

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 984**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2019 PCT/GB2019/053219**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2020 WO20099870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2019 E 19809553 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025 EP 3881050**

54 Título: **Método, solución y kit para preparar una muestra de tejido para imagenología 3D**

30 Prioridad:

14.11.2018 GB 201818567

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2025

73 Titular/es:

**THE FRANCIS CRICK INSTITUTE LIMITED
(100.00%)
1 Midland Road
London, Greater London NW1 1AT, GB**

72 Inventor/es:

**BEHRENS, AXEL y
MESSAL, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 012 984 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método, solución y kit para preparar una muestra de tejido para imagenología 3D

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la preparación de una muestra de tejido con el propósito de imagenología tridimensional (3D).

10 Antecedentes de la invención

La histología es el estudio de la anatomía de células y tejidos de plantas y animales usando microscopía. Comúnmente se estudia utilizando un microscopio óptico o un microscopio electrónico, el espécimen se ha seccionado, teñido, y montado en un portaobjetos de microscopio. La capacidad de visualizar o identificar diferencialmente estructuras microscópicas se potencia frecuentemente a través del uso de tinción. La histología es una herramienta esencial de la biología y medicina.

La histopatología es el estudio del tejido enfermo, y es una herramienta importante en la patología anatómica, puesto que el diagnóstico preciso del cáncer y otras enfermedades usualmente requiere un examen histopatológico de las muestras. Los patólogos pueden realizar un examen histopatológico y proporcionar información de diagnóstico con base en sus observaciones. Los patólogos examinan preparaciones de tejido teñido con microscopía de campo claro para estimar varios tipos de hallazgos histológicos y patológicos tal como composición de tejido, arquitectura y morfología de tejido, morfología celular, malignidad celular, grado de inflamación y fibrosis, profundidad de invasión tumoral, presencia de componentes tumorales en el margen de corte, y estado de metástasis de ganglios linfáticos.

Los métodos convencionales de histología e histopatología implican la tinción e imagenología usando microscopía. Sin embargo, aunque los métodos convencionales proporcionan información sobre cambios morfológicos de células y tejidos, también tienen limitaciones fundamentales. Por ejemplo, los métodos convencionales pueden proporcionar sólo imágenes bidimensionales (2D) planas, lo que limita su capacidad para observar estructuras tridimensionales (3D) que constan de una variedad de células en diversas estructuras anatómicas. Además, en particular en un diagnóstico histopatológico para especímenes patológicos grandes tal como especímenes resecados quirúrgicamente, sólo se evalúan habitualmente lesiones representativas identificadas por una observación macroscópica. Por lo tanto, aún no se ha abordado la preocupación de que una lesión crítica adicional pueda estar presente en las áreas no evaluadas. La evaluación histológica 2D tradicional de los tejidos limita la comprensión adecuada de la estructura de tejido 3D. Por ejemplo, para explorar la conectividad de las redes celulares locales, la imagenología 3D es esencial.

Sin embargo, la preparación de muestras de tejido para imagenología 3D ha demostrado ser un desafío. Las técnicas anteriores para preparar muestras de tejido para imagenología 3D se han enfocado en incrementar la transparencia del tejido para disminuir las propiedades de dispersión de la luz de las capas multicelulares e incrementar la penetrancia de la luz, ambas de las cuales son importantes para la microscopía óptica. Se han desarrollado técnicas anteriores en tejidos neuronales. En tanto que su aplicación incrementa la transparencia también en otros tejidos, no permiten la tinción, especialmente por inmunomarcado.

Además, las técnicas anteriores utilizadas en el arte para la preparación de muestras de tejido para imagenología 3D han utilizado varias fijaciones aumentadas de las muestras, por ejemplo, incrustación de hidrogel, puesto que se consideró en la técnica que tal fijación aumentada era necesaria a fin de lograr una muestra de tejido adecuada para imagenología 3D.

Sin embargo, el uso de esta fijación aumentada es desventajoso, puesto que disminuye la calidad de la muestra de tejido y reduce la cantidad y el tipo de anticuerpos diferentes que se pueden emplear, por ejemplo, en el inmunomarcado de la muestra. Es ventajoso ser capaces de formar en imagen los numerosos anticuerpos de diferentes especificidades en una muestra de tejido, puesto que a menudo hay una cantidad limitada de muestra disponible (por ejemplo, en un entorno clínico o de diagnóstico, por ejemplo, de una biopsia).

Esto no es posible con los métodos actuales en la técnica para preparar muestras de tejido para imagenología 3D, debido a la limitación de la cantidad y el tipo de anticuerpos que se pueden usar en la muestra de tejido resultante. Con respecto a esto, la muestra de tejido resultante no es susceptible de marcaje con una amplia variedad de tipos de anticuerpos y especificidades. Sin desear limitarse por la teoría, esto puede deberse al enmascaramiento de antígenos durante los pasos de fijación aumentada.

Por lo tanto, en la técnica existe la necesidad de métodos alternativos para preparar muestras de tejido para imagenología 3D, por ejemplo, que faciliten el uso de una variedad más amplia de anticuerpos para el inmunomarcado de una muestra.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que un método como se describe en la presente se puede utilizar para preparar muestras de tejido para imagenología 3D, particularmente por inmunomarcado utilizando una amplia variedad de anticuerpos. Los inventores sorprendentemente encontraron que se puede utilizar un método menos complejo para preparar las muestras de tejido que los que se han utilizado previamente en la técnica. Los presentes ejemplos demuestran que la fijación adicional, por ejemplo, por hidrogel o glutaraldehído (GA), no es necesaria a fin de lograr muestras de tejido adecuadas para imagenología 3D por inmunomarcado.

Como tal, la presente invención proporciona un método altamente ventajoso para preparar muestras de tejido, y una solución que se puede utilizar en este método.

Además, las técnicas anteriores para la preparación de muestras de tejido han empleado una solución con un pH de 9 o más, puesto que se consideró que este pH era necesario para hacer que las muestras de tejido fueran transparentes con propósitos de imagenología 3D. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que una solución que comprende un detergente y una solución de agente amortiguador a un pH por debajo de 9 se puede utilizar exitosamente en la preparación de muestras de tejido con propósitos de imagenología 3D. Esta solución se puede utilizar a temperaturas más altas que en las técnicas anteriores.

En el método de la presente invención se usa una solución que comprende una solución de agente amortiguador con un pH por debajo de 9, y un detergente. La solución per se no es parte de la presente invención.

Como se demuestra en los presentes ejemplos, la solución se puede utilizar para preparar una amplia variedad de muestras de tejido utilizando una amplia variedad de anticuerpos. Por lo tanto, la presente invención tiene ventajosamente aplicabilidad general en la preparación de muestras de tejido para imagenología 3D. Los ejemplos también demuestran que la presente invención puede facilitar la imagenología con una resolución comparable a la histoquímica 2D, y que se mantienen la integridad del tejido y la arquitectura de órgano.

La presente invención también es efectiva en tiempo y es rentable, y no requiere equipo especial o adquisición de muestras (por ejemplo, incrustación en hidrogel, fijación en GA o similares). Esto representa una ventaja adicional sobre las técnicas utilizadas previamente en el arte. Como se describe anteriormente, sin desear limitarse por la teoría, las técnicas en el arte anterior pueden tener desventajas asociadas con la fijación excesiva, la recuperación complicada de epítomos y la reticulación que se deben superar a fin de preparar una muestra de tejido que sea adecuada para la imagenología al lograr la integridad de tejido, al conservar la arquitectura del órgano y al producir una señal fiable cuando se inmunomarca.

Por lo tanto, la presente invención puede permitir el uso de un paso de fijación más simple, tal como reducir el tiempo que la muestra de tejido se expone al fijador o usar un fijador convencional, por ejemplo, formalina amortiguada neutral (NBF).

La presente invención facilita ventajosamente la provisión de una amplia variedad de muestras de tejido para la imagenología 3D usando una amplia variedad de anticuerpos. Las técnicas histológicas tradicionales para la imagenología 2D pueden no ser efectivas a través de una amplia variedad de tejidos y las técnicas histológicas tradicionales pueden no funcionar con una amplia variedad de anticuerpos, incluidos anticuerpos de especificidad tanto amplia como estrecha.

En otra ventaja, la invención también permite la imagenología de muestras de tejido enteras e intactas sin el requisito de seccionamiento en serie de la muestra. La invención también permite ventajosamente la imagenología 3D de muestras de tejido en seccionadas parcialmente o seccionadas en serie en un grado coincidente o mejorado con respecto a las técnicas histológicas tradicionales.

La capacidad de proporcionar muestras de tejido completas e intactas inmunomarcadas para la imagenología 3D puede ser particularmente ventajosa con propósitos patológicos o de diagnóstico. Por ejemplo, la invención puede permitir la imagenología tumoral 3D y la determinación de los márgenes de tumor en una muestra de tejido. Esto es ventajoso sobre el análisis histológico convencional que requiere el seccionamiento en serie de muestras de tejido que consume mucho tiempo y es costoso.

En la histología convencional con propósitos patológicos o de diagnóstico, es común muestrear parte del tejido completo y se sabe que el submuestreo puede resultar en la falta de marcadores esenciales o tumores completos, lo que puede conducir a conclusiones incorrectas sobre la presencia o ausencia de un estado de enfermedad. Por lo tanto, la invención puede reducir ventajosamente la probabilidad de que un estado de enfermedad no se detecte y proporciona ventajosamente un método mejorado para determinar la presencia o ausencia de un estado de enfermedad en una muestra de tejido, es decir, en un entorno de diagnóstico.

En una ventaja, el método o uso de la invención proporciona una muestra de tejido mejorada para la imagenología

3D, que permite una variedad más amplia de inmunomarcado de la muestra de tejido para la imagenología 3D.

A manera de ventaja adicional, la presente invención también se puede utilizar con muestras de tejido de archivo, tal como aquellas en bloques de parafina.

5

Se conoce que las muestras de tejido que se archivan (almacenan) en bloques de parafina se ponen en contacto con y se incrustan en parafina para su almacenamiento (incrustado en parafina) utilizando métodos estándar. También se sabe que para recuperar las muestras de tejido del almacenamiento, la muestra de tejido almacenada se desparafina y posteriormente se procesa para la imagenología. Los métodos de inmunomarcado convencionales no son adecuados para uso con muestras que se han incrustado en parafina, en tanto que la invención como se describe en la presente es sorprendentemente adecuada para uso con estas muestras.

10

La solución descrita en la presente se puede utilizar en la preparación de muestras de tejido. Como se utiliza en la presente, el término "preparación" como se utiliza en la presente pretende abarcar cualquier aspecto de la producción de una muestra de tejido antes de que se someta a imagenología 3D.

15

En un aspecto, la muestra de tejido puede ser de un ratón, rata, conejo, vaca, cerdo o primate no humano. En un aspecto preferido, la muestra de tejido es de un ser humano.

20

Los métodos de la invención encuentran muchos usos, por ejemplo, en medicina e investigación. Los métodos de la invención se pueden utilizar para diagnosticar, determinar la presencia o ausencia, o monitorear un estado de enfermedad.

25

Los métodos de la invención se pueden utilizar para estudiar tejido sano o enfermo o para evaluar la eficacia de agentes candidatos en la modificación de la enfermedad.

La solución también se puede utilizar para la preparación de modelos de cultivo celular tridimensional para la tinción.

30

El método de la presente invención se define en la reivindicación 1.

De acuerdo con el método de la invención, esta muestra de tejido puede no haberse incrustado en hidrogel y/o puede no haberse fijado con glutaraldehído. De manera adecuada, de acuerdo con el método de la invención, la imagenología 3D puede ser con base en inmunotinción.

35

En algunas realizaciones del método de la invención, a) el detergente puede ser SDS o zwitteriónico, preferentemente detergente Zwittergent^{MR}, en donde el detergente Zwittergent se selecciona de cualquiera de n-octil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato y n-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato; y/o b) el pH de esta solución de agente amortiguador puede ser menor que 8,5, menor que 8, menor que 7,5 o 7; y/o c) la solución de agente amortiguador puede ser solución de ácido bórico o amortiguada con citrato, preferentemente ácido bórico.

40

De manera adecuada, en el método de la invención, la solución se puede usar a una temperatura de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 60 °C, preferentemente de aproximadamente 50 °C y aproximadamente 60 °C, más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 55 °C o aproximadamente 54 °C.

45

Adecuadamente, de acuerdo con el método de la invención, esta muestra de tejido puede ser de: a) un ratón, rata, conejo, vaca, cerdo o primate no humano; o b) un ser humano, preferentemente en donde esta muestra de tejido es un espécimen resecado quirúrgicamente.

50

De manera adecuada, de acuerdo con el método de la invención, esta muestra de tejido se puede fijar usando formalina amortiguada neutral, preferentemente formalina amortiguada neutral al 10%.

55

De manera adecuada, el método de la invención comprende además un paso de determinar la presencia o ausencia de un estado de enfermedad en la muestra de tejido.

De manera adecuada, de acuerdo con el método de la invención, esta muestra de tejido puede haberse incrustado en parafina.

60

De manera adecuada, de acuerdo con el método de la invención, esta muestra de tejido puede ser una muestra de tejido intacta.

65

De manera adecuada, esta imagenología 3D puede ser con base en inmunotinción.

De manera adecuada, a) el detergente puede ser SDS o zwitteriónico, preferentemente detergente Zwittergent^{MR}, en donde el detergente Zwittergent se selecciona de cualquiera de n-octil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato y n-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato; y/o b) el pH de esta solución de agente amortiguador puede ser menor que 8,5, menor que 8, menor que 7,5 o 7; y/o c) la solución de agente amortiguador puede ser solución de ácido bórico o amortiguada con citrato, preferentemente ácido bórico.

De manera adecuada, la solución se puede usar a una temperatura de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 60 °C, preferentemente de aproximadamente 50 °C y aproximadamente 60 °C, más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 55 °C o aproximadamente 54 °C.

Adecuadamente, de acuerdo con la solución, esta muestra de tejido puede ser de: a) un ratón, rata, conejo, vaca, cerdo o primate no humano; o b) un ser humano, preferentemente en donde esta muestra de tejido es un espécimen resecado quirúrgicamente.

En una realización, la invención proporciona un método para preparar la solución de acuerdo con la invención, este método que comprende combinar esta solución de agente amortiguador con un pH por debajo de 8 con este detergente.

El método de la invención se puede utilizar para determinar la presencia o ausencia de un estado de enfermedad.

De manera adecuada, el pH del agente amortiguador está por debajo de 9. De manera adecuada, el pH del agente amortiguador está por debajo de 8,5. De manera adecuada, el pH del agente amortiguador está por debajo de 8.

De manera adecuada, la solución de agente amortiguador no es PBS. Adecuadamente, la solución de agente amortiguador es ácido bórico o ácido cítrico.

En una realización, la solución utilizada en el método de la invención comprende una solución de agente amortiguador con un pH menor que 8,5, preferentemente menor que pH 8, y un detergente, en donde la solución de agente amortiguador es ácido bórico.

Adecuadamente, el detergente es zwitteriónico.

En una realización, la solución utilizada en el método de la invención comprende una solución de agente amortiguador con un pH de 7 y un detergente.

De manera adecuada, el detergente es SDS.

De manera adecuada, el detergente es zwitteriónico o Zwittergent^{MR}.

Lista de figuras

Figura 1. La recuperación de epítomos permite el inmunomarcado de tejido completo. a) Los lóbulos pancreáticos intactos se trataron durante 16 horas con los agentes amortiguadores indicados que contenían SDS al 4% a las temperaturas indicadas. Se muestran tinciones para Krt19 (conductos pancreáticos). Las líneas azules indican la temperatura mínima por encima de la cual se observó la tinción; las líneas rojas indican la temperatura máxima por encima de la cual se observó el daño de muestra. Los cruces indican la pérdida de muestra.

Figura 2. La clarificación de tejidos no es suficiente para el inmunomarcado. a) Tinción de inmunofluorescencia para amilasa (células acinares), PCSK1 (islotos de Langerhans) y SMA (estroma y vasculatura) en páncreas incrustado en parafina y seccionado (4 µm) después de la recuperación de antígeno mediada por calor. Barras de escala 100 µm. b) Tinción con los mismos anticuerpos que en (a) en páncreas y los páncreas de control no tratados (PBS) clarificados con agentes amortiguadores iDISCO, Clarity y CUBIC. Se muestran vistas 3D de una región representativa. Barras de escala 100 µm. c) Reconstrucción 3D de páncreas teñidos con los anticuerpos indicados después de 16 horas de tratamiento con FLASH.

Figura 3. FLASH permite la inmunotinción de pulmón, a-d) Tinción para CC10 (células clara) y SMA (células mioepiteliales y vasculatura). a) Vista 3D de un lóbulo pulmonar intacto que muestra el árbol bronquiolar. Barra de escala 1 mm. b) Aumento del área indicada en (a) (recuadro blanco) que revela una disposición intrincada de células mioepiteliales que se extienden alrededor de los conductos bronquiolares. Barra de escala 500 µm. c) Vista ampliada de la región indicada en (b) (cuadro blanco). Barra de escala 150 µm. c') Sección óptica que demuestra la compartimentación intacta de las capas de tejido epitelial y mioepitelial. Barra de escala 50 µm. d) Tinción comparativa de la sección de tejido pulmonar incrustada en parafina (4 µm). Barra de escala 50 µm. e) Tinción para CC10, SMA y Sp-C (células alveolares tipo II). Barras de escala 100 µm.

Figura 4. FLASH permite la inmunotinción del hígado. a) Vista 3D de un segmento de hígado teñido para GS (hepatocitos pericentrales). Barra de escala 300 μm . b) Reconstrucción 3D y sección óptica (b') del conducto biliar teñido para Krt19 (células de conducto) y Aqp1 (microvasculatura). Barras de escala 200 μm . c) Tinción para Krt19 y Prox1 (endotelio linfático, nuclear). Barra de escala 100 μm . d) Conducto biliar teñido con DBA (células de conducto) y CD44 (células de conducto biliar). Barra de escala 50 μm . d') Sección óptica del conducto mostrado en (d) que demuestra la localización mantenida de CD44 en las membranas celulares laterales. Barra de escala 20 μm .

Figura 5. FLASH permite la inmunotinción de la glándula lagrimal. a) Reconstrucción 3D de la glándula lagrimal teñida para Krt19 (células de conducto), SMA (estroma) y Aqp1 (microvasculatura). Barra de escala 200 μm . b) Tinción para Krt19 y S100 (nervios). Barra de escala 200 μm . c) Tinción para S100 y Krt14 (miofibroblastos). Barra de escala 100 μm . d) Tinción para Krt19 y vimentina (fibroblastos). Barra de escala 200 μm . d') Sección óptica a través de la vista en (d) que demuestra la compartimentación de las capas de tejido mesenquimal y epitelial. Barra de escala 100 μm .

Figura 6. FLASH permite la inmunotinción del riñón. a) Reconstrucción 3D de un riñón teñido para DBA (conductos colectores y grupo de túbulos) y PNA (túbulos distales). Barra de Escala 1 mm. b) Tinción para DBA, PNA y WT1 (glomérulos, nuclear). Barra de escala 100 μm . b') Sección óptica a través del área indicada en (b) (cuadro blanco). Barra de escala 50 μm . c) Tinción para DBA, PNA y WT1 en una sección renal incrustada en parafina (4 μm). Barra de escala 50 μm .

