

---

## **FISSATIVI ALTERNATIVI ALLA FORMALINA**

- METHACARNOY: MeOH 60ml;  $\text{CHCl}_3$  30 ml, HAc 10 ml
  - FINEFIX<sup>®</sup>
  - ALCOLIN<sup>™</sup>
  - RCL2<sup>®</sup>
  - HOPE<sup>®</sup>
  - PaxGene<sup>®</sup>
  - Glyoxal
-

**Table 1.** Examples of Commercially Available or Published Reagents Tested in the Screening Program

Reagent	Vendor or composition
RNAlater	Life Technologies, Carlsbad, CA
Michel's	Zeus Scientific, Raritan, NJ
HistoChoice	Amresco Inc., Solon, OH
Prefer	Anatech Ltd, Battle Creek, MI
Z5	Anatech Ltd, Battle Creek, MI
FineFIX	Milestone, Bergamo, Italy
Hope	DCS, Hamburg, Germany
RCL2	Alphelys, Plaisir, France
Streck Tissue Fixative	Streck, Omaha, NE
PreservCyt	Hologic, Bedford, MA
AquaPreserve	MultiTarget Pharmaceuticals, Salt Lake City, UT
RNAsecure	Life Technologies, Carlsbad, CA
S.T.A.R. buffer	Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germany
UMFix	Sakura Finetek, Torrance, CA
Ethanol	70% ethanol p.a. (pro analysis)
Methacarn	Methanol, chloroform, acetic acid
Carnoy's fixative	Ethanol, chloroform, acetic acid
Farmer's	Ethanol, acetic acid
Wolman's solution	Ethanol, acetic acid
Delaunay's	Acetone, ethanol, trichloroacetic acid
FAA	Formalin, acetic acid, ethanol
FPA	Formalin, acetic acid, propionic acid
Davidson's fixative	Formalin, ethanol, acetic acid, water

# Fissativi di nuova generazione

## HOPE

La tecnica di fissazione e con HOPE prevede un' incubazione del tessuto fresco in una soluzione di protezione acquosa, ON a basse temperature: 0-4° C. Il tutto viene seguito da una incubazione in acetone a 0-4° C. Dopo di ciò il tessuto può esser incluso in paraffina.

# SOLUZIONE DI PROTEZIONE



Contiene una miscela di diversi aa in concentrazioni variabili dai 10 ai 100 mM. Il pH a RT è nel range 5.8-6.4.



Contiene HEPES e ac glutammico.

