por tinción para pAKT con anticuerpo anti-pAKT en xenoinjertos Calu-3. La FIG. 14F es una representación gráfica del análisis cuantitativo de la tinción positiva para pAKT mostrada en las FIGS. 14A-D. Se retiene significativamente más pAKT en la presente muestra de fijación de temperatura doble (2+3,5) que los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas con 2+3,5). El remojo a primera temperatura a 4 °C es necesario para conservar los marcadores fosforilados puesto que la muestra tumoral colocada directamente en formol calentado sin el primer remojo frío no retuvo tinción con pAKT (panel 0+3,5).

40 Las FIGS. 15A-F ilustran la degradación de la señal postraduccional después de que se retirara la muestra. Se cortaron tumores de xenoinjerto de Calu-3 recién obtenidos en dos porciones aproximadamente iguales, se envolvieron en gasa remojada con solución salina y se colocaron en hielo durante 0 (A), 10 (B), 30 (C), 60 (D), 120 (E) o 240 (F) minutos. A continuación se colocó cada muestra en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales. La señal de pAKT disminuyó significativamente en 30 minutos después de la retirada (C), incluso cuando se enfrió hasta 4 °C en hielo.

45 Las FIGS. 16A-I ilustran la conservación de marcadores fosforilados de carcinoma de colon humano con los procedimientos de la presente invención (paneles inferiores). También se tiñeron muestras con hematoxilina y eosina (paneles superiores) para la comparación de la morfología tisular. Las FIGS. 16J y K son representaciones gráficas del análisis cuantitativo de la tinción positiva para pAKT o pPRAS40 en células normales (tres barras indicadas en el lado derecho de cada representación gráfica) y de carcinoma (tres barras indicadas en el lado izquierdo de cada representación gráfica) bajo diferentes condiciones de fijación. Se escanearon los portaobjetos con propósitos de cuantificación usando un escáner de portaobjetos Aperio (imagen inferior). Se agruparon los píxeles en grupos (cuatro grupos que consisten en negativo, positivo débil, positivo medio y positivo fuerte) indicando positivo (marrón) o negativo (azul). Se informa del porcentaje de píxeles positivos (suma de todos los píxeles positivos) en el gráfico. Se retiene significativamente más marcador fosforilado en el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) que los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas con 2+2). Además, las muestras sometidas a isquemia intencionada tuvieron una retención significativamente menor de marcadores fosforilados que las muestras fijadas por el presente protocolo de fijación de temperatura doble o bien las muestras fijadas por el protocolo estándar de temperatura de 24 horas.

60 Las FIGS. 17A y B son imágenes microscópicas de tinción para la conservación de miARN en carcinoma ductal de mama humano *in situ* (DCIS), las muestras de tejido mamario que contenían carcinoma ductal *in situ* (DCIS) se conservaron de acuerdo con el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2 horas, NBF al 10 % a 4 °C seguido de 2 horas, NBF al 10 % a 45 °C) en comparación con las fijadas por remojo con formol a temperatura ambiente de 24 horas estándar. La intensidad de la tinción de miR205 (señal azul intensa, las señales ejemplares se indican con flechas) es claramente visible en ambas muestras. La conservación de la muestra 2+2 parece ser más intensa que la del tejido fijado de 24 horas de control estándar.

Las FIGS. 18A y B son imágenes microscópicas de tinción para la conservación de ADN en carcinoma ductal de mama humano *in situ* (DCIS). Se realizó el protocolo ISH doble de Ventana (DDISH, cromosoma 17/HER2) para someter a prueba la capacidad para detectar copias únicas y múltiples de dos dianas de ADN diferentes. Las muestras de tejido mamario que contenían carcinoma ductal *in situ* (DCIS) se conservaron de acuerdo con el protocolo de fijación rápida de Ventana (2 horas, NBF al 10 % a 4 °C seguido de 2 horas, NBF al 10 % a 45 °C) en comparación con las fijadas por remojo con formol a temperatura ambiente de 24 horas estándar. Esto ilustra que el presente protocolo de fijación de temperatura doble conservó el ácido nucleico ADN en el tejido y se pudo detectar por sondas disponibles comercialmente.

Las FIGS. 19A, B y C son imágenes microscópicas de tinción para la conservación de Hif1 α en carcinoma de colon humano. Se obtuvo una muestra de un colon humano y se procesó en los 3-7 minutos posteriores a la extracción del paciente. Las muestras se cortaron en trozos de aproximadamente 4 mm y se trataron con 3 protocolos diferentes. En el protocolo 1, se colocó la muestra directamente en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales (A). En el protocolo 2, se colocó la muestra en formol a temperatura ambiente durante 24 horas después de la inmersión (B). En el protocolo 3, la muestra tuvo una isquemia intencionada durante 1 hora antes de colocarse en formol a temperatura ambiente durante 24 horas (C). Se retiene significativamente más Hif1 α en el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) que los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas con 2+2). Además, las muestras sometidas a isquemia intencionada tuvieron una retención significativamente menor de Hif1 α que las muestras fijadas por el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) o bien las muestras fijadas por el protocolo de fijación estándar de 24 horas.

V. Uso de la presente invención:

La presente invención se puede usar conjuntamente con cualquiera de los sistemas y protocolos de tinción conocidos en la técnica de la histoquímica tradicional, así como la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*. La presente invención también se puede usar conjuntamente con diversos sistemas de tinción automatizados, tales como los comercializados por Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, incluyendo las plataformas automatizadas Benchmark XT, Benchmark Ultra y Discovery. Los sistemas ejemplares se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 6.352.861, patente de EE. UU. n.º 5.654.200, patente de EE. UU. n.º 6.582.962, patente de EE. UU. n.º 6.296.809 y patente de EE. UU. n.º 5.595.707.

La siguiente descripción ejemplifica un modo de realización adecuado de un procedimiento y sistema automatizados. También se puede encontrar información adicional sobre sistemas y procedimientos automatizados en el documento PCT/US2009/067042. La detección cromogénica facilita el descifrado visual sin ayuda de patrones en el dispositivo.

En modos de realización ejemplares, la detección se realiza a través de anticuerpos anti-especies conjugados con múltiples enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP). Este conjugado enzima-anticuerpo se denomina multímero HRP o AP en vista de la multiplicidad de enzimas conjugadas con cada anticuerpo. Las tecnologías multímeras se describen en la solicitud de EE. UU. n.º 12/687.564.

Este tipo de tecnología química de detección se comercializa actualmente por Ventana Medical Systems Inc., como kit de detección *ultraView* Universal DAB (P/N 760-500), kit de detección *ultraView* Universal AP Red (P/N 760-501), kit de detección *ultraView* Red ISH DIG (P/N 760-505) y kit de detección *ultraView* SISH DNP (P/N 760-098).

En modos de realización ilustrativos, el enfoque usa haptenos no endógenos (por ejemplo, no biotina, véase la solicitud de EE. UU. n.º 12/660.017). En modos de realización ilustrativos, se puede usar una amplificación de señal de tiramida con este enfoque para incrementar además la sensibilidad y el intervalo dinámico de la detección (véase el documento PCT/US2011/042849).

Se puede usar cualquier sistema enzima/sustrato enzimático adecuado para el procedimiento de fijación divulgado. Los modos de realización de trabajo típicamente usaban fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante. Si la enzima es fosfatasa alcalina, un sustrato adecuado es el cloruro de nitroazul de tetrazolio/(5-bromo-4-cloro-1H-indol-3-il) dihidrogenofosfato (NBT/BCIP). Si la enzima es peroxidasa de rábano picante, entonces un sustrato adecuado es diaminobencidina (DAB). Numerosas otras combinaciones enzima-sustrato son conocidas para los expertos en la técnica. Para una revisión general de estas, véanse las patentes de EE. UU. n.º 4.275.149 y 4.318.980. En algunos modos de realización, la enzima es una peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante o glutatión peroxidasa o una oxidoreductasa.

La publicación de patente de EE. UU. 2008/0102006 describe distribuidores de fluidos robóticos que funcionan y se controlan por microprocesadores. La publicación de patente de EE. UU. 2011/0311123 describe procedimientos y sistemas para la detección automatizada de patrones inmunohistoquímicos (IHQ). Los sistemas de detección automatizados divulgados en estas solicitudes de patente se pueden usar para detectar las muestras tisulares fijadas de la presente invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinados rasgos característicos de los modos de realización de trabajo de la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que el alcance de la invención no se limita a los rasgos característicos mencionados en estos ejemplos.

Ejemplo 1

Este ejemplo se refiere a una evolución temporal de fijación para muestras de riñón de ratón fijadas a 30 °C, 40 °C, 50 °C y 60 °C, y confirma los resultados previos obtenidos con muestras tisulares humanas. Se obtuvieron riñones de ratón recién preparados del BMAC Department en Ventana Medical Systems, Inc.

Se colocaron 20 ml de formol (NBF al 10 %) en tubos cónicos de 50 ml. Se colocaron los tubos en un bloque de calor VWR estándar ajustado a 30 °C, 40 °C, 50 °C o 60 °C. Se cortaron por la mitad los riñones de ratón y se colocaron tres trozos en cada tubo cónico. Se retiró un trozo después de 10, 30 y 60 minutos de remojo a cada temperatura.

Se realizaron los controles colocando riñones de ratón en formol a temperatura ambiente durante 0, 2, 6 y 23 horas. Se procesaron todas las muestras en un procesador tisular Renaissance (Ventana Medical Systems, Inc.; n.º de catálogo V-REN) y se incluyeron en bloques de parafina. Se tiñeron los portaobjetos con los cortes con hematoxilina Gills II y eosina Y para el análisis de la morfología tisular.

Los tejidos de control de 0 y 2 horas mostraron propiedades de fijación con etanol características. El control de 23 horas fue mucho mejor. La cantidad de fijación se correlacionó con la temperatura y el tiempo. Los tejidos a 50 °C se acercaron a los resultados obtenidos con el control de 23 horas.

Ejemplo 2

Este ejemplo se refiere a remojos térmicos con formol extendidos a 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C para determinar cuánto calor se podría aplicar a las muestras antes de que sufran la morfología o la antigenicidad. Se repitió el ejemplo 1 con el remojo con formol, pero se sumergieron los trozos de amígdala humana en NBF al 10 % calentado a 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C. Se ensayaron diversos puntos de tiempo como se ilustra a continuación:

		Temperatura de remojo				
		50 °C	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
Minutos de remojo	10	10	10	10	5	5
	30	30	30	30	10	10
	60	60	60	60	20	20
					30	20

Se probaron puntos de tiempo ligeramente diferentes para 80 °C y 90 °C debido a las temperaturas extremas.

Se sumergieron muestras tisulares en 20 ml de NBF al 10 % calentado a las temperaturas descritas anteriormente. Después de los tiempos apropiados, se retiraron los trozos a casetes de procesamiento y se almacenaron en etanol al 70 %. Después de todos los puntos de tiempo, se procesaron los tejidos en un procesador tisular estándar durante la noche. Se cortaron por la mitad los tejidos y se incluyeron con los lados cortados hacia abajo (se cortaron los tejidos para exponer el centro).

Para los controles, se remojaron los trozos en NBF al 10 % a temperatura ambiente durante 1, 2, 5 y 22 horas y se procesaron como las muestras experimentales. Se tiñeron todos los portaobjetos con hematoxilina Gills II y eosina Y. Además, se tiñeron todos los portaobjetos con anticuerpos Ki-67, CD34, ciclina D1 y bcl-2.

Análisis de morfología tisular: los bloques de 50 °C y 60 °C parecían normales y se correlacionaron bien con el tiempo. Los portaobjetos a 70 °C tuvieron una morfología tisular aceptable con algunas pruebas de anomalías relacionadas con el calor. Los bloques de 80 °C y 90 °C mostraron más pruebas de artefactos de calor. Estos incluyeron células alargadas cerca del borde del tejido, anillos pronunciados alrededor de los centros germinales y estructura celular caótica con pruebas de movimiento o flujo de líquido.

Análisis IHQ: la antigenicidad de los bloques de 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C parecía normal comparada con los controles en estos puntos de tiempo cortos. A 90 °C, la mayoría de los anticuerpos sufrieron una disminución en la tinción.

Fijación: el efecto más pronunciado sobre la antigenicidad se produjo con el control no fijado de 0 horas. Algunos

anticuerpos disminuyeron significativamente debido a las malas condiciones de fijación.

