



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 405**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 1/31 (2006.01)

G01N 1/36 (2006.01)

B01J 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04748692 .3**

86 Fecha de presentación : **30.06.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1644715**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Método para la preparación de muestras histológicas.**

30 Prioridad: **30.06.2003 EP 03077047**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es:
ACADEMISCH ZIEKENHUIS GRONINGEN
Oostersingel 59
NL-9713 EZ Groningen, NL

72 Inventor/es: **Bleuel, Erik, Peter y**
Hofland, Gerard, Willem

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

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

Método para la preparación de muestras histológicas.

5 La presente invención se refiere al proceso de una muestra biológica desde la fijación hasta la impregnación para análisis histológico. En particular, se refiere a un sistema de proceso automatizado rápido y seguro que pueda ser llevado a cabo de manera continua y que elimine la utilización de solventes tóxicos e inflamables tales como el xileno.

10 Los métodos convencionales para la preparación de una muestra (por ejemplo un tejido) para histología incluyen la incubación en soluciones separadas de formaldehído al 10% tamponado con fosfato para fijación, incubación en serie de concentraciones crecientes de alcohol para deshidratación, e incubación en xileno para eliminar del tejido el agente de deshidratación, antes de la impregnación. Debido al tiempo requerido para realizar dicho proceso, a menudo mayor a 8 horas, se acostumbra a completar dichas etapas separadas -fijación, deshidratación, aclarado, e impregnación- durante la noche en instrumentos mecánicos automatizados diseñados para dichas tareas (ver, por ejemplo, los documentos
15 US3.892.197; US4.141.312; y US5.049.510).

El objetivo perseguido por el proceso de tejidos es proporcionar un muestra con soporte interno y externo a partir de un medio con rigidez similar a efectos de que dicha muestra pueda soportar una microtomía sin sufrir daños. El medio de soporte o de embebido más común es la parafina, pero también se utilizan muchas otras sustancias. Una
20 microtomía es un proceso de corte o seccionamiento de una muestra embebida formando láminas delgadas de 2 a 8 micrones de espesor, aproximadamente, con una cuchilla de acero afilada en un micrótopo. A continuación, las láminas son montadas en portaobjetos, normalmente en portaobjetos para microscopio.

Los procedimientos estándar de proceso con parafina incluyen la exposición a una deshidratación química a través de soluciones de alcohol progresivas, luego la inmersión en una solución de transición (comúnmente denominado agente de aclarado) seguida por una impregnación con parafina. Deshidratación quiere decir eliminación del agua. Durante procedimientos de proceso, la deshidratación es utilizada para eliminar las moléculas de agua libres y, si se lleva a cabo de forma correcta, también las moléculas de agua ligadas. Normalmente, la deshidratación es
25 lograda utilizando soluciones de alcohol; más habitualmente etanol, isopropilalcohol (isopropanol); ocasionalmente metanol; o butanol para tejidos animales y vegetales. Si las muestras son deshidratadas de manera inapropiada y se deja agua en la muestra, el agente de aclarado y el agente de impregnación (por ejemplo parafina) no penetrarán en el tejido y será blando y esponjoso. Una deshidratación excesiva eliminará las moléculas de agua ligadas, produciendo muestras contraídas, rígidas y quebradizas que requieren una rehidratación excesiva antes de realizar un seccionamiento.

35 Las grasas en una muestra de tejido son eliminadas con un solvente dado que dichas grasas impiden el aclarado y la impregnación. Una eliminación de las grasas (desengrasado) inapropiada puede resultar en la dispersión en artefactos de las secciones de tejido, arrugamiento de secciones de tejido, y una tinción deficiente. Las grasas pueden ser eliminadas de la muestra de tejido con numerosos solventes tales como, por ejemplo, acetona, cloroformo o xileno.

40 A continuación de la deshidratación de una muestra, se utiliza un agente de "aclarado" para eliminar el alcohol utilizado para la deshidratación de la muestra y para preparar la muestra para el medio de impregnación. Los agentes de aclarado, también denominados agentes de "desalcoholización", deben ser miscibles con el agente deshidratante y el medio de impregnación/embebido. Un aclarado inadecuado, que puede ser causado por agua remanente en la muestra o por tiempos de exposición inapropiados, produce una infiltración escasa de parafina que resulta en muestras blandas y esponjosas. Por otro lado, una exposición excesiva a agentes de aclarado producirá muestras rígidas y quebradizas a causa de la desnaturalización de las proteínas del tejido que es muy similar al efecto de la deshidratación excesiva.

50 El xileno (dimetilbenceno) ha sido el agente de aclarado más ampliamente utilizado durante muchos años. Éste es un hidrocarburo aromático que reemplaza rápidamente el alcohol y tiene un índice de refracción capaz de hacer transparente el tejido. Un gran inconveniente del xileno es que su utilización es muy complicada, dado que es altamente volátil, inflamable y sospechoso de ser cancerígeno. Por lo tanto, el xileno debería ser utilizado sólo con una ventilación adecuada, y evitarse el contacto con la piel. Además, el xileno es costoso.

55 Se han buscado de forma activa reemplazantes efectivos para el xileno. Un primer sustituto que fue presentado en 1981 fue el limoneno. Desafortunadamente, dicho agente químico ha echado sombra sobre el tema debido a varias cuestiones. El limoneno es aceitoso y no puede ser reciclado de forma fiable (la solución reciclada es diferente del producto original). Su olor es muy intenso y penetra rápidamente en habitaciones y salas adyacentes. Más complicado es el hecho de que produce graves reacciones de sensibilización en trabajadores expuestos a dicho agente. Otros
60 sustitutos del xileno son hidrocarburos alifáticos de cadena corta (alcanos). Los aceites esenciales también pueden ser utilizados como sustitutos del xileno pero no son tan comunes. Sin embargo, ninguno de dichos sustitutos del xileno ha probado ser tan útiles y efectivos en materia de costes como el xileno.

Los procedimientos convencionales para el proceso de tejidos pueden ser llevados a cabo manualmente o de manera
65 automatizada. La mayoría de los laboratorios de histopatología en la actualidad utilizan máquinas de proceso de tejido automáticas, que utilizan múltiples contenedores y requieren entre 6 y 20 horas para el proceso. Los dispositivos de proceso de tejido automatizado que implementan dichos procesos convencionales son fabricados y comercializados,

por ejemplo, por Shandon (modelos HYPERCENTER Y PATHCENTRE), Miles-Sakura (modelos TISSUE-TEK), y Mopec-Medite (modelo TPC15).

Una desventaja de dichos sistemas de la técnica anterior es que dichos sistemas automatizados no han sido capaces de garantizar una producción continua. A partir del tiempo necesario para completar el proceso del tejido, los casetes que contienen dichos tejidos son cargados en el sistema durante el día y el proceso de los tejidos es completado en un ciclo nocturno. Por lo tanto, el funcionamiento de los sistemas de la técnica anterior no permite que los casetes que contienen tejido sean procesados hasta el final durante el día laboral.

De manera típica, dicha metodología convencional requiere el envío de muestras de tejido desde la sala de operaciones, oficina médica u otros lugares, hasta un laboratorio de patologías en algún momento durante el día laboral, seguido por el proceso nocturno por lotes de dichas muestras, de manera que una muestra de tejido apropiada para bloqueo y seccionamiento está disponible en el mejor de los casos durante la mañana del día siguiente; y que el patólogo bloqueada y seccionada sólo es posible más tarde durante el día siguiente. Este proceso requiere como mínimo 24 horas entre la recepción de la muestra y la entrega del informe del patólogo.