**La soluzione per i tessuti per diffusione, come i fissativi per immersione.**

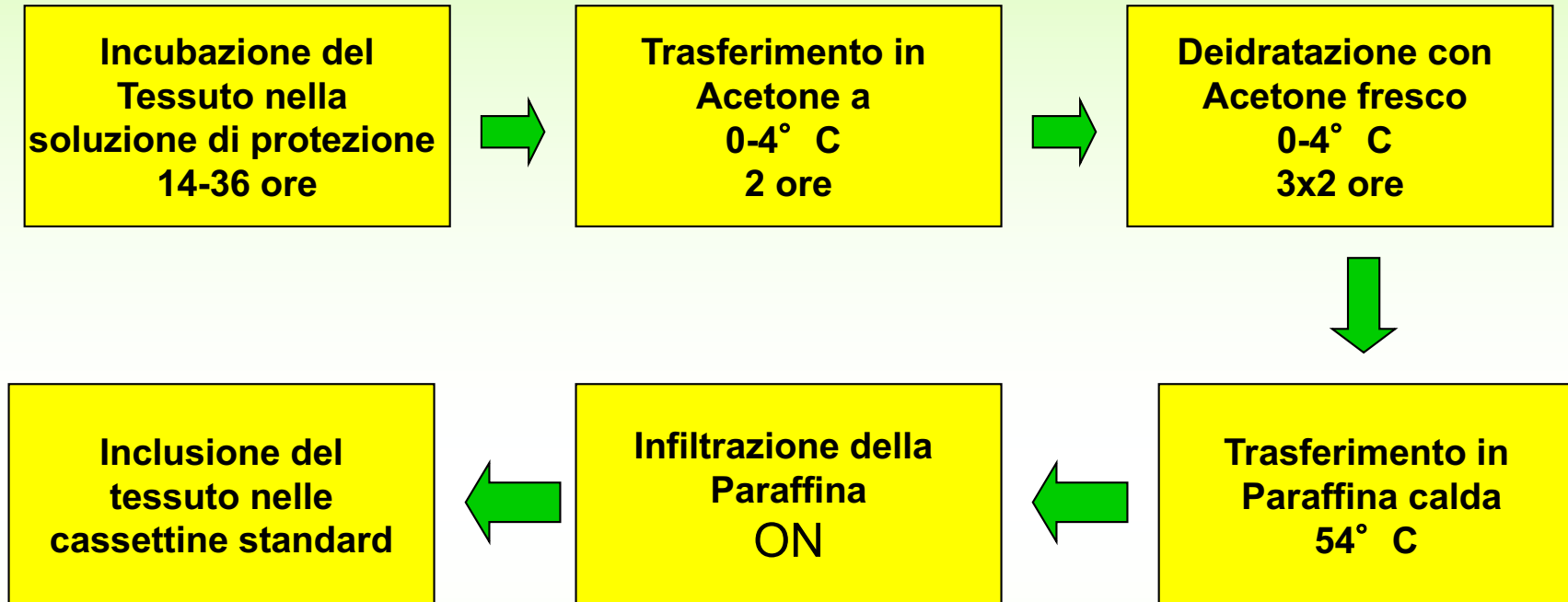


Tale step riduce gli effetti distruttivi del trattamento con il solvente organico.



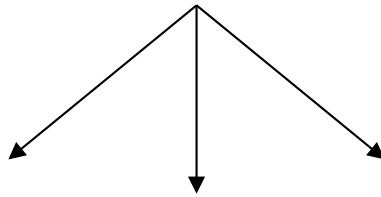
**I coposti formati nella fase di protezione vengono poi precipitati con l'acetone.**

# Schema del processo



---

# FISSATIVI ALCOLICI “SEMPLICI”



## **RCL2:**

Fissazione ON 4° C

## **Alcolin:**

Fissazione rt ON

## **MethaCarn:**

60% MeOH, 30% CHCl<sub>3</sub>,  
10% HAc glaciale  
Fissazione rt ON

---



## **RSH-2 RIDUZIONE DEI TEMPI DI LAVORO**

I tempi sono ridotti a 30 min sia per agobiopsie che biopsie endoscopiche, a 120-180 minuti per biopsie chirurgiche di più di 3 mm di spessore. RSH-2 combina l'irraggiamento al microonde con un sistema di controllo della Temperatura e tempo computerizzato nella fase di deidratazione clearing.

# IL MICROONDE E LA CONSERVAZIONE DEI TESSUTI



La diffusione è un fattore chiave in tutti le fasi della processazione dei tessuti. L'esposizione alle microonde aumenta il coefficiente di diffusione stimolandola. Ne deriva un tempo di processazione nettamente inferiore.

