

TÍTULO: CONSERVACIÓN E INCLUSIÓN DE TEJIDO PULMONAR EN FORMOL-PARAFINA

ARCHIVADO: PNT_8.2.003_v1.2_ES_TEJIDO_PULMONAR_FORMOL_PARAFINA	Nº DE CÓDIGO: 8.2.003
VERSIÓN: 1.2	FECHA DE EDICIÓN: 17/09/2015
PÁG. 1 DE 5	

REVISADO POR: Estefanía Piñero, Laura Vidaña y Daniel Pons FECHA: 11/08/2016	FIRMA:
REVISADO Y APROBADO POR: Cristina Villena FECHA: 11/08/2016	FIRMA:

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. *Parte de las muestras son conservadas en bloques de parafina, de las cuales se pueden obtener cortes histológicos mediante un micrótopo.*

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.

TÍTULO: CONSERVACIÓN E INCLUSIÓN DE TEJIDO PULMONAR EN FORMOL-PARAFINA**ARCHIVADO:**

PNT_8.2.003_v1.2_ES_TEJIDO_PULMONAR_FORMOL_PARAFINA

Nº DE CÓDIGO: 8.2.003

Materiales y Equipos	Materiales y Equipos (específicos de centro)
Solución PBS o salino	
Formaldehído (o metilaldehído; H ₂ CO) 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	
Tijeras para cortar el tejido	
Guantes para proteger al personal de manipulación de tejidos	
Etiquetas	
Máscara de protección frente salpicaduras	
Bata de protección frente derrames y salpicaduras	
Casetes de histología (inclusión en parafina)	
Tapas para casetes	
Guantes térmicos para protección individual	
Campana de tallado extractora	
Alcohol (Etanol)	
Xilol o sustituto del 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

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 procesado 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. *Para asegurar dicho tiempo se realizará un registro manual o digital.*
2. *En el caso de que el tiempo transcurrido entre la resección del tejido pulmonar y el inicio de su conservación sea superior a 30 minutos, se anotará como "Incidencia" en la información asociada a dicha muestra o en el campo "observaciones". Si el tiempo es superior a 60 minutos no deberá recogerse tejido según este protocolo.*

3. 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.
4. El patólogo o la persona delegada responsable determinará el fragmento de tejido excedente para biobanco en función de las necesidades clínicas.
5. La pieza debe ser introducida en un recipiente de plástico, que a su vez se encuentre en un contenedor lleno de hielo.
6. Si es posible, previamente preparar los kits de colección tisular.

7.2. FIJACIÓN EN FORMALDEHÍDO

1. 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. Debe realizarse lo antes posible desde su resección.
2. Tratar el tejido como potencialmente infeccioso.
3. Identificar y/o etiquetar 1 tubo de polipropileno de 50ml y preparar todo el material antes del aviso desde quirófano.
4. La pieza debe ser introducida en un recipiente de polipropileno con unos 50 ml de solución salina pre-enfriada a 4°C, que a su vez se encuentre en un contenedor lleno de hielo.
5. Lavar 3 veces en solución salina pre-enfriada a 4°C en agitación 3-4 minutos o estático durante 10 minutos.
6. Cortar con tijeras estériles el tejido pulmonar en fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5 x 0,2 cm (dependiendo de la disponibilidad de cantidad de tejido, el tamaño puede variar entre 0,2 x 0,2 x 0,2 a 1 x 1 x 0,2 cm). Hacer cortes limpios para evitar disrupciones del tejido.
7. Depositar cada fragmento de tejido en el casete pertinente y colocar la tapa. Identificar los casetes mediante un lápiz de grafito o sistema de impresión en casetes.
8. Colocar los fragmentos en solución Formol al 3,5-4% tamponada pH 7 en una proporción mínima 20:1 (volumen fijador respecto la pieza tisular).
9. Incubar a temperatura ambiente (25°C) durante un mínimo de 24h y un máximo de 72h. Proceder a la deshidratación y aclarado de los tejidos.

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 DESHIDRATACIÓN Y ACLARADO

1. Deshidratar los tejidos mediante una batería de baños en etanol a concentraciones crecientes (70% 96% y 100%).
2. Aclarar el tejido pulmonar mediante el tratamiento con xilol o sustituto del xilol (Citrus).
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 (o sustituto del Xilol)
8	60min	Xilol (o sustituto del 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.

7.4. PROCESO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

1. Preferiblemente usar parafina de bajo punto de fusión *suplementada con DMSO* para asegurar la calidad de los ácidos nucleicos. *Previo al proceso se asegurará que el dispensador ha alcanzado la temperatura de 65°C haciendo que la parafina adquiera un estado líquido permitiendo así, la inclusión del tejido y la posterior formación del bloque.*
2. Escoger un molde apropiado al tamaño de la muestra. Rellenar la base del molde con parafina líquida y colocar el tejido sobre ella. *Orientarlo de manera que la zona más amplia y más plana quede en el fondo para que el posterior corte sea lo más homogéneo posible.*
3. *En la zona caliente del inductor, aplastar la muestra con la prensa, aplicando una fuerza vertical considerable y evitando movimientos de torsión o translación (para no disrumpir la estructura de la muestra), y levantar la pesa para eliminar las burbujas de aire atrapadas en la muestra y que ahora están en la parafina.*
4. *Volver a sumergir la prensa en el molde atrapando el tejido, y arrastrarlo a la zona fría del inductor (3 segundos) hasta que la parafina de la base se endurezca y adquiera un color blanco. Levantar la pesa y con la ayuda de unas pinzas (también se puede sujetar con la mano) llevar el molde hasta el dispensador y rellenarlo con parafina hasta cubrir toda la superficie. Volver a depositar el molde en la zona fría del inductor e insertar la base del casete histológico debidamente identificado. Rellenar con parafina si es necesario y colocar el molde en la placa fría durante 15 min. aprox. para que se solidifique totalmente la parafina.*
5. *Desmoldar y obtener el bloque. Con la ayuda de un cuchillo o un rascador eliminar los restos de parafina de los bordes del bloque.*
6. 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 debidamente etiquetadas y/o identificadas.
7. 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
 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
 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
 9. SOP-PRO-Tissue-freezing.02, Oct 3, 2006. Freezing of Prostate Tissues. Procure
 10. Quebec Prostate Cancer Biobank.
 11. Recommendations of FFPE Working Group of BIG and North American breast Cancer Groups. http://ctep.cancer.gov/forms/draft_ffpe_tissue.pdf
 12. SOP# TB306.001, 18th Sep. 2006. Paraffin Block Generation, Ontario Institute for Cancer Research Tumour Bank.
 13. 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.