Ejemplo 3

- 5 Este ejemplo se refiere a un experimento de remojo previo en el que se remojaron previamente trozos de amígdala humana en NBF al 10 % durante 60 minutos antes de un remojo en formol a 52 °C. La razón fue que el formol penetraría en el tejido durante la primera hora, pero no se produciría mucha reticulación. A continuación se podría incrementar la reacción de reticulación elevando la temperatura.
- 10 Se realizó un experimento inicial donde se remojaron muestras de amígdala humana durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se colocaron los trozos en formol precalentado durante 10 minutos y se procesaron en bloques de cera. Esto mostró un patrón de anillo distinto de fijación donde los bordes se fijaron bien pero el centro se fijó mal. Esto se podría deber a muy poco remojo previo o a tiempo insuficiente en el formol calentado.
- 15 Para abordar estas posibilidades, se realizó un experimento más completo. Se extendieron los tiempos de remojo antes de la fijación y se realizaron a 4 °C.

Tiempo de remojo previo (horas) a 4 °C	0	1	2
Remojo a 50 °C en minutos	10	10	10
	30	30	30

Se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina Gills II y eosina Y.

20

Ejemplo 4

- 25 Este ejemplo se refiere a un remojo previo similar al ejemplo 3 y realizado en tejido de amígdala humana obtenido de CHTN. Se repitió este experimento muchas veces debido a la naturaleza variable del examen de diferentes secciones de amígdala. Se remojaron trozos de amígdala en formol de diferentes formas. En primer lugar, se remojaron trozos en formol calentado, 50 °C o bien 60 °C, durante 10, 30 y 60 minutos. El segundo modo fue en primer lugar un "remojo previo" de los trozos en formol a 4 °C durante de 60 a 120 minutos antes de la etapa de procesamiento de etapa calentada.

Remojo previo	0 min					
50 °C	10 min	30 min	60 min			
60 °C				10 min	30 min	60 min

30

Remojo previo	60 min	60 min	60 min	120 min	120 min	120 min
50 °C	10 min	30 min	60 min			
60 °C				10 min	30 min	60 min

Se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina Gills II y eosina Y para determinar la morfología tisular.

- 35 En general, los portaobjetos no remojados previamente sino simplemente sometidos a formol a 50 °C y 60 °C mostraron una fijación incompleta en el centro de los tejidos. Los remojos de 60 minutos fueron cercanos pero no del todo completos. Los trozos que se remojaron previamente durante 1 o 2 horas a 4 °C y a continuación se sometieron al perfil térmico fueron mejores, en especial el remojo previo de 2 horas, que fue la condición preferente para estos ensayos.

Ejemplo 5

- 40 Este ejemplo se refiere al remojo previo de ejemplo 3. Los resultados del ejemplo 4 mostraron una preferencia por un remojo previo con formol antes de un remojo calentado. se extendieron los resultados del ejemplo 4 usando amígdala humana y realizando un experimento más pequeño y más centrado. Para este experimento, se usó un
- 45 remojo previo de formol de 4 °C a 120 minutos con una etapa de procesamiento de reticulación de formol a 55 °C.

Remojo previo	0 min	0 min	0 min	120 min	120 min	120 min
55 °C	10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min

Se procesaron los tejidos en bloques de parafina como de costumbre en un procesador tisular Renaissance (Ventana Medical Systems, Inc.; n.º de catálogo V-REN). Se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina Gills II y eosina Y.

- 5 Los resultados de este ejemplo confirmaron que el remojo previo frío de 2 horas con formol proporcionó las manchas más uniformes. 30 minutos de formol calentado pueden ser un tiempo mínimo preferente para el remojo calentado.

Ejemplo 6

- 10 Este ejemplo se refiere al remojo previo a 4 °C, 12 °C y 22 °C para determinar qué efectos tuvo el remojo previo a diversas temperaturas sobre la morfología tisular. Se colocaron muestras tisulares no fijadas en formol a 4 °C, 12 °C y 22 °C durante 1 o 2 horas antes de la fijación de formol calentado.

- 15 Para este experimento, se realizaron dos tipos de controles. El primero fue un remojo en formol a temperatura ambiente durante 0 y 72 horas. El segundo control fue un baño caliente en formol a 55 °C durante 10, 30 y 60 minutos sin un remojo previo.

- 20 Se colocaron muestras, con o bien sin remojo previo, en tubos cónicos de 50 ml que contenían 20 ml de formol calentado a 44 °C. Se retiraron los tejidos después de 10, 30 y 60 minutos, y se colocaron en casetes tisulares etiquetados. Se colocaron casetes tisulares en un procesador tisular Leica y se ejecutó un programa nocturno.

Se seccionaron los bloques tisulares a 4 pm y se tiñeron con HyE para observar la morfología tisular.

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		Temp. ambiente Formol	0 y 72 horas
		55 °C	10, 30 y 60 min
4 °C	1 hora	55 °C	10, 30 y 60 min
	2 horas	55 °C	10, 30 y 60 min
12 °C	1 hora	55 °C	10, 30 y 60 min
	2 horas	55 °C	10, 30 y 60 min
22 °C	1 hora	55 °C	10, 30 y 60 min
	2 horas	55 °C	10, 30 y 60 min

- 25 Como se esperaba, el control de 0 horas tuvo mala morfología tisular. Los controles sin remojo previo, sometidos a formol a 55 °C, también tuvieron mala morfología tisular. Cualquiera de las condiciones de remojo previo parecía funcionar a la condición de 60 minutos, a 55 °C. Con tiempos menores, la morfología era mala.

Ejemplo 7

- 30 Este ejemplo se refiere al remojo previo, pero las muestras tisulares se fijaron a 55 °C en un procesador tisular de microondas, que tiene un gran recipiente de formol (alrededor de 1 litro) en lugar de un tubo cónico de 20 ml. El volumen más grande de formol no disminuyó en temperatura casi tanto como el volumen más pequeño. Esto puede ser importante si se transfiere un trozo de 4 °C a un fluido de mayor temperatura.

- 35 Se remojaron muestras de amígdala humana no fijada en formol a 55 °C durante diversos períodos de tiempo. Algunas de las muestras se sometieron a un remojo previo de 2 horas en formol a 4 °C antes del formol a 55 °C.

- 40 Para el remojo con formol calentado, se usó el procesador tisular de microondas para precalentar el formol. Se insertaron casetes tisulares en el portacasete múltiple y se sumergieron en el formol calentado. A los tiempos apropiados, se retiró un casete y se colocó en etanol al 70 % para mantenerlo. Cuando se procesaron todos los casetes, se procesaron adicionalmente durante la noche en bloques de cera.

- 45 Se seccionaron bloques a 4 pm y se tiñeron con HyE para determinar la morfología tisular.

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		Temp. ambiente	0 horas
		55 °C	10, 30 y 60 min
4 °C	2 horas	55 °C	10, 30 y 60 min

Los resultados de este ejemplo demuestran que las muestras remojadas previamente fueron ligeramente mejores de

lo que se suponía, en especial en el medio.

Ejemplo 8

- 5 Este ejemplo se refiere al uso de un protocolo de remojo previo en riñón de ratón. Se cortaron por la mitad riñones de ratón y se realizó un experimento idéntico como en el ejemplo 6.

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		Temp. ambiente	0, 2, 4 y 24 horas
		55 °C	10, 30 y 60 min
4 °C	1 hora	55 °C	10, 30 y 60 min
	2 horas	55 °C	10, 30 y 60 min
12 °C	1 hora	55 °C	10, 30 y 60 min
	2 horas	55 °C	10, 30 y 60 min
22 °C	1 hora	55 °C	10, 30 y 60 min
	2 horas	55 °C	10, 30 y 60 min

- 10 Los resultados del experimento fueron. Los riñones de ratón son más pequeños que los trozos de amígdala usados previamente. La mayoría de las condiciones de fijación con formol calentado fueron aceptables.

Ejemplo 9

- 15 Este ejemplo se refiere a la fijación a 40 °C, 55 °C, 65 °C y 75 °C con o sin remojo previo para explorar los límites de lo caliente que puede estar el formol antes de que se observen efectos perjudiciales en el tejido. Se procesaron secciones tisulares a 40 °C, 55 °C, 65 °C y 75 °C con y sin remojo previo en formol a 4 °C.

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		Temp. ambiente	0, 2, 4 y 24 horas
4 °C	2 horas	40 °C	10, 30 y 60 min
		40 °C	10, 30 y 60 min
4 °C	2 horas	55 °C	10, 30 y 60 min
		55 °C	10, 30 y 60 min
4 °C	2 horas	65 °C	10, 30 y 60 min
		65 °C	10, 30 y 60 min
4 °C	2 horas	75 °C	10, 30 y 60 min
		75 °C	10, 30 y 60 min

- 20 Se tiñeron tejidos con HyE para determinar la morfología tisular. También se tiñeron tejidos con bcl-2 y ciclina D1 para comprobar los resultados de antigenicidad. Los portaobjetos remojados previamente mostraron una morfología y antigenicidad superiores. Existió un descenso en la antigenicidad a 55 °C y superior.

Ejemplo 10

- 25 Este ejemplo se refiere a la fijación a 40 °C, 55 °C y 70 °C con o sin remojo previo, de manera muy similar al ejemplo 9. Las únicas diferencias son las temperaturas de formol calentado exactas, y se extendió el tiempo de remojo calentado.

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		Temp. ambiente	0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas
4 °C	2 horas	40 °C	10, 30, 60 y 90 min
		40 °C	10, 30, 60 y 90 min
4 °C	2 horas	55 °C	10, 30, 60 y 90 min
		55 °C	10, 30, 60 y 90 min
4 °C	2 horas	70 °C	10, 30, 60 y 90 min

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		70 °C	10, 30, 60 y 90 min

5 Se tiñeron tejidos con HyE para evaluar la morfología. Se tiñeron con bcl-2 y ciclina D1 para evaluar la antigenicidad. Los resultados de este ejemplo establecen que la morfología tisular es aceptable a 40 °C y 55 °C para todos los puntos de tiempo. Se produjo algún daño térmico a 70 °C para tratamientos de tiempo extendidos. La antigenicidad disminuyó después de aproximadamente 1 hora a 55 °C y superior. La antigenicidad fue estable a 40 °C.

Ejemplo 11

10 Este ejemplo se refiere a tiempos de remojo previo variables de 1 a 3 horas para investigar el tiempo de remojo previo como una función de la morfología tisular y la antigenicidad. Se remojaron previamente muestras de amígdala humana no fijadas en formol a 4 °C durante entre 1 y 3 horas. Se fijaron muestras en formol a °C como se indica a continuación:

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		Temp. ambiente	0, 2, 5 y 24 horas
		45 °C	30, 60, 120 min
4 °C	1 hora	45 °C	30, 60, 120 min
4 °C	2 horas	45 °C	30, 60, 120 min
4 °C	3 horas	45 °C	30, 60, 120 min

15 Se cortaron secciones tisulares a 4 µm y se tiñeron con HyE para determinar la morfología tisular. También se tiñeron secciones tisulares con bcl-2 para determinar la antigenicidad. Los resultados de este ejemplo no fueron del todo concluyentes. Las secciones tisulares no eran muy grandes, de modo que el tiempo de remojo previo fue adecuado.

20 Ejemplo 12

Este ejemplo se refiere a tiempos de remojo previo variables de 1 a 4 horas sustancialmente con los mismos parámetros usados para el ejemplo 12, excepto que los tiempos de remojo previo se variaron a cuatro horas, y el remojo con formol calentado se extendió a 4 horas.

25

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		Temp. ambiente	0 y 24 horas
		45 °C	1, 2, 3 y 4 horas
4 °C	1 hora	45 °C	0, 1, 2, 3 y 4 horas.
4 °C	2 horas	45 °C	0, 1, 2, 3 y 4 horas.
4 °C	4 horas	45 °C	0, 1, 2, 3 y 4 horas.

30 Se tiñeron secciones tisulares con bcl-2 para examinar lo bien que respondió la antigenicidad con el tiempo de remojo previo. Los tiempos de remojo previo no importaron mucho, pero esto parece en gran parte debido al pequeño tamaño de las muestras tisulares. Sin embargo, en el primer tiempo, 1 hora, parecía haber un ligero efecto tanto en la morfología tisular como en antigenicidad.

Los resultados para diversos experimentos, como el ejemplo 12, se resumen en la FIG. 8.

35 Ejemplo 13

Este ejemplo se refiere a tiempos de remojo previo variables de 1 a 4 horas, básicamente como una repetición del ejemplo 13 para incrementar el tamaño de las secciones de amígdala que se usan.

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
		Temp. ambiente	0 y 24 horas
		45 °C	1, 2, 3 y 4 horas
4 °C	1 hora	45 °C	0, 1, 2, 3 y 4 horas.

Temp. de remojo previo	Tiempo de remojo previo	Temp. de remojo con formol	Tiempo de remojo con formol
4 °C	2 horas	45 °C	0, 1, 2, 3 y 4 horas.
4 °C	4 horas	45 °C	0, 1, 2, 3 y 4 horas.