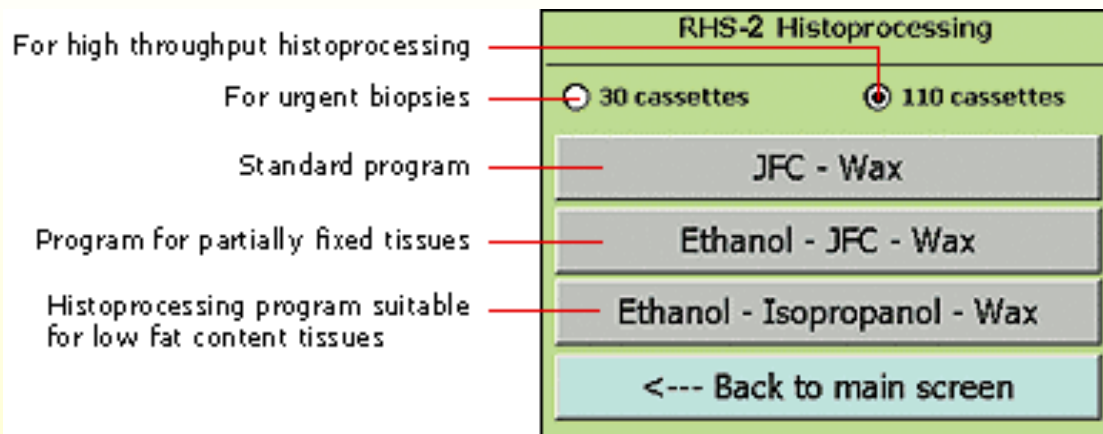
- ✓ La processazione dei tessuti dipende in primis dal fissativo scelto.
- ✓ Per la tecnica al microonde si utilizza un particolare fissativo coagulante -Kryofix. E' una miscela di etanolo assoluto e PEG300. L'utilizzo di tale fissativo è favorito perchè il tessuto viene direttamente immerso nel primo bagno di processazione (etanolo assoluto).
- ✓ Il tempo impiegato per la fissazione con fissativi coagulanti è minore in confronto alla formalina.



# VANTAGGI



- ✓ Si possono processare biopsie di svariate misure
- ✓ Processa simultaneamente tessuti diversi
- ✓ Non utilizza reagenti tossici come lo xilene
- ✓ Utilizza un unico reagente per disidratazione e clearing
- ✓ Processa 110 biopsie in 30-40 minuti
- ✓ Processa 110 cassette standard ogni 2-3 ore



- RHS-2 urgent biopsies...30 minutes
- RHS-2 urgent cassettes...2-3 hours
- Conventional... 12-14 hours



# ***LIQUIDO DI DEIDRATAZIONE***

## IL REAGENTE JFC

- Viene impiegato negli strumenti RSH che combinano il vuoto al microonde.
- La soluzione JFC contiene EtOH assoluto, isopropanolo e un idrocarburo a catena lunga. L'ultima componente è un solvente organico non tossico e chimicamente inerte.
- Scioglie e rimuove i lipidi dai tessuti.
- Sotto l'azione delle MW la miscela diventa particolarmente efficiente nella rimozione simultanea di H<sub>2</sub>O e lipidi.
- Le 3 componenti sono miscibili.
- L'azione della miscela sotto l'irraggiamento MW può essere spiegata in termini di polarità.

# Proprietà

- Per avere un'ottima estrazione la polarità del solvente usato deve essere simile alla polarità delle impurezze da rimuovere, qui lipidi ed H<sub>2</sub>O.
- I lipidi tissutali sono costituiti principalmente da glicolipidi e fosfolipidi. I primi sono moderatamente polari, I secondi sono altamente polari.
- Sotto l'azione del MW I lipidi tissutali e le molecole di H<sub>2</sub>O acquisiscono energia come l'EtOH e Isopropanolo del JFC. Come risultato le impurezze escono dai tessuti e l'EtOH e Isopropanolo del JFC vi entrano.
- La terza componente è non polare ma la sua attività nell'eliminare I lipidi viene esaltata dal MW e dalla presenza dell'EtOH e Isopropanolo.
- La componente non polare agisce sulle catene di ac grassi non polari mentre l'EtOH e Isopropanolo del JFC agiscono sulle porzioni polari dei lipidi  
⇒ estrazione dei lipidi efficiente.