Además de la demora de un día experimentada por el médico (por ejemplo un cirujano) para obtener el beneficio del informe del patólogo, también existen problemas asociados con el flujo de trabajo dificultoso en el laboratorio patológico a causa del proceso por lotes de las muestras, las implicaciones en cuanto a seguridad por la existencia de instrumentos trabajando durante la noche, el riesgo de posibles fallos de dichos instrumentos y la necesidad de monitorear dichos instrumentos, y el gasto desproporcionado por la utilización de grandes volúmenes de reactivos para dicho proceso automatizado. Además, son necesarias costosas mediciones para impedir la exposición del personal del laboratorio a gases nocivos y sustancias tóxicas asociadas con los reactivos (tal como el xileno) utilizados en dicho proceso. Además, los grandes volúmenes de desechos de solvente y detritos de parafina producidos por la metodología convencional contaminan el medio ambiente si no son desechados de forma apropiada.

Existe, por lo tanto, un interés siempre presente en facilitar el proceso y análisis de tejidos con fines de diagnóstico. Además, el enfoque reciente en la atención sanitaria se ha dirigido a la reducción de los costos de varios procedimientos incluyendo el proceso de tejidos. Los costos del proceso de tejidos están relacionados con el tiempo necesario para el proceso y el análisis de las muestras, el espacio necesario para el personal y el equipamiento en el laboratorio, el volumen de reactivos (tanto el precio de compra de los productos químicos puros y los costos para eliminar los desechos), y la cantidad de personal necesario. Lo que es más importante, los pacientes y sus médicos dependen de la evaluación y diagnóstico a cargo de los patólogos para guiar el tratamiento. La reducción de la cantidad de tiempo necesario para completar el proceso de tejidos reduciría la ansiedad experimentada durante el período existente entre la obtención de la muestra y la entrega al médico del informe del patólogo. Por lo tanto, resulta deseable una reducción significativa en el tiempo requerido para el proceso de una muestra histológica. Otras personas también han reconocido la necesidad de acortar el tiempo requerido para el proceso de tejidos, pero han logrado mejoras modestas en los métodos convencionales. Para acelerar el proceso de tejidos, las Patentes U.S. N°4.656.047, 4.839.194 y 5.244.787 utilizan energía de microondas; las Patentes U.S. N° 3.961.097 y 5.089.288 utilizan energía de ultrasonido; y la Patente U.S. N° 5.023.187 utiliza energía de infrarrojos. La Patente U.S. N° 5.104.640 da a conocer una composición no acuosa como agente de fijación, un agente estabilizador, y un agente de solubilización que adhiere una mancha de sangre a un portaobjetos.

Los inventores de la presente invención dan a conocer un método para el proceso de tejidos de una manera distinta a cualquier procedimiento utilizado en la actualidad. Es un método para el proceso de una muestra biológica para análisis histológico (o patológico), que comprende las etapas de poner en contacto la muestra con una composición que comprende un fluido supercrítico o casi supercrítico y a continuación impregnar la muestra con un medio de embebido bajo presión de más de 1 bar.

Un método de acuerdo con la presente invención es más rápido que cualquiera de los métodos citados anteriormente, produce daños mínimos al tejido procesado, evita la utilización de solventes orgánicos incluyendo el xileno, hace uso de cantidades mínimas de reactivos y, sorprendentemente, resulta en una muestra de calidad superior para análisis citológicos, histológicos o anatómicos subsiguientes. Además, con un método de acuerdo con la presente invención ya no es necesaria la utilización de contenedores (plásticos) de gran tamaño con un líquido inflamable tal como son el etanol y el xileno.

Un fluido supercrítico, algunas veces llamado fluido de gas supercrítico o "fluidum", es cualquier sustancia por encima de su temperatura supercrítica (T_c) y su presión supercrítica (P_c). Para cualquier sustancia, existe una temperatura sobre la cual ya no existe como líquido, independientemente de cuál sea la presión aplicada. Del mismo modo, existe una presión sobre la cual la sustancia no puede existir en forma de gas independientemente de cuánto se eleve la temperatura. Este punto es llamado el punto supercrítico; la temperatura crítica y la presión crítica son los límites de definición en un diagrama de fases para una sustancia pura.

En la zona supercrítica existe sólo un estado del fluido. Un fluido supercrítico presenta propiedades fisicoquímicas intermedias entre las propiedades de los líquidos y las propiedades de los gases. Los fluidos supercríticos (también conocidos como gases altamente condensados) son capaces de extenderse por una superficie más fácilmente que un verdadero líquido debido a que tienen menor tensión superficial que los líquidos. Al mismo tiempo, un fluido

supercrítico mantiene la capacidad de un líquido para disolver sustancias que son solubles en los compuestos, cosa que un gas no puede realizar.

De acuerdo con la presente invención, una muestra (tejido) es puesta en contacto con, o rodeada por, un fluido supercrítico, comprendiendo someter a presión la muestra con la composición que comprende un fluido (casi) supercrítico por encima de la presión crítica (P_c) del fluido supercrítico y el calentamiento de la muestra con el fluido supercrítico por encima de la temperatura crítica (T_c) de dicho fluido supercrítico. El fluido supercrítico penetra en una muestra a medida que atraviesa dicha muestra en un recipiente de alta presión. Es posible que no siempre sea necesario utilizar una sustancia que esté en o sobre su punto supercrítico (es decir, su T_c y P_c), siempre que las propiedades (especialmente la solubilidad) de la sustancia sean utilizadas en un método para proceso histológico. Por ejemplo, un fluido casi supercrítico, que está a presión y temperatura cercanas al punto supercrítico, puede ser utilizado de forma ventajosa en un método dado a conocer en el presente documento. De acuerdo con la presente invención, el término “fluido casi supercrítico” queda definido como un fluido a temperatura dentro del rango comprendido entre 0,7 y 1,4 veces su T_c y una presión dentro del rango comprendido entre 0,3 y 7 veces su P_c .

En una realización preferente de la presente invención, una muestra es puesta en contacto con una composición que comprende dióxido de carbono (CO_2) (casi) supercrítico. La presión supercrítica del CO_2 es de 7,3 MPa (73 bar) aproximadamente, y la temperatura supercrítica es de 31° Celsius aproximadamente. Los tejidos biológicos contienen proteínas que son desnaturalizadas por temperaturas por encima de los 60°C aproximadamente. La temperatura supercrítica relativamente baja del CO_2 permite poner en contacto una muestra con un fluido supercrítico a una temperatura que esencialmente no tiene efectos perjudiciales para dicha muestra biológica. Sin embargo, otros fluidos (casi) supercríticos con una temperatura supercrítica relativamente baja (preferentemente menor de 60°C) también son apropiados para ser utilizados en un método de acuerdo con la presente invención, por ejemplo xenon, óxido nitroso, etano, HFC-116, clorotrifluorometano, etileno, hexafluoruro de azufre y trifluorometano. El CO_2 resulta extremadamente atractivo para aplicaciones industriales debido a que es el segundo solvente en abundancia en la tierra y el segundo menos costoso. No es inflamable, no es tóxico, y está disponible fácilmente con alta pureza.

Un medio de soporte o medio de embebido proporciona a la muestra soporte mecánico de manera que puedan prepararse secciones, por ejemplo para examen microscópico. Un medio de embebido preferente de acuerdo con la presente invención es un medio de embebido líquido, por ejemplo parafina líquida. La parafina ha sido seleccionada como medio de embebido en los ejemplos dados en el presente documento, dado que es soluble en CO_2 supercrítico (o a la inversa, el CO_2 es soluble en parafina), poco costoso, fácil de manipular, y el seccionamiento en cintas está facilitado por la coherencia de las estructuras proporcionadas por dicho material. Otros materiales de embebido o impregnación apropiados son las fórmulas de cera comercial, mezclas de ceras con distintos puntos de fusión (por ejemplo, aceite mineral líquido y parafina sólida), paraplast, bioloid, embedol, plásticos y materiales similares.

