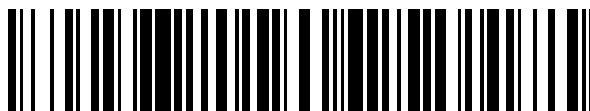


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 594**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/30** (2006.01)

**B82Y 30/00** (2011.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2009** **E 09759174 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015** **EP 2300799**

54 Título: **Método para el procesamiento histoquímico y el uso de una composición para el procesamiento histoquímico**

30 Prioridad:

**05.06.2008 US 131205 P**

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

**27.01.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JACKSON, MERRILL;**  
**HERMAN, MICHAEL;**  
**HOBEN, GRACE;**  
**SEBASTIAO, NOEMI;**  
**COCKAYNE, SCOTT y**  
**FERREA, HEATHER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 557 594 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).

## DESCRIPCION

Método para el procesamiento histoquímico y el uso de una composición para el procesamiento histoquímico

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para el desarrollo de procesos histoquímicos y el uso de composiciones que comprenden nanopartículas para el desarrollo de procesos histoquímicos.

## 10 Antecedentes de la invención

## I. Procesos histoquímicos

15 La histología es el examen microscópico de muestras de tejido para identificar los cambios estructurales y de otro tipo en las células, tejidos y órganos. Los procesos histoquímicos comprenden el examen de las moléculas biológicas que causan o que están asociadas de algún modo con una enfermedad a fin de dilucidar información sobre el diagnóstico del paciente, el pronóstico y las opciones de tratamiento, y por lo general se dividen en dos áreas principales: (i) el análisis de ADN, ARNm y proteínas en células intactas (en el lugar); y (ii) análisis de estos materiales biológicos después de haber sido extraídos de los tejidos. La primera categoría permite a un patólogo 20 estudiar la arquitectura histopatológica o la morfología de la muestra de tejido, mientras que los ácidos nucleídos o proteínas están siendo estudiadas. Estas técnicas incluyen la inmunohistoquímica (IHQ) de las proteínas que analizan, la hibridación in situ (HIS) para el análisis de los ácidos nucleídos, histoquímica (HC) de los carbohidratos que analizan y histoquímica enzimática (HE) para el estudio químico de la enzima.

25 La IHQ utiliza anticuerpos para unirse específicamente a epítomos únicos, tales como los epítomos que se encuentran en las proteínas que pueden expresarse sólo en ciertos tipos de tejido celular enfermo, y más particularmente implica detectar selectivamente dichos epítomos en una sección de tejido o células (por ejemplo, sangre o médula ósea) montado en un portaobjetos de vidrio. Los pasos típicos de un proceso IHQ incluyen el pretratamiento de la sección de tejido para eliminar la parafina y para reducir la unión no específica, la recuperación 30 de antígenos enmascarados por la reticulación de proteínas por fijadores químicos, el tratamiento con anticuerpos y la incubación, el tratamiento de una enzima marcada con un anticuerpo secundario e incubación, la reacción del sustrato con la enzima para producir un fluoróforo o cromóforo que destacan las áreas de la sección de tejido que tiene epítomos unidos con el anticuerpo, la contratinción, y similares. En particular, la recuperación de antígeno se lleva a cabo normalmente a temperaturas elevadas.

35 La HIS utiliza sondas de ácido nucleído para detectar las secuencias de ácidos nucleídos diana en una muestra. Por ejemplo, la HIS se puede utilizar para detectar oncogenes, tales como las secuencias de los genes HER2, EGFR y TOP1IA. La HIS se puede emplear además para detectar una anomalía o enfermedad genética, mediante la amplificación de los genes que causan cáncer específicamente en las células que, cuando se observan en un microscopio, aparecen como morfológicamente malignas. La HIS también es útil para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Los pasos típicos de proceso de HIS incluyen el pretratamiento de la sección de tejido 40 para eliminar la incrustación de parafina y para reducir las uniones no específicas, la recuperación de secuencias de ácidos nucleídos diana, la hibridación de sondas de ácido nucleído a secuencias diana, y la detección de la sonda unida a su diana. En particular, los pasos de recuperación de diana y sonda de hibridación se llevan a cabo a 45 temperaturas elevadas.

## I. Sistemas Automatizados

50 Los sistemas de tinción de muestras automatizada se han desarrollado para reducir el trabajo humano, la tasa de errores y los gastos. Los sistemas controlados por microprocesador representativos incluyen un carrusel de láminas que se hace girar por un motor paso a paso para colocar en serie las láminas de muestras de forma adyacente a los dispensadores para recibir los reactivos de procesamiento o las composiciones para la realización de los procesos histoquímicos. Los códigos de barras en las láminas y dispensadores permiten al ordenador controlar diferentes regímenes de tratamiento para diversas muestras de tejido. Estos sistemas de tinción también incluyen una fuente 55 de calor para calentar las muestras en aquellos los pasos que requieran temperaturas elevadas, o pasos que se faciliten a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, a fin de aumentar la cinética de la reacción.

60 Recientemente, los usuarios de sistemas automatizados se han dado cuenta de resultados tinción anómalos bajo ciertas condiciones, en particular durante el procesamiento de las muestras donde existen etapas llevadas a cabo a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, y más particularmente a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua o de las soluciones acuosas. Por ejemplo, dichos resultados de tinción anómalos se han observado más particularmente durante protocolos de tinción que incluyen etapas de procesamiento llevadas a cabo a temperaturas superiores a 60 °C, tales como temperaturas comprendidas entre aproximadamente 90 °C y aproximadamente 101 °C. Ciertos protocolos de tinción tienen como resultado áreas bien definidas, generalmente 65 circulares, de intensidad de la tinción anormalmente reducida rodeadas por áreas de tejido teñido correctamente. Estas áreas de intensidad de tinción reducida se denominan aquí como manchas. Si bien no se conocen que las

manchas comprendan un examen comprometido de las muestras, un proceso de tinción preferido, sin embargo, si tendría en cuenta la producción de muestras anómalamente manchadas.

Resumen

5 La presente invención se refiere a un método para el procesamiento histoquímico de una muestra y al uso de una solución de procesamiento. La invención se define en las reivindicaciones independientes 1 y 6.

Las composiciones que comprenden nanopartículas pueden referirse en lo adelante como nanosoluciones.

10 Las composiciones que comprenden nanopartículas y nanosoluciones "per se" no son parte de la invención reivindicada.

15 Una forma de realización de una composición ejemplar de tratamiento celular, denominada como CC1, comprende la solución tampón de ácido Tris borato de etileno- tetraacético (EDTA), a un pH de aproximadamente 8, y desde un valor mayor que cero hasta al menos aproximadamente 25 partes por millón, preferentemente de aproximadamente 2 partes por millón a aproximadamente 20 partes por millón, e incluso más preferentemente de aproximadamente 2,5 partes por millón a aproximadamente 15 partes por millón, de al menos una nanopartícula. Otro ejemplo de realización de una composición de tratamiento celular, se describe como CC2, comprende de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM de tampón citrato a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % de etilenglicol, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mM de metabisulfito de sodio, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), y de nuevo desde un valor mayor que cero hasta al menos aproximadamente 25 partes por millón, preferentemente de aproximadamente 2 partes por millón a aproximadamente 20 partes por millón, y incluso más preferentemente de aproximadamente 2,5 partes por millón a aproximadamente 15 partes por millón, de al menos una nanopartícula.

25 La nanopartícula o nanopartículas usadas incluyen nanopartículas seleccionadas dentro del grupo de alúmina ( $Al_2O_3$ ), sílice ( $SiO_2$ ) y óxido de titanio ( $TiO_2$ ) o las combinaciones de ellas.

30 También se describen las formas de realización de un método para utilizar las nanosoluciones en un proceso histoquímico. Una forma de realización se refiere a la aplicación de una composición para el procesamiento histoquímico a una muestra, la composición comprende al menos una nanopartícula en una cantidad que es eficaz para reducir el número medio de manchas por lámina en relación con la forma de realización del procedimiento sin necesidad de utilizar una nanosolución. A continuación se realiza un proceso de tinción histoquímica sobre la muestra. Por ejemplo, el método puede referirse a la realización de un tratamiento celular de la muestra usando una composición de tratamiento celular. El método también puede incluir la realización de al menos uno o varios pasos adicionales que normalmente se ejecutan de acuerdo a un protocolo de tinción de una muestra. También se pueden realizar procesos de tinción adicionales, tales como la tinción de contraste. Las formas de realización particulares están relacionadas con procesos histoquímicos automatizados que comprenden, dispensar una nanosolución sobre una muestra usando un sistema automatizado, el calentamiento de la muestra, y la ejecución de un proceso de tinción de la muestra sobre la muestra.

Los objetos de la invención anteriores y otros, así como sus características y ventajas se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

45 Breve descripción de las figuras

FIG. 1 es una fotografía de una tinción de tejido de cerebro bovino que ilustra la presencia de manchas.

50 FIG. 2 es una fotografía de una tinción de placenta humana que ilustra la presencia de manchas.

FIG. 3 es una fotografía de placenta humana preparada de acuerdo con las formas de realización descritas de la presente invención donde se muestra una reducción en la aparición de manchas.

55 Descripción detallada

I. Términos e introducción

60 A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, Genes VII, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (eds.), La Enciclopedia de Biología Molecular, publicada por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Biología Molecular y Biotecnología: una referencia de escritorio completa de Robert A. Meyers, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares.

En la presente memoria, los términos singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" se pretende que incluya "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. También, tal como se usa aquí, el término "comprende" significa "que incluye". "Que comprende A o B" por lo tanto significa que incluye A, B, o A y B. Además, es de entender que, a menos que se indique lo contrario, todos los rangos numéricos, tales como desde un valor mayor que 0 a al menos 25 partes por millón, incluyen todos números enteros y los valores no enteros entre los límites numéricos establecidos. Aunque los materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o en los ensayos de la presente descripción, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente memoria, incluye las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos de la invención.