El experimento anterior se produjo para dos conjuntos diferentes de tejidos y se generaron 43 bloques. Se tiñeron los portaobjetos con HyE para determinar la morfología tisular y bcl-2 para determinar la antigenicidad. Los resultados de este ejemplo se resumen en la FIG. 9.

5

Ejemplo 14

Este ejemplo se refiere al análisis de tiempos de remojo con xileno después de NBF y etanol.

Pretratamiento	70 %	95 %	100 %	Xileno	Cera
Muestras remojadas en NBF al 10 % a 4 °C durante 2 horas, a continuación 2 horas a 45 °C de fijación	30 min	30 min	30 min	30 min	3 horas
	30 min	30 min	30 min	60 min	3 horas
24 horas, temperatura ambiente fija	30 min	30 min	30 min	30 min	3 horas
	30 min	30 min	30 min	60 min	3 horas

10

Para este ejemplo, la morfología tisular para la mayoría de los tejidos parecía normal. Las muestras remojadas durante solo 15 minutos en xileno tuvieron centros germinales silenciados y el tejido parecía ligeramente más rosado que el tejido de control. Sin embargo, a los 30 minutos de limpieza con xileno, los tejidos fueron buenos. Por lo tanto, para 2 mm de espesor, al menos 30 minutos de xileno parece mejor.

15

Ejemplo 15

Este ejemplo analiza la tinción para pAKT en xenoinjertos de Calu-3. En este ejemplo, se cortaron tumores de xenoinjerto de Calu-3 recién obtenidos se cortaron en dos porciones aproximadamente iguales y se trataron con NBF al 10 % (formol) a t.a. o bien NBF al 10 % a 4 grados C. Se colocaron muestras tumorales tratadas con formol a t.a. directamente en la solución en los 5 minutos posteriores a la extracción tumoral. A continuación se retiraron las muestras del formol a intervalos de tiempo de 0, 2, 4 o 24 horas después de la inmersión. Se colocó una muestra tumoral directamente en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales. Se colocaron todas las muestras en etanol al 70 % como depósito de retención hasta que se procesaron adicionalmente en un procesador tisular automatizado establecido en un programa nocturno. Se incluyeron todas las muestras en parafina para microtomía. Se tiñeron los portaobjetos con un anticuerpo que reconoce el epítipo pAKT (Cell Signaling Technologies, n.º cat. 4060) en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado (instrumento VENTANA Discovery XT, Ventana Medical Systems, Inc.). Como se muestra en las FIGS. 11A-E, se retuvo significativamente más pAKT en el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) que en los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas con 2+2).

20

25

30

Ejemplo 16

Este ejemplo describe el tratamiento con fosfatasa y la tinción para pAKT en xenoinjertos de Calu-3.

35

En este ejemplo, se cortaron tumores de xenoinjerto de Calu-3 recién obtenidos se cortaron en dos porciones aproximadamente iguales y se trataron con NBF al 10 % (formol) a t.a. o bien NBF al 10 % a 4 grados C. Se colocaron muestras tumorales tratadas con formol a t.a. directamente en la solución en los 5 minutos posteriores a la extracción tumoral. A continuación se retiraron las muestras del formol después de 24 horas (panel superior) después de la inmersión. Se colocó una muestra tumoral directamente en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales (panel inferior). Se colocaron todas las muestras en etanol al 70 % como depósito de retención hasta que se procesaron adicionalmente en un procesador tisular automatizado establecido en un programa nocturno. Se incluyeron todas las muestras en parafina para microtomía. Después de desparafinar la muestra tisular, se trató el tejido con fosfatasa lambda y posteriormente se tiñó con un anticuerpo que reconoce el epítipo pAKT (Cell Signaling Technologies, n.º cat. 4060) en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado (instrumento VENTANA Discovery XT). Como se muestra en las FIGS. 12A-D, la tinción específica por el anticuerpo se anuló en ambos casos, indicando que el anticuerpo reconoce el resto fosfo y es específico.

40

45

50

Ejemplo 17

Este ejemplo describe la tinción para pAKT en mama humana con carcinoma ductal *in situ* (DCIS). En este ejemplo, se obtuvo una muestra de una mama humana y se cortó en trozos de aproximadamente 4 mm y se trató con NBF al 10 % (formol) a t.a. o bien NBF al 10 % a 4 °C. Se colocaron las muestras tumorales tratadas con formol a t.a. directamente en la solución. A continuación se retiraron las muestras del formol a intervalos de tiempo de 0, 2, 4 o 24 horas después de la inmersión. Se colocó una muestra tumoral directamente en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales. Se colocaron todas las muestras en etanol al 70 % como depósito de retención hasta que se procesaron adicionalmente en un procesador tisular automatizado establecido en un programa nocturno. Se colocaron todas las muestras en etanol al 70 % como depósito de retención hasta que se procesaron adicionalmente en un procesador tisular automatizado establecido en un programa nocturno. Se incluyeron todas las muestras en parafina para microtomía. Se tiñeron los portaobjetos con un anticuerpo que reconoce el epítipo pAKT (Cell Signaling Technologies, n.º cat. 4060) en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado (instrumento VENTANA Discovery XT). Como se muestra en las FIGS. 13 A y B, se retiene significativamente más pAKT en el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) que en los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas con 2+2). Además, la tinción parece mucho más específica para las membranas en las muestras fijadas por el presente protocolo de fijación de temperatura doble.

Ejemplo 18

Este ejemplo describe la degradación térmica de pAKT en xenoinjerto de Calu-3: En este ejemplo, se cortaron tumores de xenoinjerto de Calu-3 recién obtenidos en dos porciones aproximadamente iguales y se trataron con NBF al 10 % (formol) a t.a. o bien NBF al 10 % a 45 °C o bien NBF al 10 % a dos temperaturas diferentes. Se colocaron muestras tumorales tratadas con formol a t.a. directamente en la solución en los 5 minutos posteriores a la extracción tumoral. A continuación se retiraron las muestras del formol a intervalos de tiempo de 0 o 24 horas después de la inmersión. Se colocó una muestra tumoral directamente en formol a 45 °C durante 3,5 horas. Se colocó otra muestra tumoral en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales. Se colocaron todas las muestras en etanol al 70 % como depósito de retención hasta que se procesaron adicionalmente en un procesador tisular automatizado establecido en un programa nocturno. Se incluyeron todas las muestras en parafina para microtomía. Se tiñeron los portaobjetos con un anticuerpo que reconoce el epítipo pAKT (Cell Signaling Technologies, n.º cat. 4060) en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado (instrumento VENTANA Discovery XT). Como se muestra en las FIGS. 14A-D, se retiene significativamente más pAKT en la muestra (2+3,5) fijada por el presente protocolo de fijación de temperatura doble que en los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas con 2+3,5). El remojo a primera temperatura a 4 °C es necesario para conservar los marcadores fosforilados puesto que la muestra tumoral colocada directamente en formol calentado sin el primer remojo frío no retuvo tinción con pAKT (panel 0+3,5). Se escanearon los portaobjetos con propósitos de cuantificación usando un escáner de portaobjetos Aperio (imagen inferior). Como se muestra en la FIG. 14E, se agruparon los píxeles en dos grupos indicando positivo (marrón) o negativo (azul). Se informa del porcentaje de píxeles positivos en el gráfico.

Ejemplo 19

Este ejemplo describe que la tinción de pAKT disminuye rápidamente después de la retirada. En este ejemplo, se cortaron tumores de xenoinjerto de Calu-3 recién obtenidos en dos porciones aproximadamente iguales, se envolvieron en una gasa remojada en solución salina y se colocaron en hielo durante 0, 10, 30, 60, 120 o 240 minutos. A continuación se colocó cada muestra en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales. Se colocaron todas las muestras en etanol al 70 % como depósito de retención hasta que se procesaron adicionalmente en un procesador tisular automatizado establecido en un programa nocturno. Se incluyeron todas las muestras en parafina para microtomía. Se tiñeron los portaobjetos con un anticuerpo que reconoce el epítipo pAKT (Cell Signaling Technologies, n.º cat. 4060) en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado (instrumento VENTANA Discovery XT). Como se muestra en las FIGS. 15A-F, la señal de pAKT disminuyó significativamente en 30 minutos después de la retirada (FIG. 15B), incluso cuando se enfrió hasta 4 °C en hielo.

Ejemplo 20

Este ejemplo describe la tinción para marcadores fosforilados en carcinoma de colon humano.

En este ejemplo, se obtuvo una muestra de un colon humano y se procesó en los 3-7 minutos posteriores a la extracción del paciente. Las muestras se cortaron en trozos de aproximadamente 4 mm y se trataron con 3 protocolos diferentes. En el protocolo 1, se colocó la muestra directamente en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales. En el protocolo 2, se colocó la muestra en formol a temperatura ambiente durante 24 horas después de la inmersión. En el protocolo 3, la muestra tuvo una isquemia intencionada durante 1 hora antes de colocarse en formol a temperatura ambiente durante 24 horas. Se colocaron todas las muestras en etanol al 70 % como depósito de retención hasta que se procesaron adicionalmente en un procesador tisular automatizado establecido en un programa nocturno. Se incluyeron todas las muestras en parafina para microtomía. Se tiñeron los portaobjetos con un anticuerpo que reconoce el epítipo pAKT (Cell

5 Signaling Technologies, n.º cat. 4060) o epítipo pPRAS40 (Cell Signaling Technologies, n.º cat.) en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado (instrumento VENTANA Discovery XT). Como se muestra en las FIGS. 16A-I, se retiene significativamente más marcador fosforilado en el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) que en los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas con 2+2). Además, las muestras sometidas a isquemia intencionada tuvieron una retención significativamente menor de marcadores fosforilados que las muestras fijadas por el presente protocolo de fijación de temperatura doble o bien las muestras fijadas por el protocolo de fijación de temperatura ambiente de 24 horas. También se tiñeron muestras con hematoxilina y eosina (paneles superiores) para la comparación de la morfología tisular. Se escanearon los portaobjetos con propósitos de cuantificación usando un escáner de portaobjetos Aperio (imagen inferior). Se agruparon los píxeles en dos grupos indicando positivo (marrón) o negativo (azul). Se informa del porcentaje de píxeles positivos en el gráfico.

Ejemplo 21

15 Este ejemplo se refiere al análisis de niveles de miARN en muestras fijadas de acuerdo con el presente protocolo de fijación de temperatura doble y los protocolos estándar (24 h). Los miARN son nucleótidos cortos (21-25) que actúan como modificadores postranscripcionales de transcritos de ARNm, que influyen en la expresión génica previniendo la traducción.

20 En este ejemplo, se conservaron muestras de tejido mamario que contenían carcinoma ductal *in situ* (DCIS) de acuerdo con el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2 horas, NBF al 10 % a 4 °C seguido de 2 horas, NBF al 10 % a 45 °C) en comparación con las fijadas por inmersión en formol a temperatura ambiente de 24 horas estándar. Se tiñeron los portaobjetos en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado VENTANA Discovery Ultra (Ventana Medical Systems, Inc.). Se analizaron los niveles de miR205 en las muestras para determinar qué efecto tiene el presente protocolo de fijación de temperatura doble sobre la retención y conservación de este miARN particular. En este ejemplo, la intensidad de la tinción de miR205, una señal azul intensa es claramente visible en ambas muestras (las señales ejemplares se indican por flechas). Como se muestra en las FIGS. 17A y B, la conservación de la muestra 2+2 parece ser más intensa que la del tejido fijado de 24 horas de control estándar.

30

Ejemplo 22

Este ejemplo se refiere a la conservación de ADN en carcinoma ductal de mama humano *in situ* (DCIS).

35 En este ejemplo, se usó el HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, cromosoma 17/HER2 (DDISH; Ventana Medical System Inc. n.º de catálogo 780-4422), en las muestras tumorales de mama para someter a prueba la capacidad para detectar copias únicas y múltiples de dos dianas de ADN diferentes con el presente protocolo de fijación de temperatura doble. Se conservaron muestras de tejido mamario que contenían carcinoma ductal *in situ* (DCIS) de acuerdo con el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2 horas, NBF al 10 % a 4 °C seguido de 2 horas, NBF al 10 % a 45 °C) en comparación con las fijadas por inmersión en formol a temperatura ambiente de 24 horas estándar. Se detectaron las sondas de HER2 y cromosoma 17 usando hibridación *in situ* (ISH) cromogénica de dos colores en los portaobjetos incluidos en parafina y fijados con formol después de la tinción en un instrumento de tinción tisular automatizado VENTANA Discovery XT (n.º de catálogo 786-089). A continuación se enumeró el estado del gen HER2 calculando la proporción del gen HER2 con respecto al cromosoma 17. Como se muestra en las FIGS. 18A y B, la prueba fue exitosa para ambas muestras, detectándose copias únicas y múltiples del gen HER2 (señales negras). Además, también se detectó el centrómero del cromosoma 17 con éxito (señales rojas; las señales ejemplares se indican por flechas). Esto ilustra que el presente protocolo de fijación de temperatura doble conservó el ácido nucleico ADN en el tejido y se pudo detectar por sondas disponibles comercialmente.

