

<b>TÍTULO: CONSERVACIÓN TEJIDO PULMONAR EN FORMOL-PARAFINA</b>		
<b>ARCHIVADO:</b> PNT_8.2.003_TEJIDO_PULMONAR_FORMOL_PARAFINA.doc		<b>Nº DE CÓDIGO:</b> 8.2.003
<b>VERSIÓN:</b> 1.1	<b>FECHA DE EDICIÓN:</b> 14/06/10	<b>PÁG.</b> 1 DE 4
<b>REDACTADO POR:</b> Meritxell Arqué <b>FECHA:</b> 01/01/2009		<b>FIRMA:</b>
<b>REVISADO Y APROBADO POR:</b> Cristina Villena <b>FECHA:</b> 14/06/2010		<b>FIRMA:</b>

## 1. OBJETIVO

Las muestras de tejido son recogidas del excedente del descarte quirúrgico de pacientes que han consentido y están de acuerdo en participar en la Plataforma Biobanco Pulmonar.

Las colecciones de tejido fresco fijado en formaldehído y embebido en parafina (FFPE) son un valioso recurso para la investigación, y se conservan fácilmente a temperatura ambiente por un largo período de tiempo. El formaldehído es el fijador más utilizado universalmente ya que conserva una gran variedad de tejidos y compuestos tisulares. El método es efectivo para preservar la morfología histológica del tejido pulmonar. El propósito de este documento es normalizar y estandarizar el procedimiento de preservación de tejido pulmonar fijado en formaldehído y embebido en parafina, para la Plataforma Biobanco Pulmonar.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento describe la manera de conservar el tejido pulmonar fijado en formaldehído y embebido en parafina (FFPE). Este PNT no detalla los procesos para la seguridad e higiene laboral sobre materiales de riesgo biológico y/o productos químicos, y se recomienda que el personal siga las normas de Seguridad e Higiene establecidas en cada centro.

## 3. DOCUMENTACIÓN RELACIONADA

PNT\_8.2.001\_Recogida y transporte Tejido Pulmonar.doc  
PNT\_8.1.001\_Etiquetado y Trazabilidad.doc

## 4. FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES

El cumplimiento de este PNT recae sobre todos los miembros de la Plataforma Biobanco Pulmonar que son responsables de la conservación del tejido pulmonar mediante fijación en formaldehído y embebido en parafina.

## 5. MATERIAL Y EQUIPO

Los materiales, equipos y formas que se enumeran en la siguiente lista son sólo recomendaciones y pueden ser sustituidos por alternativas o productos equivalentes más adecuados para el lugar dónde se realiza la tarea o procedimiento.

<b>Materiales y Equipos</b>	<b>Materiales y Equipos (específicos de centro)</b>
Solución PBS o salino	
Formaldehído 3,5-4% pH7	
Tubo polipropileno 50ml	
Recipiente adecuado para manipulación y corte (Placas Petri)	
Marcadores y bolígrafos	
Lápiz de grafito o Sistema impresión en casetes	
Pinzas estériles	
Papel de filtro	
Bisturí y pinzas para cortar el tejido	
Guantes para proteger al personal de manipulación de tejidos	

**TÍTULO: CONSERVACIÓN TEJIDO PULMONAR EN FORMOL-PARAFINA****ARCHIVADO:**

PNT\_8.2.003\_TEJIDO\_PULMONAR\_FORMOL\_PARAFINA.doc

**Nº DE CÓDIGO:** 8.2.003

Etiquetas suficientes y adecuadas para criomoldes	
Máscara de protección frente salpicaduras	
Bata de protección frente derrames y salpicaduras	
Casos de histología (inclusión en parafina)	
Tapas para casos	
Guantes térmicos para protección individual	
Campana de tallado extractora	
Alcohol (Etanol)	
Xilol	
Estación de parafina	
Moldes de parafinado	
Pesa para parafinado	
Parafina (bajo punto de fusión)	

**6. DEFINICIONES**

**Conservación:** Usar agentes químicos, alterar las condiciones ambientales u otras acciones durante el procedimiento para prevenir o retardar el deterioro biológico o físico de la muestra.