Con el fin de facilitar la revisión de los diversos ejemplos de esta descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Aditivo, tampón, componente, acondicionador celular, reactivo, y solución: Las composiciones adecuadas para el desarrollo de las formas de realización descritas en la presente invención, particularmente las composiciones de condicionado celular, puede incluir, pero no se limitan a, el siguiente reactivo, reactivos, o composiciones de los mismos, en donde los reactivos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de la firma Sigma Chemical, a menos que se indique lo contrario: citrato 5 mM a aproximadamente pH 6; citrato 5 mM con aproximadamente 0,5 % de dodecilsulfato de sodio (SDS) a aproximadamente pH 6; citrato 10 mM a un pH de aproximadamente 6; citrato 10 mM con aproximadamente 0,5% de SDS a aproximadamente pH 6; Citrato 20 mM a aproximadamente pH 6; citrato 20 mM con aproximadamente 0,5% de SDS a aproximadamente pH 6; citrato 50 mM a aproximadamente pH 6; citrato 50 mM con aproximadamente 0,5% de SDS a aproximadamente pH 6; 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a aproximadamente pH 8; EDTA 1 mM con alrededor de 0,075% de SDS a aproximadamente pH 8; 10 mM EDTA a aproximadamente pH 8; EDTA 10 mM con alrededor de 0,075% de SDS a aproximadamente pH 8; 20 mM EDTA a aproximadamente pH 8; EDTA 20 mM con alrededor de 0,075% de SDS a aproximadamente pH 8; 50 mM EDTA a aproximadamente pH 8; EDTA 50 mM con alrededor de 0,075 % de SDS a aproximadamente pH 8; citrato 10 mM con aproximadamente 0,5 % de SDS y aproximadamente 1 % de etilenglicol a aproximadamente pH 6; citrato 10 mM con aproximadamente 0,5% de SDS y aproximadamente 5 % de etilenglicol a aproximadamente pH 6; citrato 10 mM con aproximadamente 0,5 % de SDS y aproximadamente 10 % de etilenglicol a aproximadamente pH 6; EDTA 1 mM con alrededor de 0,075 % de SDS y aproximadamente 1 % de etilenglicol a aproximadamente pH 8; EDTA 1 mM con alrededor de 0,075 % de SDS y aproximadamente 5% de etilenglicol a aproximadamente pH 8; EDTA 1 mM con alrededor de 0,075% de SDS y aproximadamente 10% de etilenglicol a aproximadamente pH 8; fosfato / citrato / EDTA a aproximadamente pH 9; citrato 10 mM con alrededor de 10 mM de urea a aproximadamente pH 6; citrato 10 mM con urea aproximadamente 1 mM a aproximadamente pH 6,2; 10 mM de citrato de sodio con aproximadamente 1,4 mM  $MgCl_2$  y aproximadamente 0,1 % de SDS a aproximadamente pH 7; 10 mM de citrato de sodio con aproximadamente 1,4 mM  $MgCl_2$  y aproximadamente 0,1 % de SDS a aproximadamente pH 7,99; 10 mM Tris-Cl a aproximadamente pH 8; 10 mM Tris-Cl con alrededor de 20 % de formamida a aproximadamente pH 8; citrato 10 mM con alrededor de 5c% sulfóxido de dimetilo (DMSO) a un pH de aproximadamente 6; citrato 10 mM con 0,1c% Triton X-100 y alrededor de 20 % de formamida a aproximadamente pH 6; Fosfato 10 mM con 5XSSC y aproximadamente 2,5 % condroitin A a aproximadamente pH 7; 10 mM Tris-Cl con alrededor de 10 mM EDTA y aproximadamente 0,1% Triton X-100 y alrededor de 20 % de formamida a aproximadamente pH 8,2; citrato 10 mM con aproximadamente 20 % de glicerol a aproximadamente pH 6; citrato 10 mM con 0,1 % Triton X-100 y glicina 10 mM a aproximadamente un pH de aproximadamente 6; EDTA 1 mM con aproximadamente 1 mM citrato y aproximadamente 0,25 % de SDS a aproximadamente pH 7,8; Aceite Norpar / mineral (cubreobjetos alta temperatura); Aceite PAG-100; Citrato 10 mM con cerca de 2 % de SDS a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 6,2; Citrato 10 mM con aproximadamente 1 % de SDS a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 6,2; Citrato 10 mM con aproximadamente 0,5 % de SDS a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 6,2; Citrato 10 mM con aproximadamente 0,25 % de SDS a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 6,2; EDTA 1 mM con cerca de 2 % de SDS a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8; EDTA 1 mM con aproximadamente 1 % de SDS a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8; EDTA 1 mM con aproximadamente 0,5 % de SDS a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8; 1 mM EDTA con aproximadamente 0,25 % de SDS a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8; 1 mM EDTA con aproximadamente 0,1 % de SDS a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8; 1 mM EDTA con alrededor de 0,075 % de SDS a un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8; 0,5 mM EDTA con aproximadamente 0,25 % de SDS a aproximadamente pH 8; 10 mM EDTA con aproximadamente 0,5% de SDS a aproximadamente pH 9,6. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica reconocerá que las concentraciones indicadas anteriormente se pueden variar sin alterar las características del reactivo, tampón, aditivo o solución para acondicionamiento celular.

Ciertas composiciones de acondicionamiento celular descritas comprenden 10 mM Tris base, ácido bórico 7,5 mM, EDTA 1 mM (sal disódica), 0,05% ProClin <sup>TM</sup> 300 (Supelco, Inc., Bellefonte, Pa.) a pH 8,5. Otras realizaciones contempladas incluyen la formulación básica en la que los intervalos de concentración de base Tris desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, en el que la concentración de ácido bórico oscila desde

aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, en el que los intervalos de concentración de EDTA de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2 mM o en el que los intervalos de pH desde aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 9.

- 5 Otras realizaciones contempladas incluyen, pero no se limitan a: tampón citrato (una combinación de sal trisódica de citrato de sodio dihidratado y ácido cítrico hidratado); 10 mM Tris 20 mM + ácido bórico + EDTA 1 mM; Tris 10 mM + 20 mM de ácido bórico; Tris 10 mM + EDTA 1 mM; Tris 10 mM; 20 mM de ácido bórico; EDTA 1 mM; 20 mM Tris 20 mM + ácido bórico + EDTA 1 mM; 5 mM Tris 20 mM + ácido bórico + EDTA 1 mM; 10 mM Tris 20 mM + ácido bórico + EDTA 2 mM; 10 mM Tris 20 mM + ácido bórico + EDTA 0,5 mM; 10 mM Tris + 40 mM ácido bórico + EDTA 1 mM; 10 mM Tris 10 mM + ácido bórico + EDTA 1 mM; Tris 10 mM ácido bórico + 5 mM + EDTA 1 mM; ácido bórico 10 mM Tris mM + 7,5 + EDTA 1 mM; Tris 10 mM + 20 mM ácido bórico + EDTA 1 mM + 5% de etilenglicol; Tris 10 mM + 20 mM ácido bórico + 5% de etilenglicol; ácido bórico 10 mM Tris + 20 mM + EDTA 1 mM + 0,1% SDS; 10 mM Tris + 20 mM ácido bórico + 0,1% SDS; Tris 10 mM ácido bórico + 20 mM + EDTA 1 mM + 5% DMSO; ácido bórico + 20 mM Tris 10 mM + 5% DMSO; Tris 10 mM ácido bórico + 20 mM + EDTA 1 mM 10% de DMSO; ácido bórico + 20 mM Tris 10 mM + 10% de DMSO; Tris 10 mM + 20 mM ácido bórico + EDTA 1 mM + 5% de formamida; Tris 10 mM + 20 mM ácido bórico + 5% de formamida; Tris 10 mM + 20 mM ácido bórico + EDTA 1 mM + 10% formamida; Tris 10 mM + 20 mM ácido bórico + 10% formamida; 10 mM Tris + 20 mM de ácido bórico + EDTA 1 mM + 0,5% Brij 35; Tris 10 mM + ácido bórico 20 mM + 0,5% de Brij 35; 10 mM Tris + 20 ácido bórico mM + 1 mM EDTA + 0,1% Brij 35; 10 mM Tris + 20 ácido bórico mM + 0,1% Brij 35; 10 mM Tris 20 + ácido bórico + 1 mM mM EDTA + 0,5% Triton X-100; 10 mM Tris 20 + ácido bórico + 0,5% mM Triton X-100.

- 25 Aditivos, componentes, reactivo y solución: Como se usa en este documento para exponer o desparafinizar (es decir, el proceso de desparafinación), estos términos pueden incluir, pero no se limitan a, los siguientes reactivos, reactivos o composiciones de los mismos, donde los reactivos están disponibles comercialmente, por ejemplo de Sigma Chemical: agua desionizada, agua desionizada con 0,1 % Triton X-100, fosfato 10 mM a pH alrededor de 6,1, fosfato 10 mM con 0,1 % Triton X-100 en alrededor de 6,1 pH, citrato 10 mM a alrededor de pH 6, citrato 10 mM con 0,1 % Triton X-100, 2X SSC, 10 mM Tris [hidroximetil] aminometano cloruro de (es decir, Tris-Cl) en alrededor de 8,2 pH, 10 mM Tris-Cl con aproximadamente 0,1 % Triton X-100 en alrededor de 8,2 pH. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención reconocerá que la concentración o concentraciones del componente o componentes enumerados anteriormente se pueden variar sin alterar las características del reactivo, tampón, aditivo o solución para exponer o desparafinizar.

- 35 Amplificación: Se refiere a la detección de una diana usando complejos de visualización múltiple, donde los complejos pueden ser iguales o diferentes.