Figura 7. Localización de proteínas subcelulares conservadas después de FLASH. a) Vista 3D de un páncreas tratado con FLASH que muestra la disposición de células acinares (Amy, amilasa) en grupos (acinos) entre láminas de matriz extracelular positiva para CollIV. Barra de escala 50 μm . a') Sección óptica a través del área en (a) que muestra la localización de Mist1 (células acinares, nucleares), Amy y CollIV en un acino. Barra de escala 20 μm . b) Intensidad de fluorescencia a lo largo de la línea indicada en (a) que muestra una localización subcelular distinta de los epítomos. c) Imágenes de canal individual de (a'). d) Tinción para Amy, CollIV y Mist1 en sección de tejido pancreático incrustado en parafina (4 μm). Barra de escala 20 μm . e) Perfiles de intensidad de los fluoróforos en (d).

Figura 8. Morfología de tejido intacto después de FLASH. a) Tinción de hematoxilina y eosina (H&E) en páncreas, hígado y pulmón de control de PBS incrustado en parafina (secciones de tejido de 4 μm). b) Tinción de H&E en páncreas, hígado y pulmón tratados con FLASH (secciones de tejido de 4 μm) que demuestra la morfología de tejido conservada y la idoneidad para usar muestras tratadas con FLASH para tinciones 2D posteriores y análisis histológico. Todas las barras de escala 100 μm .

Figura 9. Imagenología de FLASH del páncreas intacto y visualización del árbol ductal. (a-c) Representación 3D del páncreas intacto teñido con tdTomato de R26-CAG-tdTomato tratado con *tamoxifeno*; *ratón Hnf1 β CreERT2*, (a) vista 3D de todo el páncreas unido al duodeno y al bazo. Barra de escala 5 mm. (b) Ampliación 3D del área en (a). Barra de escala 500 μm . (c) Vistas 3D de segmentos ductales. (1) conducto principal; (2) conducto interlobulillar; (3) conducto intralobulillar; (4) conductos intercalados. Barras de escala 100 μm . (d) Heterogeneidad segmentaria del diámetro de conducto. Cada punto representa un conducto, 180 conductos, 3 ratones. (e) Sección de tejido pancreático teñida para Cdh1 y ADN para resaltar diferentes formas de células del conducto. Barras de escala 10 μm . (f) Heterogeneidad segmentaria de ancho de célula de conducto (negro), altura (rojo) y longitud (azul); promedios de cinco células por conducto, 115 conductos, 6 ratones. Líneas ajustadas obtenidas usando regresión no lineal. (g) Ilustración de heterogeneidad segmentaria del árbol ductal. L - longitud de célula, W - ancho de célula, H - altura de célula.

Figura 10. Integridad de órgano conservada después de FLASH. (a) tinción de FLASH de un páncreas de ratón indicador de insulina(Ins)-GFP para amilasa (Amy), Krt19 e Ins-GFP. Reconstrucción 3D izquierda que demuestra una organización compleja de islotes y conductos pancreáticos. Barra de escala 100 μm . Sección óptica derecha a través del área indicada (izquierda) que muestra la compartimentación conservada en glándulas exocrinas y endocrinas como se ve por la tinción mutuamente excluyente para Amy, Krt19 e Ins-GFP. Barras de escala 50 μm . (b) Vista 3D de un conducto de alto calibre (32 μm de diámetro) teñido para Krt19 y ADN, que demuestra integridad epitelial conservada. Barra de escala 50 μm . (b') Sección óptica izquierda a través del área indicada en (b) que demuestra la monocapa de células de conducto continuo y el lumen de conducto conservado. Barra de escala 30 μm . Tinción derecha para Krt19 y ADN en una sección de tejido de 4 μm de páncreas incrustado en parafina. Barra de escala 30 μm . (c) tinción de FLASH para tdTomato (tdTOM) y Krt19 en los páncreas de R26-CAG-tdTomato; *ratones Hnf1 β CreERT2* sin (izquierda) y con (derecha) inyección intraperitoneal de 100 μg de tamoxifeno por gramo de peso corporal. Barras de escala 500 μm . (d) Arborización del árbol ductal. Cada punto representa un conducto y las líneas indican ramificación. Para tres páncreas teñidos con Krt19, se tomaron pilas z de al menos 30 vistas aleatorias de gran aumento. Según la vista, se identificó el conducto más grande y se midieron los diámetros de cuatro conductos de ramificación posteriores para categorizar el modo de arborización. Para conductos con más de una furcación, la secuencia se continuó con el conducto más grande ramificándose a partir del mismo. A las células de conducto terminal se les asignó un diámetro de conducto de 0 μm para indicar el final del árbol ductal. (e) La dirección de división celular se midió en clones de dos células de *ratones R26-LSL-*

Confetti; Hnf1 β -CreERT2 tratados con tamoxifeno como el ángulo determinado con respecto a la línea que conecta ambos núcleos y la direccionalidad del conducto. (263 clones, 5 ratones). (f) Dirección de división celular y relación de aspecto celular en conductos de diámetro variable. Las líneas continuas representan ajustes exponenciales.

5 Figura 11. Heterogeneidad de inducción de neoplasia en los conductos pancreáticos. (a) Deformaciones ductales de páncreas exofíticas y endofíticas. (b-g) comparación de FLASH con histología 2D. (b, e) Vista 3D (izquierda) y sección óptica (derecha) de *KrasG12D*; *F/F* de *Fbw7*; *R26-EYFP*; *Ck19-CreERT* (*KFck19*) deformaciones exofíticas (b) y endofíticas (e) 10 días después de la recombinación. Barras de escala 50 μ m. (c-d, f-g) Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) de lesiones exofíticas (c-d) y endofíticas (f-g) 10 días (c, f) y 21 días (d, g) después de la recombinación. Barras de escala 100 μ m.

15 Figura 12. Neoplasia exofítica y endofítica en modelo *KrasG12D*; *Fbw7 F/F*. (a) Modelo de ratón *KFck19* para inducción tumoral en el epitelio ductal activado por eliminación de exón *Fbw7* y activación de *KrasG12D*. (b) La eficacia de recombinación de la inyección de tamoxifeno de dosis baja y el número de clones transformados por célula recombinada se cuantificaron una semana después de la inyección de tamoxifeno en ratones *KFck19*. Las células *Krt19*⁺ trazadas con *EYFP* se cuantificaron por conducto y el número total de células de conducto se estimó al dividir la longitud de conducto por la longitud de célula promedio medida para este conducto y al multiplicar esto por el número promedio de células circunscritas para este conducto. Los clones transformados se reconocieron como grupos de más de tres células trazadas por *EYFP* que comparten una interfaz. 1 punto representa un conducto (112 conductos, 3 ratones). (c-d) Modelo de ratón *KFH* para direccionamiento alternativo de conductos pancreáticos. (d) Izquierda, representación 3D de neoplasia exofítica (parte superior) y neoplasia endofítica (parte inferior) de ratones *KFH*. Tinción para *Krt19* y *tdTomato*. Barras de escala 100 μ m. Derecha, tinciones de H&E para lesiones exofíticas (parte superior) y endofíticas (parte inferior) de *KFH*. Barras de escala 100 μ m. (e) Tinción de H&E y AB/PAS para lesiones exofíticas y endofíticas en ratones *KFck19* que demuestran un carácter no mucinoso habitual de la neoplasia derivada del conducto. Barras de escala 100 μ m. (f) Estrategia experimental para visualizar la conexión de la neoplasia exofítica con el árbol ductal. El conducto biliar extrahepático se canuló en la ampolla y el árbol ductal de páncreas se perfundió con 50 μ l de dextrano marcado con FITC. (g) Captación de DexFITC por una lesión exofítica de *KFck19* que demuestra la conexión de la lesión al sistema ductal. Izquierda, vista 3D y derecha, sección óptica. Barras de escala 50 μ m.

30 Figura 13. Progresión de morfología de neoplasia derivada de acinar.(a) Esquema que ilustra la estrategia genética para la transformación de células acinares mediante activación de *KrasG12D* con eliminación concomitante de *F/F* de *P53* o *F/F* de *Fbw7* utilizando impulsores de *Ela1-CreERT* o *Ptf1a-ERT2*. (b-c) Ratones *KrasG12D*; *F/F* de *Fbw7*; *Ela1-CreERT* (*KFEla1*). (b) Vista 3D de la metaplasia acinar a ductal identificada por el aumento de manera regulada local de la expresión de *Krt19* en células acinares. Se muestran acinos trazados por *tdTomato* conectados a un conducto terminal. La cabeza de flecha delimita la expresión de *Krt19* por el acino medio, formando un pequeño anillo de células *Krt19*⁺ derivadas de acinar, trazadas por *tdTomato*. Barra de escala 50 μ m. (c) Proyección 3D de una lesión globular de *KFEla1* en contacto con un conducto de pequeño calibre (línea punteada). Barra de escala 20 μ m. (c') Secciones ópticas de la lesión mostradas en (c) que demuestran el trazado de *tdTomato* (parte superior) y la morfología globular (parte inferior). Barras de escala 20 μ m. (d-g) Ratones *KrasG12D*; *p53 F/F*; *Ela1-CreERT* (*KPEla1*). (d) Vista 3D de una lesión globular de *KPEla1* trazada por *tdTomato* conectada a un conducto terminal (punta de flecha). Barra de escala 50 μ m. (e) Proyección 3D de una gran lesión de *KPEla1* que muestra una morfología central tipo uva de estructuras globulares consecutivas y una conexión mantenida a varios conductos de pequeño calibre (puntas de flecha) en el borde de lesión. Barra de escala 200 μ m. (e') Mayor aumento del área indicada en (e) que demuestra una conexión perfecta de células *Krt19*⁺ derivadas de acinar y epitelio ductal tipo silvestre (líneas punteadas). Barra de escala 30 μ m. (f) Perfusión retrógrada del árbol ductal con dextrano-FITC como en Datos extendidos. La figura 2f que demuestra la conexión directa de lesiones derivadas de acinar al sistema ductal. Vista 3D de una lesión de *KPEla1*. Barra de escala 50 μ m. (g) Tinción de H&E de una lesión de *KPEla1* que demuestra morfología globular. Barra de escala 100 μ m. (h) Ratones *KrasG12D*; *p53 F/F*; *Ptf1a-CreERT2* (*KPPtf1a*). Tinción de H&E que demuestra la morfología globular de las lesiones. Barra de escala 100 μ m.

55 Figura 14. Neoplasia exofítica y endofítica en *KrasG12D*; modelo de *F/F* de *p53* y en páncreas humano.(a-c) Lesiones endofíticas y exofíticas inducidas por eliminación de *p53* con activación de *KrasG12D* después de la recombinación pancreática completa inducida por *Pdx1-Cre* (*KPC*). (b) Vista 3D de una región pancreática con deformaciones endofíticas (1) y exofíticas (2). Barra de escala 150 μ m. (1-2) Mayores aumentos de las áreas indicadas en (b). Barras de escala 50 μ m. (1) Las puntas de flecha demarcan invaginaciones habituales de crecimiento endofítico. (2) La línea punteada marca un conducto de pequeño calibre morfológicamente normal en contacto con una lesión globular, exofítica. (c) Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) para lesiones exofíticas (izquierda) y endofíticas (derecha) en el modelo de *KPC*. Barras de escala 100 μ m. (d-e) Lesiones exofíticas y endofíticas inducidas por eliminación de *p53* con activación de *KrasG12D* en conductos pancreáticos (*Ck19-CreERT*; *KPCk19*). (e) Proyección 3D de formas de lesiones exofíticas (izquierda) y endofíticas (derecha) en ratones *KPCk19*. Barras de escala 100 μ m. (f) Tinción de H&E de secciones de tejido de páncreas de fondo de un paciente que presenta adenocarcinoma ductal pancreático. (Izquierda) Lesión exofítica. (Derecha) Lesión endofítica. Barras de escala 100 μ m.

Figura 15. Imagenología 3D de FLASH de biopsias humanas.(a-b) Lesión exofítica de un páncreas humano. (a) Tinción de H&E de una sección de tejido de páncreas humano. Barra de escala 100 µm. (b) Biopsia pancreática humana fotografiada con FLASH, que muestra una lesión ductal exofítica identificada por inmunomarcado de Krt19. Izquierda, vista 3D. Derecha, sección óptica. (c-d) Lesión endofítica. (c) Tinción de H&E de páncreas humano. Barra de escala 100 µm. (d) Biopsia pancreática humana formada en imagen con FLASH, que muestra una lesión ductal endofítica identificada por inmunomarcado de Cdh1 (verde). Las células mucinosas se identifican con inmunotinción de Muc5AC (rojo) y el estroma circundante con tinción de SMA (blanco). Izquierda, vista 3D. Derecha, sección óptica.

10 Descripción detallada de la invención

Imagenología 3D

15 La presente invención permite la visualización de estructuras marcadas molecularmente dentro de grandes tejidos intactos en tres dimensiones.

20 La imagenología 3D se puede llevar a cabo por métodos que serán conocidos por aquellos expertos en la técnica en este campo. Por ejemplo, la imagenología 3D se puede llevar a cabo por microscopía óptica, microscopía de fluorescencia, tal como microscopía confocal, microscopía de lámina de luz, microscopía de súper resolución, microscopía de distancia de precisión espectral, agotamiento de emisión estimulada, microscopía de expansión, o tomografía de proyección óptica y cualquier variación de estas.

25 En un aspecto preferido de la invención como se describe en la presente, la imagenología 3D es con base en la inmunotinción.

30 La presente invención facilita o permite la inmunotinción de muestras de tejido para la imagenología 3D. La invención facilita la tinción de anticuerpos de la muestra de tejido. La presente invención es con base en la solubilización de membrana con recuperación de antígeno sin interrumpir la arquitectura de tejido. A diferencia de las técnicas anteriores, como se demuestra en la presente, la invención permite la tinción robusta de una amplia variedad de tipos de tejido con una alta relación de señal a ruido.

35 "Inmunotinción", como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier uso de un método basado en anticuerpos para detectar una proteína específica en una muestra, tal como inmunomarcado o tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido.

40 En un aspecto, la invención facilita la inmunotinción de una muestra de tejido antes de la imagenología 3D. La inmunohistoquímica, o IHC, o inmunomarcado de secciones de tejido (o inmunocitoquímica o marcaje de inmunofluorescencia, que es la tinción de células), son quizás las técnicas de inmunotinción más comúnmente aplicadas. En tanto que el inmunomarcado y el marcaje por inmunofluorescencia usan tintes fluorescentes, la inmunohistoquímica y la inmunocitoquímica usan enzimas tal como la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Estas enzimas son capaces de catalizar reacciones que dan un producto coloreado que es fácilmente detectable por microscopía óptica. Alternativamente, los elementos radiactivos se pueden utilizar como etiquetas, y la inmunorreacción se puede visualizar por autorradiografía.

45 Cuando se inmunotifia un antígeno específico, se pueden emplear varios métodos. Por ejemplo, en el método, se puede preparar un marcador (conjugado) al unirse directamente a una marca fluorescente y un anticuerpo primario y entonces se tinte un antígeno (método de anticuerpo primario). Alternativamente, la marca se puede preparar al unir directamente una etiqueta fluorescente y un anticuerpo secundario y un antígeno unido con un anticuerpo primario se tinte entonces (método de anticuerpo secundario). En un método alternativo adicional, se puede preparar una marca al unirse directamente a una marca fluorescente y biotina y entonces se tinte un antígeno unido con un anticuerpo primario y avidina o un anticuerpo secundario modificado con estreptavidina (método de biotina-avidina o método de intercalación).

55 Cualquier anticuerpo primario adecuado se puede utilizar en la inmunotinción, y el anticuerpo primario es variable dependiendo del sujeto que se va a inmunotefir. Por ejemplo, cuando la inmunotinción se realiza utilizando HER2 como un antígeno, se utiliza un anticuerpo anti-HER2. Un experto en la técnica sería consciente de los anticuerpos adecuados para la tinción.

60 En un aspecto, el antígeno se puede seleccionar de SST, KCNE3, PP, Péptido C, Ins, CD44, SMA, RFP y derivados de la misma, GFP y derivados de la misma, Krt19, Krt5, Krt14, Krt7, Krt76, Pan-Citoqueratina, WT-1, Epcam, Muc1, Muc5Ac, Muc2, Prox1, Cdh1, Mist1, Lyz, GFAP, TH, PGC, GIF, Endomucina, PGP9.5, PCSK1/3, GS, S100, Aqp1, Aqp2, Gluc, H/K-ATPasa, Amy, CC10, SFTPC, ColIV, Vim, Ki67, PCNA, Miosina, fosfohistona H3, y Caspasa-3 escindida.

65 Además, se puede utilizar cualquier anticuerpo secundario y el anticuerpo secundario es variable dependiendo del anticuerpo primario. Los ejemplos de los mismos incluyen anticuerpos anti-ratón, de conejo, bovinos, cabra, oveja,

perro y pollo.

Para la unión de una marca fluorescente con un anticuerpo o biotina, se puede emplear cualquier método existente. Por ejemplo, se puede utilizar la amidación por reacción entre la amina y el ácido carboxílico, la sulfuración por reacción entre la maleimida y el tiol, la iminación por reacción entre el aldehído y la amina, o la aminación por reacción entre el epoxi y la amina.

La inmunotinción no se restringe a la tinción de tejido y también se puede aplicar a la tinción de células.

En un aspecto de la invención, la tinción no se limita a anticuerpos, y se puede utilizar cualquier sustancia que interactúe con la muestra. Por ejemplo, se pueden utilizar tintes que interactúan con estructuras bioquímicas, tal como tintes de intercalación de ADN como Dapi, Syto11, yoduro de propidio, Draq5, o se pueden utilizar agentes que interactúan con propiedades bioquímicas o grupos reactivos de constituyentes de tejido, por ejemplo, se pueden utilizar lectinas como aglutinina de dolichos biflorus, aglutinina de germen de trigo, aglutinina de cacahuete o aglutinina de ulex europaeus que detectan ciertas modificaciones postraduccionales en proteínas. La detección no se restringe a marcas fluorescentes conjugadas a anticuerpos y también se puede combinar con tintes inherentemente fluorescentes, o marcado secundario por química click-it.

En un aspecto, la imagenología 3D no se restringe a la tinción, y también puede implicar la detección de señales inherentes a la muestra, tal como la generación de segundos armónicos y la imagenología de proteínas fluorescentes.

Solución de agente amortiguador

Una solución de agente amortiguador (más precisamente, agente amortiguador de pH o agente amortiguador de iones de hidrógeno) es una solución acuosa que consta de una mezcla de un ácido débil y su base conjugada, o viceversa. El pH de un agente amortiguador cambia muy poco cuando se le adiciona una pequeña cantidad de ácido o base fuerte. Las soluciones de agente amortiguador se utilizan como un medio para mantener el pH en un valor casi constante en una amplia variedad de aplicaciones.

La solución de agente amortiguador de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier agente amortiguador adecuado que tenga un pH por debajo de 9 para preparar muestras de tejido para la imagenología 3D.