**Deshidratación:** Extraer el agua del tejido.

**7. PROCEDIMIENTOS**

Este procedimiento tiene por objeto garantizar que las muestras de tejido pulmonar recogidas de pacientes que han consentido participar en la Plataforma Biobanco Pulmonar se conserven de forma segura, oportuna y eficiente, evitando riesgos de contaminación y pérdida de integridad molecular y estructural. La estandarización del protocolo es importante para obtener resultados que puedan ser comparables y fiables. La fijación en formaldehído es una práctica estandarizada en laboratorios de histopatología. Las siguientes indicaciones favorecen una correcta preservación del tejido en formaldehído:

1. Las muestras de tejido no deben ser mayores a 1.5 x 1 x 0.5cm.
2. Un defecto de fijación tiene un riesgo mayor en la calidad del proceso, pero también un exceso de fijación puede conllevar problemas en la aplicación de métodos inmunohistoquímicos.

Es aconsejable que el laboratorio esté provisto de un procesador automático de inclusión en parafina con los tiempos de procesamiento estandarizados. Sin embargo, se pueden usar los siguientes pasos de protocolo como guía de referencia.

**7.1. TRANSPORTE DEL TEJIDO**

1. La movilización de la pieza debe ser rápida, no más de 30 minutos entre la resección y el inicio de su conservación.
2. El personal de quirófano notificará de la existencia de tejido candidato a la persona responsable de la obtención de la muestra, quien organizará su transporte desde el quirófano al laboratorio patológico (o laboratorio designado) de manera óptima para preservar la integridad celular y molecular.
3. El patólogo o la persona delegada responsable determinará el fragmento de tejido excedente para biobanco en función de las necesidades clínicas.
4. La pieza debe ser introducida en un recipiente de plástico, que a su vez se encuentre en un contenedor lleno de hielo.
5. Si es posible, previamente preparar los kits de colección tisular.

**7.2. FIJACIÓN EN FORMALDEHÍDO**

1. Tratar el tejido como potencialmente infeccioso.
2. La fijación se llevará a cabo por el técnico de laboratorio o la persona formada para ello nombrada por el responsable de cada uno de los nodos de la Plataforma Biobanco Pulmonar.
3. Identificar y/o etiquetar 1 tubo de polipropileno de 50ml, y preparar todo el material antes del aviso desde quirófano.

4. La fijación del tejido debe realizarse lo antes posible desde su resección, y no exceder a un máximo de 60 minutos.
5. Usar Formaldehído, solución 3,5-4% tamponada pH=7 con carbonatos, como reactivo fijador. Es importante que el fijador esté tamponado para prevenir la formación de pigmentos formaldehídicos, en tejidos ricos en sangre.
6. Depositar una muestra de tejido pulmonar de aproximadamente 1x1x0,2 cm en un recipiente de polipropileno con unos 50 ml de solución salina preenfriada a 4°C.
7. Lavar 3 veces en solución salina.
8. Colocar el filete en 45ml aproximadamente de solución Formol al 4% tamponada (10% formalina) y dejar en incubación a temperatura ambiente (25°C) durante un mínimo de 24h y un máximo de 72h.

NOTA: Los pasos que vienen a continuación se encuentran estandarizados en cada uno de los centros. Se adjuntan a modo orientativo, aunque pueden existir pequeñas diferencias entre centros.

### 7.3. PROCESO DE CORTE DEL TEJIDO FIJADO

1. Tras la fijación cortar bajo una campana de tallado extractora fragmentos de 3-5mm<sup>3</sup> de tejido pulmonar fijado.
2. Identificar los casetes según cada centro o laboratorio de anatomía patológica, mediante un lápiz de grafito o sistema de impresión en casetes.
3. Depositar cada fragmento de tejido en el casete pertinente, colocar la tapa de cada casete, y proceder a la deshidratación y aclarado de los tejidos.