- Animal: Se refiere a organismos vivos vertebrados multicelulares, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye tanto mamíferos humanos como no humanos. Del mismo modo, el término "sujeto" incluye tanto a los sujetos humanos como veterinarios, por ejemplo, los seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, caballos y vacas.

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

- 50 Más particularmente, "anticuerpo" se refiere a un ligando polipeptídico que comprende al menos una cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina de región variable que reconoce y se une específicamente a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominados el (VP) de la región variable pesada y la región variable de la luz (VL). Juntas, la región VP y la región VL son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo.

- 55 Esto incluye inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de ellas que son bien conocidas en la técnica. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos de anticuerpos proteolíticos [tales como  $F(ab')_2$ , fragmentos  $Fab'$ , fragmentos  $Fab'$ -SH y fragmentos  $Fab$  como los que se conocen en la técnica], fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como fragmentos sFv, fragmentos dsFv, biespecíficos fragmentos sFv, fragmentos dsFv biespecíficos  $F(ab')_2$  fragmentos, de una sola cadena proteínas Fv ("scFv"), disulfuro estabilizan proteínas Fv ("dsFv"), diacuerpos, y triacuerpos (como se conocen en la técnica), y de anticuerpos camélidos (ver, por ejemplo, las patentes US nº 6.015.695; 6.005.079, 5.874.541; 5.840.526; 5.800.988; y 5.759.808). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una cadena ligera de la región variable de una inmunoglobulina y una cadena pesada de la región variable de una inmunoglobulina están unidos por un enlazador, mientras que en dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye otras formas de la ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos

humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como, los anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog y Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Inmunología, 3<sup>er</sup> Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

5 Antígeno: Se refiere a un compuesto, composición o sustancia que pueda ser unido específicamente por los productos de la inmunidad humoral específica o celular, tal como una molécula de anticuerpo o receptor de células T. Los antígenos pueden ser de cualquier tipo de molécula, incluyendo, por ejemplo, haptenos, metabolitos intermedios simples, azúcares (por ejemplo, oligosacáridos), lípidos, y hormonas, así como macromoléculas tales como hidratos de carbono complejos (por ejemplo, polisacáridos), fosfolípidos, ácidos nucleídos y proteínas. Las categorías comunes de antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, protozoarios y otros antígenos parasitarios, antígenos tumorales, antígenos implicados en la enfermedad autoinmune, alergia y rechazo de injerto, toxinas, y otros antígenos diversos. En un ejemplo, un antígeno es un antígeno de *Bacillus*, tales como  $\gamma$ PGA.

15 Automatizado o Automático: Se refiere a un sistema y/o proceso, al menos parcialmente, y potencialmente sustancialmente por completo, controlado por uno o más ordenadores.

20 Muestra biológica: Este término incluye, pero no se limita a, cualquier colección de células (ya sea sueltas o en el tejido) que se pueden montar en un portaobjetos de vidrio estándar de microscopia, incluyendo, sin limitación, las secciones de órganos, secciones de tumores, fluidos corporales, frotis, sangre, preparaciones citológicas, microorganismos, matrices de tejido y líneas de células congeladas.

25 Solución de bloqueo: Se refiere a una solución útil para prevenir la unión no específica de una diana marcada a un ácido nucleído en una micromatriz. En una realización, la solución de bloqueo comprende un tampón fosfato de cualquier concentración total de sal; material protéico (por ejemplo, globulinas gamma, caseína, o cualquier otra proteína adecuados para bloquear la unión no específica); y un detergente no iónico. Los ejemplos particulares soluciones de bloqueo incluyen (a) una solución que comprende tampón de fosfato de concentración de 10 - 200 mM total de sal, 0,5-6 % de gamma globulinas de cabra, 5-15 % de caseína hidrolizada, y 0,005-1 % de detergente no iónico, y (b) una solución que comprende 75 mM de fosfato de potasio, fosfato de sodio 25 mM, NaCl 55 mM, 3 % de gamma globulinas de cabra, 13,4 % de caseína hidrolizada, y 0,05 % "bloqueo de detergente" y se conoce como "CHIPS PREP<sup>TM</sup> 2".

35 Detergente de bloqueo: Se refiere a un constituyente de la solución de bloqueo, que puede ser un detergente no iónico que comprende de polioxietileno (23) lauril éter, que tiene una fórmula molecular de  $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ , donde n es de aproximadamente 23. Los productos adecuados se obtienen de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Missouri, en 2000, Producto No. 858366, que se vende bajo la marca comercial BRIJ<sup>®</sup> 35

40 Condicionado celular: Se refiere a un proceso de mejora de la accesibilidad de los reactivos histoquímicos de procesos o composiciones, ambos reactivos o composiciones químicas y biológicas, a una diana molecular deseada.

Reactivo de condicionado de la célula: Se refiere a una solución acuosa útil para muestras de células acondicionada antes de la hibridación. Los ejemplos de reactivos de condicionamiento celular incluyen los descritos en este documento y en la Patente de Estados Unidos N° 6.855.552, que se incorpora aquí por referencia.

45 Solución de condicionamiento celular: Se refiere a un ejemplo de un reactivo de condicionamiento celular.

50 Soluciones de condicionamiento celular ejemplares incluyen (A) una composición que comprende citrato de sodio, ácido cítrico, "conservante de condicionado celular", y un detergente no iónico; (B) una composición que comprende una solución de condicionamiento celular que comprende 0,4 a 8,2 mM de citrato de sodio, ácido cítrico 1,8-10 mM, 0,1-1 % de conservante de condicionado celular, y 0,05 a 5 % de detergente de condicionado celular, y (C) una célula que comprende la composición solución de condicionamiento que comprende 8,2 mM citrato sódico, ácido cítrico 1,8 mM, 0,05 % de conservante de condicionado celular, y 0,1 % RIBOCC<sup>TM</sup> detergente de condicionado celular. La información adicional relativa a tales soluciones aparece en Analytical Morfología, Gu, ed., Eaton Publishing Co. (1997) en las págs. 1-40, que se incorpora en la presente descripción a modo de referencia.

55 Conservante de condicionamiento celular: Se refiere a un constituyente de la solución de condicionamiento celular. Los ejemplos de conservantes celular condicionado incluyen una composición que comprende 2,3 % 5-cloro-2 metil-4-isotiazolin-3-ona, 0,7 % de glicol modificado 2-metil-4- isotiazolin-3-ona, de 94-95 %, y 2-3 % carboxilato de alquilo, como se obtiene de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., Catalog No. 48125, y vendido bajo la marca comercial de PROCLIN <®> 300, una marca registrada de Rohm and Haas Company.

60 Detergente de condicionamiento celular: Se refiere a otro constituyente de la solución de condicionamiento celular. Los ejemplos de detergentes de condicionado celular incluyen un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., y vendido bajo la marca registrada TWEEN<®>, tal como Tween<sup>®</sup> 20 (monolaurato de sorbitán polioxietileno), una marca registrada de ICI Americas, Inc.

65

Marcador detectable: Se refiere a un compuesto o composición detectable que se une directa o indirectamente con otra molécula, tal como un anticuerpo o una proteína, para facilitar la detección de esa molécula. Ejemplos específicos, no limitantes de marcadores incluyen marcadores fluorescentes, enzimas, e isótopos radiactivos.

5 Epítipo: Se refiere a un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias de péptidos contiguos o no contiguos en una molécula que son antigénicos, es decir, que provocan una respuesta inmune específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico particular.

10 Primer detergente de prehibridación primaria: Se refiere a un componente de una solución de prehibridación primaria. Ejemplos de primeros detergentes de prehibridación primaria incluyen un producto que comprende t-octilfenoxipolietoxietanol como se obtiene de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., teniendo Producto No. 21123, y vendido bajo la marca registrada TRITON® X-100, una marca registrada marca comercial de Union Carbide Corp.

15 Detergente de primer lavado: Se refiere a un constituyente de la solución de lavado. Los ejemplos de detergentes de primer lavado incluyen detergentes no iónicos que comprenden octilfenol de óxido de etileno condensado, tales como TRITON® X-100.

20 Hapteno: Se refiere a una molécula, normalmente una molécula pequeña que se puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero normalmente es sustancialmente incapaz de ser inmunogénica, excepto en combinación con una molécula portadora.

25 Solución de hibridación: Se refiere a una solución acuosa útil para la hibridación de una sonda de ácido nucleído a un ácido nucleído diana. "La solución de hibridación" incluye "en la solución de hibridación in situ" y "solución de hibridación para microarreglos."

30 Respuesta inmune: Se refiere a una respuesta a un estímulo de una célula del sistema inmunitario, tal como una célula B, células T, macrófagos o un polimorfonucleocito. Una respuesta inmune puede incluir cualquier célula del cuerpo implicada en una respuesta de defensa del huésped, por ejemplo, una célula epitelial que secreta interferón o una citoquina. Una respuesta inmune incluye, pero no se limita a, una respuesta inmune innata o inflamación.

35 Detergente de hibridación *in situ*: Se refiere a un constituyente de la solución de hibridación *in situ*. Ejemplos de realización de los detergentes de hibridación *in situ* incluyen (a) detergentes no iónicos que comprenden de polioxietileno (23) lauril éter, que tiene una fórmula molecular de  $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ , donde n es aproximadamente 23 tal como se obtuvo de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., Producto No. 858366, que se vende bajo la marca comercial BRIJ® 35.