Ejemplo 23

Este ejemplo describe la tinción de Hif1 α en carcinoma de colon humano.

55 En este ejemplo, se obtuvo una muestra de un colon humano y se procesó en los 3-7 minutos posteriores a la extracción del paciente. Las muestras se cortaron en trozos de aproximadamente 4 mm y se trataron con 3 protocolos diferentes. En el protocolo 1, se colocó la muestra directamente en formol a 4 °C durante 2 horas y a continuación se transfirió a formol a 45 °C durante 2 horas adicionales (A). En el protocolo 2, se colocó la muestra en formol a temperatura ambiente durante 24 horas después de la inmersión (B). En el protocolo 3, la muestra tuvo una isquemia intencionada durante 1 hora antes de colocarse en formol a temperatura ambiente durante 24 horas (C). Se colocaron todas las muestras en etanol al 70 % como depósito de retención hasta que se procesaron adicionalmente en un procesador tisular automatizado establecido en un programa nocturno. Se incluyeron todas las muestras en parafina para microtomía. Se tiñeron los portaobjetos con un anticuerpo que reconoce el epítipo Hif1 α (ABCam, n.º cat. Ab51608) en un instrumento de tinción de portaobjetos automatizado (instrumento VENTANA Discovery XT). Como se muestra en la FIG. 19A, B y C, se retiene significativamente más Hif1 α en el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) que en los procedimientos de formol a t.a. estándar (comparar paneles de 24 horas con 2+2). Además, las muestras sometidas a isquemia intencionada tuvieron una retención

65

significativamente menor de Hif1 α que el presente protocolo de fijación de temperatura doble (2+2) o bien las muestras de 24 horas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para fijar una muestra tisular, que comprende:
- 5 a) poner en contacto la muestra tisular con una primera solución de aldehído a una primera temperatura y durante un primer período de tiempo;
- b) incrementar la temperatura de la muestra tisular obtenida en a) hasta una segunda temperatura calentando la muestra tisular hasta la segunda temperatura o sumergiendo la muestra tisular en una segunda solución de aldehído a la segunda temperatura; e
- 10 c) incubar la muestra tisular durante un segundo período de tiempo a dicha segunda temperatura;
- en el que la primera temperatura es de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 15 °C, y dicha segunda temperatura es de aproximadamente 22 °C a al menos aproximadamente 50 °C; y en el que el primer período de tiempo varía de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 4 horas, y el segundo período de tiempo varía de aproximadamente 15 min a aproximadamente 5 horas.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de la muestra tisular obtenida en a) se incrementa usando calentamiento por microondas.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la primera temperatura es de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 15 °C, opcionalmente de aproximadamente 3 °C a aproximadamente 5 °C.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el primer período de tiempo varía de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la segunda temperatura es de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 45 °C.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segundo período de tiempo es de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de la muestra tisular obtenida en a) se incrementa sumergiendo la muestra tisular en la segunda solución de aldehído a la segunda temperatura y en el que la segunda solución de aldehído es la misma que la primera solución de aldehído o en el que la segunda solución de aldehído es diferente de la primera solución de aldehído.
- 35 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el aldehído en la solución de aldehído es un aldehído de alquilo inferior, opcionalmente en el que el aldehído se selecciona de formol, glutaraldehído y combinaciones de los mismos.
- 40 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la primera solución de aldehído es una solución de formol, y en el que la primera temperatura es de mayor que 0 a aproximadamente 5 °C, y en el que el segundo período de tiempo varía de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas.
- 45 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de la muestra tisular obtenida en a) se incrementa sumergiendo la muestra tisular en la segunda solución de aldehído a la segunda temperatura, en el que la primera y la segunda solución de aldehído es una solución de formol, y en el que la primera temperatura es de mayor que 0 °C a aproximadamente 5 °C, y en el que el segundo período de tiempo varía de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas.
- 50 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además detectar la muestra tisular fijada en un sistema de detección automática.