De acuerdo con la presente invención, de manera típica una muestra es sumergida primero en etanol u otro tipo de agente deshidratante a efectos de reemplazar el agua en la muestra. Luego, la muestra es presurizada con un fluido (casi) supercrítico para eliminar el agente deshidratante, tal como por ejemplo el etanol. En condiciones (casi) supercríticas, el agente deshidratante y el fluido son miscibles, es decir, se disuelven completamente uno en el otro, independientemente de cuáles sean las proporciones de los componentes. De manera subsiguiente, el fluido (casi) supercrítico es reemplazado filtrando un medio de embebido al mismo tiempo que se mantiene una alta presión, es decir una presión por encima de la presión de 1 bar (1 atmósfera, 1 kg/cm²). El fluido (casi) supercrítico dentro de la muestra es disuelto en el medio de embebido mientras que al mismo tiempo está siendo reemplazado de manera gradual por la parafina. La alta presión durante la etapa de infiltración asegura que no quede gas atrapado en el tejido y que las estructuras celulares permanezcan intactas. Preferentemente, la presión aplicada es como mínimo de 50 bar, de manera más preferente es como mínimo de 100 bar, por ejemplo 120 ó 150 bar o incluso una presión más alta, tal como por ejemplo una presión de 200 bar aproximadamente. De manera general, cuanto mayor es la presión aplicada, mayor es la solubilidad del fluido (casi) supercrítico en el medio de embebido y con mayor eficiencia será reemplazado el fluido por el medio de embebido. Por ejemplo, se ha observado que la solubilidad del CO_2 en parafina líquida es de aproximadamente el 15% en peso a 80 bar y 55°C, aproximadamente el 30% (peso/peso) a 120 bar y el 50% a 180 bar. La temperatura a la que la impregnación de acuerdo con la presente invención puede ser llevada a cabo puede variar y depende, entre otras cosas, del medio de embebido utilizado. De manera típica, se selecciona una temperatura por encima del punto de fusión del medio de embebido. En el caso de la parafina, esta temperatura es de 56 a 58°C. Sin embargo, bajo condiciones de alta presión el punto de fusión por lo general se reduce. Por ejemplo, a una presión de 110 bar, la parafina comienza a fundir a 51°C y está completamente fundida a 57°C. Cuando se aumenta la temperatura de un reactor que incluye una muestra (ver figura 1) por encima de la temperatura de fusión, aumenta la presión en el reactor. En una realización de la presente invención, una muestra es puesta en contacto con CO_2 a una presión de 150 bar y aproximadamente 40°C durante 0,5-1 hora para eliminar el etanol de la muestra. Subsiguientemente, la muestra es calentada hasta los 65°C manteniendo la densidad del CO_2 de manera que la presión aumenta hasta los 220-250 bar aproximadamente. Se permite la entrada de la parafina líquida en el reactor, al mismo tiempo que se permite la salida del CO_2 del reactor intentado mantener una presión constante. El reactor es llenado completamente con parafina durante un período de tiempo de 30 minutos aproximadamente, para eliminar y/o disolver el CO_2 de la muestra. Durante dicha etapa del proceso, la presión puede caer, por ejemplo, hasta los 100-140 bar. Una vez que la muestra está completamente sumergida en parafina, la presión puede disminuir de forma gradual para permitir la difusión del CO_2 desde el tejido hacia la parafina y evitar que queden burbujas de CO_2 atrapadas en el tejido.

Una vez que la muestra es despresurizada, puede resultar ventajoso dejar las muestras durante un período de tiempo (por ejemplo 10-60 minutos) dentro de la parafina en caliente.

Los fenómenos de solubilidad mejorada en fluidos supercríticos se conocen desde finales del siglo XIX. Durante décadas han sido utilizados en las industrias de proceso de alimentos para extraer compuestos saborizantes tales como la cafeína y el aceite de lúpulo. El poder solubilizante de los fluidos supercríticos es sensible a pequeños cambios en las condiciones de funcionamiento, y es posible ajustar de forma fina la presión y la temperatura para determinar la capacidad como solvente de un fluido supercrítico para un proceso determinado. Las propiedades deseadas y únicas de los fluidos supercríticos han impulsado la aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos en varios otros ámbitos, por ejemplo la limpieza de telas o el saneamiento de tierras contaminadas.

La extracción mediante fluidos supercríticos ha sido utilizada en métodos para la preparación de tejidos esterilizados para incorporación en injertos heterólogos y dispositivos bioprotésicos. La Solicitud de Patente U.S. N° US2003/0072677 da a conocer la utilización de fluidos supercríticos para eliminar materiales infecciosos de tejidos y para tratar el tejido con un agente químico. A diferencia de la presente invención, la patente US2003/0072677 no se refiere al proceso de muestras para realizar exámenes adicionales, ni a la aplicación de fluidos supercríticos en procedimientos histológicos (embebido). La Patente U.S. N° 6.493.964 da a conocer un aparato de secado de punto crítico para preparación de muestras en microscopia de electrones y producción de obleas semiconductoras. Utiliza la técnica de sustitución de un fluido supercrítico de "transición" por el fluido deshidratante en la estructura celular y luego la eliminación del fluido de transición. Sin embargo, el documento US 6.493.964 no se refiere a la impregnación de muestras y no da a conocer ni sugiere que los fluidos supercríticos sean utilizados de manera ventajosa como intermedio entre agentes de deshidratación y un medio de embebido manteniendo una alta presión, ni que dicha utilización resulte en una calidad superior de la muestra (ver a continuación) en comparación con los procedimientos convencionales. El documento EP0822403 da a conocer el proceso de tejidos orgánicos como preparación para un examen adicional utilizando un gas inerte a alta presión, de manera que la muestra puede ser tratada a altas temperaturas. La presión puede aumentar introduciendo un gas inerte dentro del contenedor que incluye la muestra de tejido, por ejemplo CO₂. Se menciona que una etapa de deshidratación/aclarado es llevada a cabo preferentemente y simultánea a una presión de hasta 10 bar y a una temperatura entre temperatura ambiente y 90°C. En dichas condiciones, el CO₂ no está en estado supercrítico o casi supercrítico. Por lo tanto, el proceso del documento EP0822403 supone un concepto completamente distinto en comparación con el método de la presente invención y no incluye un fluido (casi) supercrítico. Además, el documento EP0822403 menciona que la impregnación es llevada a cabo preferentemente en condiciones de vacío.

En un método para proceso histológico de acuerdo con la presente invención, una muestra es tratada con un fluido (casi) supercrítico y subsiguientemente impregnado con un medio de embebido en condiciones de alta presión. En una realización, un método de acuerdo con la presente invención comprende además la deshidratación, eliminación de grasas y/o descalcificación de dicha muestra antes de la impregnación. Dichas etapas de proceso adicional pueden ser llevadas a cabo utilizando los procedimientos convencionales mencionados anteriormente en el presente documento. Sin embargo, preferentemente, son llevados a cabo haciendo uso de un fluido supercrítico. En una realización de la presente invención, se da a conocer un método para proceso de una muestra en el que dicho proceso comprende la deshidratación de dicha muestra utilizando un fluido supercrítico. Por ejemplo, una muestra se pone en contacto con un fluido supercrítico para solubilizar y eliminar el agua de dicha muestra antes de impregnar ésta con un medio de embebido. Un fluido supercrítico puede ser mezclado con otro solvente, para facilitar la extracción de determinadas sustancias (por ejemplo agua) de la muestra. En una realización, una muestra es deshidratada con una composición que comprende un fluido supercrítico y un agente deshidratante, preferentemente un alcohol, tal como el etilalcohol (etanol; EtOH) o un detergente, tal como el Tween. La deshidratación utilizando un fluido supercrítico tal como se da a conocer en el presente documento es lograda de forma rápida, algunas veces incluso en minutos. Por lo tanto, la presente invención combina el procedimiento de embebido mejorado con una alternativa atractiva a la deshidratación escalonada tradicional que consume mucho tiempo utilizando soluciones de alcohol de concentración variable. De manera ventajosa, el fluido supercrítico disuelve y extrae otras sustancias de una muestra, tal como por ejemplo grasas y lípidos, facilitando de este modo el corte de la muestra en láminas delgadas. En una realización específica de la presente invención, el proceso de una muestra, en particular un tejido calcificado tal como una muestra ósea, comprende la eliminación del calcio de una muestra. La descalcificación de una muestra es importante para el corte de láminas delgadas de tejido óseo y otras partículas calcificadas en los tejidos, debido a que las estructuras calcificadas son en general difíciles de cortar. Los protocolos de descalcificación tradicionales requieren la incubación adicional de una muestra fija durante una a cinco noches en una solución de descalcificación ácida (típicamente ácido fórmico, ácido acético, ácido clorhídrico o ácido nítrico). La descalcificación también es llevada a cabo utilizando un quelante de calcio tal como el EDTA (ácido etilendiaminatetracético). De acuerdo con la presente invención, la descalcificación de una muestra se consigue de manera más simple y rápida en comparación con los métodos de descalcificación existentes. Entonces, una muestra biológica es puesta en contacto con una composición que contiene un fluido (casi) supercrítico, en la que dicha composición comprende de forma adicional un agente descalcificante. Los agentes descalcificantes apropiados incluyen ácidos tales como los ácidos carboxílicos, por ejemplo el ácido fórmico o el ácido acético, y otros agentes químicos capaces de unir o captar calcio.