En un aspecto, el agente amortiguador se puede seleccionar de ácido cítrico, ácido acético, borato, CHES, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , TAPS (ácido [Tris(hidroximetil)metilamino]propanosulfónico), Bicina (ácido 2-(Bis(2-hidroxietil)amino)acético), Tris (Tris(hidroximetil)aminometano) o, (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol), Tricina (ácido 3-[N-Tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxi-propanosulfónico), TAPSO (ácido 3-[N-Tris(hidroximetil)metilamino]-2-hidroxi-propanosulfónico), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico), TES (ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), PIPES (Piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)), cacodilato (ácido dimetilénico), MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), y combinaciones de los mismos. En un aspecto, la solución de agente amortiguador puede ser solución salina amortiguada con fosfato (PBS).

En un aspecto preferido, la solución de agente amortiguador es una solución de ácido bórico o amortiguada con citrato.

En un aspecto, la solución de ácido bórico está a una concentración de aproximadamente 50 a 500 mM, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mM. En un aspecto, la concentración es de aproximadamente 200 mM.

En un aspecto, el pH del agente amortiguador está en el intervalo de aproximadamente pH 3 a un pH por debajo de 9. En un aspecto, el pH del agente amortiguador está en el intervalo de aproximadamente pH 4 a un pH por debajo de 9. En un aspecto, el pH del agente amortiguador está en el intervalo de aproximadamente pH 5 a un pH por debajo de 9. En una realización, el pH del agente amortiguador está en el intervalo de aproximadamente pH 6 a un pH por debajo de 9. En una realización, el pH del agente amortiguador está en el intervalo de aproximadamente pH 7 a un pH por debajo de 9. En una realización, el pH del agente amortiguador está en el intervalo de aproximadamente pH 8 a un pH por debajo de 9.

En un aspecto, el pH del agente amortiguador es de aproximadamente 8,9, 8,8, 8,7, 8,6, 8,5, 8,4, 8,3, 8,2, 8,1, 8,0, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, 7,1, 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1 o 3,0.

En un aspecto preferido, el pH del agente amortiguador es de aproximadamente 7,0.

Temperatura

La solución utilizada en el método de la invención se utiliza a una temperatura entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 100 °C. Por ejemplo, la solución se puede usar a una temperatura de entre aproximadamente 40°C y 95°C, aproximadamente 50°C y aproximadamente 90°C, aproximadamente 55°C y 85°C, aproximadamente 60°C y aproximadamente 80°C, o aproximadamente 65°C y 75°C. En una realización preferida, la solución se usa a una temperatura de entre aproximadamente 50 °C y 60 °C, de manera preferente aproximadamente 55 °C. La solución se puede usar a una temperatura seleccionada de aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 °C.

Detergente

Los detergentes adecuados para uso en la invención son detergentes utilizados en métodos estándar de preparación de muestras de tejido.

En un aspecto, el detergente se selecciona de un detergente no iónico, iónico o zwitteriónico. En un aspecto, el detergente es un detergente iónico. En un aspecto, el detergente es un detergente zwitteriónico.

Un detergente no iónico se puede seleccionar de BigCHAP (N,N-Bis[3-(D-gluconamido)propil]colamida), Brij^{MR} 35 (polietilenglicol-dodecil-éter), C12E8 (octaetilenglicol monododecil éter), C12E9 (polioxietilen(9)dodecil-éter), decil-β-glucósido, decil-β-maltósido, desoxi-BigCHAP (N,N-Bis[3-(D-gluconamido)propil]desoxicolamida), digitonina, dodecil-β-glucósido, dodecil maltósido, Lubrol PX, Nonidet^{MR} P-40 (octilfenoxi poli(etileno)etanol, ramificado), octil-β-glucósido, octil-β-maltósido, octil-β-tiogalactósido, octil-β-tiogalactósido, octil-β-tiogalactósido, octil-β-tiogalactósido, PLURONIC^{MR} F-127 (copolímero de bloque de polioxipropileno)ietileno), Trit^{MR} X-100 (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol), Tween^{MR} 20 (monolaurato de polietilenglicol sorbitán) y Tween^{MR} 80 (monooleato de polietilenglicol sorbitán).

En un aspecto de la invención, el detergente es un agente tensioactivo iónico. Un detergente iónico se puede seleccionar de colato de sodio, CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), desoxicolato de sodio, sulfato de litio, taurocolato de sodio y taurodesoxicolato de sodio. Preferentemente, el agente tensioactivo aniónico es dodecil-sulfato de sodio (SDS).

En un aspecto alternativo, el detergente es un detergente zwitteriónico. Los grupos de cabeza polar de los detergentes zwitteriónicos contienen grupos atómicos cargados tanto de manera negativa como positivamente, por lo que la carga total es neutral. Se considera que la fuerza de acción de estos compuestos es intermedia entre los detergentes iónicos y no iónicos, que comparten características con ambos tipos.

Un detergente zwitteriónico se puede seleccionar de CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidratado) y CHAPSO (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxil-1-propanosulfonato), que están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Merck.

En un aspecto, el detergente zwitteriónico es un detergente Zwittergent^{MR}, que se puede seleccionar de Zwittergent^{MR}3-08 (n-octil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent^{MR}3-10 (n-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent^{MR}3-12 (n-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent^{MR}3-14 (n-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), y Zwittergent^{MR}3-16 (n-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato).

En un aspecto preferido de la invención, el detergente es Zwittergent^{MR}3-10 (n-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato).

Los detergentes Zwittergent^{MR} están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Calbiochem (Merck KGaA, Damstadt, Alemania).

La cantidad de detergente que se va a incluir en la solución se puede determinar por un experto en la técnica.

En un aspecto preferido, se puede utilizar SDS al 4% o Zwittergent^{MR}3-10 al 8%.

Aditivos

Para potenciar además la tinción, se pueden adicionar compuestos que ayudan a la recuperación de antígeno o incrementan la penetración de muestra a la solución. Los compuestos que apoyan la recuperación de antígeno pueden, por ejemplo, ser depuradores de formaldehído tal como ácido ascórbico, urea, tris, 2-imidazolidinona o catalizadores tal como antranilatos y fosfanilatos o proteasas tal como tripsina o pepsina o colagenasa. Los compuestos que apoyan la penetración de muestra pueden ser agentes caotrópicos tal como tiocianato de amonio, n-butanol, dimetilsulfóxido, etanol, cloruro de guanidinio, perclorato de litio, acetato de litio, urea, cloruro de magnesio, fenol, 2-propanol, tiocianato de sodio y tiourea, o agentes reductores tal como 1,4-ditiotreitól, b-mercaptoetanol y clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina.

Muestra de tejido

La invención como se describe en la presente se puede aplicar a cualquier muestra de tejido.

5 La muestra de tejido se puede seleccionar de epitelio, tejido conectivo, tejido muscular y tejido nervioso.

10 En un aspecto preferido, la muestra de tejido se selecciona de tejido pancreático, tejido cerebral, tejido óseo, tejido de médula ósea, tejido pulmonar, tejido hepático, tejido estomacal, tejido de glándula mamaria, tejido de cabeza y cuello, tejido intestinal, tejido de glándula salival, tejido neuronal, tejido de ovario, tejido de testículo, tejido de músculo y tejido de la piel.

En un aspecto de la invención, la muestra de tejido puede ser una muestra de tejido embrionario.

15 En un aspecto, la muestra de tejido puede ser una muestra de tejido enfermo.

20 En un aspecto, la muestra de tejido puede ser una muestra de tumor. El tumor puede ser de un cáncer o carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioma, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, o un cáncer de cabeza y cuello.

25 En un aspecto, la muestra de tejido no es una muestra de tejido cerebral.

En un aspecto, la muestra de tejido es una muestra de tejido intacta.

En un aspecto, el tejido es un tejido completo o parte de un tejido.

30 En un aspecto, la muestra de tejido no se ha seccionado en serie.

En un aspecto, la muestra de tejido puede ser fresca, fija o congelada.

35 Una muestra de tejido fijada es una muestra de tejido que se ha tratado con cualquier fijador adecuado a fin de conservar el tejido de la descomposición. Los ejemplos de fijadores incluyen solución de formalina amortiguada neutral (NBS) al 10%, solución de paraformaldehído o glutaraldehído al 4%.

40 Una muestra de tejido congelada es una muestra de tejido que se ha criopreservado. Los ejemplos de congelación de tejido incluyen inmersión de tejido en isopentano/nitrógeno líquido o congelación instantánea en hielo seco o en nitrógeno líquido.

En un aspecto, la muestra de tejido es una biopsia de ganglio centinela.

45 Una biopsia de ganglio centinela es un procedimiento quirúrgico utilizado para determinar si el cáncer se ha diseminado más allá de un tumor primario al sistema linfático.

Métodos

50 La solución como se describe en la presente se puede utilizar en un método para preparar una muestra de tejido para la imagenología 3D.

El método de acuerdo con la invención puede comprender además determinar la presencia o ausencia de un estado de enfermedad en la muestra de tejido.

55 Por "estado de enfermedad" se entiende habitualmente que el método se puede utilizar para determinar si un sujeto está padeciendo de una o más enfermedades conocidas. Las enfermedades incluyen pero no se limitan a cáncer, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades endocrinas/reproductivas, enfermedades cardiovasculares/pulmonares, enfermedades musculoesqueléticas, o enfermedad gastrointestinal.

60 Por lo tanto, en realizaciones particulares, el método de la invención se puede utilizar para diagnosticar la presencia de una o más enfermedades conocidas. Esto puede implicar obtener muestras de tejido de uno o más pacientes; detectar la presencia de una o más enfermedades, preferentemente usando tinción de anticuerpos; y/o monitorear la progresión de una o más enfermedades en un sujeto. El presente método también se puede utilizar para distinguir una enfermedad de otras enfermedades.

65

En realizaciones de la presente invención, la muestra de tejido se tñe con anticuerpos y se forman imágenes 3D. La muestra se evalúa para determinar la inmunotinción anormal o inusual para determinar la presencia o ausencia de un estado de enfermedad en la muestra de tejido.

5 Se prevé que el método de acuerdo con la presente invención se puede utilizar como un paso en la determinación de si un paciente está respondiendo o ha respondido al tratamiento terapéutico por la preparación de una muestra de tejido para la imagenología 3D utilizando la solución descrita en la presente.

10 Como tal, la invención proporciona un método para preparar una muestra de tejido para la imagenología 3D, en donde este método comprende el paso de tratar una muestra de tejido con la solución como se describe en la presente.

15 También se describe el uso de la solución como se describe en la presente para preparar una muestra de tejido para la imagenología 3D.

La solución descrita en la presente se puede utilizar para depurar una muestra de tejido, es decir, para hacer que la muestra de tejido sea transparente.

20 El método de acuerdo con la invención puede comprender opcionalmente pasos adicionales.

El método puede comprender un paso de fijar la muestra de tejido. El método puede comprender un paso de lavado de la muestra de tejido. El método puede comprender un paso de incubación de la muestra de tejido en la solución descrita en la presente. El método puede comprender un paso de inmunomarcado.

25 El método puede comprender cualquiera de uno o más de los siguientes pasos:

1. Remoción de tejido, con perfusión vascular opcional con PBS.
2. Fijación de tejido.
3. Almacenamiento opcional de tejidos a largo plazo.
- 30 4. Pasos de lavado.
5. Un paso de limpieza de la muestra de escombros y tejidos adyacentes donde corresponda. Opcionalmente, la muestra se puede diseccionar en piezas más pequeñas.
6. Incubación de tejidos en una solución que permite el inmunomarcado.
- 35 7. Incubación con un anticuerpo primario o secundario.

40 En un aspecto, el método comprende incubar la muestra de tejido con una solución como se describe en la presente a una temperatura entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 100 °C. Por ejemplo, la incubación puede ser a una temperatura de entre aproximadamente 40°C y 95°C, aproximadamente 50°C y aproximadamente 90°C, aproximadamente 55°C y 85°C, aproximadamente 60°C y aproximadamente 80°C, o aproximadamente 65°C y 75°C. En un aspecto preferido de la invención, la incubación puede ser a una temperatura de entre aproximadamente 50 °C y 60 °C, de manera preferente aproximadamente 55 °C. La incubación puede ser a una temperatura seleccionada de aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 54, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 °C. En un aspecto de la invención como se describe en la presente, la incubación puede ser a una temperatura de aproximadamente 54 o 55 °C.

45 El período de incubación puede ser entre aproximadamente 2 y aproximadamente 48 horas, por ejemplo, aproximadamente 6 a 44, 10 a 40, 14 a 36, 18 a 32, o 22 a 28 horas. En un aspecto, el período de incubación es de aproximadamente 16 horas. El período de incubación puede ser una cuestión de días, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 días. En un aspecto, el período de incubación es de aproximadamente 24 horas. En un aspecto, el período de incubación puede ser una cuestión de semanas, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 semanas.

50 En un aspecto de la invención, la solución se puede utilizar para preparar una muestra de tejido para la imagenología 3D antes de que la muestra se procese para la tinción 2D. Por ejemplo, la muestra de tejido se puede someter a imagenología 3D antes de procesarse para la imagenología 2D. En un aspecto, la muestra de tejido se puede preparar usando la solución descrita en la presente antes de que la muestra se incruste en parafina con los propósitos de tinción e/o imagenología 2D.

55 En un aspecto de la invención, la solución se puede utilizar en un método para preparar una muestra de tejido para la imagenología 3D para el análisis de material de pacientes humanos en la clínica. En otro aspecto de la invención, la solución se puede utilizar para preparar una muestra de tejido para la imagenología 3D para medicina veterinaria.

60 En otro aspecto de la invención, la solución se puede utilizar para preparar una muestra de tejido para la imagenología 3D para el análisis de tejidos biológicos modificados o impresos.

65 La invención se describirá ahora adicionalmente a través de ejemplos, que se propone que sirvan para ayudar a

un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no se propone de ninguna manera que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

FLASH. Se desarrolló FLASH para la detección rápida de una multitud de antígenos en órganos adultos intactos mediante la recuperación de epítomos no destructivos leves (FLASH - Análisis con microscopio óptico rápido de órganos completos teñidos con anticuerpos).

Los ratones se sometieron a eutanasia por dislocación cervical. La perfusión cardíaca se llevó a cabo con 20 ml de PBS. Los órganos se recuperaron y se fijaron en NBF al 10% durante la noche a 4 °C. Las muestras se lavaron en PBT (Triton X-100 al 0,4% (Sigma-Aldrich) en PBS) dos veces durante una hora. Para la comparación del agente amortiguador en la figura 1, las muestras se incubaron en soluciones de la composición indicada que incluyen SDS al 4% durante 16 horas. Para la tinción con FLASH de varios órganos que se muestran en las figuras 2 a 5, los especímenes se incubaron en ácido bórico 200 mM (Sigma-Aldrich) y SDS al 4% (Sigma-Aldrich) pH 7,0 durante 16 horas a 54°C. Para los resultados mostrados en las figuras 6 y 7, las muestras se incubaron en ácido bórico 200 mM (Sigma-Aldrich) y Zwittergent^{MR} 3-10 al 8% (Merck) pH 7,0 durante 24 horas a 54 °C. Para la figura 8, las muestras se incubaron en PBS (control) o en ácido bórico 200 mM (Sigma-Aldrich) y Zwittergent^{MR} 3-10 al 8% (Merck) pH 7,0 durante 24 horas a 54 °C.

Las muestras se lavaron en PBT durante tres horas o más con al menos tres intercambios de volumen. Para el inmunomarcado, las muestras se incubaron en agente amortiguador de bloqueo de FLASH (albúmina de suero bovino al 1% (Sigma-Aldrich), DMSO al 5% (Sigma-Aldrich), suero de ternero fetal al 10% (Gibco), azida de sodio al 0,02% (Sigma-Aldrich), Triton X-100 al 0,2% en PBS) durante una hora y se incubaron con antisueros (todos 1:100) durante al menos 16 horas a temperatura ambiente en un nutador. Las muestras se lavaron por tres intercambios de volumen de PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios (todos 1:100) durante al menos dos días a temperatura ambiente.

Las muestras se lavaron por tres intercambios de volumen con PBS y se deshidrataron gradualmente en 30%, 50%, 75%, 2x 100% MetOH (Sigma-Aldrich), 1 hora cada una y, en una placa de vidrio, se sumergieron en salicilato de metilo diluido en MetOH: 25%, 50%, 75%, 2x 100% de salicilato de metilo (Sigma-Aldrich), 30 min cada uno, protegido de la luz.

Las proteínas fluorescentes se tiñeron por inmunofluorescencia. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Aqp1 (conejo, Atlas), Amilasa (cabra, SCBT), CC10 (cabra, SCBT), CD44 (rata, Chemicon), CollIV (conejo, USBiological), GFP (cabra, Abcam), GFP (ratón, Roche), GS (conejo, Abeam), Krt14 (ratón, Abcam), Krt19 TROMA III (rata, DSHB), Pcsk1 (conejo, Millipore), Mist1 (ratón, SCBT), Prox1 (conejo, Abeam), S100 (conejo, Dako), Sftpc (conejo, Millipore), SMA (ratón, Sigma-Aldrich), Tomate (conejo, Rockland), Vim (conejo, NEB), WT-1 (conejo, SCBT). Todos los anticuerpos secundarios fueron conjugados de Alexa-tinte (ThermoFisher). Los núcleos se tiñeron con DRAQ5 (Biostatus). Se emplearon las siguientes lectinas: DBA-FITC (VectorLabs), DBA-Rodamina (VectorLabs), PNA-FITC (VectorLabs).

Resultados

Para permitir el inmunomarcado de tejidos intactos, se desarrolló una combinación de permeabilización de tejidos e inversión parcial de la reticulación de proteínas a fin de recuperar la antigenicidad sin comprometer la integridad del tejido. Se sometió a ensayo una variedad de diferentes sistemas de agente amortiguador en combinación con solubilización de membrana y bajo calor, seguido por incubación de anticuerpo en un reactivo de bloqueo rico en solvente. La arquitectura frágil y altamente compartimentada del páncreas es inherentemente difícil de procesar para la histología, puesto que es propensa al daño por el jugo pancreático rico en enzimas digestivas. Procesamos los lóbulos pancreáticos enteros y los conductos pancreáticos marcados después de la incubación en solución de agente amortiguador en un paso individual de recuperación de antígeno durante la noche. En particular, todas las soluciones de agente amortiguador probadas produjeron una tinción robusta de conductos ramificados que abarcan los lóbulos pancreáticos. En tanto que era necesario un calor suave para lograr la tinción, las temperaturas más altas perturbaban la integridad del tejido y provocaron la pérdida de muestra (figura 1). A continuación, se trataron páncreas enteros con FLASH seguido por tinciones con anticuerpos de amilasa, Pcsk1, y SMA que previamente fallaron en páncreas clarificados convencionalmente. Todas las tinciones produjeron señales robustas detectables en tres dimensiones utilizando microscopía confocal estándar en línea con el rendimiento de anticuerpo en la tinción 2D tradicional (figura 2).