## ***Paraffina***

- x** Assorbe l'energia del MW
- x** E' trasparente al MW

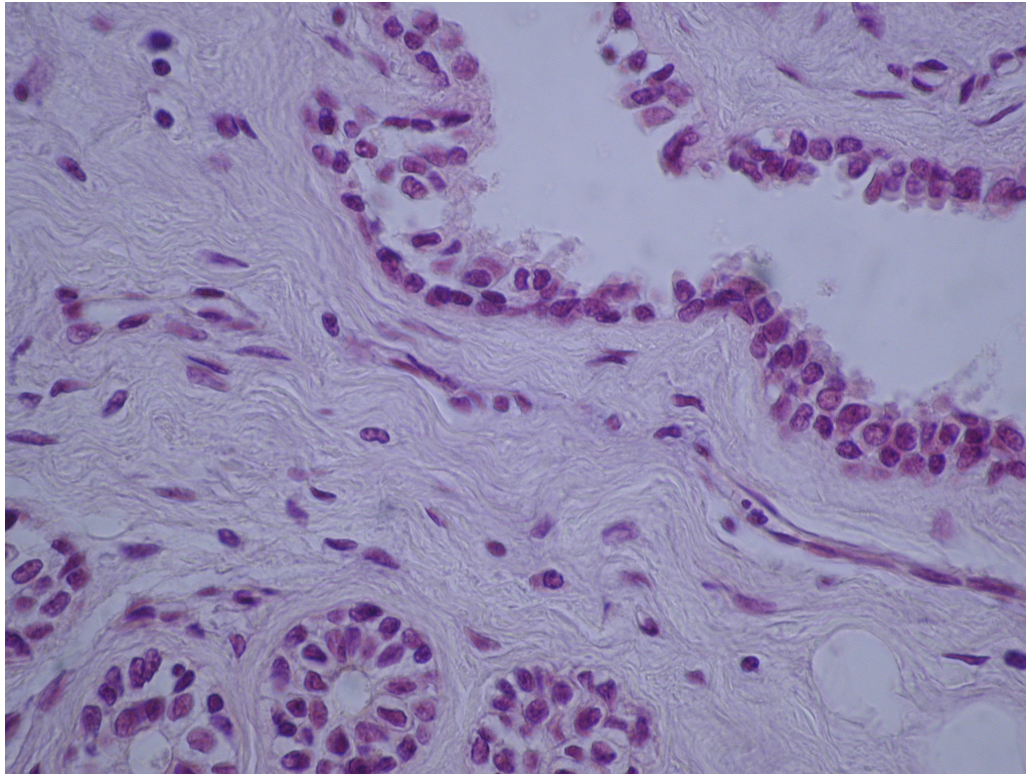
## ***Vuoto***

- x** La procedura così non consente di rimuovere l'isopropanolo nello step di inclusione.
- x** Vuoto contemporaneo al MW per eliminare le tracce.

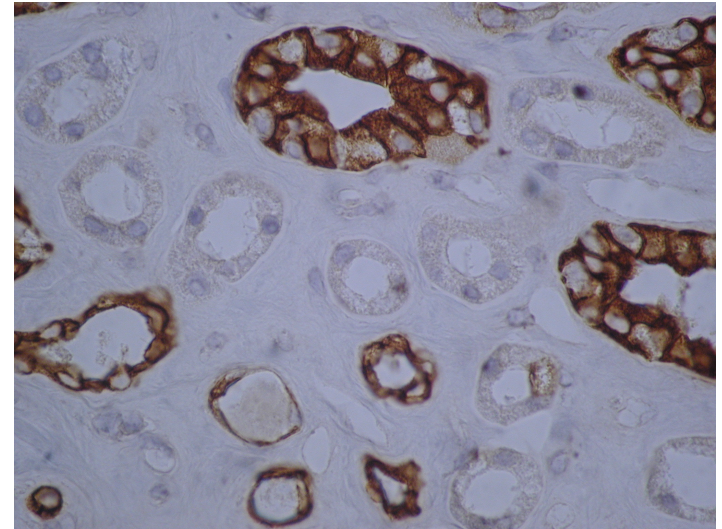
## ***Vantaggi***

- x** Sotto vuoto le temperature di esercizio sono inferiori
- x** Nell'inclusione EtOH e isopropanolo vengono rimossi in fase gassosa dai tessuti (aspirati via dal mezzo di trasporto: aria)

