

TÍTULO: CONSERVACIÓN TEJIDO PULMONAR EN PARAFORMALDEHIDO Y OCT		
ARCHIVADO: PNT_8.2.005_v1.2_ES_TEJIDO_PULMONAR_PF_OCT		Nº DE CÓDIGO: 8.2.005
VERSIÓN: 1.2	FECHA DE EDICIÓN: 09/08/2016	PÁG. 1 DE 4
REVISADO POR: Laura Vidaña, Estefanía Piñero, Daniel Pons FECHA: 09/08/2016		FIRMA:
REVISADO Y APROBADO POR: Cristina Villena FECHA: 09/08/2016		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.

Las colecciones de tejido fresco fijado en paraformaldehído y embebido en OCT (*Optimal Cutting Temperature*) son un valioso recurso para la investigación. El paraformaldehído es uno de los fijadores más utilizados universalmente ya que conserva una gran variedad de tejidos y compuestos tisulares, preservando mejor las estructuras intracelulares. El método es efectivo para preservar la morfología del tejido pulmonar. El propósito de este documento es normalizar y estandarizar el procedimiento de conservación de tejido pulmonar fijado en paraformaldehído y embebido en OCT, para la Plataforma Biobanco Pulmonar.

2. ALCANCE

Este procedimiento describe la manera de conservar el tejido pulmonar en paraformaldehído y OCT. 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 en paraformaldehído y OCT.

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.

Materiales y Equipos	Materiales y Equipos (específicos de centro)
Contenedor para transporte de nitrógeno líquido	
Nitrógeno líquido	
2-metilbutano (isopentano)	
Contenedor para isopentano (baño maría en N ₂ líquido o nieve carbónica)	Histobath o equivalente
Recipiente adecuado para manipulación y corte (Placas Petri)	
Marcadores y bolígrafos	
Pinzas estériles	
Solución PBS o salino	
Criomoldes de vinilo (como Tissue-Tek Ref.#4557 25mm x 20mm x 5mm)	
4% PARAFORMALDEHÍDO (o Polioximetileno) en PBS	
Medio de congelación O.C.T. (Tissue –Tek O.C.T. Ref.#4583)	
Tijeras para cortar el tejido	
Guantes para proteger al personal de manipulación de tejidos	
Etiquetas suficientes y adecuadas para criomoldes	
Máscara de protección frente salpicaduras	
Bata de protección frente derrames y salpicaduras	
Máscara de protección para manejo de N ₂ líquido	
Crioguantas protección para manejo de N ₂ líquido	

6. DEFINICIONES

Crioconservación: Proceso de conservación de material biológico a muy bajas temperaturas por un periodo prolongado de tiempo.

OCT: “*Optimal Cutting Temperature*” es el nombre utilizado del compuesto preservador frente la congelación. El OCT preserva al tejido de la deshidratación y degradación y actúa como un aislante sobre las variaciones de temperatura, y minimiza la formación de cristales. Es especialmente útil para la conservación de tejido fresco congelado que debe ser seccionado a posteriori.

PARAFORMALDEHIDO: Es un producto resultante de la polimerización del formaldehido, que se utiliza como agente de reticulación para fijar células y tejidos en histología.

7. PROCEDIMIENTOS

Este procedimiento tiene por objeto garantizar que las muestras de tejidos que se recogerán de pacientes que se conservarán de manera segura, oportuna y eficiente, evitando riesgos de contaminación y pérdida de integridad celular y molecular. Para llevar a cabo técnicas genómicas y proteómicas es de vital importancia que el proceso de conservación de las muestras sea óptimo, garantizando así la calidad e integridad de éstas.

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 DEL TEJIDO PULMONAR EN 4% PARAFORMALDEHIDO EN PBS

1. Tratar el tejido como potencialmente infeccioso y no colocar el tejido directamente en el hielo.
2. La fijación y congelación 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. A menos de poder ser fijado inmediatamente, el tejido debería ser *procesado* dentro de los 30 minutos desde su resección.
4. Asegurarse que el tejido seccionado no se seque ni se contamine por contacto con otros tejidos o muestras. *Utilizar pinzas y tijeras limpias y estériles.* Evitar contaminaciones cruzadas entre muestras o entre zona tumoral y tejido normal.
5. Colocar una pieza de aproximadamente 1 x 1 x 0,2 cm en un recipiente de unos 50 ml en salino o PBS pre-enfriado a 4°C.
6. Lavar 3 veces en salino o PBS *pre-enfriado en agitación 3-4 minutos* o estático durante 10 minutos.
7. Colocar la pieza en 5-10 ml PBS-paraformaldehido 4% pre-enfriado. Incubar durante 24h a 4°C.
8. Dividir en *fragmentos de 0.3 x 0.3 x 0.2 cm aproximadamente* y colocarlos en un recipiente estéril con OCT:PBS 1:3.
9. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
10. *Cambiarlos a un nuevo recipiente* que contenga solución OCT:PBS 1:1.
11. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
12. *Cambiarlos a un nuevo recipiente* que contenga OCT e incubar 1 hora a temperatura ambiente.

7.3 CONGELACIÓN DEL TEJIDO PULMONAR FIJADO EN OCT

1. Enfriar el isopentano suspendiéndolo en un contenedor sobre nitrógeno líquido o nieve carbónica (*baño maría*). El isopentano estará suficientemente frío cuando aparezcan formas de perlas y la solución adquiera un aspecto denso y *un color blanco*.
2. Depositar unas gotas de medio OCT en el criomolde previamente etiquetado y/o identificado *con el fin de crear una fina capa*.

3. Con unas pinzas estériles colocar 1 fragmento de tejido en el criomolde. Es importante orientar correctamente el tejido en el criomolde para obtener cortes histológicos óptimos mediante el criostato.
4. Cubrir el fragmento de tejido pulmonar depositado con OCT.
5. Usar pinzas o una punta de pipeta para orientar el tejido pulmonar y eliminar las posibles burbujas de aire en el OCT.
6. Depositar el criomolde en el isopentano pre-enfriado a -50°C (*en Histobath o baño maría en Nitrógeno líquido*) con ayuda de las pinzas. Evitar que el isopentano entre en contacto con el OCT, para evitar la formación de burbujas de aire con la consecuente rotura del tejido pulmonar.
7. Una vez congelada, transferir la muestra a un congelador de -80°C . Para el transporte utilizar nitrógeno líquido o nieve carbónica.
8. Registrar la ubicación de la muestra guardada en el software de la Plataforma Biobanco Pulmonar.

Los protocolos de conservación de tejido se encuentran en los PNT 8.2.002, 8.2.003, 8.2.004, 8.2.005 y 8.2.006.

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.