Se aplicó FLASH exitosamente a pulmón, hígado y glándula lagrimal sin más adaptaciones tecnológicas, produciendo una distribución de marca en tres dimensiones que fue altamente coherente con la presentación en tinciones de tejido 2D (figuras 3-5). La variedad de anticuerpos soportados permitió visualizar la estructura de todos los componentes de tejido, a veces simultáneamente, incluyendo los conductos, la vasculatura, el estroma, la

inervación, y el sistema linfático, así como los tipos de células específicas para tejido, tal como los hepatocitos, las células acinares pancreáticas y las células alveolares pulmonares (Figuras 3-5).

Para ampliar además la variedad de reactivos de tinción compatibles con anticuerpos que pueden ser sensibles al SDS residual en la muestra tratada con FLASH, se probaron detergentes permeabilizantes de membrana alternativos. El detergente zwitteriónico Zwittergent-3-10 (reactivo 2 de FLASH) produjo una inmunotinción robusta en todos los tejidos analizados y mejoró el rendimiento de anticuerpos difíciles tal como aquellos de los factores de transcripción WT1 y Mist1. Es importante destacar que la integridad de tejido y celular se conservó y la distribución de tinción subcelular se correlacionó con la inmunofluorescencia 2D tradicional como antes (Figuras 6-7). Por lo tanto, FLASH es robusto para una variedad de opciones de reactivo, lo que permite una optimización adicional de la técnica para antígenos particulares de interés.

Para probar aún más el efecto del procesamiento FLASH en la morfología del tejido, se incrustaron órganos tratados con FLASH en parafina y se analizaron especímenes previamente fotografiados en tres dimensiones por histología 2D convencional. A pesar de los tratamientos y análisis previos, los tejidos se mantuvieron receptivos a la tinción con hematoxilina y eosina. La arquitectura del tejido permaneció intacta y se pudieron identificar fácilmente diferentes compartimentos tal como vasos sanguíneos y conductos como en los controles no tratados (figura 8). Por lo tanto, FLASH permite el inmunomarcado de tejido profundo de órganos internos intactos en tanto que se mantiene la integridad epitelial y la arquitectura de tejido.

Ejemplo 2 - imagenología del sistema ductal pancreático adulto

Materiales y métodos

FLASH. Se desarrolló FLASH para la detección rápida de una multitud de antígenos en órganos adultos intactos mediante la recuperación de epítomos no destructivos leves (FLASH - Análisis con microscopio óptico rápido de órganos completos teñidos con anticuerpos).

Los ratones se sometieron a eutanasia por dislocación cervical. La perfusión cardíaca se llevó a cabo con 20 ml de PBS. Los páncreas se removieron unidos al bazo y al duodeno sin perturbar la glándula. Las muestras se fijaron en PFA al 4% durante la noche a 4 °C. Las muestras se lavaron en PBT (Triton X-100 al 0,4% (Sigma-Aldrich) en PBS) dos veces durante una hora y se incubaron en ácido bórico 200 mM (Sigma-Aldrich) con SDS al 4% (Sigma-Aldrich) pH 7,0 durante la noche a 54 °C.

Las muestras se lavaron en PBT durante tres horas con tres intercambios de volumen. Para el inmunomarcado, las muestras se incubaron en agente amortiguador de bloqueo de FLASH (albúmina de suero bovino al 1% (Sigma-Aldrich), DMSO al 5% (Sigma-Aldrich), suero de ternero fetal al 10% (Gibco), azida de sodio al 0,02% (Sigma-Aldrich), Triton X-100 al 0,2% en PBS) durante una hora y se incubaron con antisueros (todos 1:100) durante al menos 16 horas a temperatura ambiente en un nutador. Las muestras se lavaron por tres intercambios de volumen de PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios (todos 1:100) durante al menos dos días a temperatura ambiente.

Las muestras se lavaron por tres intercambios de volumen con PBS y se deshidrataron gradualmente en 30%, 50%, 75%, 2x 100% MetOH (Sigma-Aldrich), 1 hora cada una y, en una placa de vidrio, se sumergieron en salicilato de metilo diluido en MetOH: 25%, 50%, 75%, 2x 100% de salicilato de metilo (Sigma-Aldrich), 30 min cada uno, protegido de la luz.

Las proteínas fluorescentes se tiñeron por inmunohistoquímica. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Amilasa (cabra, SCBT), GFP (cabra, Abcam), GFP (ratón, Roche), Krt19 TROMA III (rata, DSHB), tomate (conejo, Rockland). Todos los anticuerpos secundarios fueron conjugados de Alexa-tinte (ThermoFisher). Los núcleos se tiñeron con DRAQ5 (Biostatus).

Resultados

Para conservar la complejidad geométrica del páncreas adulto, se desarrolló una nueva técnica para la inmunotinción e imagenología tridimensional rápida de órganos completos (FLASH, ver métodos) que permite una evaluación cuantitativa sólida de la arquitectura de órganos a nivel de células individuales y tejidos. El FLASH mantuvo la compartimentalización pancreática y la integridad de tejido (Figuras 10a, 10b). Se visualizó el sistema ductal pancreático adulto induciendo la expresión de tdTomato en todas las células del conducto (*R26-CAG-tdTomato; Hnf1b-CreERT2*). La imagenología de FLASH de páncreas enteros reveló una intrincada jerarquía de túbulos que abarcan los lóbulos exocrinos (Figuras 9a, 9b, Figuras 10c, 10d). Los segmentos ductales variaron significativamente en diámetro (figuras 9c, 9d), con conductos más pequeños compuestos de células alargadas y conductos grandes de células cuboidales (figuras 9e, 9f). El marcado Confetti mostró expansión clonal predominantemente a lo largo del eje de elongación celular (figuras 10e, 10f). Estos hallazgos iluminan la complejidad y heterogeneidad del sistema ductal de páncreas (figura 9g).

Para activar deformaciones epiteliales, se indujo la activación de mosaico condicional del oncogén *KrasG12D* con la eliminación concomitante de ya sea supresores tumorales *p53* o *Fbw7*. El análisis FLASH de ratones *KrasG12D; Fbw7 F/F; Ck19-CreERT* (KFCk19) y *KrasG12D; Fbw7 F/F; Hnf1 β -CreERT* (KFH) reveló dos tipos de lesión morfológicamente distintos que se presentan conjuntamente en todos los páncreas analizados. Los conductos transformados ya sea se evaginaron basalmente, lejos del lumen de conducto (designado "exofítico"), o se invaginaron apicalmente, hacia el lumen de conducto (designado "endofítico") (figura 11A y figuras 12a-12d). Las lesiones exofíticas extendieron el lumen del conducto y formaron estructuras globulares (figuras 11b, 11c, figuras 12e-12g), que progresaron a neoplasia ductal tipo glándula consecutiva (figura 11d). Las lesiones endofíticas, por el contrario, crecieron en el lumen de conducto de una manera papilar (figura 11e, 11f, figura 12e), y progresaron a neoplasia intratubular con obstrucción local del lumen de conducto (figura 11g). La activación de *KrasG12D* y la eliminación de *Fbw7* o *p53* en células acinares, ubicadas en las puntas de conductos de pequeño calibre, indujeron metaplasia acinar a ductal (ADM), lo que condujo a lesiones globulares positivas para *Krt19* continuas con el árbol ductal (figuras 13a-13f). En ratones con activación de *KrasG12D* específica del conducto (KPCk19) o de todo el páncreas (KPC) y eliminación de *p53*, también se identificaron lesiones exofíticas y endofíticas, lo que indica que estas observaciones no dependen de una combinación de oncogén particular (figuras 14a-14e).

Ejemplo 3 - Imagenología 3D de biopsias de tejido humano

Materiales y métodos

FLASH. Se obtuvieron biopsias de tejido humano de pacientes con consentimiento con adenocarcinoma ductal pancreático. Las biopsias se fijaron en NBF al 10% durante la noche y se procesaron con FLASH inmediatamente, o se incrustaron en parafina para su archivo. Para realizar el FLASH en el material de archivo, las muestras incrustadas en parafina se desparafinaron primero por incubación en HistoClear o xileno durante 30 minutos, seguido por lavados en EtOH y rehidratación por pasos por lavados de 30 minutos en 90%, 75%, 30% de EtOH, seguido por 2x ddH₂O. Los especímenes se incubaron en ácido bórico 200 mM (Sigma-Aldrich) con Zwittergent^{MR3-10} al 8% (Merck) pH 7,0 durante la noche a 54 °C.

Las muestras se lavaron en PBT durante tres horas con tres intercambios de volumen. Para el inmunomarcado, las muestras se incubaron en agente amortiguador de bloqueo de FLASH (albúmina de suero bovino al 1% (Sigma-Aldrich), DMSO al 5% (Sigma-Aldrich), suero de ternero fetal al 10% (Gibco), azida de sodio al 0,02% (Sigma-Aldrich), Triton X-100 al 0,2% en PBS) durante una hora y se incubaron con antisueros (todos 1:100) durante al menos 16 horas a temperatura ambiente en un nutador. Las muestras se lavaron por tres intercambios de volumen de PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios (todos 1:100) durante al menos dos días a temperatura ambiente.

Las muestras se lavaron por tres intercambios de volumen con PBS y se deshidrataron gradualmente en 30%, 50%, 75%, 2x 100% MetOH (Sigma-Aldrich), 1 hora cada una y, en una placa de vidrio, se sumergieron en salicilato de metilo diluido en MetOH: 25%, 50%, 75%, 2x 100% de salicilato de metilo (Sigma-Aldrich), 30 min cada uno, protegido de la luz.

Las proteínas fluorescentes se tiñeron por inmunohistoquímica. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: *Cdh1* (rata, Novex), *Krt19* TROMA III (rata, DSHB), *Muc5AC* (conejo, Atlas), *SMA* (ratón, Sigma-Aldrich). Todos los anticuerpos secundarios fueron conjugados de Alexa-tinte (ThermoFisher).

Resultados

Para probar si el FLASH se puede utilizar para el análisis de muestras de tejido humano, por ejemplo, en histopatología clínica, se realizó una comparación de análisis de biopsia convencional por histología estándar en secciones de tejido, con imagenología 3D de FLASH de biopsias intactas. Específicamente, se compararon secciones ópticas 2D de muestras formadas en imagen de FLASH con secciones de tejido 2D de muestras procesadas por estándar. Se encontró que el FLASH permitió el inmunomarcado y la clarificación óptica de biopsias frescas, fijas e incrustadas en parafina. Se detectaron lesiones exofíticas y endofíticas en las muestras clarificadas con FLASH (figuras 15a-15d). El inmunomarcado con FLASH identificó características ductales y mucinosas, y células mesenquimales en las biopsias en el contexto espacial de las regiones circundantes de tejido pancreático normal y canceroso. Las secciones ópticas 2D de los conjuntos de datos de imagenología 3D reprodujeron la presentación de la morfología de tejido y lesión en el análisis histopatológico estándar de las secciones de tejido (figuras 15a, 15c). Por lo tanto, el FLASH permite una rápida caracterización histopatológica del material humano. Todos los documentos a los que se hace referencia en la presente se incorporan por la presente como referencia en su totalidad, con especial atención a la presente materia a la que se refieren. Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica sin desviarse del alcance y espíritu de la invención.

Aunque la invención se ha descrito con relación a realizaciones preferidas específicas, se debe entender que la invención como se reivindica no se debe limitar indebidamente a estas realizaciones específicas. De hecho, se propone que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para

aquellos expertos en biología molecular, inmunología celular o campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar una muestra de tejido para imagenología 3D, donde este método comprende tratar esta muestra de tejido con una solución, donde la solución comprende una solución de agente amortiguador con un pH por debajo de 9 y un detergente, y donde esta muestra de tejido no se ha incrustado en hidrogel y/o no se ha fijado con glutaraldehído.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la imagenología 3D es con base en inmunotinción.
- 10 3. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde:
- 15 a) el detergente es SDS o zwitteriónico, preferentemente detergente Zwittergent^{MR}, en donde el detergente Zwittergent^{MR} se selecciona de cualquiera de n-octil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, n-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, y n-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato; y/o
- 20 b) el pH de esta solución de agente amortiguador es menor que 8,5, menor que 8, menor que 7,5 o 7; y/o
- c) la solución de agente amortiguador es ácido bórico o solución de agente amortiguador de citrato, preferentemente ácido bórico.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde esta solución se usa a una temperatura de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 60 °C, preferentemente de aproximadamente 50 °C y aproximadamente 60 °C, más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 55 °C o aproximadamente 54 °C.
- 25 5. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde esta muestra de tejido es de:
- a) un ratón, rata, conejo, vaca, cerdo o primate no humano; o
- b) un ser humano,
- 30 preferentemente en donde esta muestra de tejido es una muestra resecada quirúrgicamente, una muestra de material de cultivo celular 3D (organoides) o una muestra de tejido de bioingeniería.
6. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde esta muestra de tejido se ha fijado usando formalina amortiguada neutral, preferentemente formalina amortiguada neutral al 10%.
- 35 7. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además determinar la presencia o ausencia de un estado de enfermedad en la muestra de tejido.
8. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde esta muestra de tejido se ha incrustado en parafina.
- 40 9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde esta muestra de tejido es una muestra de tejido intacta.