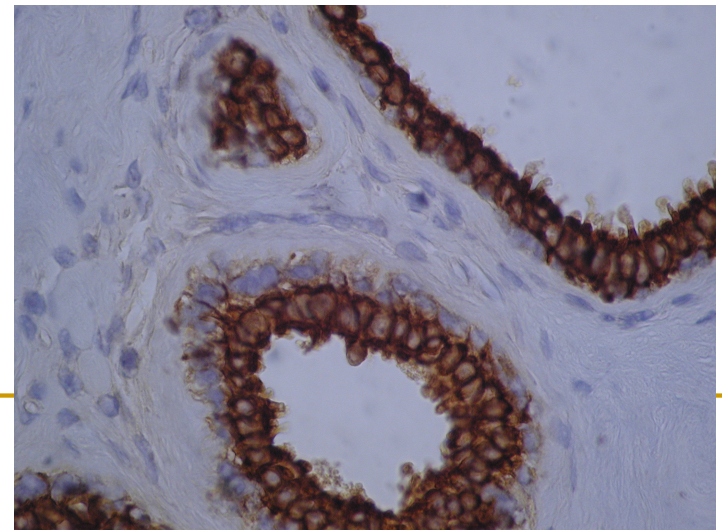
# Morphology and immunohistochemistry



Breast, H&E



Kidney, IHC



Breast, IHC

**DNA**

FORMALIN

New Fixative

CONTROLS

1 2 3 4 5

1\* 2\* 3\* 4\* 5\*

- +

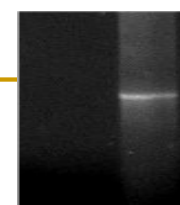
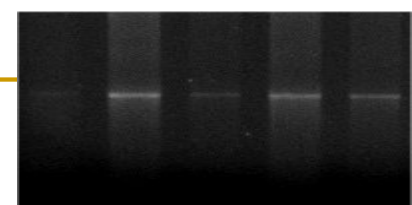
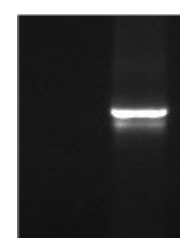
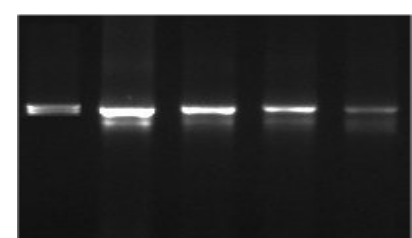
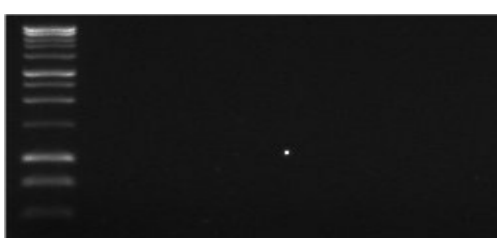
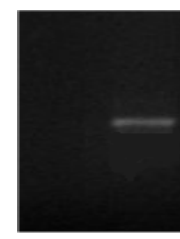
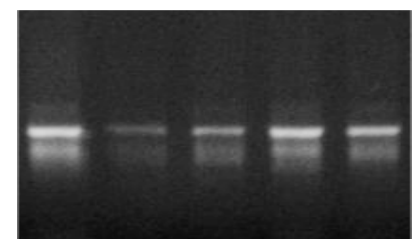
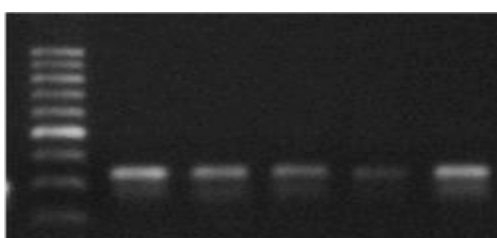
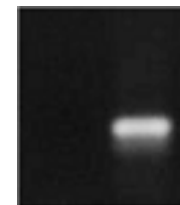
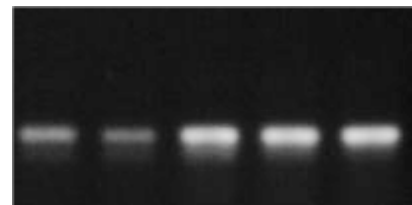
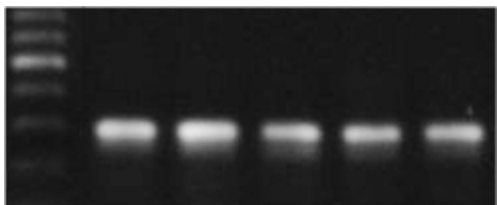
291 bases