40 Solución de hibridación *in situ*: Se refiere a una solución acuosa útil para la hibridación de una sonda a un ácido nucleído diana en procesos de hibridación *in situ*. Ejemplos de realización de soluciones de hibridación *in situ* incluyen SSPE, la sal sulfato de sodio dextrano, de peso molecular promedio 10.000, formamida, y detergentes no iónicos, tales como un "detergente de hibridación in situ." Las realizaciones más particulares de soluciones de hibridación in situ incluyen (A) 1X-5X SSPE, 10-50 % de sal dextrano sulfato de sodio de peso molecular medio 10.000, el 50-80 % de formamida, y 0,01 a 1 % en detergente hibridación *in situ*, y (B ) 2X SSPE, 20 % de sal de dextrano sulfato de sodio de peso molecular promedio 10.000, 80 % de formamida, y 0,05 % de detergente en hibridación *in situ*, referido como "RiboHybe™". RiboHybe™ se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.656.685, que se incorpora en la presente descripción a modo de referencia.

50 Aislado: Se refiere a un microorganismo "aislado" (tal como un virus, bacteria, hongo, protozoo o) que se ha separado o purificado a partir de microorganismos de diferentes tipos, cepas o especies sustancialmente. Los microorganismos se pueden aislar mediante una variedad de técnicas, que incluyen dilución seriada y cultivo. Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleído, proteína u orgánulo) se ha separado o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se produce de forma natural, tales como otros sustancialmente ADN y ARN cromosómicos y extra-cromosómicos, proteínas y orgánulos. Mamíferos: Este término incluye tanto los mamíferos no humanos y humanos. Del mismo modo, el término "sujeto" incluye tanto a los sujetos humanos y veterinarios.

55 Solución hibridación por microarreglo: Se refiere a una solución acuosa útil para la hibridación de una sonda a un ácido nucleído diana en un microarreglo. Ejemplos de realización de soluciones de hibridación de microarreglos incluyen SSPE, la sal sulfato de sodio dextrano, peso molecular promedio 10.000, y formamida. Una realización particular de una solución de hibridación de microarreglos comprende 6X SSPE, la sal 20% de dextrano sulfato de sodio, peso molecular medio 10.000, y 10% de formamida, y se conoce como "CHIPHYBE™" como se describe en la patente US No. 6.656.685, incorporada aquí por referencia.

65 Solución de limpieza de microarreglo: Se refiere a una solución útil para eliminar LIQUID COVERSLP™ (véase, por ejemplo, las patentes US n° 5.225.325 y 5.418.138, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia). A partir de una micromatriz siguiendo los pasos de los métodos de hibridación de microarreglos de hibridación y lavado, reduciendo la señal de fondo observó en el análisis de los microarreglos. La solución de limpieza de microarreglos

comprende un "detergente de limpieza de microarreglos" diluido en agua, preferiblemente agua desionizada. Una realización particular de una solución de limpieza de microarreglo comprende 0,1-5% de detergente de limpieza de microarreglos, incluso más normalmente 1 % de detergente de limpieza de microarreglos, y se conoce como "CHIPCLEAN™".

Detergente de limpieza del microarreglo: Se refiere a un constituyente de la solución de limpieza de microarreglos y se refiere a cualquier detergente que elimina eficazmente el líquido del cubreobjetos LIQUID COVERSLIP™ o compuestos o composiciones que tienen funciones similares, en un microarreglo. Los detergentes de limpieza del microarreglo comprenden normalmente tensioactivos aniónico y no iónicos biodegradable y sin fosfato. Un detergente de limpieza microarreglo ejemplar es un producto fabricado por Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, Ohio, 45202, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5.990.065 y 6.069.122 (ambos de los cuales se incorporan aquí como referencia), y se vende bajo la marca comercial DAWN™, una marca comercial registrada de Procter & Gamble, Inc. LIQUID COVERSLIP™ se refiere a composiciones que comprenden parafina (Norpar 15) y Aceite Rojo O.

Molécula de interés o diana: Se refiere a una molécula para la que se ha de determinar, la presencia, la ubicación y / o concentración. Ejemplos de moléculas de interés, como las proteínas y las secuencias de ácidos nucleídos etiquetados con haptenos.

Anticuerpo Monoclonal: Se refiere a un anticuerpo producido por un único clon de Linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes cadena ligera y pesada de un único anticuerpo.

Multiplexación: Se refiere a la detección de múltiples dianas en una muestra sustancialmente de forma simultánea o secuencial, según se desee, utilizando plurales conjugados diferentes. Multiplexación puede incluir la identificación y / o cuantificación de ácidos nucleídos en general, ADN, ARN, péptidos, proteínas, tanto individual como en cualquier y todas las combinaciones. Multiplexación también puede incluir la detección de dos o más genes, un mensajero y una proteína en una célula en su contexto anatómico.

Nanopartículas: Se refiere a una partícula que tiene al menos una dimensión, como por ejemplo un diámetro, de menos de aproximadamente 100 nanómetros. Las nanopartículas adecuados pueden ser utilizados para diversos fines, incluyendo la visualización y el control y/o modificación de las propiedades térmicas, tales como la transferencia de calor, de una composición. Por ejemplo, las nanopartículas pueden controlar y/o modificar las propiedades térmicas de una composición, y de modificar las propiedades, por ejemplo, la tensión superficial de los fluidos, ya que interactúan con una superficie.

Nanosolución: Una nanosolución es cualquier solución útil para la práctica de un proceso histoquímico que tiene por lo menos una nanopartícula, y potencialmente plural diferentes nanopartículas, en una cantidad eficaz para reducir o eliminar resultados de una tinción anómala, tales como manchas. Una cantidad eficaz puede variar, pero para las realizaciones de trabajo normalmente es desde un valor mayor que cero hasta al menos aproximadamente 25 partes por millón.

Solución de prehibridación: Se refiere a una solución aplicada a las muestras de tejido antes de la etapa de hibridación en los procesos automatizados de hibridación *in situ*. "La solución de prehibridación" incluye "solución de prehibridación primaria" y "solución de prehibridación secundaria".

Solución de prehibridación primaria: Se refiere a una solución acuosa útil para el tratamiento de muestras de tejido antes de la hibridación, incluyendo la fijación de muestras después de deparafinizar. Las realizaciones ilustrativas incluyen (A) una solución acuosa que comprende cloruro de sodio, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio, EDTA, "primer detergente de prehibridación primaria", "segundo detergente de prehibridación primaria", y formalina; (B) una solución que comprende cloruro de sodio 0,15 a 1,5 M, de 8-80 mM de fosfato de sodio dibásico, 2-20 mM de fosfato de sodio monobásico, EDTA 1-10 mM, 0,0125 - 0,125% de primer detergente de prehibridación primaria, 0,0375 - 0,0375 % segundo detergente de prehibridación primaria, y 10-40 % de formalina; y (C) cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, 0,025% primer detergente de prehibridación primaria, 0,0075% de segundo detergente de prehibridación primaria, y 30% de formalina, referido como "RIBOPREP™".

Polipéptido: Se refiere a un polímero que comprende residuos de aminoácidos unidos por enlaces amida. "Polipéptido" y "proteína" abarcan cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glicoproteínas. El término "polipéptido" se emplea específicamente para cubrir proteínas de origen natural, así como aquellas que se producen de manera recombinante o sintéticamente.

Solución de fijación post-hibridación: Se refiere a una solución útil para la fijación de las muestras después de la hibridación en procesos de hibridación *in situ*. Una realización de una solución de fijación post- hibridación es RIBOFIX™, que es idéntica a RIBOPREP™.

Proteína: Se refiere a una molécula, en particular un polipéptido, que comprende aminoácidos.



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

- 5 Muestra: Se refiere a un espécimen biológico que contienen una molécula biológica, tal como ADN, 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 de tejido, muestra quirúrgica, las muestras de la amniocentesis y material de autopsia.
- 10 Segundo detergente de prehibridación primaria: Se refiere a un constituyente de la solución de prehibridación primaria. Segundo detergente prehibridación primaria ejemplares incluyen (A) un detergente no iónico que comprende de polioxietileno (23) lauril éter, que tiene una fórmula molecular de  $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ , donde n es aproximadamente 23, y (B) un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., Producto No. 858366, que se vende bajo la marca comercial BRIJ<sup>®</sup> 35, una marca registrada de ICI Americas, Inc.
- 15 Solución de prehibridación secundaria: Se refiere a un solución de ácido clorhídrico adecuada como un reactivo de pretratamiento secundario empleado en los protocolos de hibridación in situ. Ejemplos de realización de solución de prehibridación secundaria comprenden (A) HCl 0,1-1 N, y (B) una composición de HCl 0,3 N denominado RIBOCLEAR<sup>™</sup>.
- 20 Detergente del segundo lavado: Se refiere a un constituyente de solución de lavado, tales como BRIJ<sup>®</sup> 35.  
  