Cuando una composición que comprende un fluido supercrítico y que comprende de manera adicional un cosolvente (por ejemplo para agua y/o calcio) es utilizado, el fluido supercrítico y el cosolvente (por ejemplo un alcohol y/o un ácido) pueden ser suministrados como una mezcla en un cilindro. Otro método para suministrar el cosolvente

adicional puede lograrse mediante la utilización de sistemas de bomba adicionales *in situ* para mezclar el cosolvente necesario para el fluido supercrítico.

El término análisis histológico, tal como es utilizado en el presente documento, hace referencia a cualquier tipo de análisis que pueda ser llevado a cabo para estudiar el aspecto, las propiedades y el comportamiento de un tejido, una célula, un órgano o un organismo. Puede ser llevado a cabo inspeccionando una muestra procesada bajo un microscopio. Una (componente de) muestra procesada puede ser puesta en contacto con uno o más reactivos, tales como un tinte, un reactivo o una sonda especialmente reactiva con uno o más componentes (tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos) presentes en la muestra para identificar o marcar un determinado tipo de célula o tejido. Un tejido hace referencia a un grupo o capa de células que son esencialmente disímiles y trabajan de forma conjunta para llevar a cabo una función específica. Las sondas típicas incluyen anticuerpos (por ejemplo para inmuno-histoquímica), sondas de ácido nucleico (RNA; DNA) (por ejemplo para hibridación *in situ* o técnicas de PCR), sustratos para utilización en histoquímica de enzimas (por ejemplo NADH para detectar acetilcolinesterasa o actividad ATP-asa) y agentes químicos de tinción convencionales tales como hematoxilina y eosina (H&E); azul alciano para mucosustancias sulfatadas; tinte Brown-Brenn Gram para bacterias Gram-positivo y Gram-negativo; rojo Congo para amiloides; Giemsa para *H. Pylori*; y médula ósea; tinte de hierro modificado de Gomori; y muchas otras sondas conocidas por los técnicos en la materia que son utilizadas para identificar o marcar un determinado tipo de célula o tejido, tanto normal como enfermo.

El término análisis patológico hace referencia a análisis histológicos que están relacionados con una patología. De manera típica, los análisis patológicos son llevados a cabo por un patólogo que diagnostica una enfermedad estudiando una muestra que comprende células y tejidos bajo el microscopio. En una realización preferente de la presente invención, un análisis patológico comprende el análisis de una muestra humana para establecer el grado o etapa de desarrollo de una enfermedad.

De acuerdo con la presente invención, una muestra comprende una muestra biológica, tal como una muestra de tejido. En el contexto de la presente invención, una "muestra de tejido" es cualquier trozo de tejido que pueda ser procesado mediante un método dado a conocer en el presente documento. También puede hacer referencia a células individuales tomadas a partir de cualquier fluido biológico (por ejemplo, ascitis, sangre, exudado pleural), o una suspensión de células obtenida a partir de aspiración de órganos sólidos o lavado de cavidades corporales. Las células individuales pueden ser granuladas por sedimentación o centrifugación flotante antes del proceso. También puede hacer referencia a un órgano intacto, o incluso a un organismo intacto, o una parte del mismo. Los organismos incluyen organismos unicelulares o multicelulares, y están dentro del rango comprendido desde las bacterias, hongos, insectos y plantas hasta los mamíferos. Las piezas sólidas (es decir láminas de tejido o biopsias de aguja) tomadas de un sujeto humano son procesadas comúnmente con fines histológicos y patológicos. Mientras que los métodos convencionales para la fijación y embebido de un órgano (por ejemplo el cerebro) requieren hasta 6 y 8 semanas, un método de acuerdo con la presente invención permite la impregnación de un órgano (intacto) o una parte del mismo con un medio de embebido sólido en un plazo que está dentro de un día y sin la utilización de solventes tóxicos (agentes de aclarado).

Con el método de la presente invención, es posible reducir el tiempo total de proceso (desde la fijación hasta la impregnación) desde las 8 a 12 horas convencionales hasta menos de 2 horas, preferentemente menos de 1,5 horas, más preferentemente menos de una hora. En ningún caso la técnica anterior ha dado a conocer o sugerido que todo el proceso de preparación de láminas de tejido para diagnóstico pudiera completarse en menos de 1,5 a 2 horas, comenzando a partir de la preparación de una muestra a partir de un tejido fijado o no fijado y finalizando con la impregnación, con el proceso continuado de muestras, evitando la utilización de agentes de aclarado tóxicos, posiblemente cancerígenos, y una calidad superior de la muestra. El documento WO 01/44783 da a conocer un sistema de proceso de tejidos incluyendo una unidad de microondas mejorada que permite el proceso rápido en menos de dos horas y, opcionalmente, sin la utilización de agentes de aclarado con xileno. Sin embargo, el protocolo del documento WO 01/44783 sólo puede procesar una muestra de tejido con un espesor de menor de tres milímetros. Por el contrario, en un método de acuerdo con la presente invención, pueden procesarse de forma rápida muestras con un espesor de 5 milímetros, de 8 milímetros o hasta más de un centímetro utilizando un fluido supercrítico. Tal como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, y a diferencia del documento WO 01/44783, el método de la presente invención no está limitado a muestras de tejido o secciones pequeñas de tejido. El método de acuerdo con la presente invención permite procesar una muestra con un volumen que está dentro del rango entre 0,001 cm³ (por ejemplo una biopsia) o 1 cm³ (por ejemplo una muestra de piel) hasta 10 cm³ (por ejemplo un tumor pequeño) o aún hasta muestras más grandes tales como las de un volumen de 2000 cm³ (por ejemplo un órgano tal como un cerebro completo). En general, de acuerdo con el método de la presente invención, cuanto mayor es el tamaño de la muestra, mayor es el tiempo que se tarda en procesar dicha muestra. Sin embargo, en comparación con la técnica anterior, la ganancia de tiempo lograda con la presente invención también aumenta con el tamaño de la muestra. Por ejemplo, una muestra de tejido de 20 x 15 x 5 mm es deshidratada e impregnada rápidamente de acuerdo con el método de la presente invención. Esto ofrece una ventaja considerable, dado que una muestra puede ser procesada con un volumen o un tamaño que permite obtener múltiples láminas (micrótomos) a partir de dicha muestra. Por ejemplo, siguiendo una inspección histológica de una muestra, un patólogo puede desear inspeccionar la misma muestra que ha sido marcada con un reactivo específico, tal como un anticuerpo, para facilitar el análisis histológico. El proceso de una muestra de acuerdo con la presente invención permite proporcionar de forma simple una segunda, tercera o un número incluso mayor de láminas (paralelas) a partir de la misma muestra. Si la muestra ya tiene menos de 3 milímetros antes de ser procesada, tal como en el caso descrito en el documento WO 01/44783, obviamente esto no es posible. Por el contrario, es necesario tomar

múltiples muestras desde el comienzo y su orientación relativa debe ser registrada de forma cuidadosa para reconstruir su conexión *in situ*.