DIBUJOS

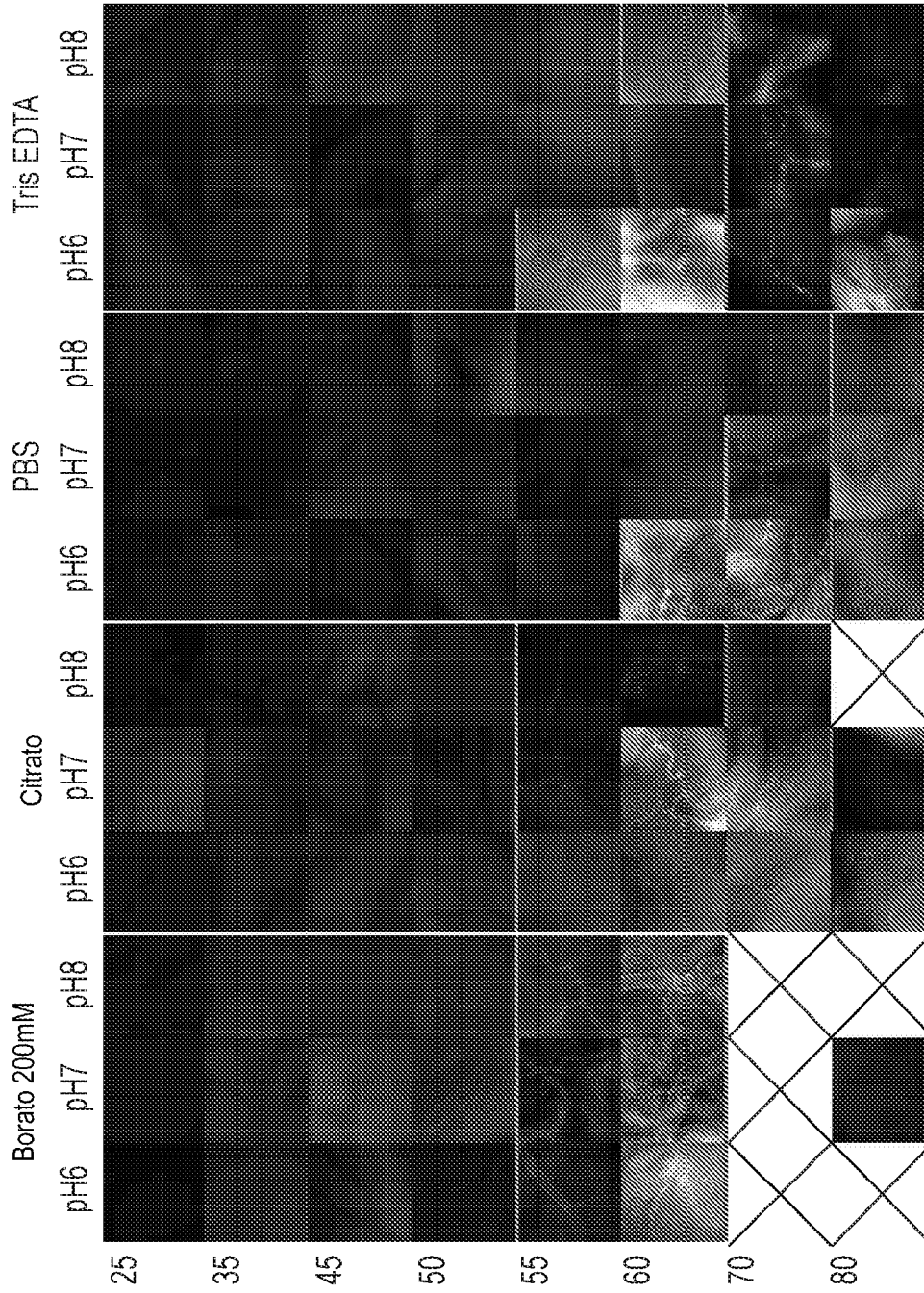


FIGURA 1a

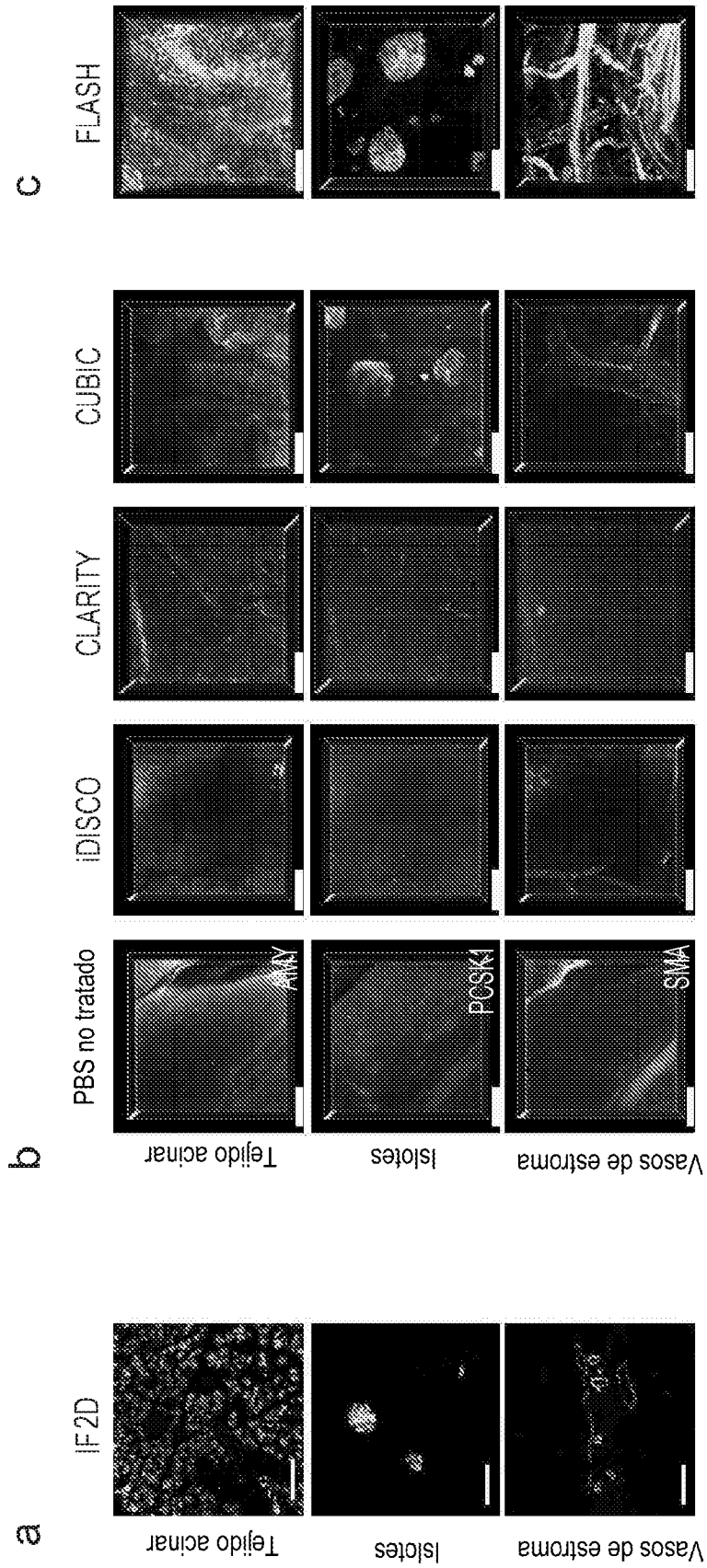


FIGURA 2

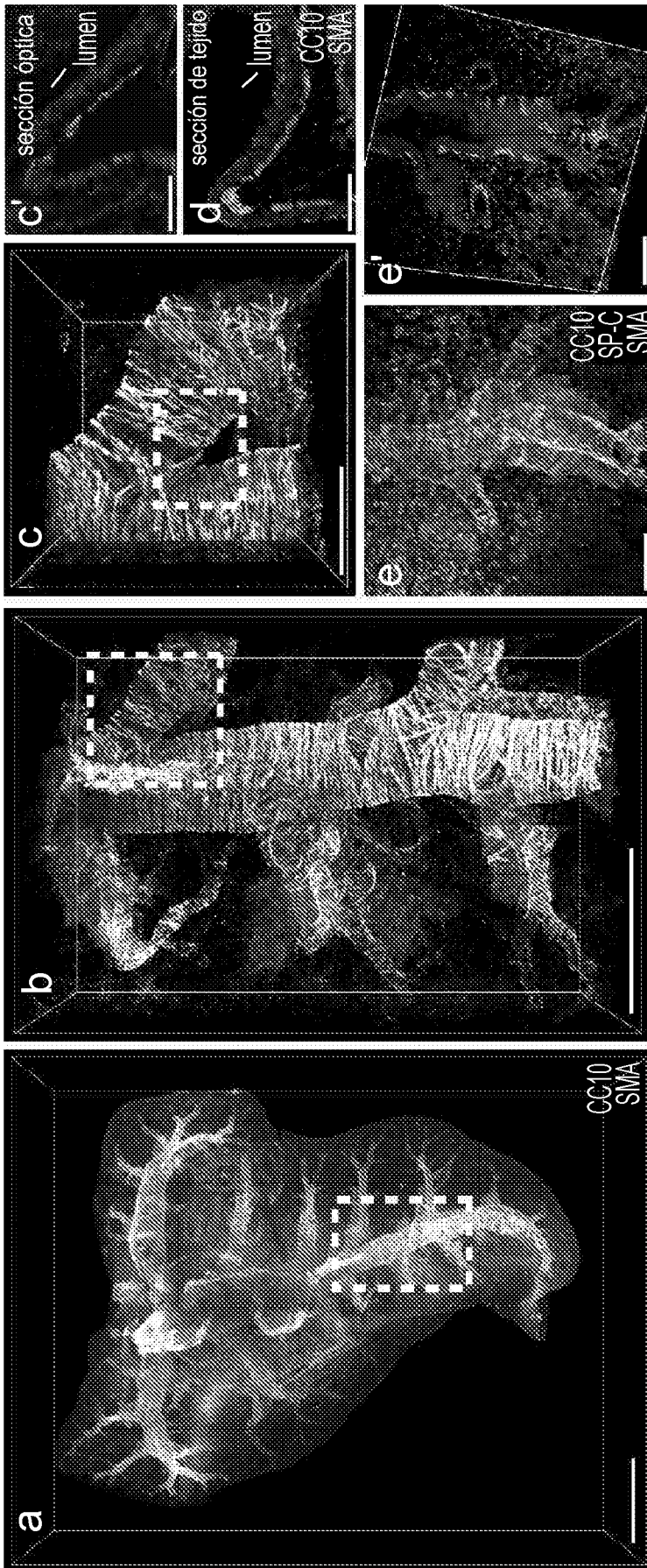


FIGURA 3

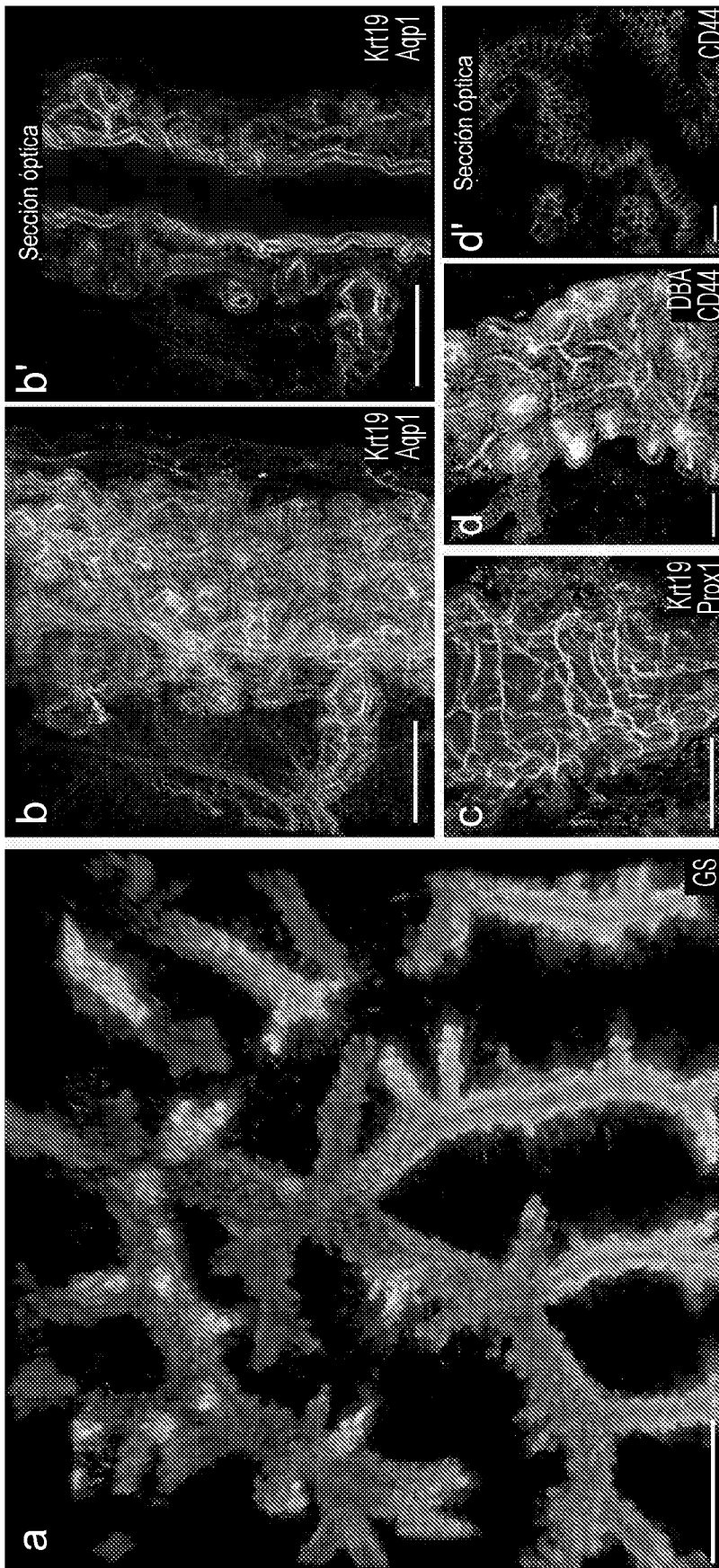


FIGURA 4

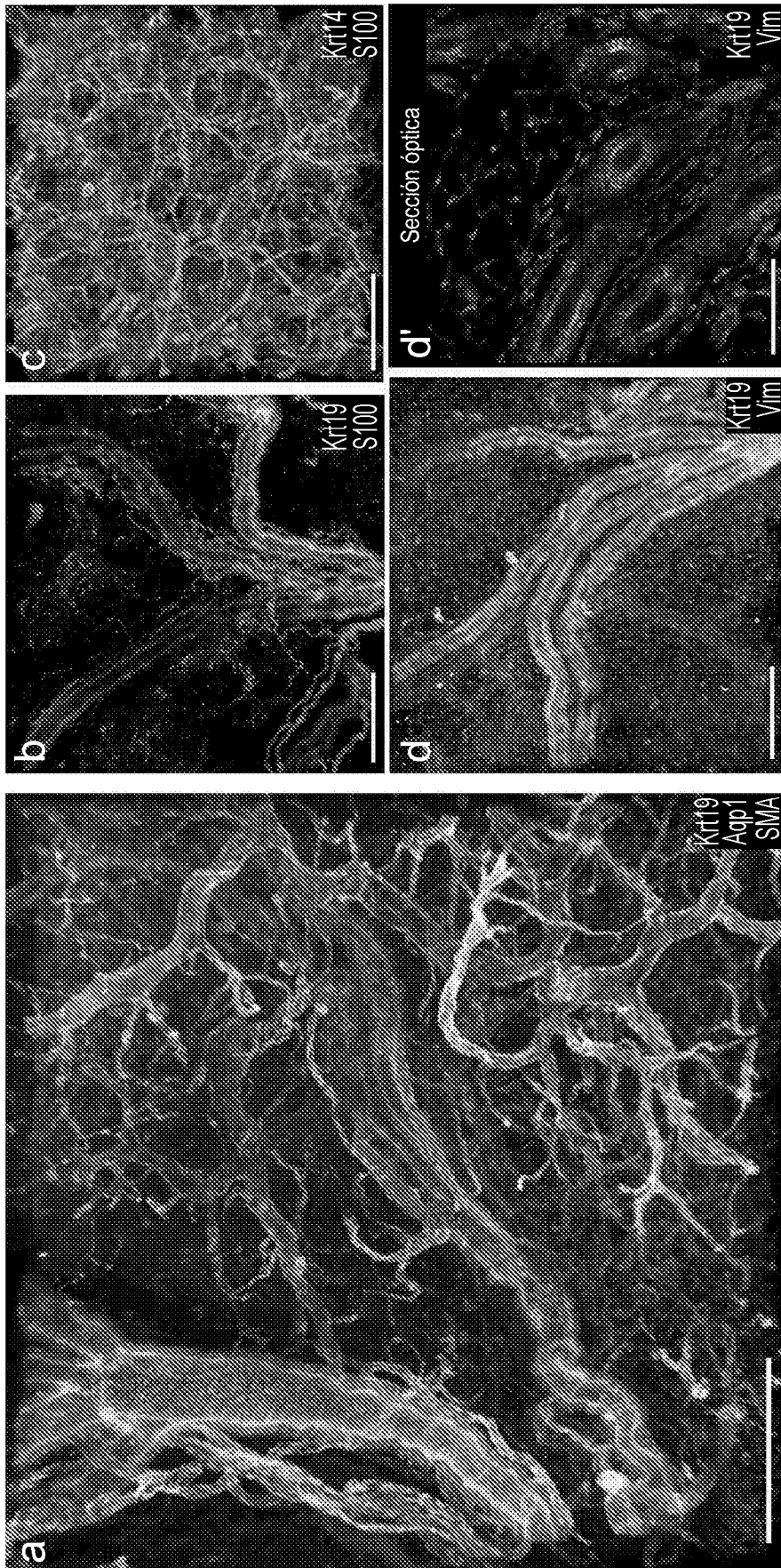


FIGURA 5

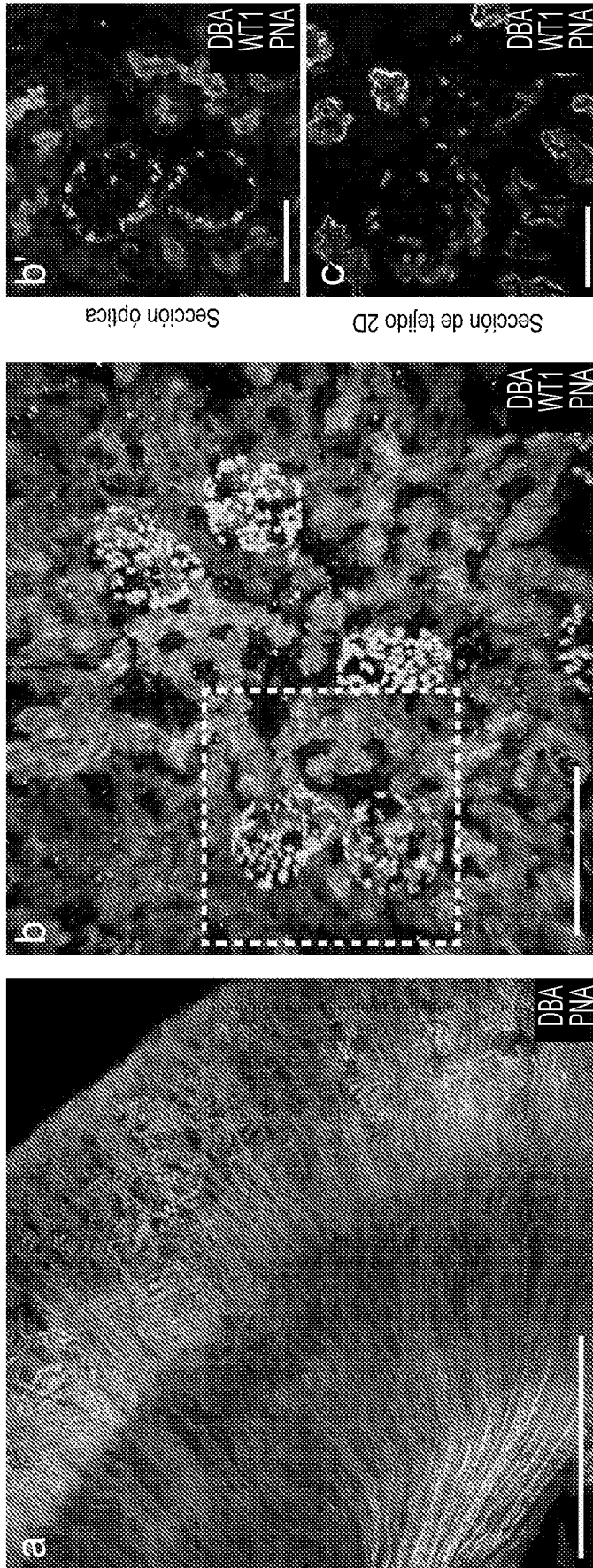


FIGURA 6

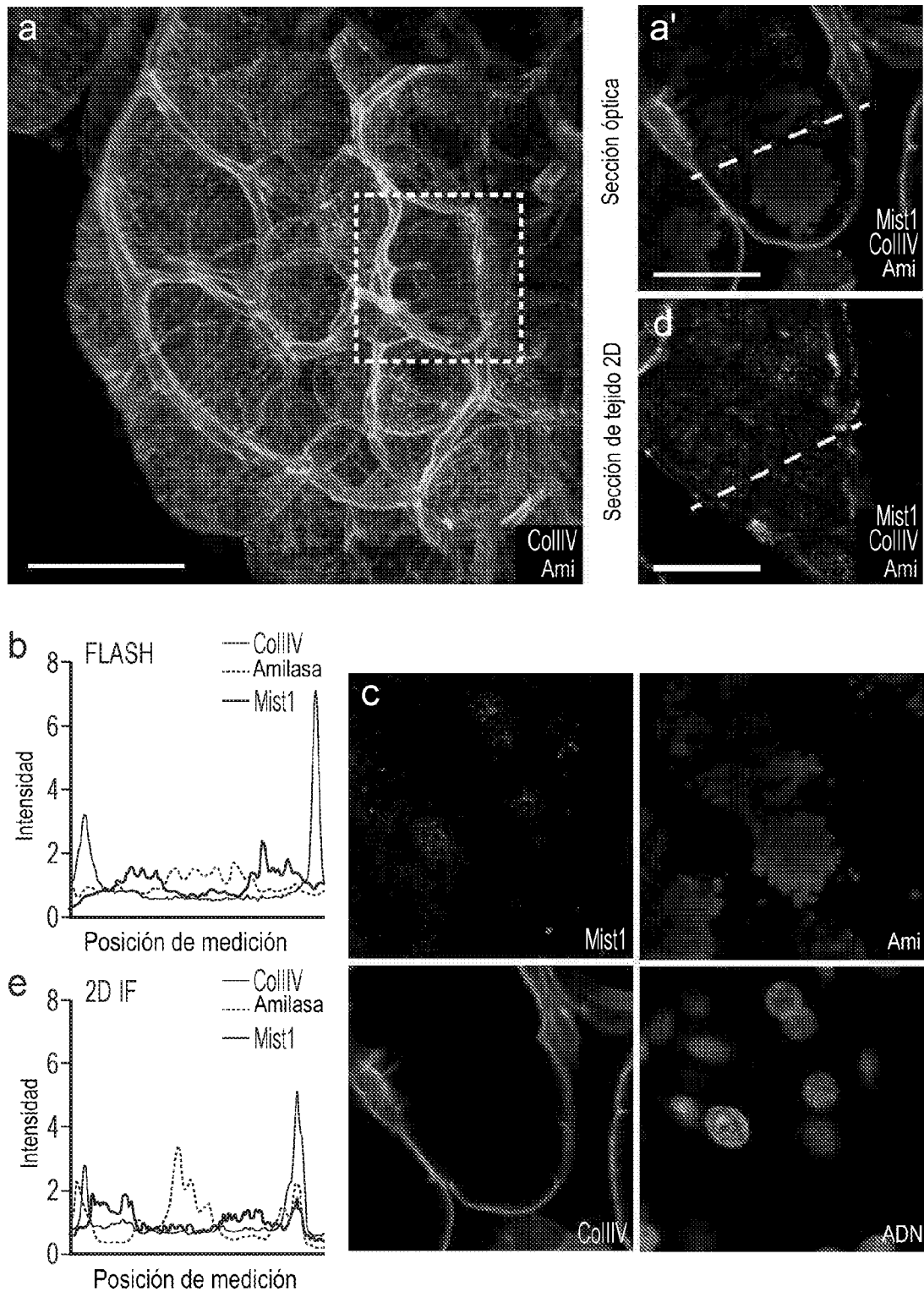