339 bases

1000 bases

1900 bases

2400 bases



# RNA

FORMALIN

1 2 3 4 5

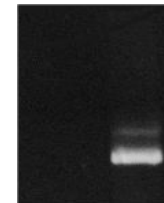
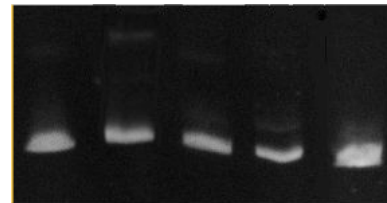
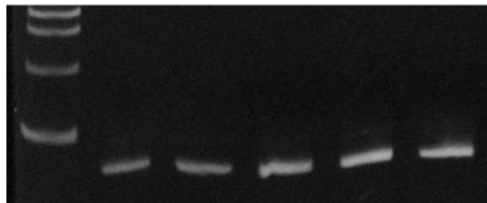
New Fixative

1\* 2\* 3\* 4\* 5\*

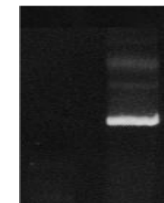
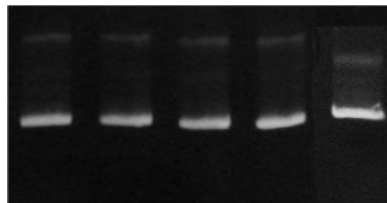
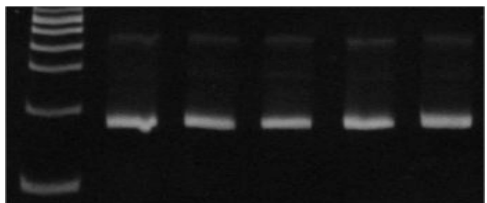
CONTROLS

- +

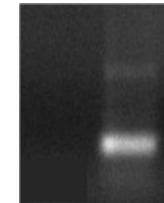
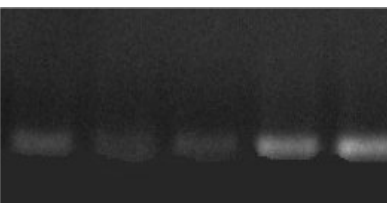
77 bases



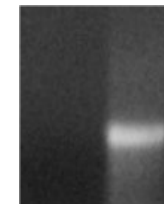
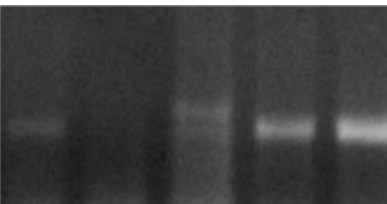
170 bases