El análisis histológico de varios tipos de muestras de tejido humano que fueron procesadas utilizando un fluido supercrítico de acuerdo con la presente invención reveló de manera sorprendente una calidad superior en la muestra en comparación con las muestras tomadas de la misma muestra de tejido y fueron procesados de acuerdo con procedimientos convencionales. Por ejemplo, el patrón de tinción con keratina de una muestra de colon humano a continuación del proceso utilizando dióxido de carbono mostrado en la figura 3 es más intenso en comparación con el patrón de tinción con keratina de la figura 2, que muestra una muestra tomada de la misma muestra de colon que fue procesada utilizando métodos convencionales. Del mismo modo, pudo llevarse a cabo un análisis histológico mejorado sobre una muestra de vesícula biliar humana marcada con vimentina procesada de acuerdo con un método de la presente invención (comparar figuras 3 y 4) y sobre una muestra de nervio humano marcado con proteína S-100 (comparar figuras 6 y 7).

En una realización de la presente invención, una muestra es fijada de acuerdo con los métodos convencionales antes de ser procesada de acuerdo con un método de acuerdo con la presente invención, por ejemplo utilizando una solución de formaldehído (también conocido como formalina). El formaldehído (CH_2O) reacciona con los grupos $-\text{NH}_2$ libres de terminales de proteínas y forman puentes de metileno covalentes entre dos componentes de una proteína o entre dos proteínas diferentes. Sin embargo, un inconveniente serio de la fijación convencional y el proceso del tejido (es decir en bloques de parafina) se halla en el hecho de que puede causar daños irreversibles (por ejemplo, hidrólisis de una unión fosfodiéster y/o deamidación) a la estructura de ácidos nucleicos (por ejemplo, DNA y especialmente RNA). En consecuencia, la fijación y proceso de una muestra (de tejido) en bloques de parafina limita la aplicación de técnicas genéticas para diagnóstico e investigación.

En una realización de la presente invención, una muestra que ha sido congelada previamente es procesada de acuerdo con un método según la presente invención. Es sabido dentro del sector de la técnica que la mayoría de los análisis de DNA y RNA requieren precauciones especiales con la manipulación del material de muestra, tal como la congelación inmediata ("snap") de los tejidos frescos en nitrógeno líquido para impedir la degradación del ácido nucleico. Un método según la presente invención puede ser utilizado para impregnar una muestra congelada ("snap"), proporcionando un método para obtener una muestra biológica procesada que pueda ser analizada subsiguientemente en varios tipos de análisis histológicos, incluyendo análisis de ácido nucleico (DNA, RNA). Por otra parte, sin embargo, el diagnóstico histológico de una sección congelada puede experimentar desventajas en comparación con las secciones preparadas a partir de bloques de parafina. Por ejemplo, las muestras congeladas son propensas a la deshidratación. El almacenamiento de muestras congeladas requiere, por lo tanto, medidas de prevención de la deshidratación. A menudo, los tejidos congelados presentan artefactos que son producidos por la presencia de cristales de hielo en la muestra. Por lo tanto, algunas veces puede resultar difícil sopesar de manera apropiada las ventajas y desventajas asociadas con muestras fijadas o congeladas.

Un método de acuerdo con la presente invención para proceso de una muestra proporciona una solución elegante para dichos problemas, dado que además del proceso de una muestra fijada o congelada, también permite el proceso rápido de una muestra fresca que no haya sido fijada o congelada antes de ser puesta en contacto con un fluido supercrítico. En lugar de congelar o utilizar un fijador químico, la alta presión experimentada por la muestra durante el contacto con el fluido supercrítico y la rápida impregnación con un medio de embebido (por ejemplo cera de parafina) bajo condiciones de alta presión asegura una conservación óptima de la estructura y arquitectura. Sorprendentemente, no se producen daños en la muestra de tejido si se aumenta la presión y luego se disminuye de forma gradual. La presurización del tejido puede ser llevada a cabo de manera relativamente rápida. Las células dentro del tejido son llenadas con líquido que soportará un rápido aumento de presión. Sin embargo, la muestra debe ser despresurizada de forma gradual para evitar una expansión rápida del fluido y una ruptura de las células. Por lo tanto, la presente invención da a conocer una alternativa atractiva para la congelación inmediata de una muestra y permite la preparación de una muestra que sea compatible con múltiples tipos de análisis (patológicos) incluyendo análisis histológicos, bioquímicos y de ácidos nucleicos, sin la utilización de formalina.

Debe indicarse que, además de la reducción del tiempo necesario para el proceso del tejido, la preparación rápida del tejido utilizando un fluido supercrítico permite la conservación de las estructuras y morfología del tejido que se pierden con la metodología convencional. El glicógeno, que es un compuesto importante que proporciona solidez a las estructuras, se pierde casi siempre utilizando la metodología convencional. Los vasos linfáticos, particularmente el miometrio, colapsan durante el proceso convencional mientras que permanecen esencialmente intactos cuando se utiliza un método de acuerdo con la presente invención. Además, los estudios con tejidos procesados de acuerdo con al presente invención indican una mejor conservación de extracción de DNA y RNA en comparación con los métodos de proceso convencionales. Los tejidos obtenidos en hospitales y otros emplazamientos quirúrgicos pueden ser procesados para obtener estudios histológicos y genéticos rápidamente después del envío al laboratorio. Además, debido a que una muestra procesada de acuerdo con al presente invención se conserva bien de manera típica, puede ponerse a disposición un material de muestra de archivo para investigaciones futuras y otras aplicaciones.

La presente invención no prohíbe la preparación de ácidos nucleicos, DNA o RNA, a partir de muestras procesadas. Por lo tanto, un estudio genético es posible para muestras recogidas de manera rutinaria en el laboratorio de patología clínica. La potencia combinada de dichas tecnologías será muy importante. Las observaciones histológicas pueden ser correlacionadas con resultados de estudios genéticos analizando una sección histoquímica mediante tinción o

inmunohistoquímica, y analizando ácidos nucleicos de una sección adyacente para un análisis genético (utilizando por ejemplo técnicas PCR). Por ejemplo, zonas normales y enfermas de la misma sección pueden ser comparadas para detectar diferencias genéticas (por ejemplo mutaciones, niveles de transcripción), el avance de una enfermedad puede ser caracterizado mediante la comparación de diferencias genéticas en muestras tomadas en distintos momentos, y la evolución de un tumor puede ser evaluada mediante el seguimiento de la acumulación de diferencias genéticas a partir del cáncer primario hasta la metástasis.