FIGURA 7

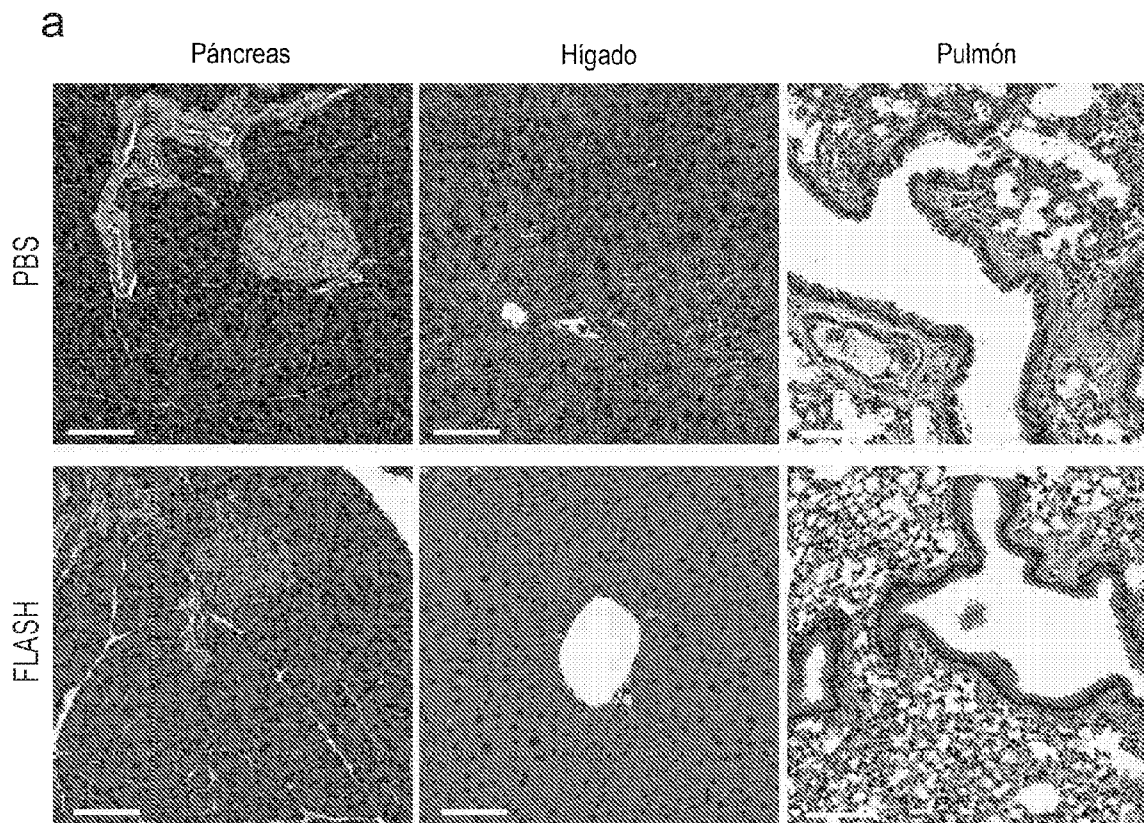


FIGURA 8

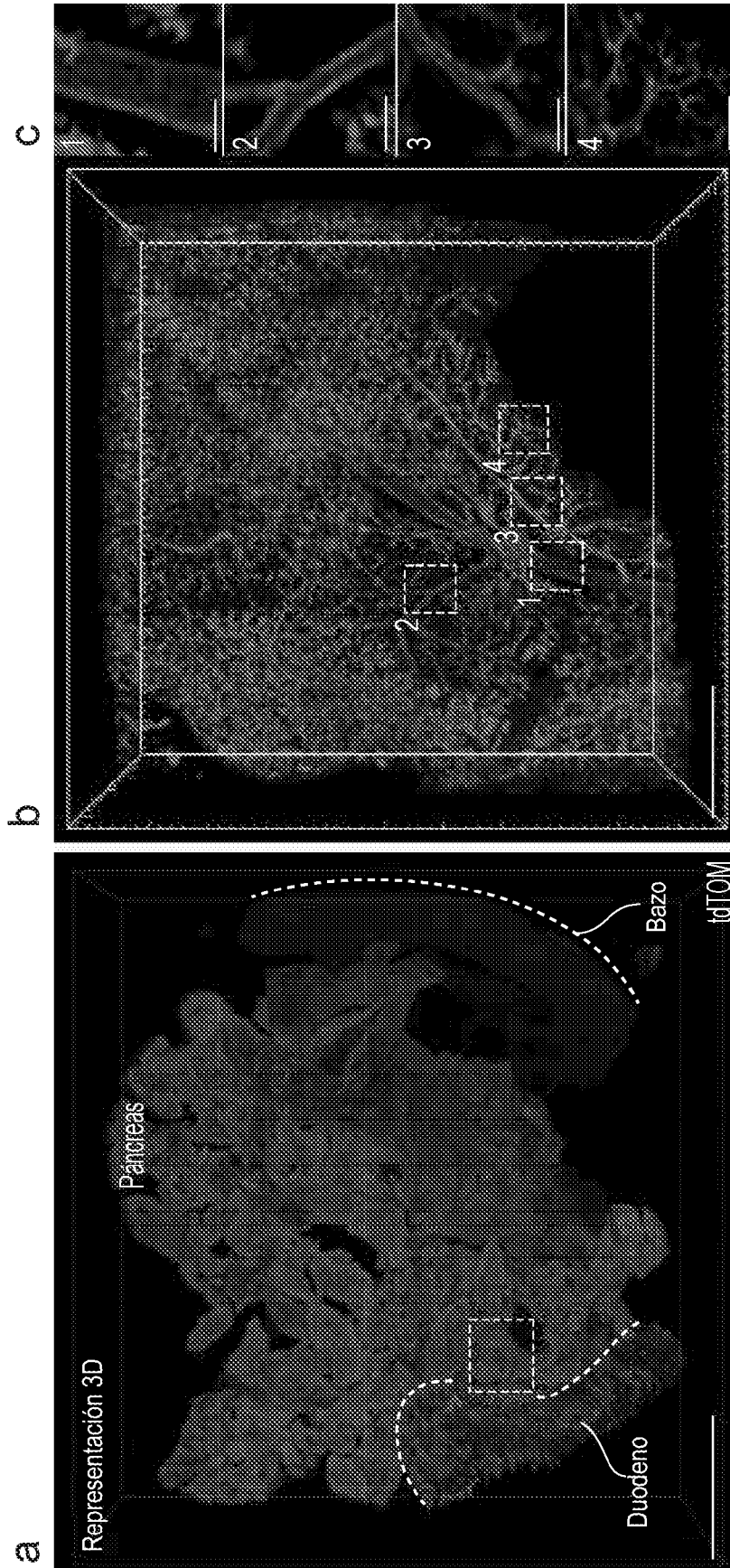


FIGURA 9

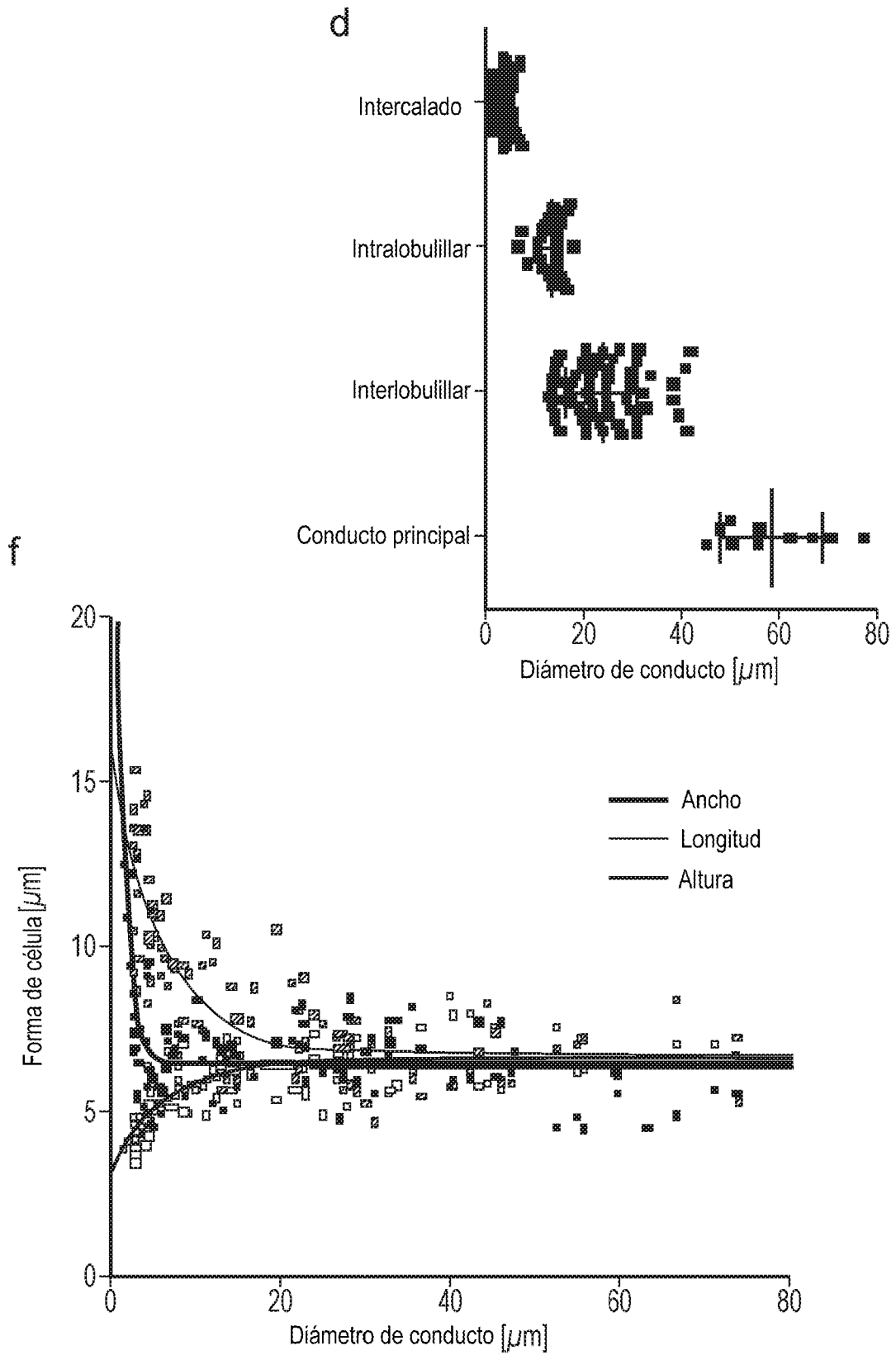


FIGURA 9 (continuación)

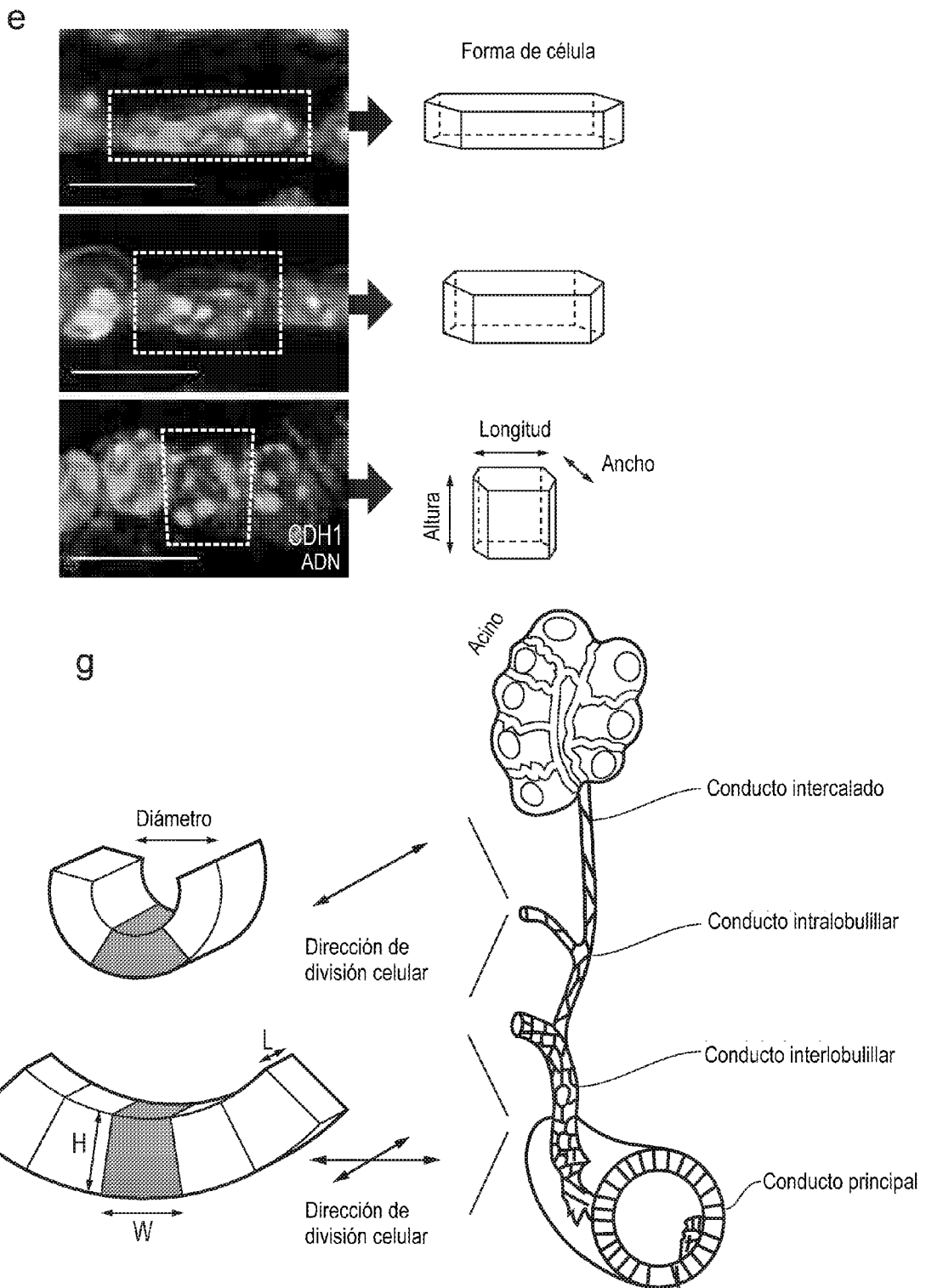


FIGURA 9 (continuación)

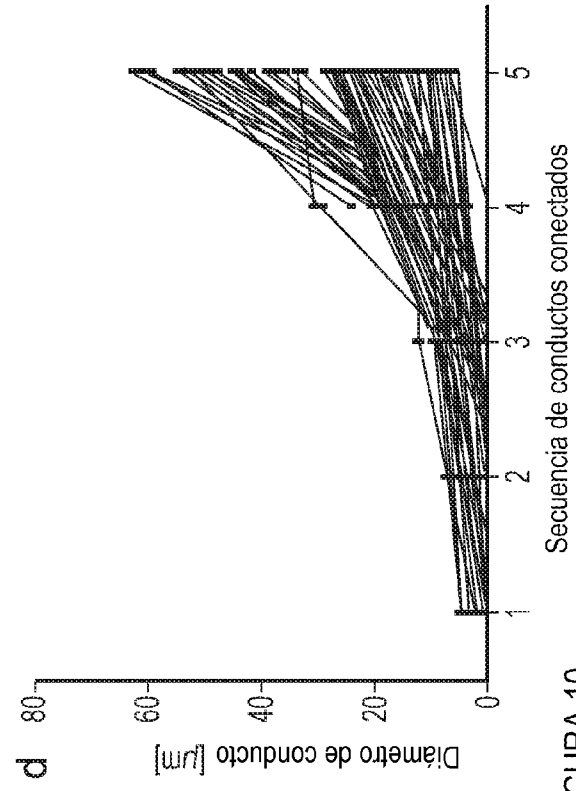
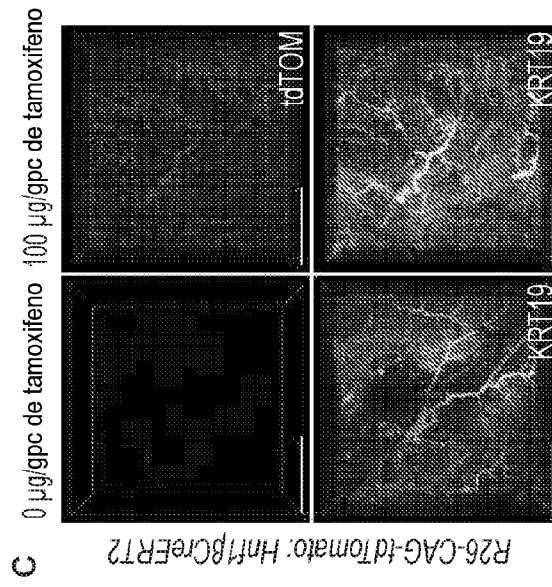
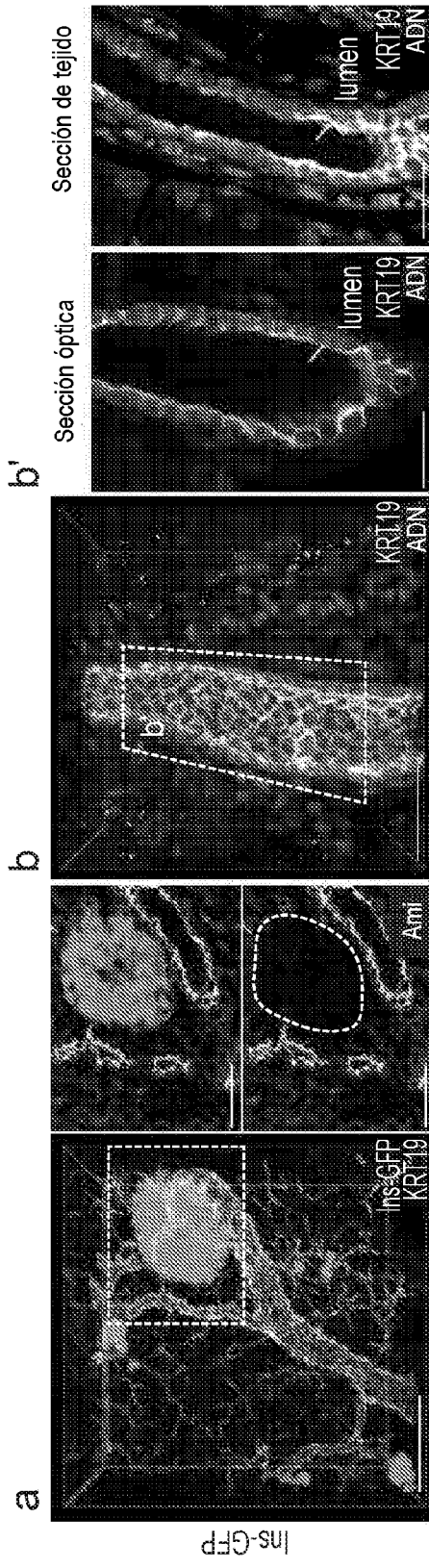