### 7.4. PROCESO DESHIDRATACIÓN Y ACLARADO

1. Deshidratar los tejidos mediante una batería de alcoholes a diferentes concentraciones.
2. Aclarar el tejido pulmonar mediante el tratamiento con xilol.
3. Deshidratar y aclarar el tejido siguiendo los pasos siguientes:

PASO	TIEMPO	SOLUCIÓN
1	60min	Etanol 70%
2	60min	Etanol 96%
3	60min	Etanol 96%
4	60min	Etanol 100%
5	60min	Etanol 100%
6	60min	Etanol 100%
7	60min	Xilol
8	60min	Xilol

4. Tras finalizar el proceso de deshidratación y aclarado, colocar los casetes con las piezas en parafina caliente (aprox 58°C) hasta iniciar el proceso de inclusión en parafina.

### 7.5. PROCESO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

1. Preferiblemente usar parafina de bajo punto de fusión para asegurar la calidad de los ácidos nucleicos.
2. Depositar el tejido en un molde caliente apropiado a su tamaño.
3. Mediante una pinza sujetar el tejido para que quede en la base del molde, mientras se rellene el molde con parafina.
4. Depositar el molde en la zona fría de la estación de parafina y colocar una pesa encima del tejido para que la superficie de corte quede en un mismo plano. Posteriormente acabar de rellenar el molde con parafina caliente. Asegurar que el tejido se enfría en la base del molde.
5. Depositar el casete debidamente identificado en cada molde de parafinado.
6. Enfriar los bloques de parafina en una zona de enfriado, durante unos 15min.
7. Desmoldar los casetes (bloques) de parafina.

8. Los tejidos pulmonares embebidos en parafina están ahora listos para ser seccionados o almacenados.
9. Almacenar los casetes de parafina a Temperatura Ambiente (25°C) o menor. Prevenir la exposición al sol o extremas variaciones de temperatura. Almacenar los casetes en cajas de almacenaje de plástico debidamente etiquetadas y/o identificadas, añadiendo la etiqueta de Plataforma Biobanco Pulmonar.
10. Registrar la ubicación de las muestras almacenadas en el software de la Plataforma Biobanco Pulmonar.

**8. REFERENCIAS, REGLAMENTOS Y DIRECTRICES APLICABLES**

1. Declaration of Helsinki. <http://ohsr.od.nih.gov/helsinki.php3>  
<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
2. Tri-Council Policy Statement; Ethical Conduct for Research Involving Humans; Medical Research Council of Canada; Natural Sciences and Engineering Council of Canada; Social Sciences and Humanities Research Council of Canada, August 1998.  
<http://www.pre.ethics.gc.ca/english/policystatement/policystatement.cfm>
3. Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics Series. [http://www.mrc.ac.uk/pdf-tissue\\_guide\\_fin.pdf](http://www.mrc.ac.uk/pdf-tissue_guide_fin.pdf)
4. Best Practices for Repositories I. Collection, Storage and Retrieval of Human Biological Materials for Research. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER). <http://www.isber.org>
5. National Bioethics Advisory Commission: Research involving human biological materials: Ethical issues and policy guidance, Vol. I: Report and recommendations of the National Bioethics Advisory Committee. August 1999.  
<http://bioethics.georgetown.edu/nbac/hbm.pdf>
6. US National Biospecimen Network Blueprint  
[http://www.ndoc.org/about\\_ndc/reports/NBN\\_comment.asp](http://www.ndoc.org/about_ndc/reports/NBN_comment.asp)
7. Jewell, S. et al. 2002, Analysis of the Molecular Quality of Human Tissues, an experience from the Cooperative Human Tissue Network. Am. J. Clin.Pathol.118:733-741.
8. Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups [http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines\\_fresh\\_tissue.pdf](http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines_fresh_tissue.pdf)
9. SOP-PRO-Tissue-freezing.02, Oct 3, 2006. Freezing of Prostate Tissues. Procure
10. Quebec Prostate Cancer Biobank.
11. 10. Recommendations of FFPE Working Group of BIG and North American breast Cancer Groups. [http://ctep.cancer.gov/forms/draft\\_ffpe\\_tissue.pdf](http://ctep.cancer.gov/forms/draft_ffpe_tissue.pdf)
12. 11. SOP# TB306.001, 18th Sep. 2006. Paraffin Block Generation, Ontario Institute for Cancer Research Tumour Bank.
13. 12. Snell L. and P. H. Watson. 2006, Breast Tissue Banking: Collection, Handling, Storage and Release of Tissue for Breast Cancer Research. Methods Mol Med. 120:3-24.