Una ventaja adicional de un método de acuerdo con la presente invención se refiere a la orientación de la muestra. La orientación de la muestra es un factor clave para alcanzar un resultado final -el diagnóstico correcto. En los procedimientos existentes, una muestra procesada (embebida) es colocada en un soporte o molde de muestra para permitir el seccionamiento del tejido en un micrótomos. La fijación e inmovilización de una muestra, a menudo pequeña y delicada, en la orientación correcta en un soporte es una tarea complicada. Dado que la mayoría de los adhesivos no son compatibles con los solventes orgánicos utilizados en el proceso histológico, se utilizan típicamente moldes con una superficie rugosa o “pegajosa” para fijar una muestra en la parte inferior del molde o soporte. Sin embargo, frecuentemente dichos soportes no fijan suficientemente una muestra, de manera que pueda ser seccionada. Otros soportes de muestra están dotados de tapas de colocación a presión para inmovilizar una muestra simplemente sujetando la muestra entre la parte inferior y dicha tapa. Aún así, dichos soportes no son apropiados para muestras delicadas, tales como la piel o tejidos epiteliales, debido a que la presión requerida para sujetar una muestra de forma sencilla destruye la integridad de dichos tejidos, por ejemplo evidenciado por vasos sanguíneos colapsados. La presente invención da a conocer una solución para dichos problemas. Dado que un método de acuerdo con la presente invención no requiere solventes orgánicos (xilenos) que previamente descalificaron la utilización de adhesivos, ahora una muestra puede ser pegada con una orientación deseada en la parte inferior del soporte. Además, tal como se ha mencionado anteriormente, un método de acuerdo con la presente invención es utilizado de forma apropiada para impregnar muestras de tamaño considerablemente mayor que las que podían ser utilizadas hasta la actualidad. En consecuencia, ahora es posible orientar primero un tejido intacto, órgano o incluso un organismo, antes de ser procesado. Por ejemplo, un tumor es eliminado en la sala de operaciones. En lugar de cortar el tumor en múltiples muestras pequeñas, y por lo tanto teniendo que tomar información acerca de las orientaciones relativas, la presente invención permite orientar y embeber todo el tumor intacto.

Los inventores han desarrollado un proceso simple, seguro, de bajo coste, rápido y fiable que permite la preparación de bloques de tejido impregnado apropiados para seccionamiento en micrótomos en menos de 1,5 horas a partir del momento en el que el tejido es recibido en el laboratorio de patologías. La presente invención permite el proceso y flujo continuos de muestras, frescas, fijadas o congeladas, puede ser adaptado para ser un proceso automatizado, excluye la necesidad de formalina y xileno con sus gases tóxicos, permite la estandarización del proceso de tejidos, y requiere volúmenes de reactivos considerablemente menores que los métodos convencionales. El término proceso “continuo” significa que se accede al sistema de la presente invención con muestras de tejido adicionales a intervalos determinados por el tiempo requerido para completar una etapa individual del proceso (es decir, unos pocos minutos) en lugar del tiempo requerido para completar el proceso (es decir, de una a varias horas). En cualquier momento determinado puede haber muestras en distintas etapas de proceso. En otras palabras, se hace posible mediante la presente invención obtener una producción y un flujo continuos de muestras a lo largo de las diversas etapas de proceso de tejidos. El proceso continuo puede lograrse manualmente o mediante un instrumento automatizado, tal como un procesador de tejidos.

En un aspecto de la presente invención, un procesador es dispuesto para ser utilizado en un método de acuerdo con la presente invención. Una realización de un procesador de este tipo de acuerdo con la presente invención será descrita a continuación a modo de ejemplo haciendo referencia a la figura 1 de los dibujos adjuntos.

La figura 1 muestra esquemáticamente un ejemplo de un procesador de acuerdo con la presente invención.

El procesador (1) de la figura 1 comprende un depósito de almacenamiento (3) y un sistema de conductos (4). El sistema de conductos (4) tiene una entrada (2) para suministrar una sustancia al procesador, en dicho ejemplo se supone dióxido de carbono líquido. El dióxido de carbono es transportado a través de un conducto del sistema de conductos (4) a través de un refrigerador (13) hacia el interior del depósito de almacenamiento (3). El procesador (1) comprende, a continuación del depósito de almacenamiento (3), medios de presurización (5) y medios de calentamiento (6), para poner el dióxido de carbono en las condiciones necesarias. El dióxido de carbono es suministrado a un reactor de proceso (9). Dicho reactor (9) puede contener muestras (10) que serán preparadas por el procesador (1) para análisis histológico. El reactor (9) comprende medios de calentamiento y/o refrigeración (14) para mantener al dióxido de carbono en el reactor (9) en las condiciones requeridas. Con dichos medios de acondicionamiento (14) del reactor (9), las distintas etapas de los distintos métodos de la presente invención, tal como han sido descritos en el presente documento, pueden ser llevados a cabo en el reactor de proceso (9). Más allá del reactor de proceso (9), el procesador (1) comprende además una válvula de control (16), seguida por medios de separación (11) para separar distintas sustancias de la mezcla de sustancias que abandonan el reactor (9). Las sustancias extraídas, tales como alcohol, parafina, agua, etc., pueden abandonar los medios de extracción a través de orificios de salida (12). Algunas de dichas sustancias, por ejemplo la parafina, pueden ser reutilizadas. El dióxido de carbono sobrante de la mezcla puede ser reciclado. Con esta finalidad, es alimentado desde los medios de separación (11) a través del conducto (4) hacia los medios de reciclado (13), por ejemplo un refrigerador (13) de dióxido de carbono gaseoso comprendido en el sistema de conductos (4) del procesador (1), a continuación del cual el dióxido de carbono licuado es alimentado al depósito de almacenamiento (3) nuevamente. Cuando el reactor (9) está suficientemente lleno con dióxido de carbono, la bomba

(5) es detenida y el recipiente a presión (7) que contiene el medio de embebido (por ejemplo, parafina) es vaciado dentro del reactor (9) mediante la apertura de la válvula (17), de manera que el agente de embebido fluye por gravedad a través del conducto (8) y hacia el interior del reactor (9). El recipiente a presión (7) es mantenido bajo presión debido a que está conectado con el conducto (4). En este momento, las muestras (10) son impregnadas con el medio de embebido, y a continuación el reactor (9) y el recipiente a presión (7) pueden ser despresurizados a través del conducto (4A) hacia el recipiente de separación (11) y vaciados a través del orificio de salida (15).

Habiendo descrito un ejemplo de procesador (1) de acuerdo con la presente invención, muchas modificaciones aplicables al mismo resultarán evidentes para los técnicos en la materia sin salirse del alcance de la presente invención tal como queda definida en las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, resulta posible aplicar en un solo procesador una gran cantidad de reactores, recipientes a presión, depósitos de almacenamiento, bombas, medios de control, válvulas, etc. Las válvulas, por ejemplo, pueden ser utilizadas para añadir cosolventes o agentes de deshidratación (por ejemplo, etanol, acetona, formaldehído, etc.).

15 Ejemplo

Muestras de vesícula biliar humana, colon, y nervios fueron impregnadas con etanol y colocados dentro de un reactor de 1 litro de capacidad. El reactor fue mantenido a una temperatura de 40°C. El reactor fue cerrado y presurizado hasta 150 bar con dióxido de carbono a 40°C. Manteniendo la presión a 150 bar aplicando una válvula de control, el reactor fue llenado con dióxido de carbono fresco con un caudal de 10 kg/h utilizando una válvula. Después de 20 45 minutos, la bomba fue detenida y la temperatura se elevó hasta 60°C, aumentando la presión hasta 230 bar aproximadamente. Se bombeó lentamente parafina fundida a 60°C al interior del reactor con un caudal de 2 litros/hora, impregnando la muestra, manteniendo una presión de 210 bar. Una vez que el reactor estuvo prácticamente lleno con parafina, el reactor fue despresurizado en 10 minutos. El exceso de parafina fue drenado del reactor y éste fue enfriado 25 hasta 40°C, después de lo cual las muestras embebidas fueron extraídas del reactor. Las muestras fueron analizadas histológicamente de acuerdo con procedimientos convencionales.

Leyendas

30 Figura 1

Ejemplo de un procesador de acuerdo con la presente invención.

Figura 2

35 Muestra de colon humano (100x; inserto 400x) procesada de acuerdo con el procesador de tejido convencional de alto rendimiento, automatizado, de mesa, Sakura VIP-300. La keratina fue marcada utilizando Keratine 20 (citoqueratina monoclonal de ratón antihumana 20 Clones K_s 20.8 clones n° M7019 lote 067 de Dako). Se utilizó un inmunomarcador automatizado Ventana NexES™.