Solución de distribución del potenciador (SDP): Se refiere a una solución útil para reducir la hibridación no específica y facilitar la cobertura de superficie de deslizamiento inicial para automatizado hibridación de microarreglos. Una realización ejemplar de SDP comprende un tampón (por ejemplo, SSPE) y un detergente no iónico. Las realizaciones particulares de SDP incluyen (A) una composición que comprende 4X-8X SSPE y 8-12% "difundir detergente potenciador;" y (B) una composición que comprende 6X SSPE y 10% detergente de distribución del potenciador, referido como CHIPPREP<sup>™</sup> 1.
- 25 Detergente de distribución del potenciador: Se refiere a un constituyente de solución de distribución del potenciador, tal como un detergente que comprende monolaurato (20) de sorbitán polioxietileno. Una realización particular de un detergente potenciador de la difusión es un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., en 2000, Producto No. 274348, que se vende bajo la marca registrada TWEEN<sup>®</sup> 20.
- 30 SSC: Se refiere a una solución que comprende cloruro de sodio y citrato de sodio.
- 35 SSPE: Se refiere a otro constituyente de la solución de hibridación *in situ*, y que es un tampón común que se utiliza en muchos métodos bioquímicos. SSPE comprende NaCl 3 M, de fosfato monobásico de sodio 40 mM, de fosfato de sodio dibásico 160 mM, y EDTA 20 mM.
- 40 Resto de unión específica: Se refiere un miembro de un par de unión específica. Los pares de unión específica son pares de moléculas que se caracterizan en que se unen entre sí para la exclusión sustancial de la unión a otras moléculas. Ejemplos particulares de restos de unión específicos incluyen proteínas de unión específica (por ejemplo, anticuerpos, lectinas, tales como *streptavidins* *avidins*, y la proteína A), ácidos nucleicos, secuencias y ácidos nucleicos en proteínas.
- 45 Hibridación específica: Se refiere a la formación de híbridos entre un polinucleótido sonda (por ejemplo, un polinucleótido de la invención que pueden incluir sustituciones, delección, y/o adiciones) y un polinucleótido diana específico (por ejemplo, un polinucleótido analito) en el que la sonda se hibrida preferentemente al polinucleótido diana de forma específica y sustancialmente no se hibrida a polinucleótidos que consisten en secuencias que no son sustancialmente idénticas al polinucleótido diana.
- 50 Tinción: Se refiere a cualquier entidad biológica o química, que, cuando se aplica a moléculas específicas en la muestra biológica, hace que las moléculas sean detectables bajo examen microscópico. Las limitaciones incluyen, sin limitación, sondas de ácidos nucleídos detectables, anticuerpos, colorantes y otros reactivos que en combinación o por ellos mismos dan lugar a un producto final coloreado (por campo brillante o metodologías de detección de fluorescencia).
- 55 Hibridación potente: Se refiere a todas aquellas condiciones que normalmente incluirán concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1 M, más habitualmente menos de aproximadamente 500 mM, y preferiblemente menos de aproximadamente 200 mM. Las temperaturas de hibridación pueden ser tan bajas como 5 °C, pero son normalmente mayores de 22 °C, más normalmente mayor que aproximadamente 30 °C, y preferiblemente en exceso de aproximadamente 37 °C.
- 60 Moléculas diana: Se refiere a las moléculas detectables que se encuentran en las células, incluyendo, sin limitación, ácidos nucleídos, proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas.
- 65

Tejido: Se refiere a cualquier colección de células que se pueden montar en un portaobjetos de vidrio estándar de microscopia, incluyendo, sin limitación, las secciones de órganos, tumores secciones, fluidos corporales, frotis, secciones congeladas, preparaciones citológicas, y líneas celulares.

- 5 Tratar o tratamiento: Se refiere a la tinción de un tejido, así como otros procesos asociados con dicha aplicación incluyendo, pero sin limitarse a ellos, calefacción, refrigeración, lavado, enjuague, secado, la inhibición de la evaporación, desparafinizar, condicionado celular, mezclar, incubar, evaporar y cualquiera y todas las combinaciones de tales procesos.
- 10 Solución de lavado: Se refiere a una solución acuosa útil para el lavado de las muestras después de la etapa de hibridación en los procesos de hibridación *in situ* y de hibridación de microarreglos. La solución de lavado es útil para las muestras de lavado o bien cuando se utiliza una sonda de ARN (ribosonda) o una sonda de ADN (oligosonda). Ejemplos de realización de la solución de lavado incluyen (A) una composición que comprende cloruro de sodio, tampón de fosfato, EDTA, y uno o más detergentes no iónicos, (B) una composición que comprende dos detergentes no iónicos, un "primer detergente de lavado" y un "segundo detergente de lavado;" (C) una composición que comprende cloruro de sodio 0,1 - 0,5 M, fosfato de sodio dibásico 5-30 mM, fosfato de sodio monobásico 1-10 mM, EDTA 0,5 - 5 mM, 0,01 a 0,1% de primer detergente de lavado, y 0,0025 - 0,025% segundo detergente de lavado; y (D) una composición que comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, 0,025% de primer detergente de lavado y 0,0075% de segundo detergente de lavado, referida como RiboWash™.

- 10XSSC: Se refiere a una solución con una concentración de 10 molar de cloruro de sodio / solución de citrato sódico, que comprende agua desionizada según sea necesario para preparar un litro de solución, 87,66 gramos de NaCl, 44,12 gramos de sal de ácido cítrico trisódico, ajustada a pH 7,0 con HCl o NaOH, según sea apropiado. Se añade 0,5 ml ProClin 300 como conservante.

## II. Tratamiento histoquímica automatizado de la muestra

- 30 El titular de la presente tecnología, Ventana Medical Systems, Inc., es una autoridad en el campo de las composiciones y métodos para realizar los análisis histoquímicos, así como aparatos automáticos de referencia disponible en el mercado, como los aparatos líderes del mercado de Benchmark XT, Discovery, Discovery XT y Sympony. Varios de los aspectos de los aparatos automatizados para patología molecular, métodos para su uso y composiciones utilizadas para tales métodos, se describen en las Patentes US Nos. 6.045.759, 6.296.809, 6.544.798, 6.582.962, 6.855.552, 6.855.559, 6.933.117, 7.067.325, 7.270.785, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia. Una breve discusión de tales aparatos y métodos para su uso se proporciona a continuación.

- Los aparatos automáticos están diseñados para teñir de forma automática o de otro modo tratar muestras el tejido montadas en el microscopio con un reactivo apropiado, los reactivos, o composiciones de los mismos, en una secuencia deseada, durante un tiempo particular y a una temperatura efectiva para proporcionar el resultado deseado. Las secciones de tejido teñidas, entonces se observan por un médico bajo un microscopio. Los aparatos automatizados también incluyen normalmente otros componentes, tales como un ordenador anfitrión, un monitor, un dispositivo de entrada, tal como un teclado y un ratón, recipientes para coleccionar fluidos, por lo menos un contenedor de residuos y algún equipo relacionado. Los módulos de tinción adicionales u otros instrumentos pueden añadirse para formar una red.

- 45 Una configuración ejemplar de un aparato automatizado se describe en la patente de Estados Unidos número 6.045.759, así como generalmente está disponible en la Guía del usuario Ventana Nexes de Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, Ariz.), que también se incorpora aquí a modo de referencia. El aparato es un instrumento de tinción controlado por microprocesador. Un carrusel de láminas de soporte portaobjetos de vidrio posicionadas radialmente se hace girar por medio de un motor paso a paso para colocar cada lámina debajo de uno de una serie de dispensadores de reactivos. Los aparatos controlan la dispensación de reactivos, lavado, mezcla, y calefacción. El carrusel de portaobjetos puede incluir una pluralidad de plataformas térmicas que están montadas radialmente alrededor del perímetro de un carrusel sobre el cual se pueden colocar los portaobjetos de vidrio estándar con las muestras de tejido. Una placa de circuito se incorpora también al carrusel de portaobjetos para supervisar los sensores y controlar los calentadores. Para ciertas realizaciones descritas en el sistema de calefacción de láminas calienta rápidamente el área útil de la corredera a aproximadamente 95 °C en menos de dos minutos. Un procesador controla la temperatura de las láminas mediante la modificación del calor a las láminas para que la temperatura de las mismas pueda estar a la temperatura deseada. Si la temperatura de la corredera es menor que la temperatura deseada, se activa un calentador de portaobjetos. Si la temperatura de la corredera es mayor que la temperatura objetivo, se activa un refrigerador.

- Un carrusel de reactivo incluye dispensadores de reactivos para la distribución de los reactivos en portaobjetos. Los reactivos pueden incluir cualquier químico o material biológico convencionalmente aplicado a las láminas que incluyen sondas de ácidos nucleídos o cebadores, polimerasa, anticuerpos primarios y secundarios, enzimas de digestión, pre-fixativos, post-fijadores, la química de lectura, y contratinciones. Para cada lámina procesada por el aparato, se aplica un reactivo o reactivos y luego se incubaron durante un período de tiempo preciso en un entorno de temperatura controlada. Después del período de incubación apropiado, el reactivo se lava fuera de la lámina

utilizando boquillas de dispensación de lavado. Restante del volumen de tampón de lavado se ajusta mediante un ajuste de volumen de la boquilla. La solución Coverslip™ se aplica para inhibir la evaporación utilizando una tobera de distribución. Estos pasos se repiten a la vez que el carrusel gira hasta que se completa un protocolo deseado.

- 5 Los aparatos automatizados para histoquímicas se pueden utilizar para llevar a cabo la hibridación *in situ* (HIS), PCR *in situ*, inmunohistoquímica (IHQ), técnicas de tinción de tejidos con otros productos químicos (no hay Biológicos), etc. Muchos de los pasos del proceso deben ser cuidadosamente controlados para una temperatura por periodo de tiempo preciso. Diferentes muestras pueden requerir diferentes temperaturas dependiendo del proceso que se utiliza, de cómo se preparó el tejido y se fijó, etc. Por ejemplo, el calentamiento del tejido en una solución acuosa adecuada mejora la accesibilidad de la molécula diana a la mancha (por ejemplo, proteína, ácido nucleico, hidratos de carbono, lípidos, o una molécula pequeña). Por ejemplo, un tampón citrato es una solución de condicionamiento adecuada para: ADN, a una temperatura de hasta aproximadamente 95 °C; para dianas proteicas a una temperatura de hasta aproximadamente 100 °C, durante aproximadamente 42 minutos; y para dianas de ARN a una temperatura de hasta aproximadamente 75 °C durante aproximadamente una hora. Muchos reactivos o composiciones celular condicionado alternativos, además de tampón citrato, se pueden utilizar, incluyendo los descritos específicamente en este documento, así como la sección de definiciones.