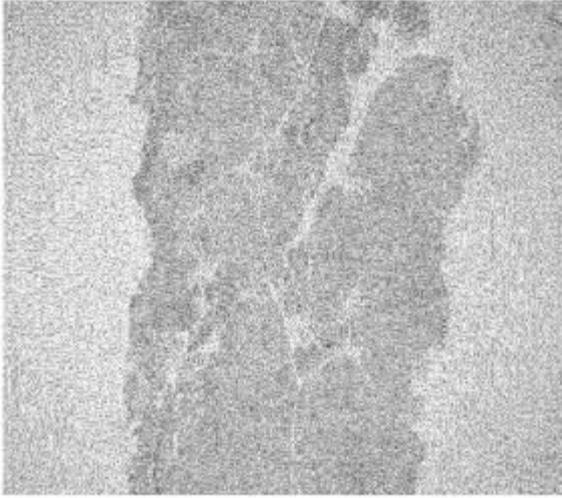


FIG. 1A

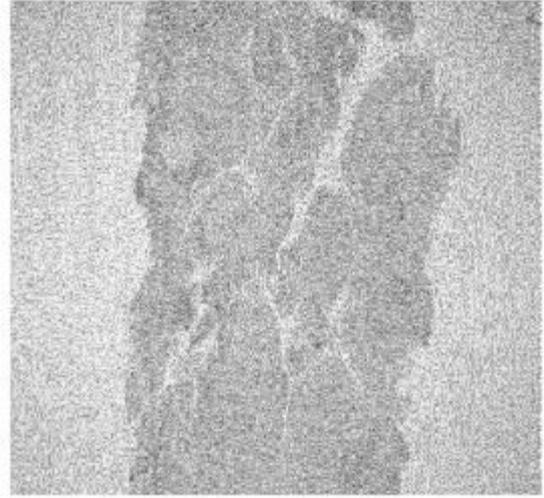


FIG. 1B

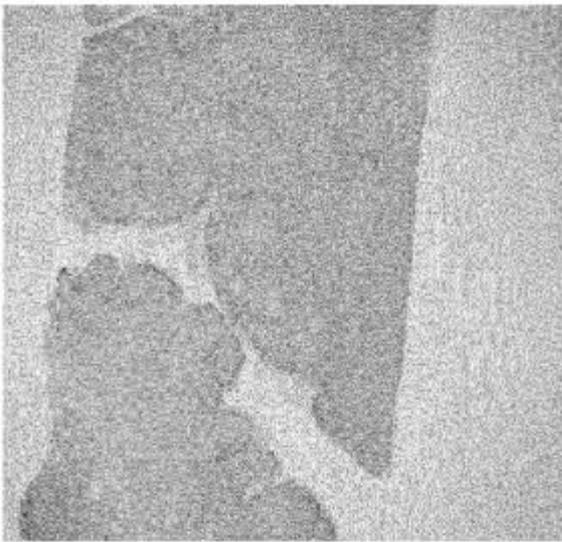


FIG. 1C



FIG. 1D

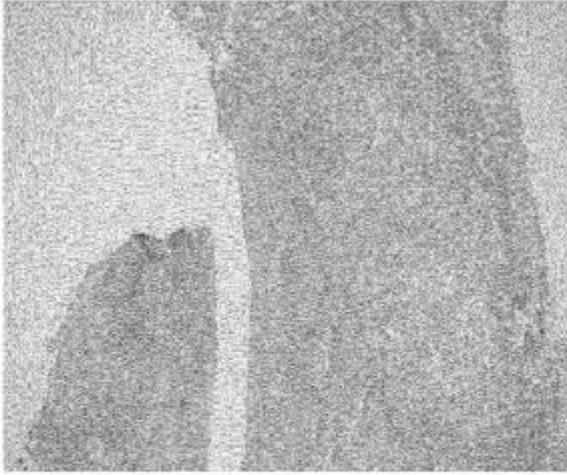


FIG. 2A



FIG. 2B

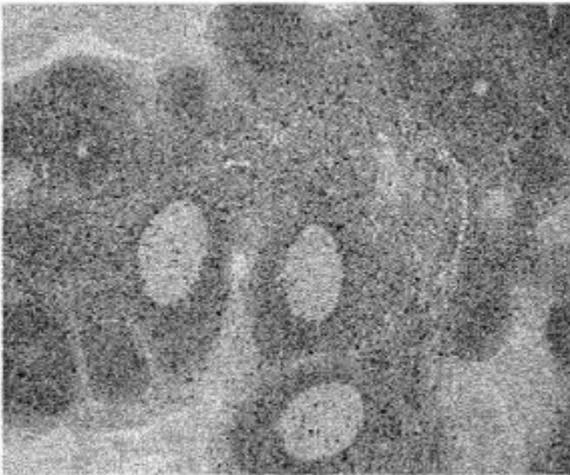


FIG. 2C

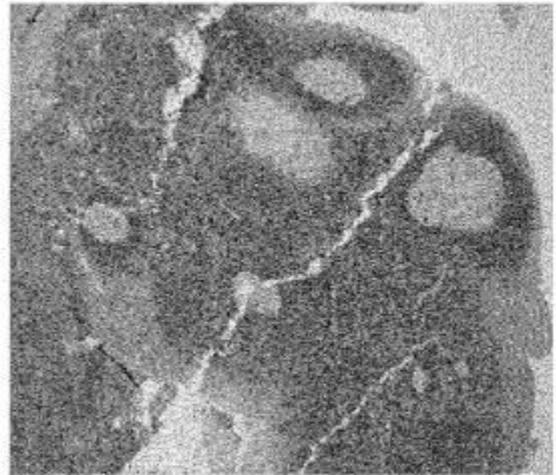


FIG. 2D

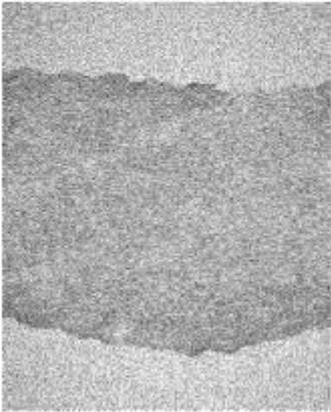


FIG. 3A

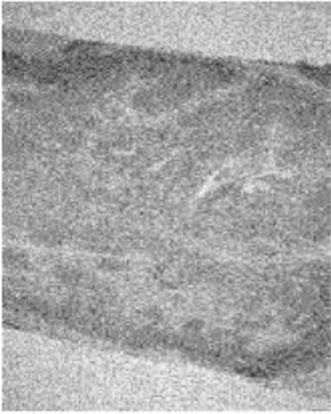


FIG. 3B

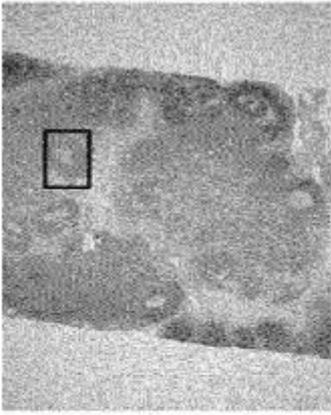


FIG. 3C



FIG. 3D

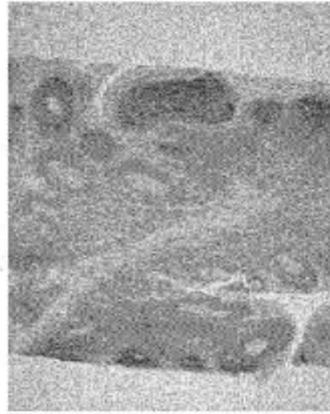


FIG. 3E

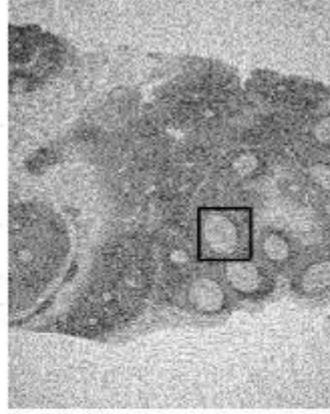


FIG. 3F

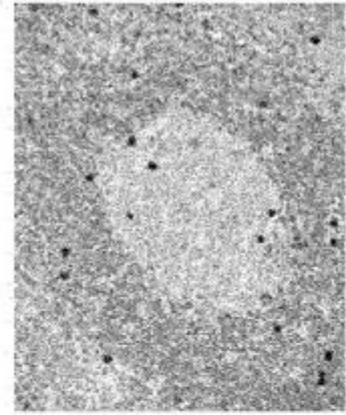


FIG. 3G

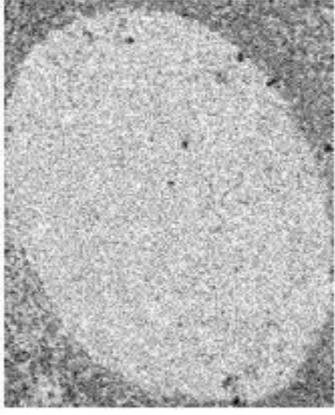


FIG. 3H

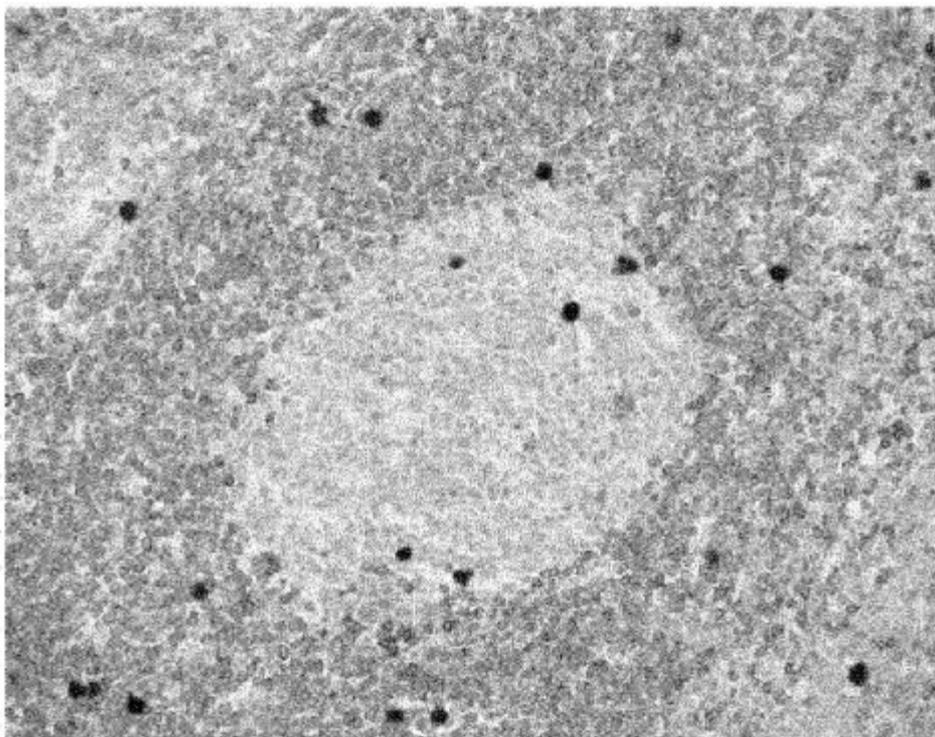


FIG. 4A

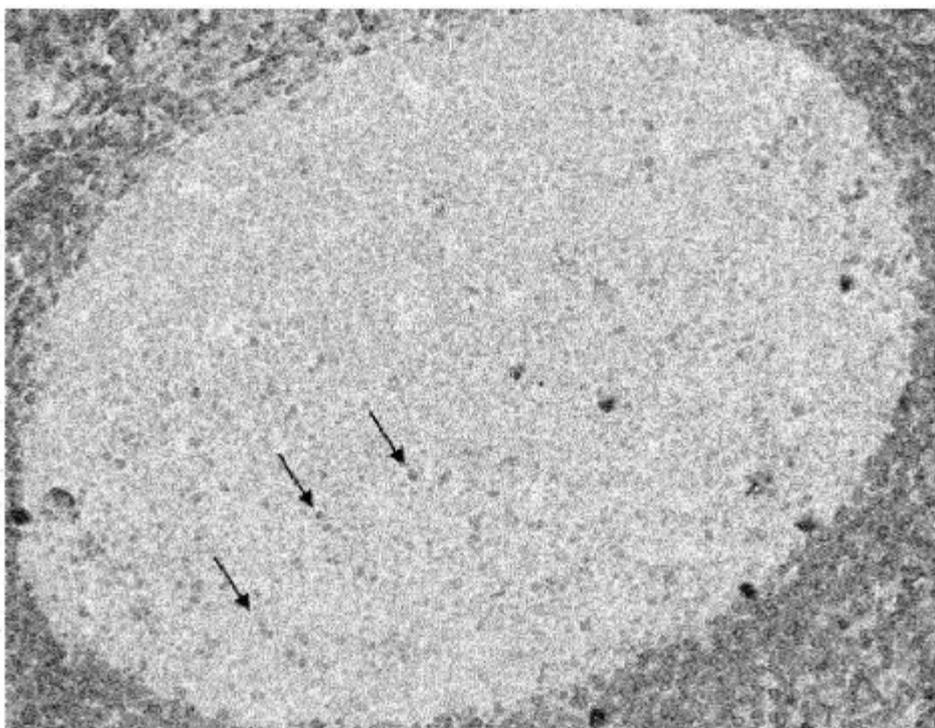


FIG. 4B

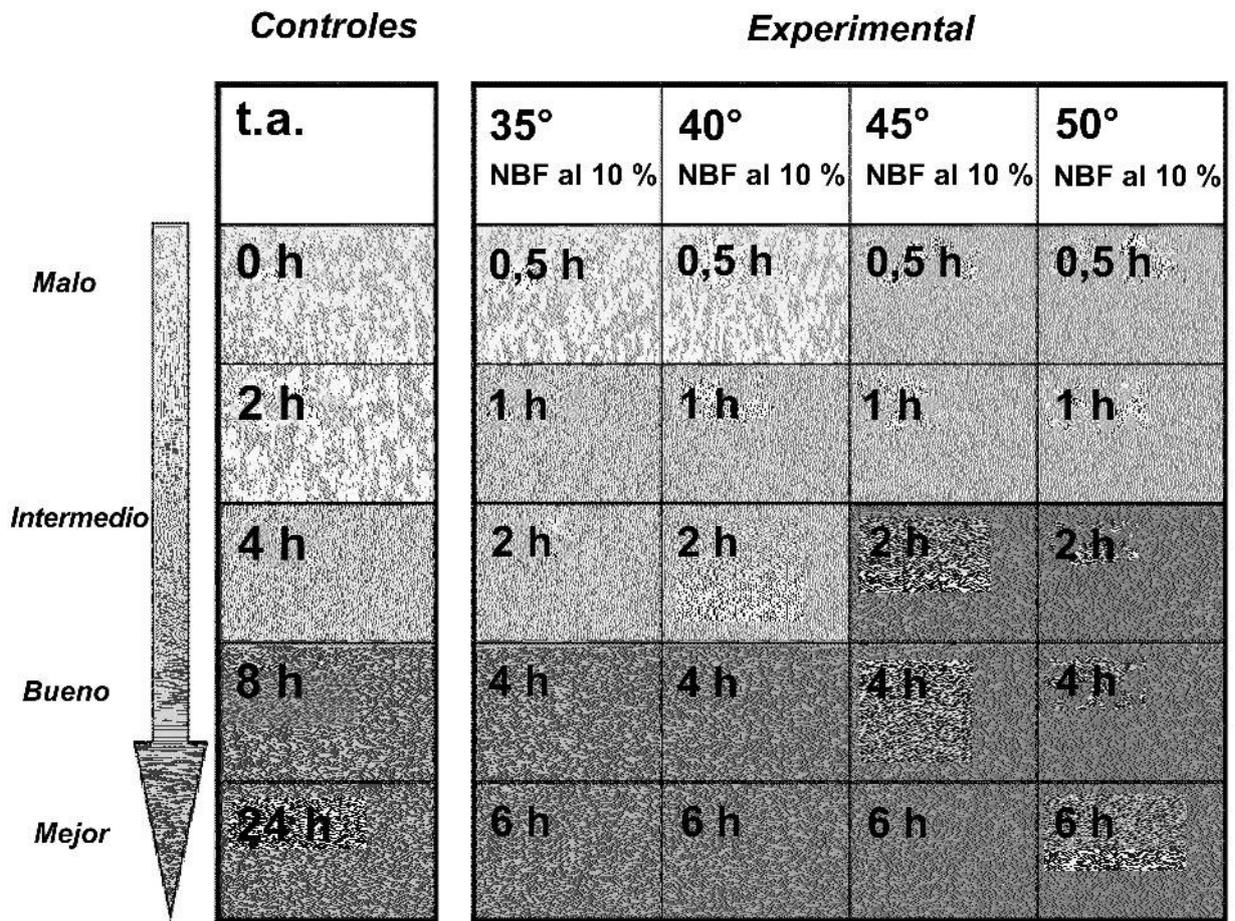


FIG. 5

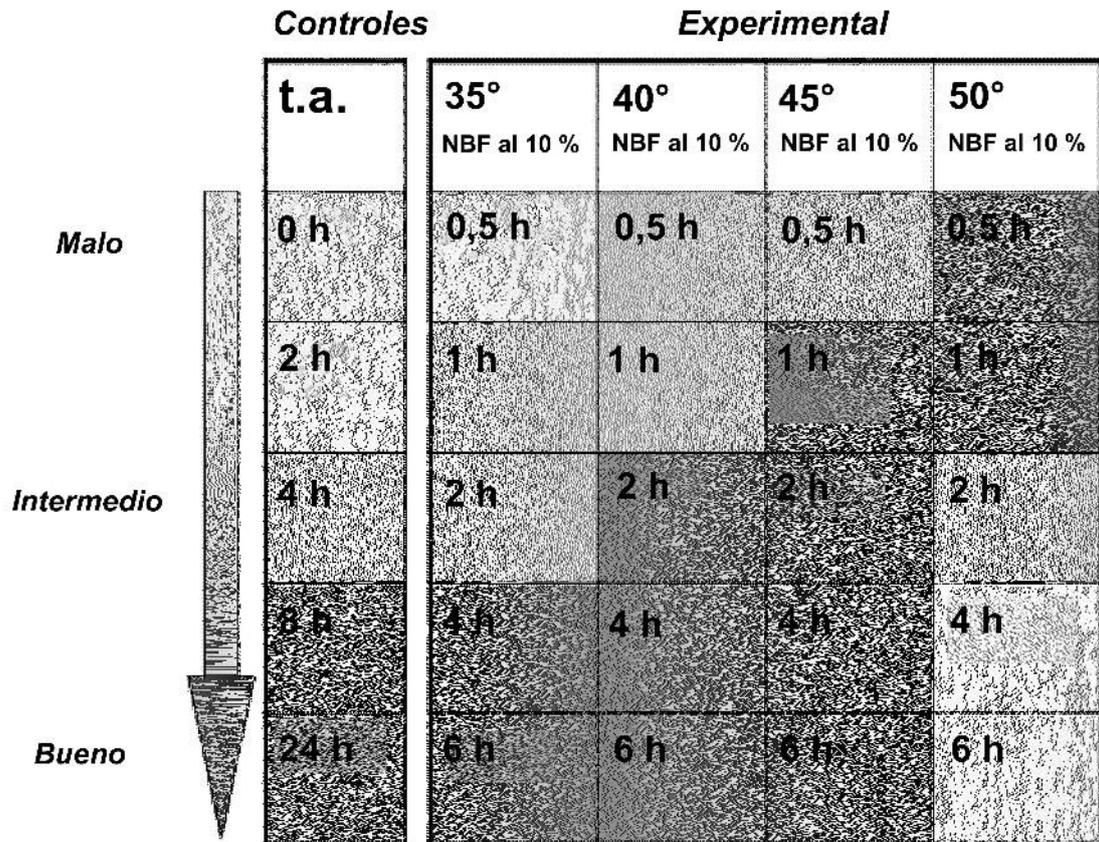


FIG. 6

2 h remojo prev.

t.a.	35° NBF al 10 %	40° NBF al 10 %	45° NBF al 10 %	50° NBF al 10 %
0 h	0,5 h	0,5 h	0,5 h	0,5 h
2 h	1 h	1 h	1 h	1 h
4 h	2 h	2 h	2 h	2 h
8 h	4 h	4 h	4 h	4 h
24 h	6 h	6 h	6 h	6 h

Tinción uniforme en toda la sección

Sin remojo prev.

t.a.	35° NBF al 10 %	40° NBF al 10 %	45° NBF al 10 %	50° NBF al 10 %
0 h	0,5 h	0,5 h	0,5 h	0,5 h
2 h	1 h	1 h	1 h	1 h
4 h	2 h	2 h	2 h	2 h
8 h	4 h	4 h	4 h	4 h
24 h	6 h	6 h	6 h	6 h