FIGURA 10

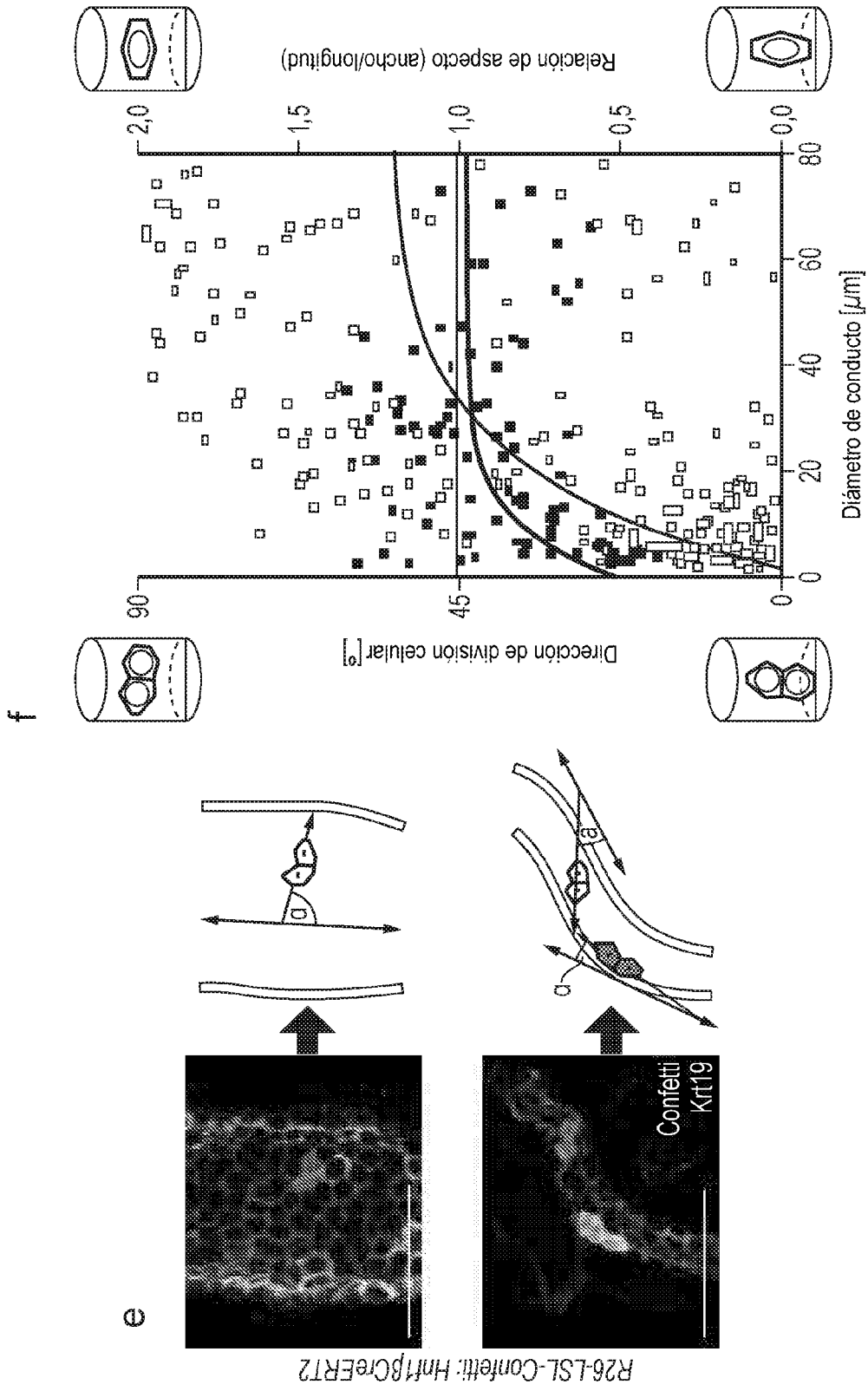


FIGURA 10 (Continuación)

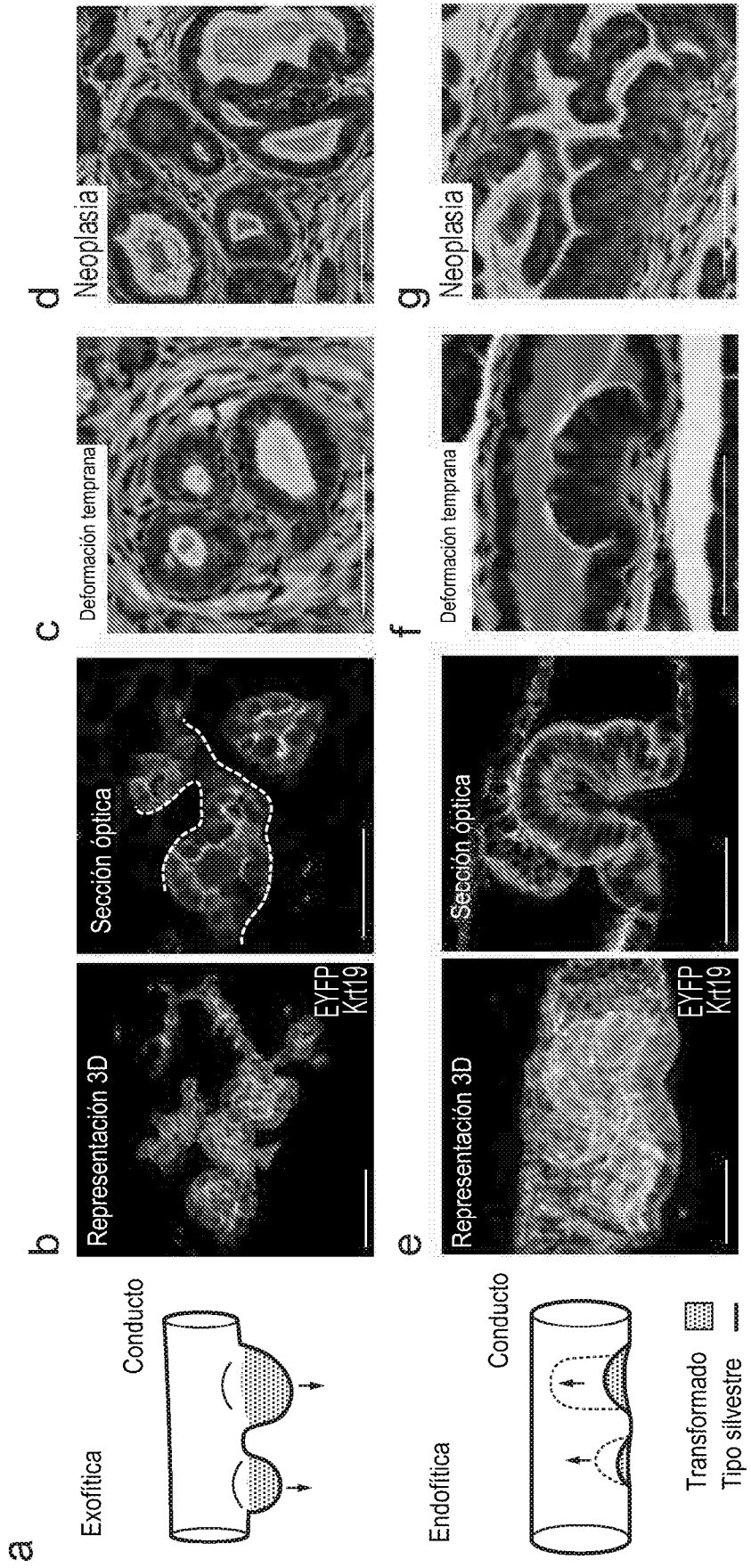


FIGURA 11

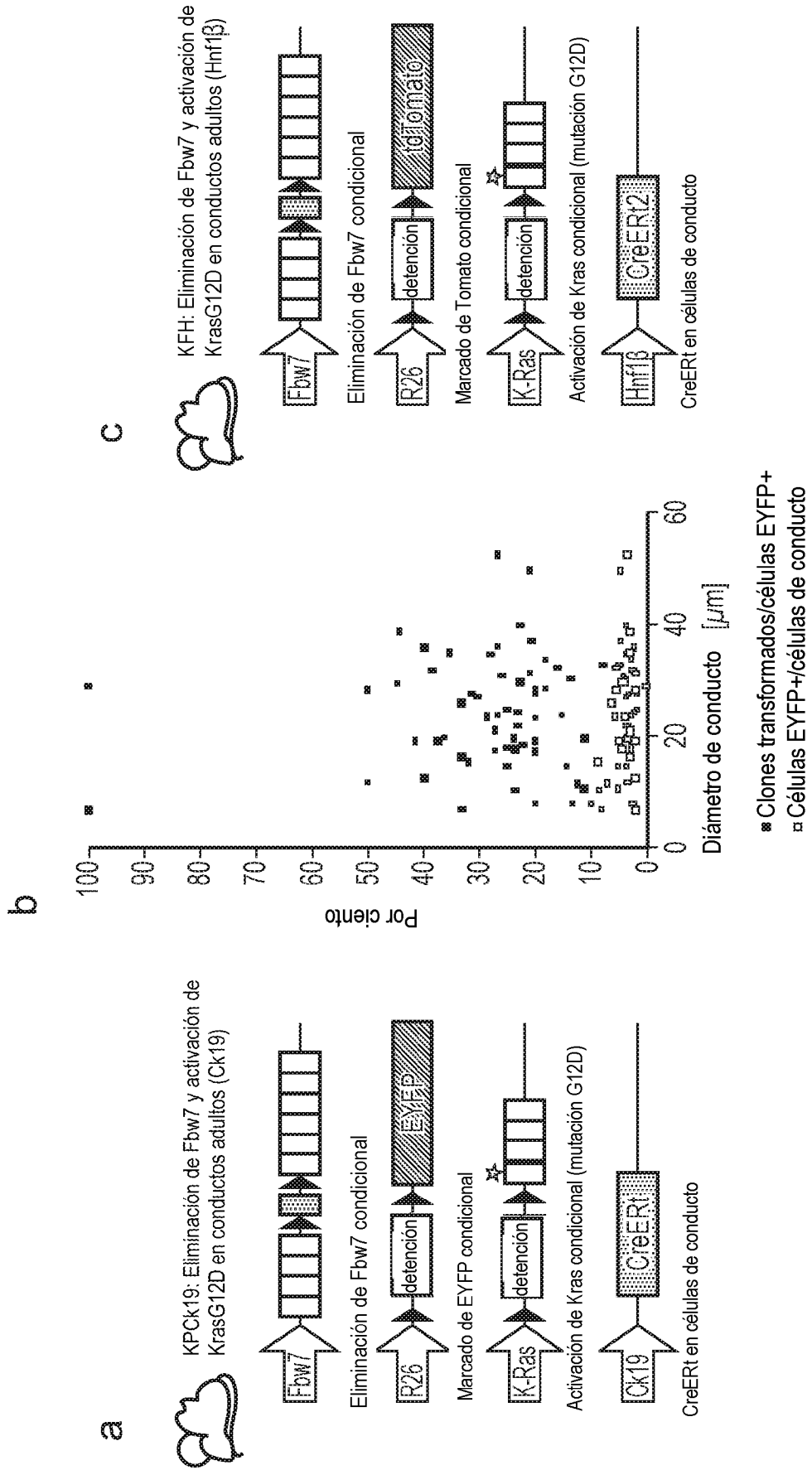


FIGURA 12

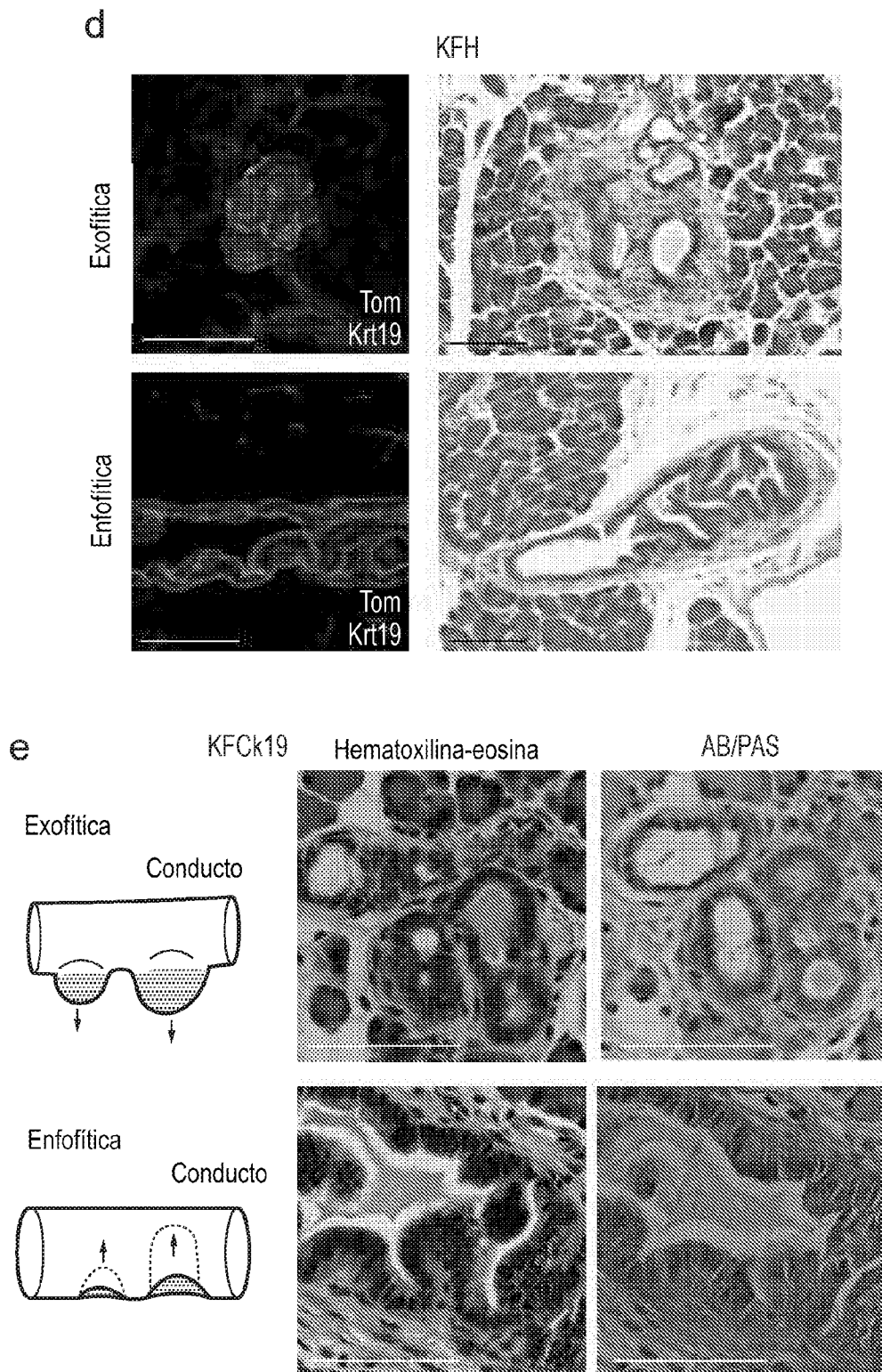


FIGURA 12 (continuación)

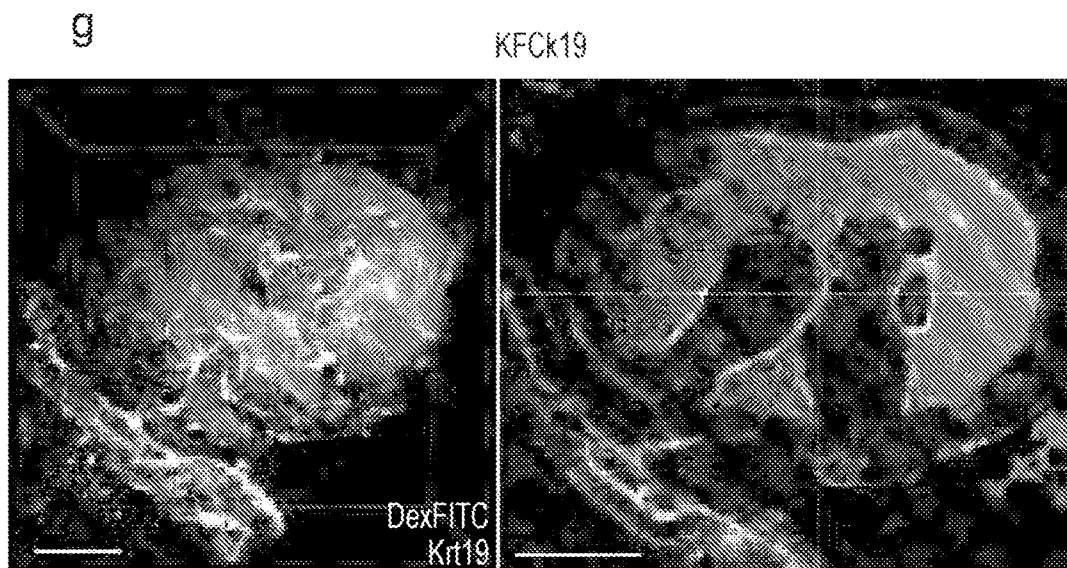
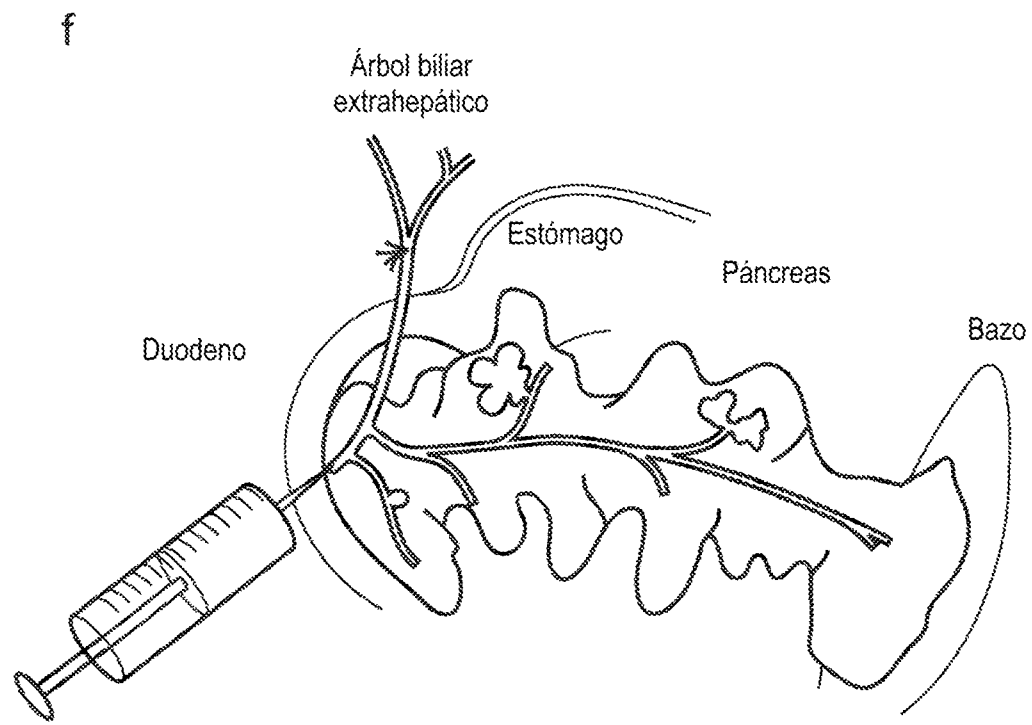


FIGURA 12 (continuación)