### III. Soluciones de proceso que comprende nanopartículas

- 20 Recientemente, resultados de tinción anómala, en particular manchas, no se observaban cuando se llevaban a cabo ciertas etapas del proceso histoquímico, utilizando aparatos de proceso histoquímicas automatizados, como se ejemplifica para el condicionado celular a una temperatura mayor que la ambiental, sin necesidad de utilizar soluciones que comprendan nanopartículas. Véase, por ejemplo la FIG. 1, que es una fotografía de tejido de cerebro de bovino teñido donde se ilustra la presencia de manchas. La FIG. 2 también ilustra la producción de manchas cuando se tiñe placenta humana. En consecuencia, se dan a conocer formas de realización de la presente invención que se refieren a nanosoluciones histoquímicas y formas de realización de un método para hacer y usar tales nanosoluciones histoquímicas para hacer frente a la aparición de manchas no deseadas. Por ejemplo, dan a conocer formas de realización que se refieren a cualquier solución de proceso utilizada durante un proceso de tinción, hibridación *in situ* (HIS), PCR *in situ*, inmunohistoquímica (IHQ), etc., así como una variedad de técnicas de tinción de tejidos con reactivos químicos (no biológicos), donde una nanopartícula, o nanopartículas, se añaden para reducir o eliminar las manchas. Las nanosoluciones histoquímicas se utilizan, incluso más particularmente en las etapas de proceso, particularmente los procesos automatizados, que se practican a temperaturas superiores a la ambiente, y más normalmente a una temperatura desde aproximadamente 60 °C a aproximadamente 101 °C. Reactivos o composiciones utilizadas para procesos histoquímicas puede ser suspensiones o soluciones acuosas u orgánicas, pero más normalmente son soluciones acuosas de un solo reactivo o varios reactivos.

- La adición de nanopartículas a un fluido mejora sustancialmente la capacidad del fluido para transferir el calor. Véase, por ejemplo, LC. Bang et al., "Boiling Heat Transfer Performance and Phenomena of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-water Nanofluids from Plain Surface in a Pool", Int. J. Misa Heat Transfer 48, pp. 2.407 a 2419 (2.005). El uso de soluciones de procesamiento histoquímicas que incluyen nanopartículas elimina sustancialmente la aparición de manchas. Ver Fig. 3. Por lo tanto, de acuerdo al método de la presente invención las nanopartículas se pueden añadir a diversos aditivos, tampones, reactivos, condicionadores celulares, etc., para mejorar la capacidad de tales materiales para su uso en los análisis histoquímicos. Las soluciones de procesamiento a modo de ejemplo, y nanopartículas también a nombre de ejemplo adecuados para preparar soluciones nano histoquímicas, se discuten con más detalle a continuación.

#### A. Composiciones de condicionamiento celular

- 50 Para dianas de ADN una composición de condicionamiento celular puede ser una solución de EDTA que comprende desde un valor mayor de 0 a aproximadamente 25 ppm de una nanopartícula adecuada. Tales soluciones se usan normalmente en un ajuste de temperatura de aproximadamente 95 °C durante un periodo de tiempo eficaz, de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos.

- 55 Los reactivos utilizados para condicionamiento celular pueden ser los mismos que los empleados para la exposición de la muestra biológica incrustada. Por ejemplo, para dianas de ADN, otro ejemplo de una solución de condicionamiento celular puede ser una solución de SSC que comprende una nanopartícula adecuada desde un valor mayor que 0 a aproximadamente 25 ppm. Tales composiciones normalmente se utilizan a una temperatura de aproximadamente 95 °C durante un tiempo que varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos. Como otra opción, para dianas de ADN la solución de condicionado celular puede ser una solución de citrato de sodio que comprende una nanopartícula adecuada desde un valor mayor de 0 a aproximadamente 25 ppm. Tales composiciones normalmente se utilizan a una temperatura de aproximadamente 90 °C durante un tiempo que varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos.

- 65 Para objetivos de ARN, una solución de condicionamiento celular adecuada puede ser una solución de SSC que comprende una nanopartícula adecuada desde un valor mayor que 0 a aproximadamente 25 ppm. Tales soluciones

se usan normalmente a una temperatura de aproximadamente 75 °C durante un período de tiempo eficaz de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos.

5 Para dianas proteicas, una solución de condicionamiento celular adecuada es una solución tampón de ácido bórico que comprende una nanopartícula adecuada desde un valor mayor de 0 a aproximadamente 25 ppm. Tales soluciones se usan normalmente en un ajuste de temperatura común de más de aproximadamente 100 °C durante un período de tiempo eficaz, tal como de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos. Otro ejemplo de una solución condicionado celular para dianas proteicas es una solución tampón de fosfato que comprende una nanopartícula adecuada desde un valor mayor de 0 a aproximadamente 25 ppm. Tales composiciones normalmente se usan a un ajuste de temperatura común en exceso de 100 °C durante un período de tiempo eficaz tal como de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos. Como otra opción para dianas proteicas, una solución de condicionamiento celular puede ser una solución de urea que comprende una nanopartícula adecuada desde un valor mayor que 0 a aproximadamente 25 ppm. Tales composiciones normalmente se usan a un ajuste de temperatura común de un valor mayor que 100 °C durante un período eficaz que varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos.

20 Para las reacciones histoquímicas, tales como una tinción de hematoxilina y eosina (H & E), se puede tratar con una nanosolución de condicionado celular que comprende una nanopartícula adecuada en agua desionizada a una concentración desde un valor mayor de 0 a aproximadamente 25 ppm. Tales soluciones se usan normalmente a una temperatura de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 80 °C durante un período de tiempo eficaz de aproximadamente 2 a aproximadamente 90 minutos. El dodecil sulfato de sodio (SDS) y / o etilenglicol también se pueden añadir a la solución condicionado.

25 Para las reacciones histoquímicas, como una tinción con tricromo, una nanosolución de condicionado celular puede ser líquido de Bouins [solución acuosa saturada de ácido pícrico 750 ml, 250 ml de formalina 37-40% (formaldehído), 50 ml de ácido acético glacial] que comprende desde un valor mayor que 0 a aproximadamente 25 ppm de una nanopartícula adecuada. Tales composiciones se utilizan a una temperatura de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 80 °C durante un período de tiempo eficaz de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 minutos. Como otra opción para las reacciones histoquímicas, tales como una tinción ácido rápida de bacilo (AFB), una nanosolución de condicionado celular puede ser aceite de cacahuate que comprende una nanopartícula adecuada desde un valor mayor de 0 a aproximadamente 25 ppm y un rango de temperatura es de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C.

35 Para las células enteras, una solución de condicionamiento celular puede ser una nanosolución de un alquil alcohol inferior (10 átomos de carbono o menos), tales como metanol. Tales composiciones se utilizan en condiciones ambientales durante un periodo eficaz que varía de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 minutos. Para todas las composiciones de base acuosa descritas en este documento, tales composiciones también pueden incluir, ya sea como un reemplazo para el agua, o como aditivo además de agua, un alcohol, glicol o poliglicol. Por ejemplo, tales soluciones pueden incluir etilenglicol como un reemplazo del agua o además del agua utilizada para formular tales composiciones.

40 B. Ejemplos de realización de trabajo de composiciones de procesamiento utilizadas con aparatos histoquímicos automáticos

45 Una realización descrita de un condicionador celular (solución de condicionado celular 1 o CC1) utilizados por el cesionario de la presente invención para sus aparatos histoquímicos automatizados es una composición que comprende tampón ácido Tris-borato etilendiaminotetraacético (EDTA), a un pH de aproximadamente 8. La solución CC1 se puede formular como una solución mediante la adición de al menos una nanopartícula a la composición en una cantidad eficaz, por ejemplo, de un valor mayor que 0 a al menos aproximadamente 25 partes por millón,.

50 Una segunda realización descrita de un condicionador celular (solución de células condicionado 2 o CC2) comprende alrededor de 10 mM de tampón citrato a un pH de aproximadamente 6, aproximadamente 5% de etilenglicol, aproximadamente 1 mM metabisulfite de sodio (Morphosave <sup>TM</sup>, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson , Ariz .; patente de EE.UU. n° 5.432.056) y aproximadamente 0,3% de dodecilsulfato de sodio (SDS). La concentración de citrato puede oscilar entre aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM. El pH del tampón puede variar de aproximadamente 4 a aproximadamente 8. La concentración de etilenglicol puede variar de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%. La concentración de metabisulfito de sodio puede variar de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM. La concentración de SDS puede variar de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1%, preferiblemente de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 0,5%. CC2 se puede formular como una nanosolución mediante la adición de una cantidad eficaz de al menos una nanopartícula a la composición, por ejemplo, de un valor mayor que 0 a al menos aproximadamente 25 partes por millón.

A continuación se brindan ejemplos adicionales de nanosoluciones histoquímicas

Tabla 1

Nanosolución EZ prep plus	
Componente	Cantidad
Agua desionizada	Tanta como requiera 1 L
Tritón <sup>®</sup> X-100 (Sigma)	10 mL
ProClin <sup>®</sup> 300 (Sigma)	0,50 ml
Nanopartícula	0-25 partes por millón

Triton<sup>®</sup> X-100 es el tert-octilfenileter de polietilenglicol, con una fórmula molecular t-Oct-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>OH, x= 9-10. ProClin<sup>®</sup> 300 es una composición disponible en Sigma-Aldrich que comprende 2.3% de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one, 0.70 % 2-metil-4-isotiazolin-3-one, 2-3% de un alquil carboxilato and a 93- 95% of a glicol modificado.