Tinción irregular observada

1 h

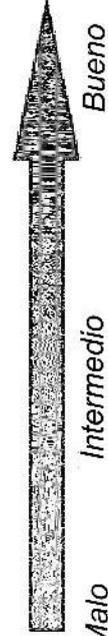


FIG. 7

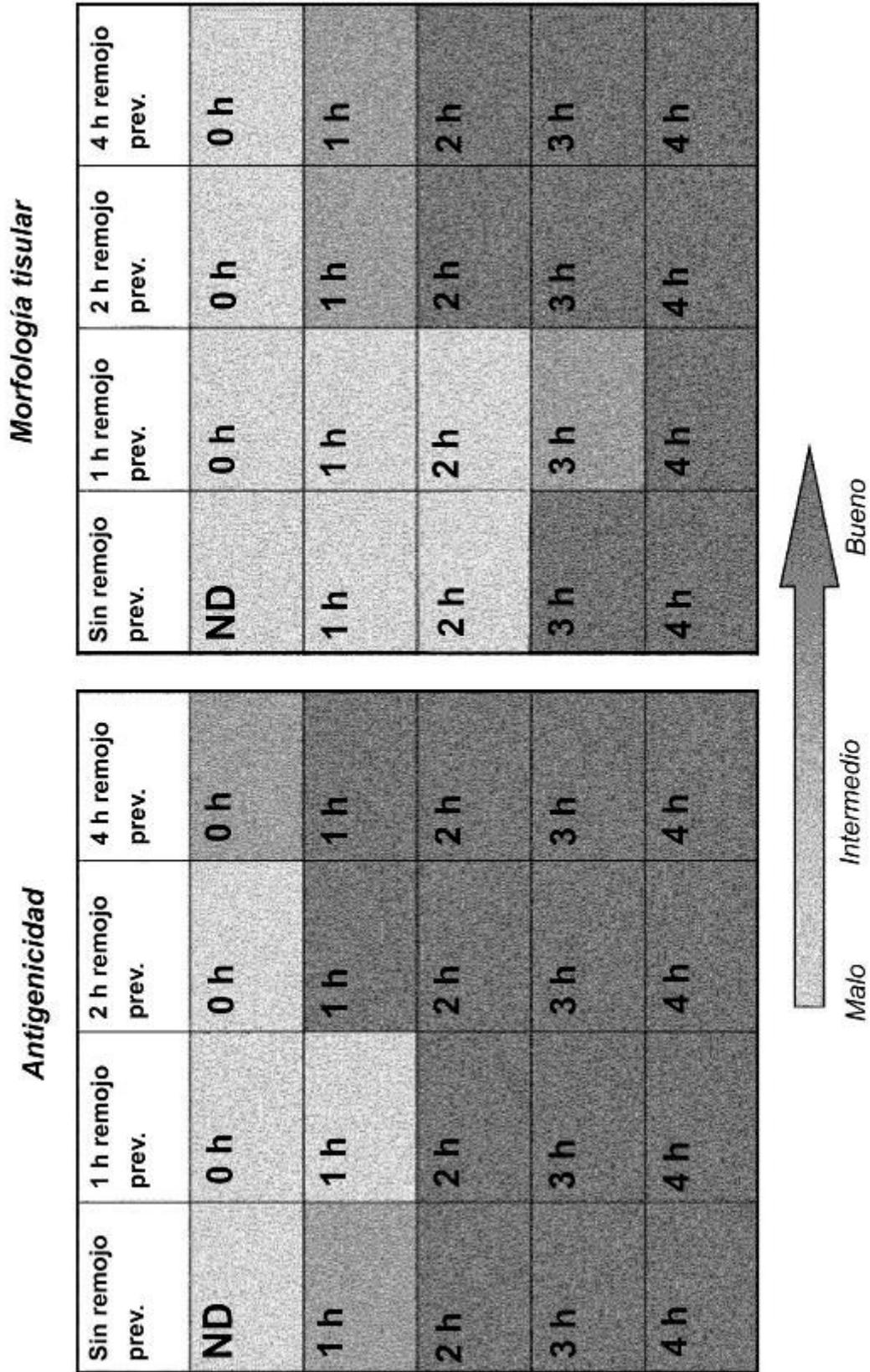


FIG. 8

Morfología tisular

Sin remojo prev.*	1 h remojo prev.	2 h remojo prev.	4 h remojo prev.
ND	0 h	0 h	0 h
1 h	1 h	1 h	1 h
2 h	2 h	2 h	2 h
3 h	3 h	3 h	3 h
4 h	4 h	4 h	4 h

Antigenicidad

Sin remojo prev.*	1 h remojo prev.	2 h remojo prev.	4 h remojo prev.
ND	0 h	0 h	0 h
1 h	1 h	1 h	1 h
2 h	2 h	2 h	2 h
3 h	3 h	3 h	3 h
4 h	4 h	4 h	4 h