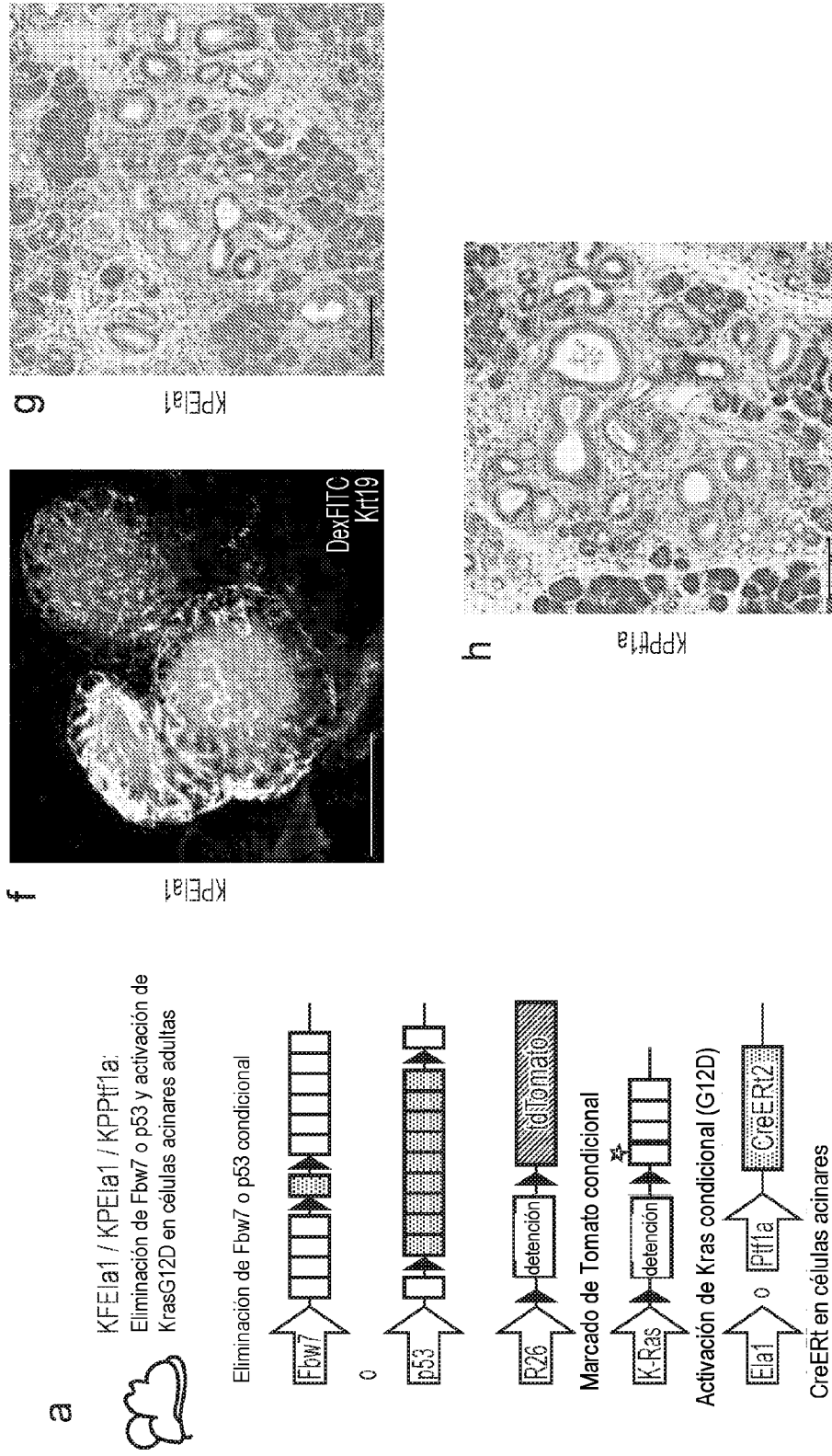


FIGURA 13

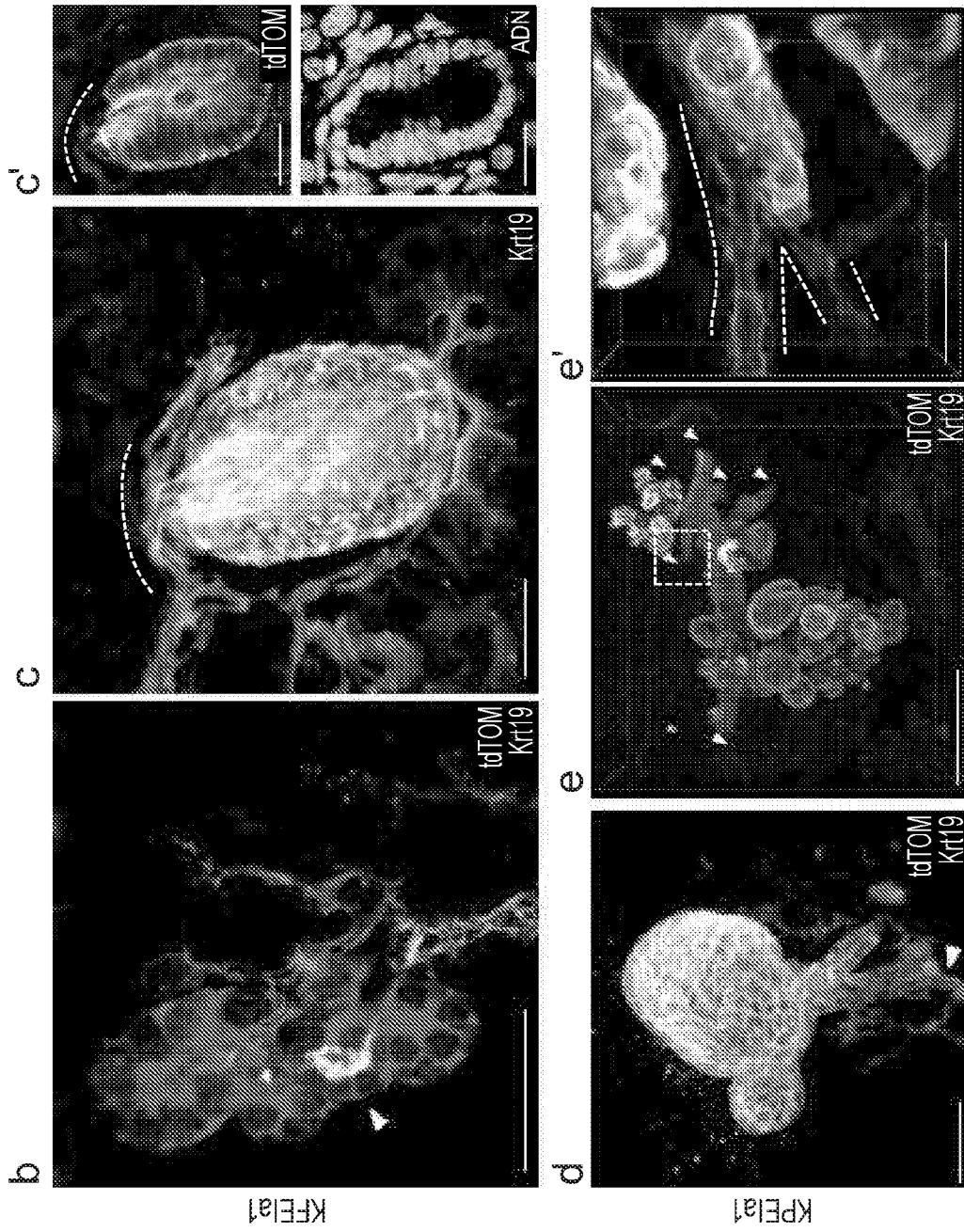


FIGURA 13 (continuación)

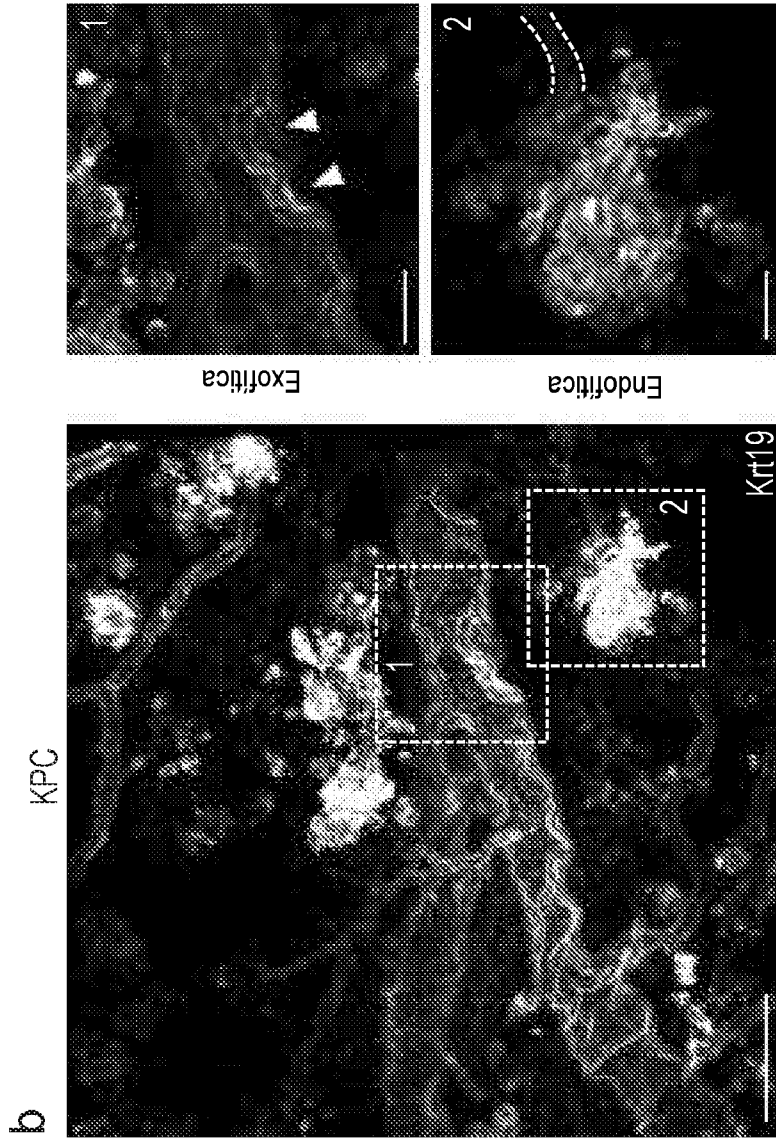
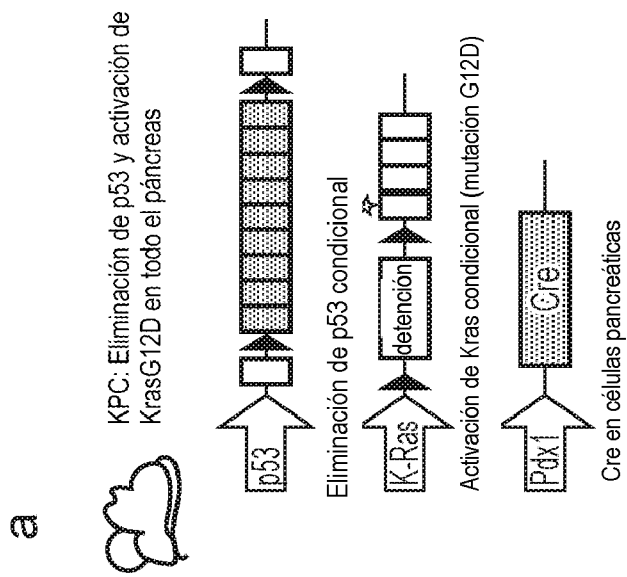


FIGURA 14



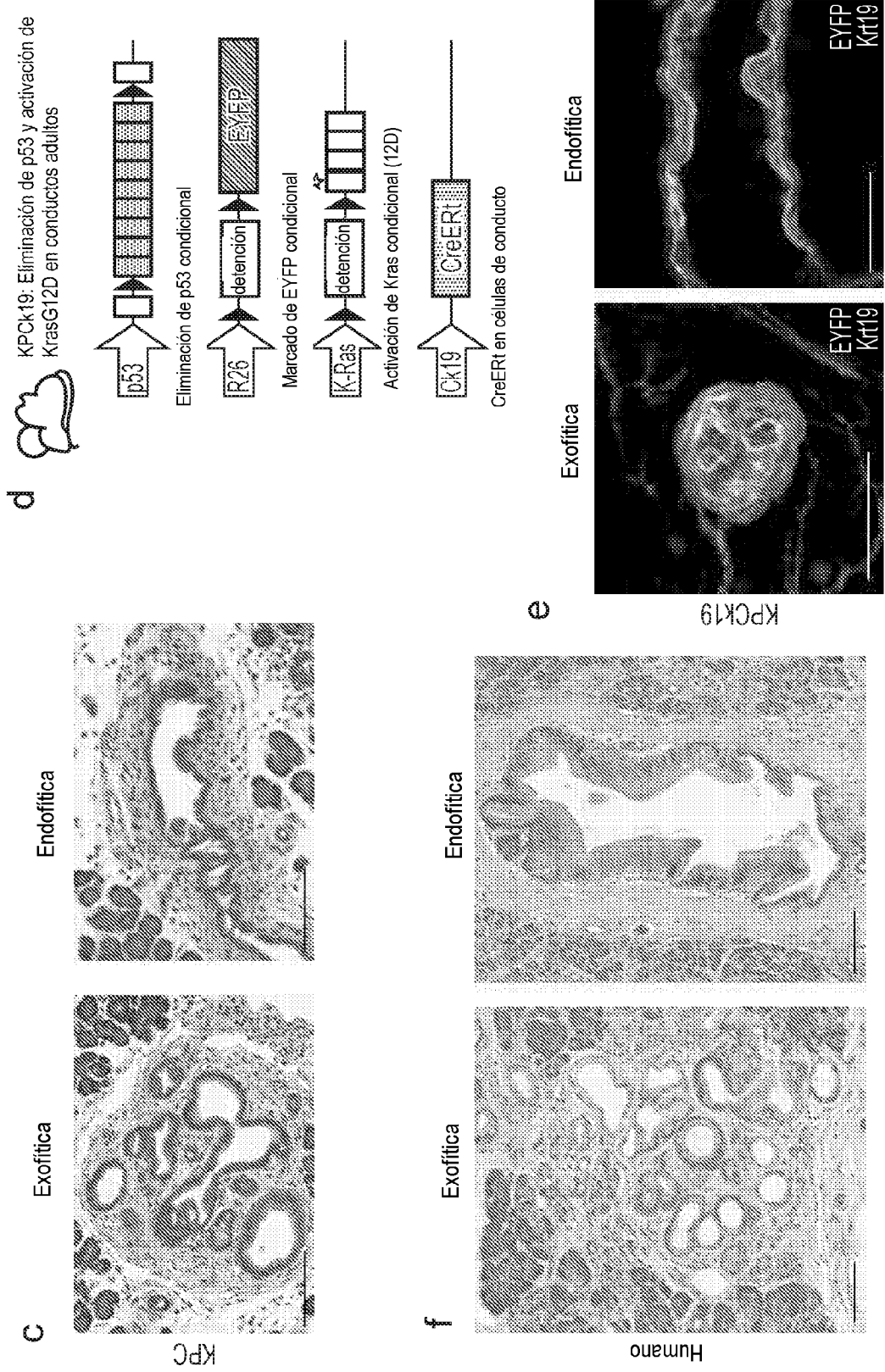


FIGURA 14 (continuación)

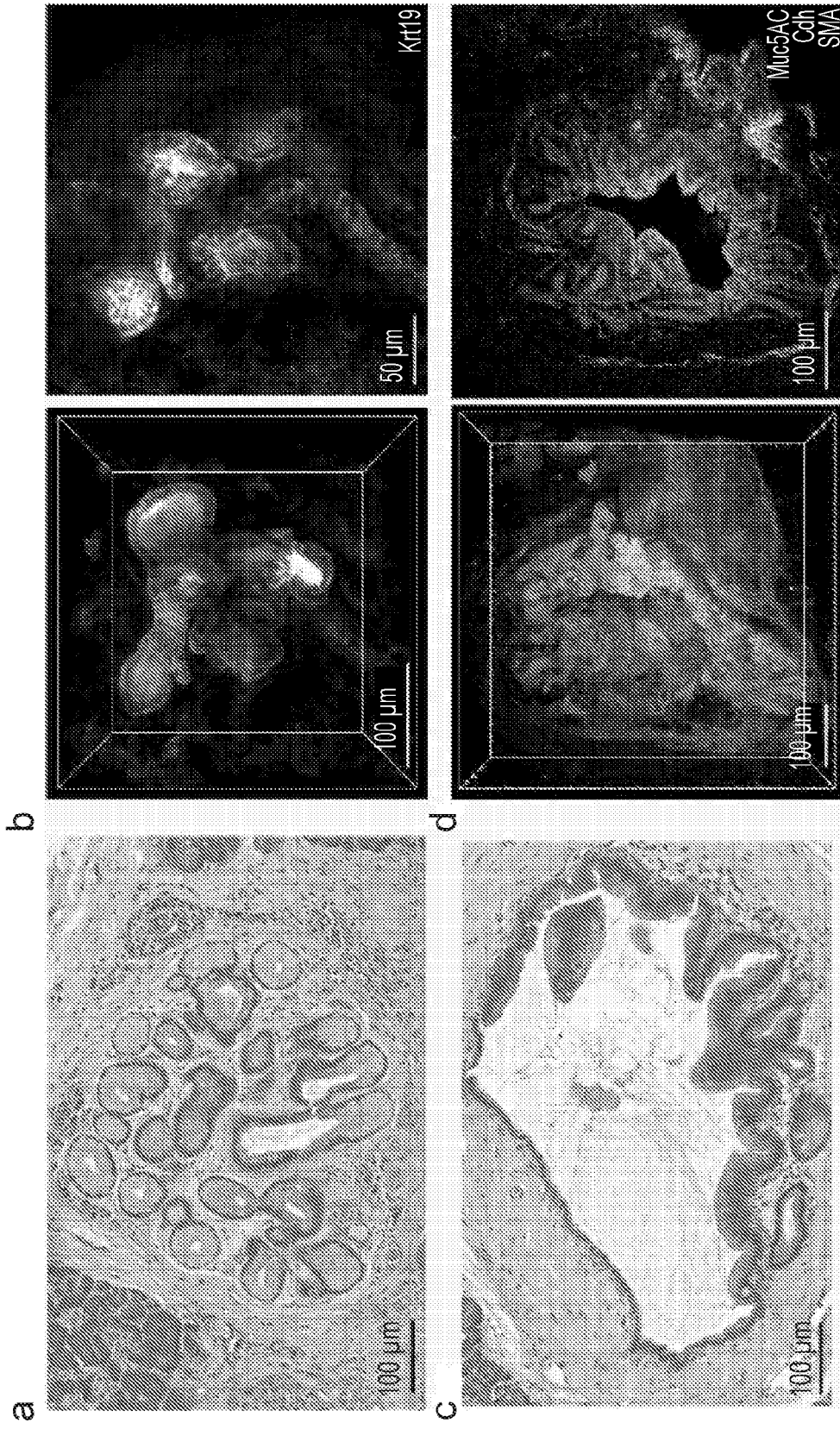


FIGURA 15