Tabla 2

Nanosolución CC plus	
Componente	Cantidad
Agua desionizada	1000 ml
Tris Base (WWR)	1,211 g (10 mM)
Ácido bórico (Sigma)	0,372 g (6 mM)
Sal disódica dihidratada EDTA (Sigma)	0,46 g (0,25 mM EDTA)
Tabla 2 continuación	
ProClin <sup>®</sup> 300 (Sigma)	0,50 ml (0,5 %)
Nanopartícula	0-25 partes por millón

Tabla 3

Nanosolución RiboCC	
Componente	Cantidad
Agua desionizada	1000 ml
Citrato de sodio dihidratado (Sigma)	2,41 g (8,2 mM)
Ácido cítrico monohidratado (Sigma)	0,38 g (1,8 mM)
Tween <sup>®</sup> 20 (Sigma)	1 ml (0,1 %)
ProClin <sup>®</sup> 300 (Sigma)	0,50 ml (0,5 %)
Nanopartícula	0-25 partes por millón

Tween<sup>®</sup> 20 monolaurato de polietilensorbitan

Tabla 4

Nanosolución RiboCC plus	
Componente	Cantidad
Agua desionizada	1000 ml
Citrato de sodio dihidratado (Sigma)	2,41 g (8,2 mM)
Ácido cítrico monohidratado (Sigma)	0,38 g (1,8 mM)
ProClin <sup>®</sup> 300 (Sigma)	0,50 ml (0,5 %)
Nanopartícula	0-25 partes por millón

#### C. Nanopartículas.

Las nanopartículas empleadas en el método de la presente invención son alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), de sílice (SiO<sub>2</sub>), óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), y combinaciones de los mismos. Las nanopartículas normalmente preferidas en función de la disponibilidad, el costo y la reducción del punto, son nanopartículas de sílice. Las nanopartículas se añaden a diversas composiciones útiles para llevar a cabo análisis histoquímicos, tales como composiciones celular condicionado, en concentraciones adecuadas para llevar a cabo tales análisis.

Para las realizaciones descritas, una nanopartícula, o combinaciones de las nanopartículas, se puede añadir a tales composiciones a una concentración de más de cero hasta al menos aproximadamente 25 ppm, más normalmente de aproximadamente 2 ppm a aproximadamente 20 ppm, e incluso más normalmente de aproximadamente 2,5 ppm a aproximadamente 15 ppm. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que estas concentraciones pueden variar a la establecida, siempre y cuando tales concentraciones (1) no impiden o interfieren con la realización con éxito el análisis patológico molecular deseado, y (2) de manera deseable para reducir o eliminar sustancialmente el número medio de manchas de tinción que se producen en relación con composiciones que no incluyen la nanopartícula o nanopartículas.

## IV. Ejemplo

El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar características particulares de determinadas formas de realización de trabajo. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica apreciará que el alcance de la invención no está limitada a las características particulares descritas por este ejemplo.

## Ejemplo 1

Láminas de tejido de cerebro de vaca (30 láminas) estaban preparadas. En general, las muestras de tejido fueron fijadas en formol, embebido en parafina, cortada en bruto en cubos de aproximadamente de una pulgada, cortados en secciones de 8 micras, y se colocaron en portaobjetos de vidrio.

Se utilizó un instrumento Benchmark o XT Benchmark, para procesar aún más las láminas. Las muestras de tejido montadas en láminas se desparafinizaron utilizando la solución EZ Prep, seguido de condicionamiento celular con una solución de condicionado celular como se indica en la siguiente Tabla 5. El análisis histoquímico a continuación, se llevó a cabo. Para cada una de varias composiciones de reactivos probados, un primer grupo de láminas se preparó usando una composición de condicionamiento celular, tales como CC1, pero sin la adición de nanopartículas para establecer un control para el número medio de manchas por portaobjetos, y la desviación estándar de los mismos. A partir de entonces, se utilizaron para realizar los análisis histoquímicos varias nanosoluciones, como se indica a continuación en la Tabla 5, donde se resumen los resultados.

Tabla 5		
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE TINCIÓN		
Composición	Promedio de manchas totales	Desviación estándar de manchas totales
1. CC1 (lote 540818)	12,7	6,4
2. CC1 (lote 540818) + 2,5 mg/L TiO <sub>2</sub>	9,6	5,1
3. CC1 (lote 540818) + 2,5 mg/L Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,0	1,7
4. CC1 (lote 537661)	13,1	4,7
5. CC1 (lote 537661) + 15 mg/L Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,3	1,3
6. CC1 y un nuevo bloque de tejido	8,4	4,0
7. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 5 mg/L Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,6	0,5
8. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 10 mg/L Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,2	0,8
9. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 5 mg/L TiO <sub>2</sub>	4,2	2,7
10. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 10 mg/L TiO <sub>2</sub>	3,0	2,3
11. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 2,5 mg/L SiO <sub>2</sub>	3,0	1,8
12. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 5 mg/L SiO <sub>2</sub>	2,7	2,4
13. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 10 mg/L SiO <sub>2</sub>	2,1	2,1
14. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 15 mg/L SiO <sub>2</sub>	1,8	2,0
15. CC1 y un nuevo bloque de tejido + 15 mg/L TiO <sub>2</sub>	2,0	2,1
16. 10 mg/L SiO <sub>2</sub> con anticuerpo 1:400	1,1	1,1
17. Línea base de anticuerpo <sup>2</sup> a 1:400	2,0	1,6
18. Línea base de anticuerpo a 1:100	NA	NA
19. Línea base de anticuerpo a 1:400	0,9	1,0
20. Línea base de anticuerpo a 1:100	2,6	2,3
21. Línea base de anticuerpo a 1:100	NA	NA
22. Línea base de anticuerpo a 1:100	3,2	3,1
23. CC1 + anticuerpo a 1:100	1,3	1,9
24. CC1 + anticuerpo a 1:400	0,3	0,7
23. CC1 plus + anticuerpo a 1:100 + 10 ppm TiO <sub>2</sub>	0,8	1,0
24. CC1 plus + anticuerpo a 1:400 + 10 ppm TiO <sub>2</sub>	0,0	0,0

Para los resultados de las pruebas reportadas, se requirieron cientos de láminas para replicar (de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 ensayos / condición) diferentes condiciones ensayadas. Esto requiere el uso de diferentes bloques de tejido, es decir, nuevos. Sólo se utilizó un anticuerpo (ubiquitina): "anticuerpo de línea base". El anticuerpo se usó a dos diluciones, 1:100 y 1:400, con 1:400 como la dilución probable utilizada para las realizaciones comerciales. La dilución 1:100 se utilizó como el "peor escenario" de forma deliberada sobre la tinción, haciendo puntos más fáciles de identificar. "Anticuerpo de línea de base" se refiere al "nuevo bloque de tejido". Cada nuevo bloque de tejido se tiñó con cada una de las dos diluciones de anticuerpo, usando las condiciones de tinción estándar. Después de eso, cada nueva condición se comparó con la obtenida de la línea de base para el bloque de tejido. Los datos proporcionados por el cuadro 5 establece claramente que el uso de nanosoluciones para el análisis histoquímico disminuye sustancialmente el número promedio de puntos por lámina.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de procesamiento de una muestra biológica que comprende:

Suministrar la muestra biológica;

5 Aplicar una composición acuosa de proceso histoquímico a la muestra, la composición comprendiendo desde un valor mayor de cero hasta 25 partes por millón de al menos una nanopartícula seleccionada de entre alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), sílica ( $\text{SiO}_2$ ), titania ( $\text{TiO}_2$ ), o las combinaciones entre ellas, en una cantidad efectiva para reducir el número promedio de áreas de intensidad reducida por lámina; teñir la muestra biológica, y desarrollar al menos un paso histoquímico adicional.

10 2. El método de acuerdo a la reivindicación 1 donde desarrollando un proceso histoquímico comprende el condicionamiento celular de la muestra usando una composición de condicionamiento celular.

3. El método de acuerdo a la reivindicación 1, donde la muestra biológica y la composición para el procesamiento histoquímico son calentadas a una temperatura desde 60 °C hasta 101 °C.

4. El método acorde con la reivindicación 1 donde la composición tienen una concentración de nanopartícula desde 2 partes por millón hasta 20 partes por millón.

15 5. El método de acuerdo a la reivindicación 1 donde la composición tiene una concentración de nanopartículas desde 2,5 partes por millón hasta 15 partes por millón.

20 6. Uso de una composición acuosa que comprende más de cero y menos de 25 partes por millón de al menos una nanopartícula seleccionada del grupo de alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), sílica ( $\text{SiO}_2$ ), titania ( $\text{TiO}_2$ ), o las combinaciones entre ellas, para desarrollar un proceso histoquímico que incluye el paso de tinción para reducir el número promedio de áreas de intensidad reducida por lámina.

7. Uso de acuerdo a la reivindicación 6, donde la composición comprende un agente de condicionamiento celular.

8. Uso de acuerdo a la reivindicación 7 donde el proceso histoquímico se lleva a cabo sobre una muestra biológica que comprende un ácido nucleído y donde la composición de condicionamiento celular comprende EDTA, SSC, ácido cítrico, o una combinación de ellos.