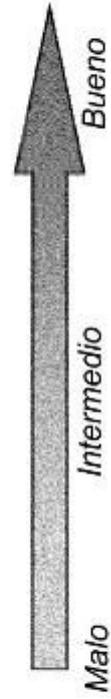


FIG. 9

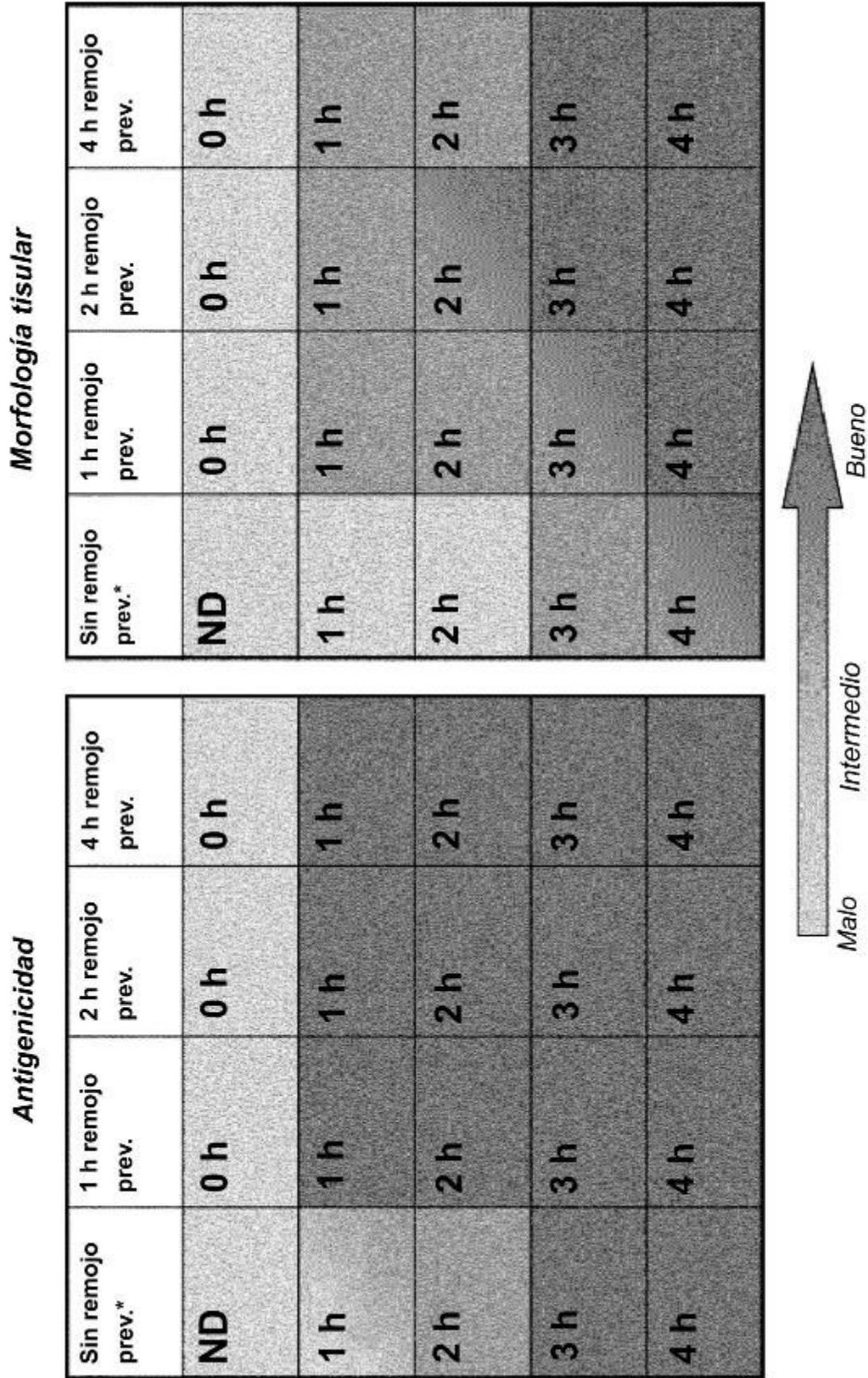


FIG. 10

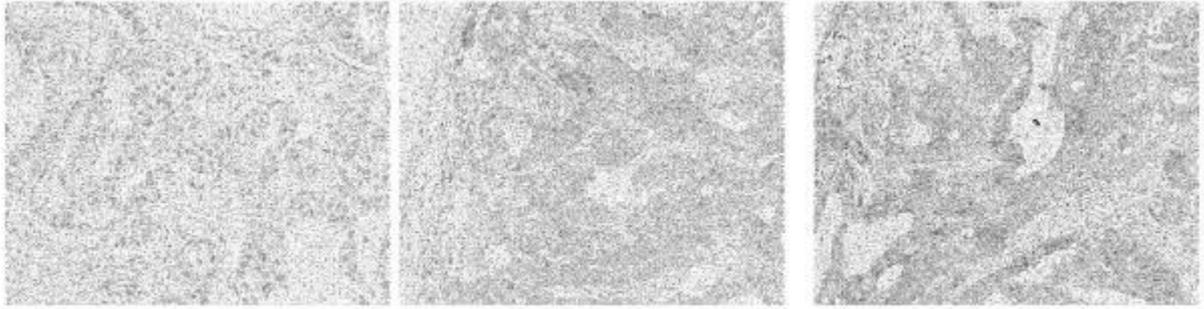


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

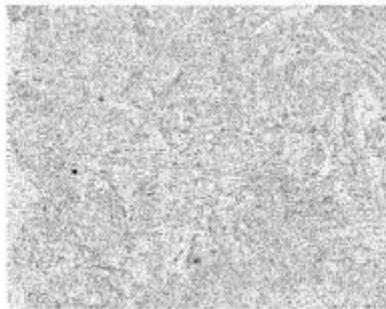


FIG. 11D

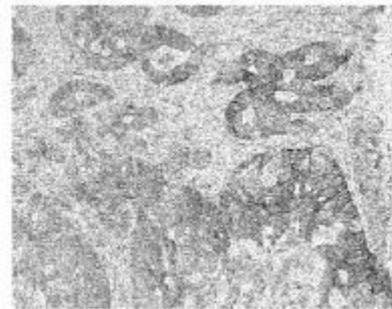


FIG. 11E

Imágenes 20x

- Fosfatasa

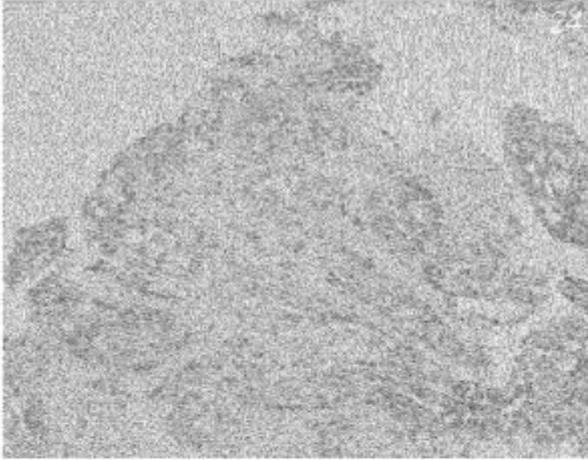


FIG. 12A

+ Fosfatasa

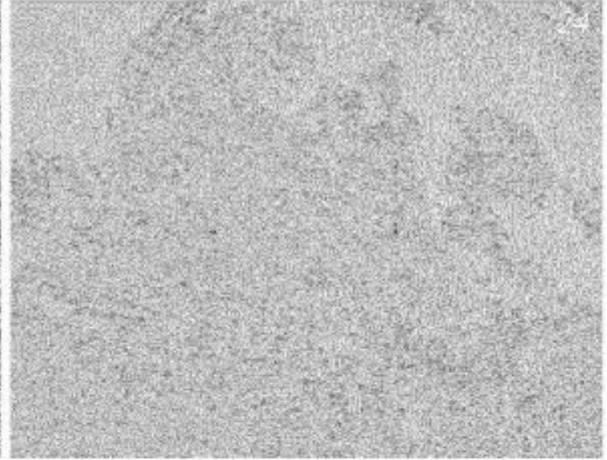


FIG. 12B

Imágenes 20x

- Fosfatasa

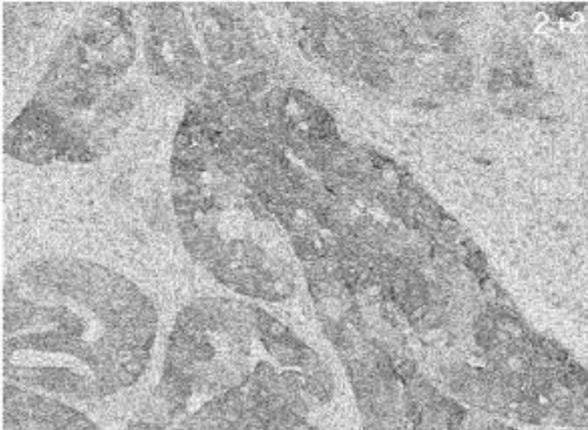


FIG. 12C

+ Fosfatasa

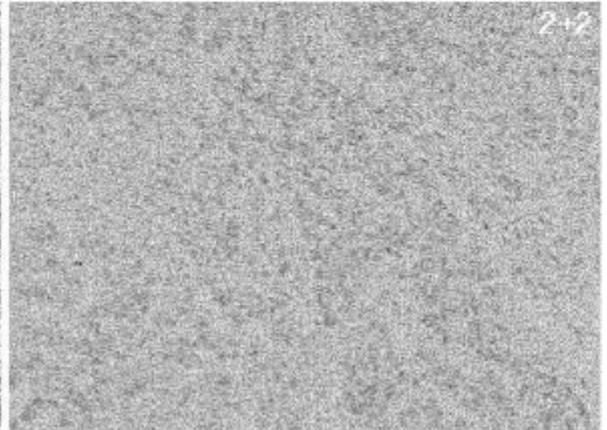
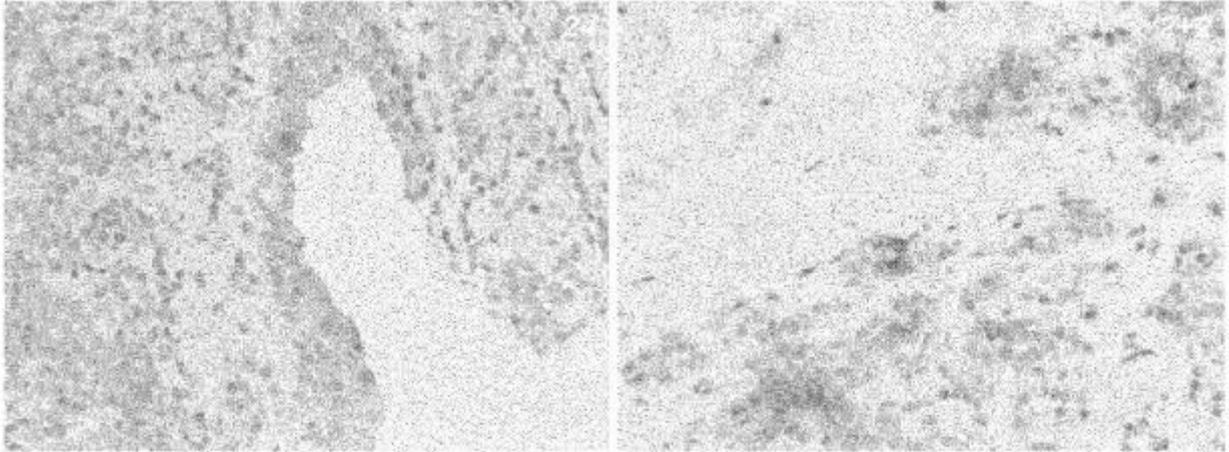