40 Especificidad: se marcan células epiteliales de la mucosa del intestino grueso, no se observa tinción de fondo.

Intensidad: patrón de tinción difuso a lo largo de la cripta.

45 Figura 3

Una muestra de colon humano (100x; inserto 400x) de la misma muestra que la mostrada en la figura 2, pero procesada utilizando dióxido de carbono supercrítico. El marcado fue llevado a cabo tal como fue descrito para la figura 2.

50 Especificidad: se marcan células epiteliales de la mucosa del intestino grueso, no se observa tinción de fondo.

Intensidad: tinción difusa a lo largo de toda la cripta, tinción mejorada en comparación con el método convencional (VIP).

55 Figura 4

Muestra de vesícula biliar humana (100x; inserto 400x) procesada mediante procedimiento estándar VIP300. Se marcó vimentina utilizando anticuerpo anti-vimentina (vim clon 3B4) cat n° 112457 Boehringer Mannheim) y tinción 60 Ventana de acuerdo con el protocolo.

Especificidad: se marcaron células mesenquimales en la lámina propia y las capas más profundas de la vesícula biliar. Las células epiteliales son negativas.

65 Intensidad: tinción intracitoplasmática difusa de las células mesenquimales.

ES 2 279 405 T3

Figura 5

Muestra de vesícula biliar humana (100x; inserto 400x) de la misma muestra que la mostrada en la figura 4, pero procesada utilizando dióxido de carbono supercrítico. La tinción fue llevada a cabo tal como se ha descrito para la figura 4.

Especificidad: células mesenquimales marcadas en la lamina propia y capas más profundas de la vesícula biliar.

Intensidad: mejorada en comparación con el procedimiento convencional (VIP).

Figura 6

Muestra de nervio humano (400x) procesada utilizando el procedimiento estándar VIP300. El marcado fue llevado a cabo utilizando anticuerpo: código S-100 N° Z311 lote N° 026 Dako. Marcado Ventana de acuerdo con el protocolo.

Especificidad: los nervios son marcados y otras estructuras son negativas.

Intensidad: tinción intracitoplasmática difusa de las células Schwann y de las neuronas. No se observa tinción de fondo.

Figura 7

Muestra de nervio humano (400x) de la misma muestra que la mostrada en la figura 6, pero procesada utilizando dióxido de carbono supercrítico.

El marcado fue llevado a cabo tal como ha sido descrito para la figura 6

Especificidad: los nervios son marcados y otras estructuras son negativas.

Intensidad: tinción fuerte de las células Schwann y de las neuronas. No se observa tinción de fondo.

REIVINDICACIONES

1. Método para proceso de una muestra biológica para análisis histológico, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto la muestra con un agente deshidratante:

b) eliminar el agente deshidratante con una composición, y

c) reemplazar el fluido supercrítico infiltrando un medio de embebido, preferentemente parafina, con una presión como mínimo de 1 bar

caracterizado porque dicha composición comprende un fluido supercrítico o casi supercrítico a una temperatura dentro del rango entre 0,7 y 1,4 veces su temperatura crítica y una presión dentro del rango entre 0,3 y 7 veces su presión crítica.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicho fluido supercrítico o casi supercrítico es dióxido de carbono.

3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha muestra biológica es una muestra de tejido fresco, congelado o fijado, preferentemente una muestra no fijada de tejido fresco.

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra biológica comprende un órgano o una parte de un órgano.

5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra es deshidratada, desengrasada y/o descalcificada antes de la impregnación mediante la utilización de una composición que incluye un fluido supercrítico.

6. Método, según la reivindicación 5, en el que dicha composición comprende de manera adicional un agente deshidratante, preferentemente un alcohol.

7. Método, según la reivindicación 5 ó 6, en el que dicha composición comprende de manera adicional un agente descalcificador, preferentemente un ácido.

8. Procesador (1) para preparar, como mínimo, una muestra (10) para análisis histológico, que comprende como mínimo un reactor de proceso (9) para dicha muestra (10), en el que dicho procesador (1) comprende medios de suministro (4) para suministrar al reactor (9) como mínimo una sustancia y como mínimo unos medios de suministro (7) para añadir el medio de embebido al reactor (9) a través del conducto (8) del procesador, estando **caracterizado** porque una de las sustancias suministradas está en fase supercrítica o casi supercrítica y el procesador comprende además medios de presurización y/o calentamiento (5, 6) para llevar dicha sustancia en fase supercrítica o casi supercrítica a la presión requerida dentro del rango entre 0,3 y 7 veces su presión crítica y/o una temperatura dentro del rango entre 0,7 y 1,4 veces su temperatura crítica.

9. Procesador (1), según la reivindicación 8, que comprende de manera adicional medios de separación (11) para separar sustancias de una mezcla de sustancias que abandonan el reactor (9).

10. Procesador (1), según la reivindicación 8 ó 9, que comprende además medios de reciclaje (13) para reciclar las sustancias descargadas desde el reactor (9).

11. Uso de un procesador, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para procesar una muestra biológica para análisis histológico.