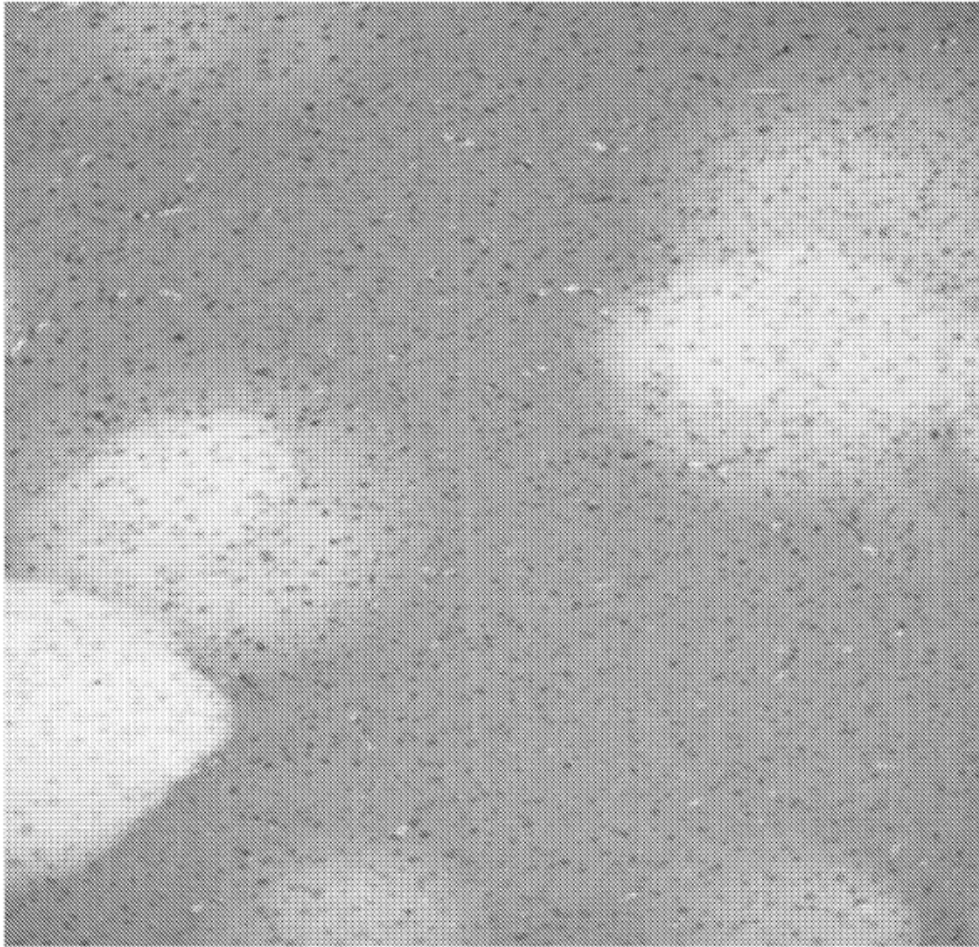
25 9. Uso de acuerdo a la reivindicación 8 donde el ácido nucleído es ADN y la composición de condicionamiento celular comprende EDTA.

10. Uso de acuerdo a la reivindicación 8 donde el ácido nucleído es RNA y la muestra de condicionamiento celular comprende SSC.

30 11. Uso de acuerdo a la reivindicación 7 donde el proceso histoquímico se lleva a cabo sobre una muestra biológica que comprende una proteína y la composición de condicionamiento celular comprende tampón fosfato, solución tampón de ácido bórico, urea o una combinación de ellas.

12. Uso de acuerdo a la reivindicación 6, donde la composición comprende tampón de ácido TRIS borato etileno diamina tetraacético (EDTA), a un pH de aproximadamente 8.





**FIG. 1**

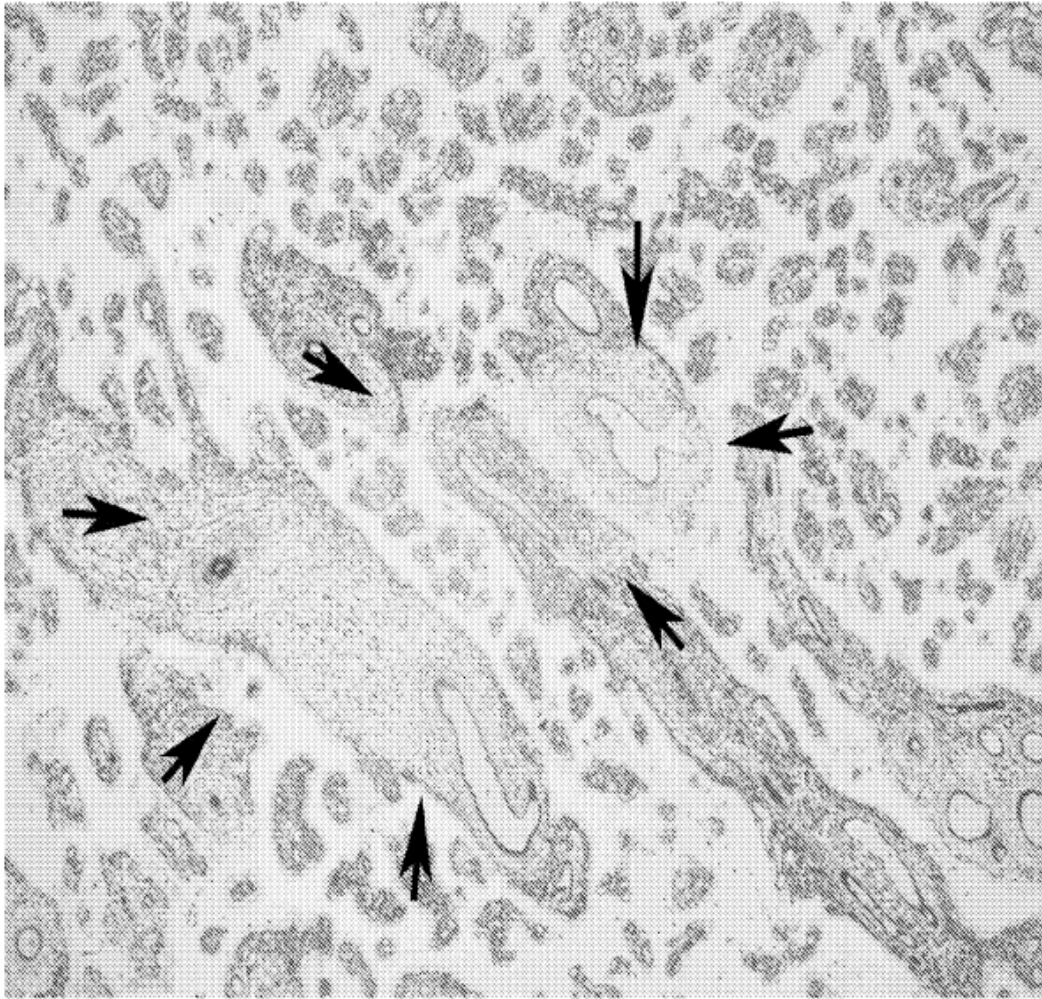
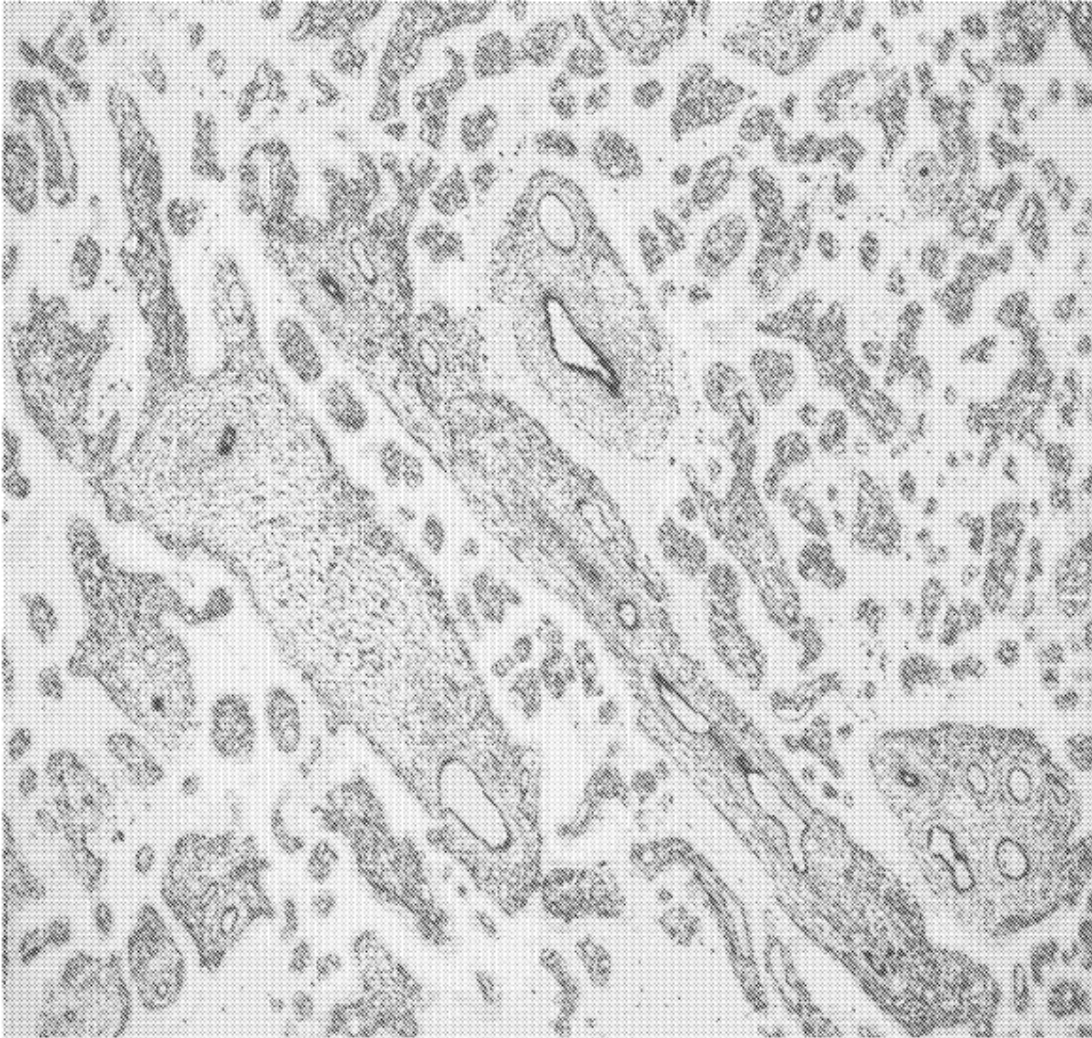


FIG. 2



**FIG. 3**