FIG. 12D

Imágenes 20x



Imágenes 20x

FIG. 13A

FIG. 13B

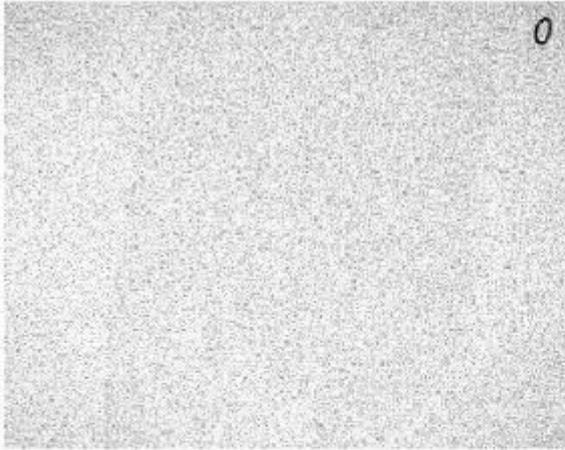


FIG. 14A

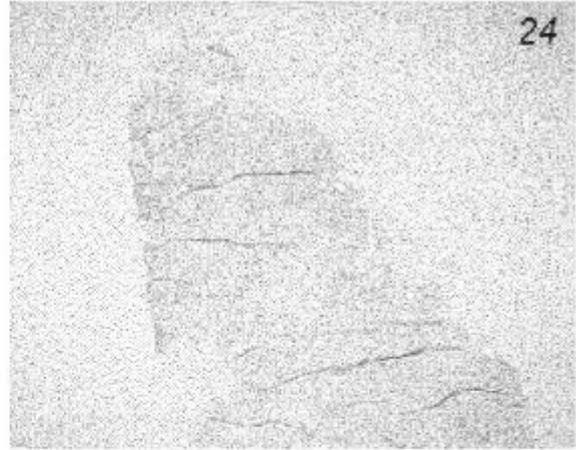


FIG. 14B

Imágenes 2x

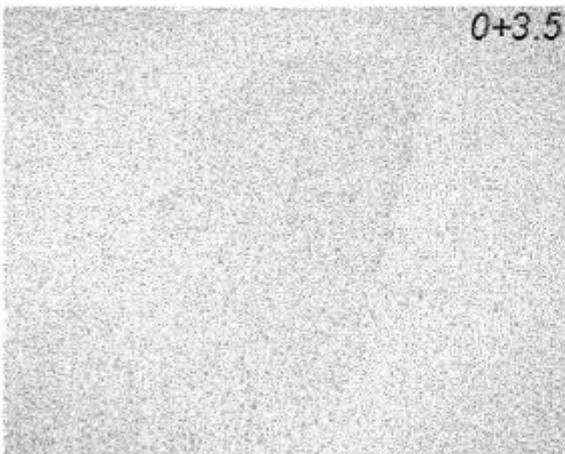


FIG. 14C

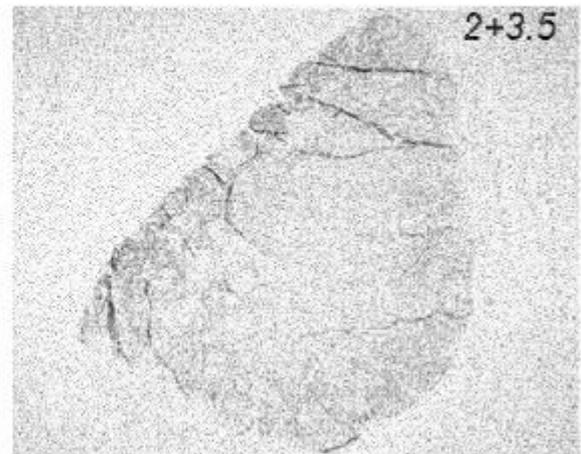


FIG. 14D

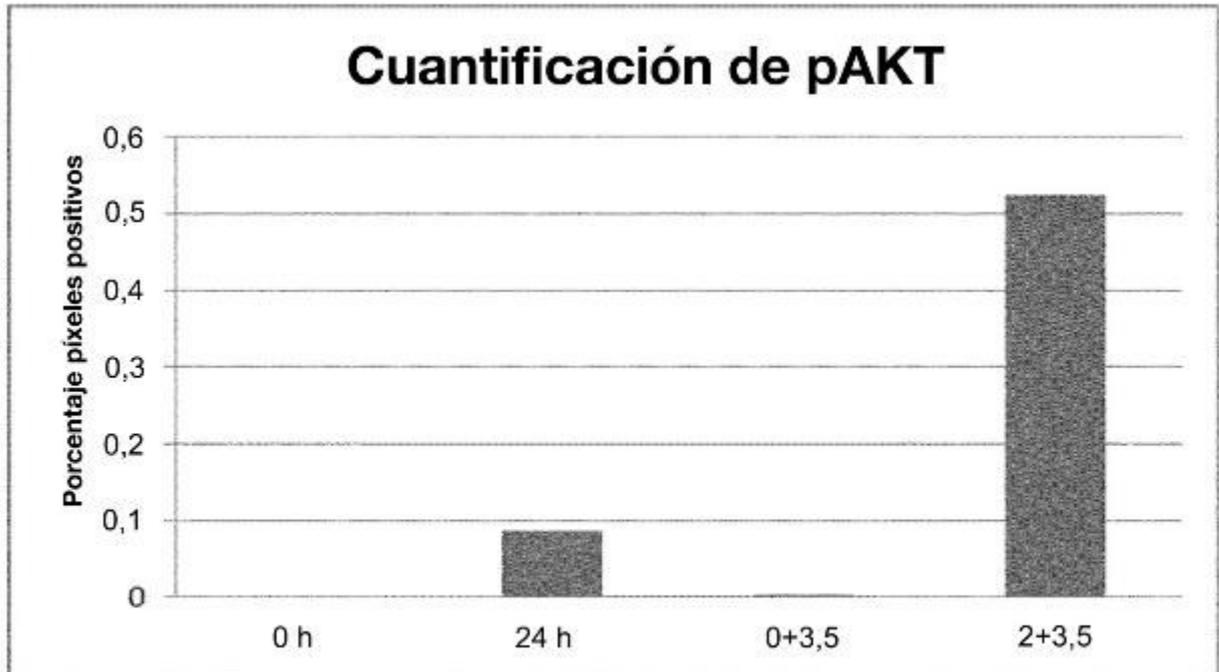


FIG. 14E

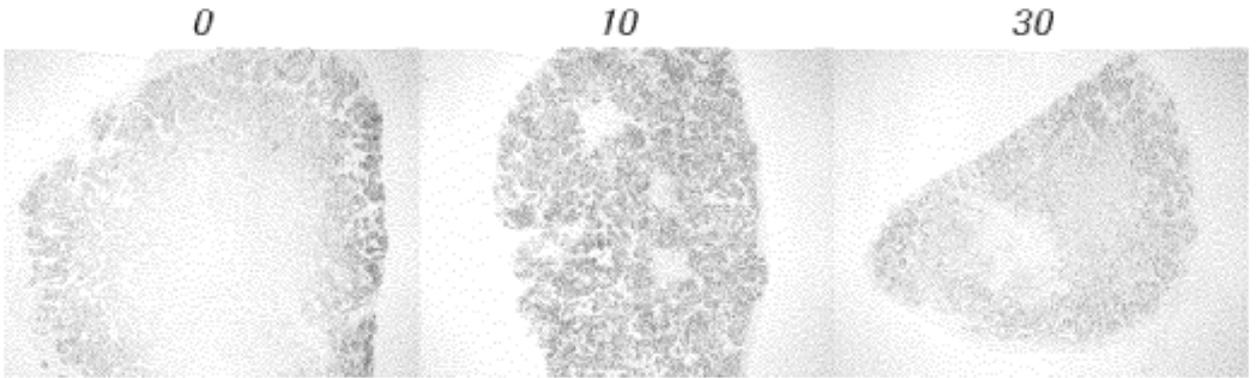


FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15C

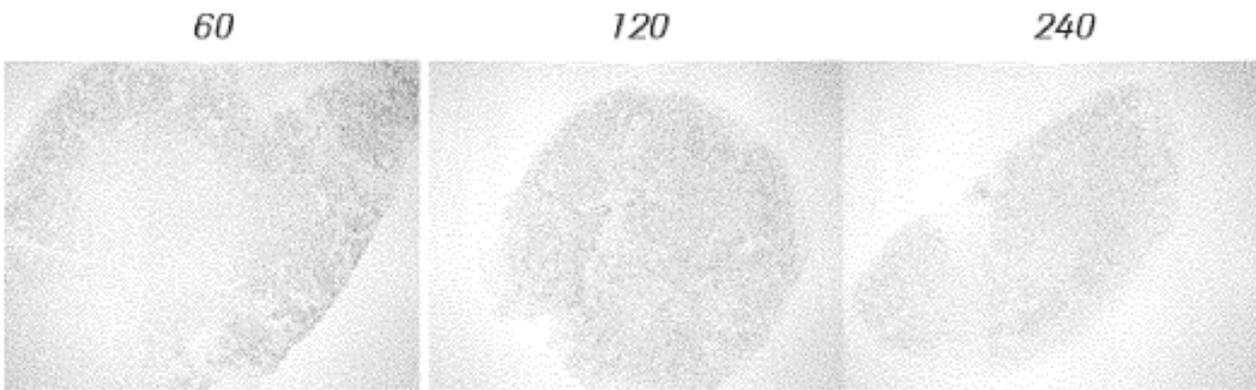


FIG. 15D

FIG. 15E

FIG. 15F

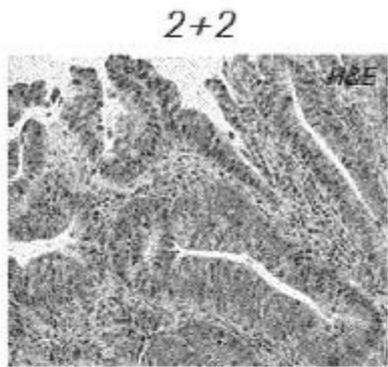


FIG. 16A

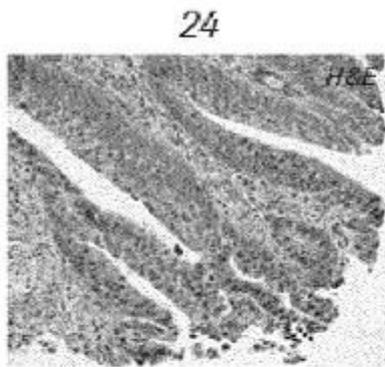


FIG 16B

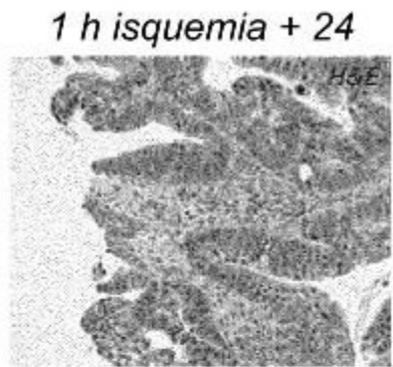


FIG. 16C

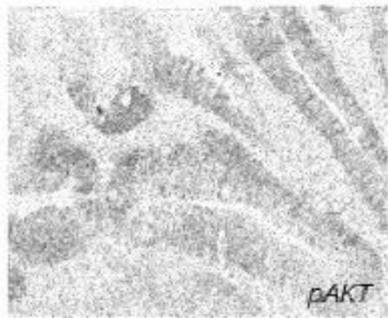


FIG. 16D

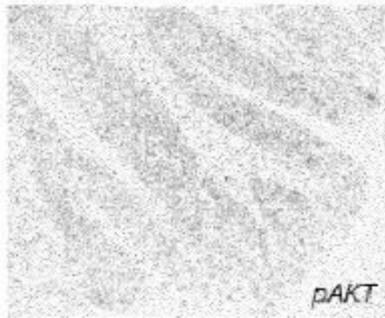


FIG. 16E

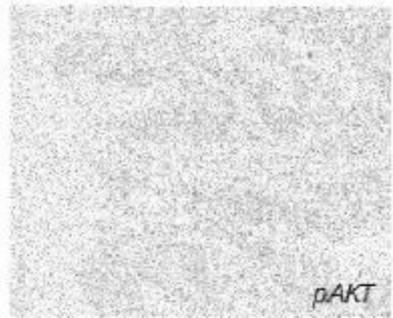


FIG. 16F



FIG. 16G

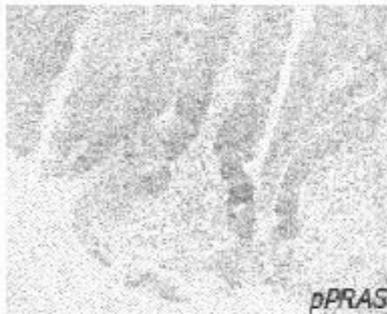


FIG. 16H

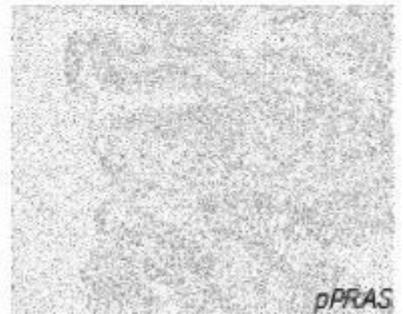


FIG. 16I

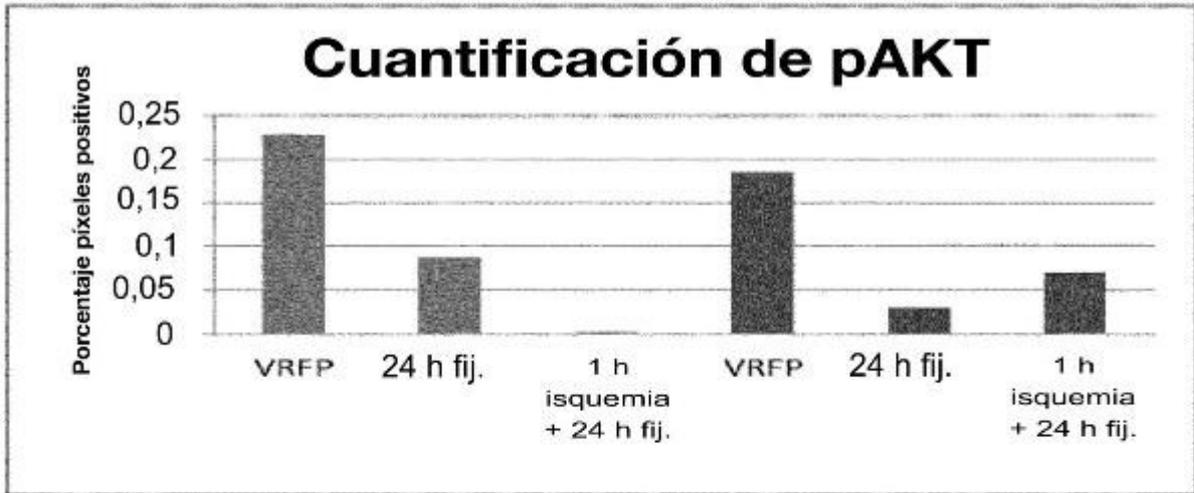


FIG. 16J

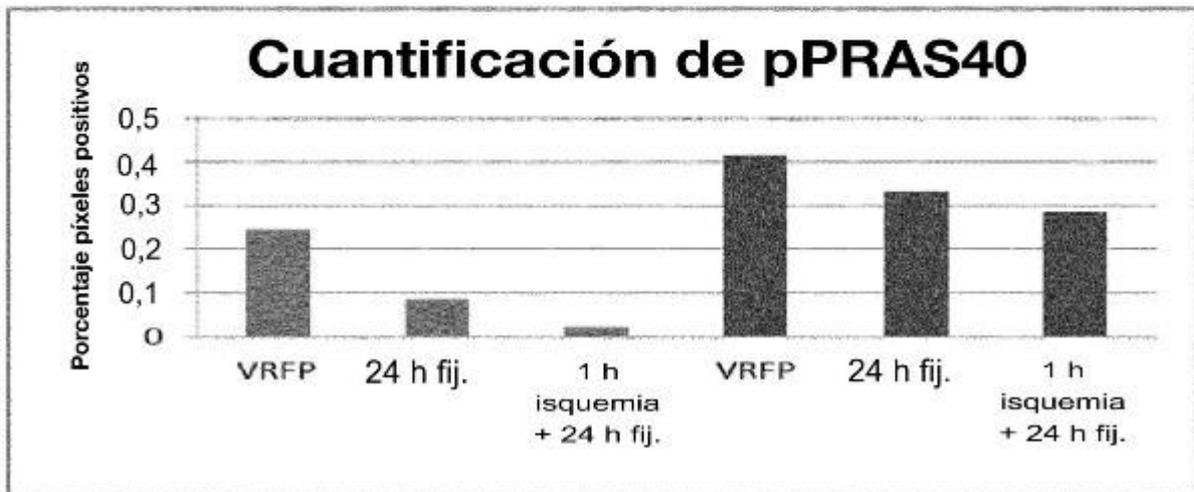


FIG. 16K

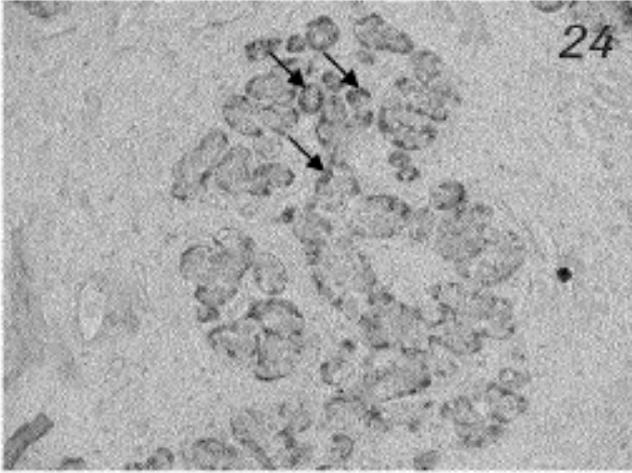


FIG. 17A

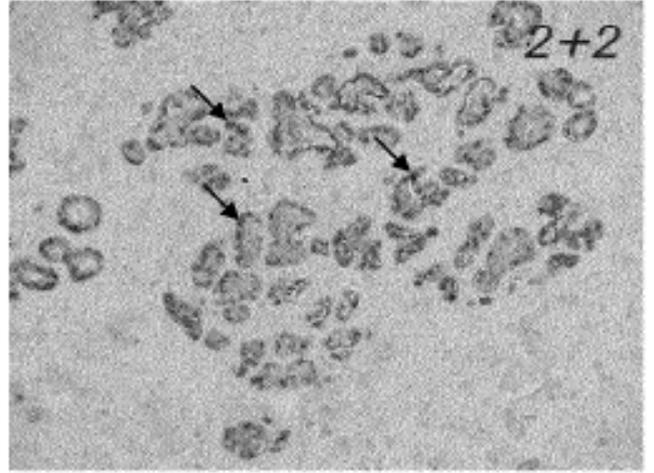


FIG. 17B

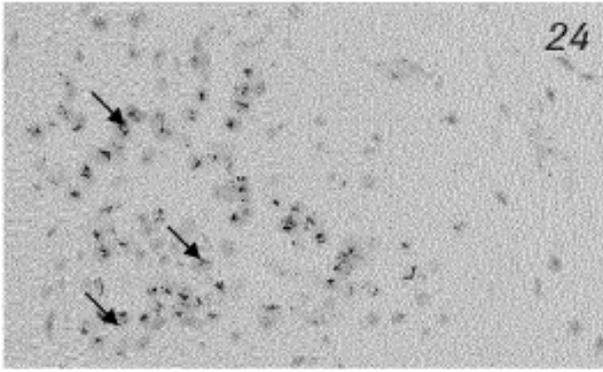


FIG. 18A

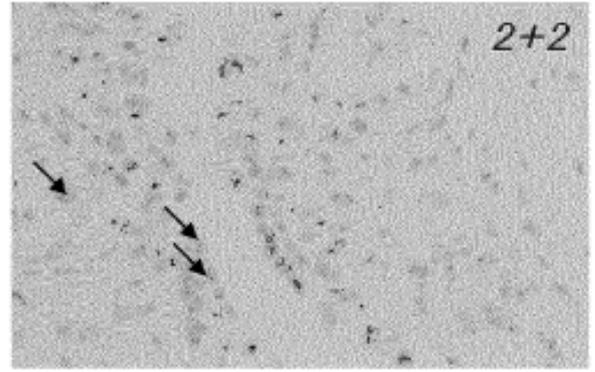


FIG 18B

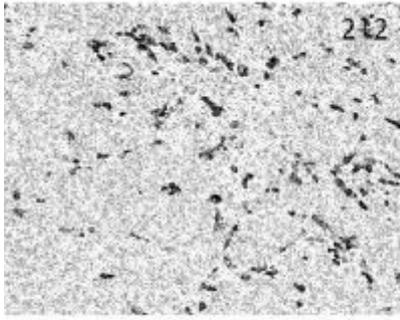


FIG. 19A

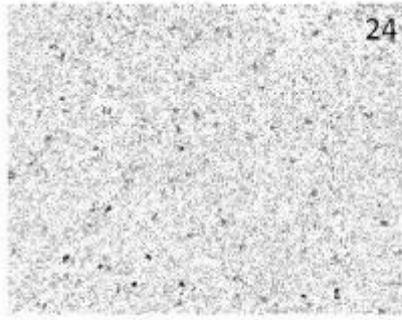


FIG. 19B

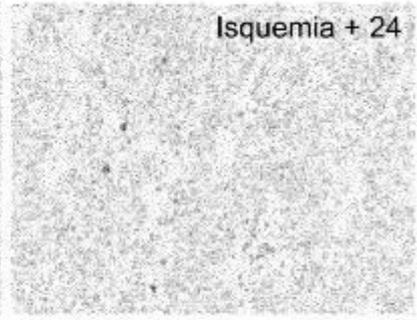


FIG. 19C