Figura 1

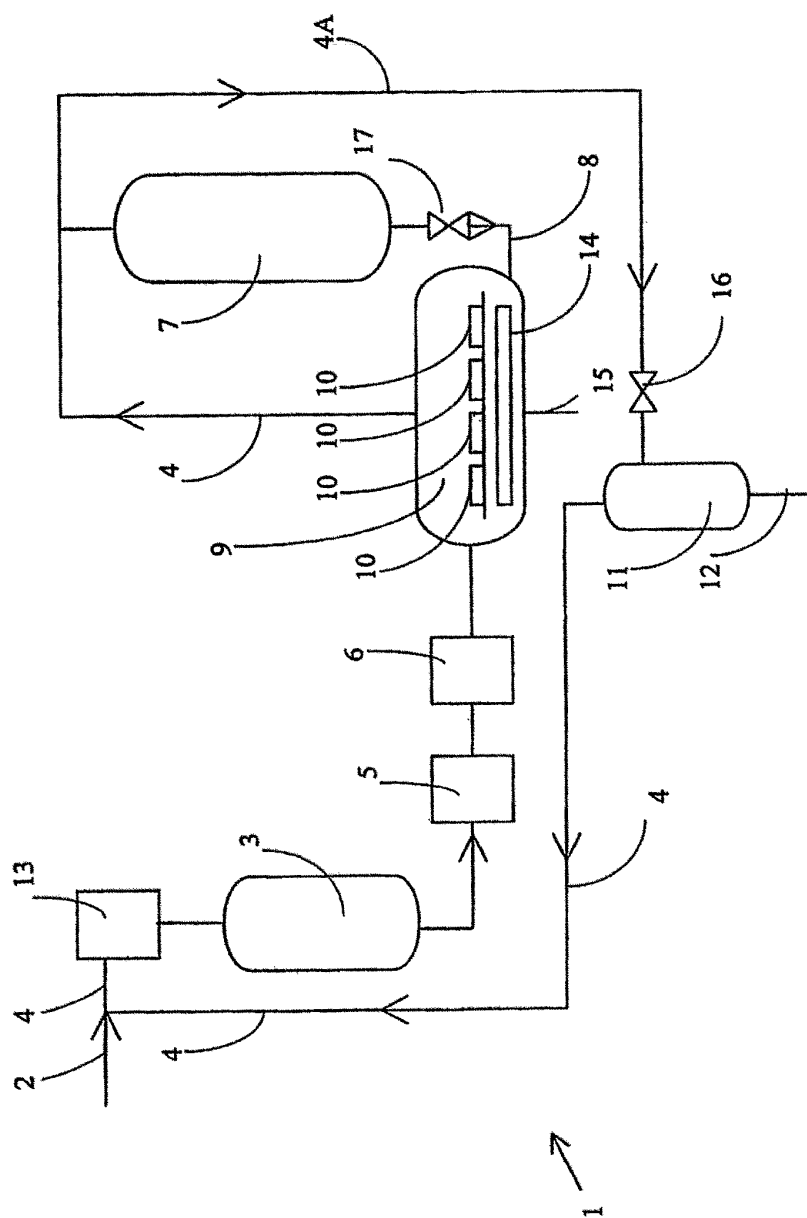


Figura 2

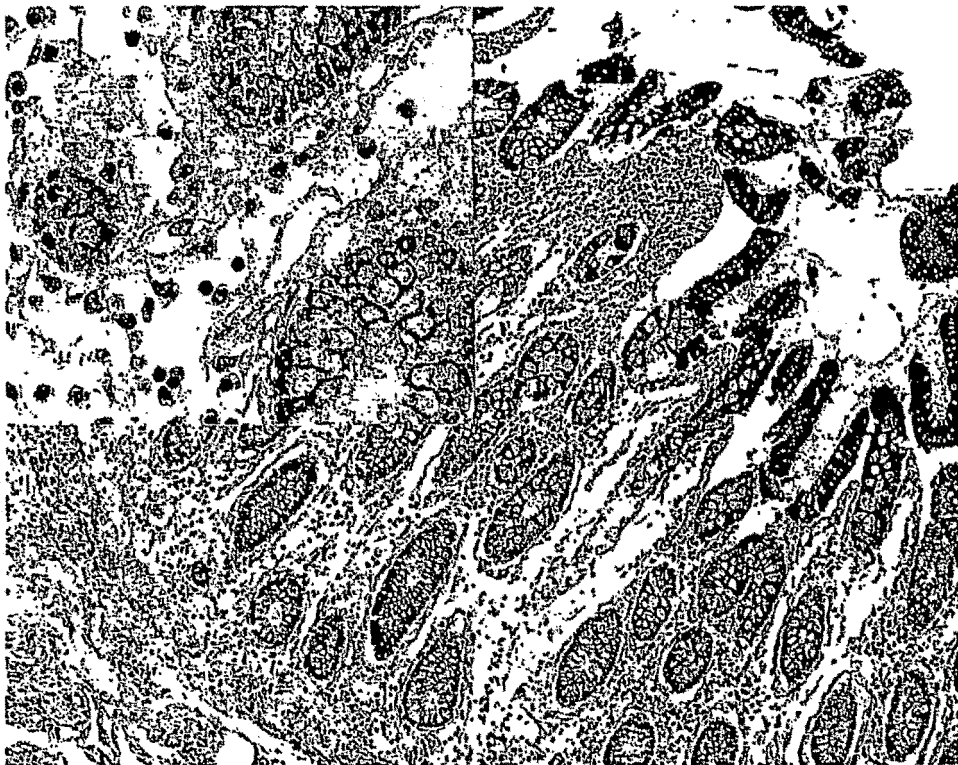


Figura 3

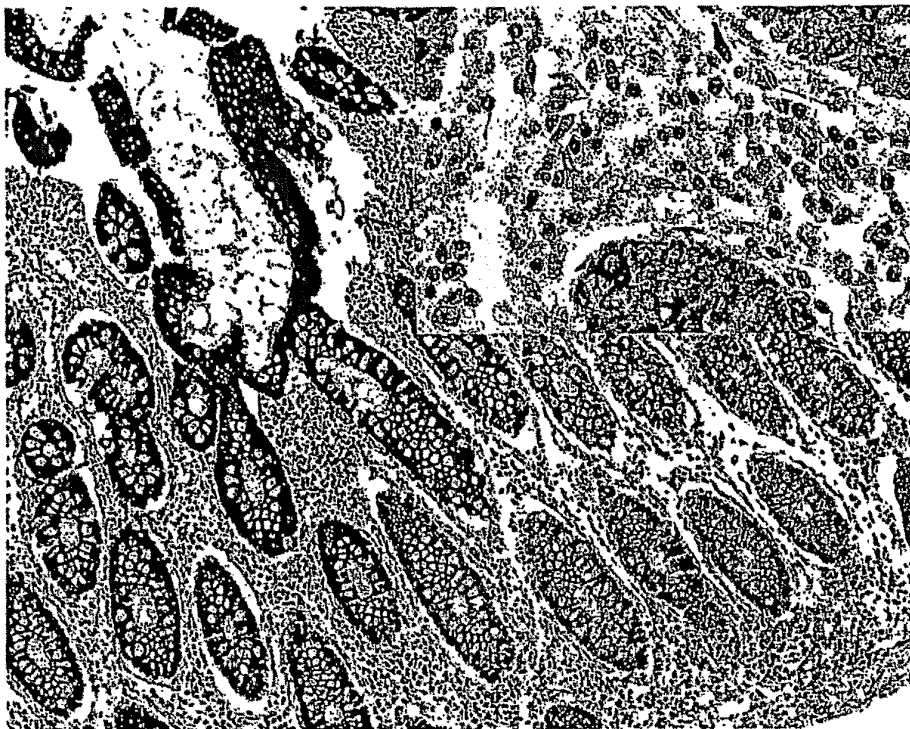


Figura 4



Figura 5



Figura 6

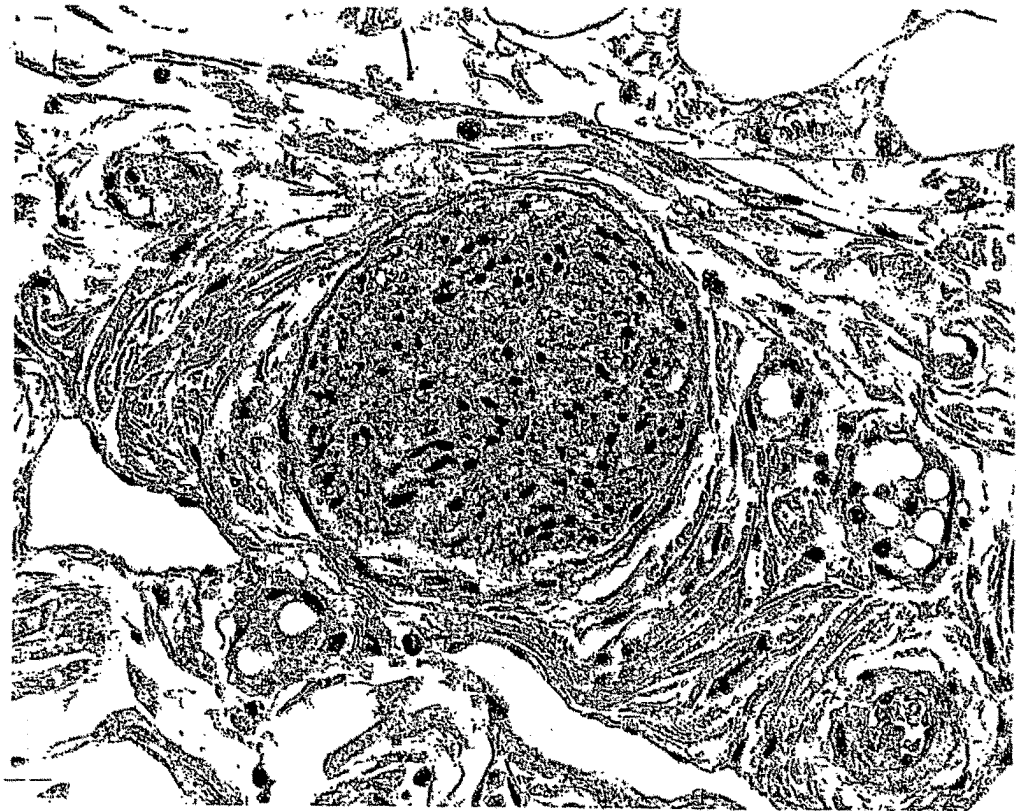


Figura 7