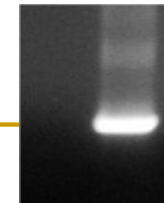
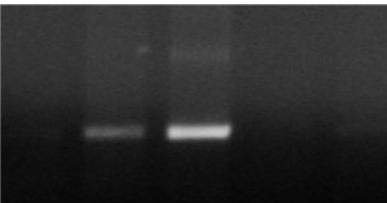
200 bases



450 bases

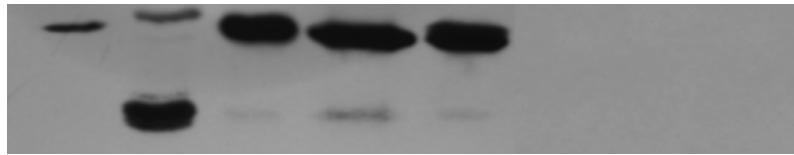


600 bases



# Western Blot analysis

Hep G2 lysate (C+)  
Fresh Tissue extract  
New fixative, case 1  
New fixative, case 2  
New fixative, case 3  
Formalin fixed, case 4  
Formalin fixed, case 5  
Formalin fixed, case 6



WB against  $\alpha$ -tubulin, around 50 kDa

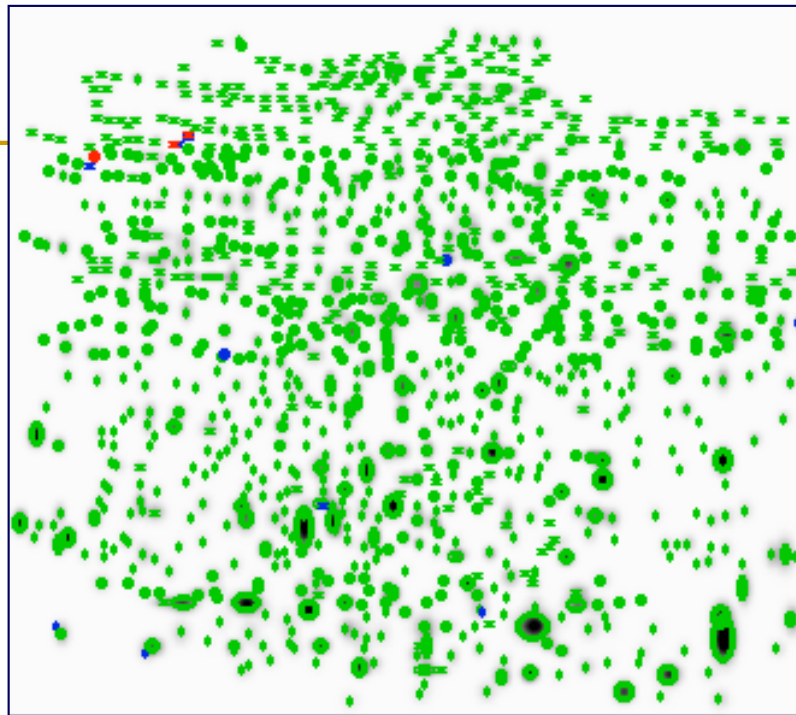
Recombinant tTG  
New fixative, case 1  
New fixative, case 2  
New fixative, case 3  
Fresh Tissue, case 1  
Fresh Tissue, case 2  
Fresh Tissue, case 3  
Formalin fixed, case 4  
Formalin fixed, case 5  
Formalin fixed, case 6

WB against human tTG, 77 kDa





**New  
Fixatives**



**Fresh  
Tissue**

*Stanta G, Pozzi Mucelli S,  
Petrera F, Bonin S, Bussolati  
G, "A novel fixative improves  
opportunity of nucleic acids  
and proteomic analysis in  
human tissues", Diagn.  
Molec. Pathol 15:115-23;2006*

## DNA

Lenght (bases)	Formalin	RSH
291	5/5	5/5
339	5/5	5/5
1000	0/5	5/5
1900	0/5	5/5
2400	0/5	5/5

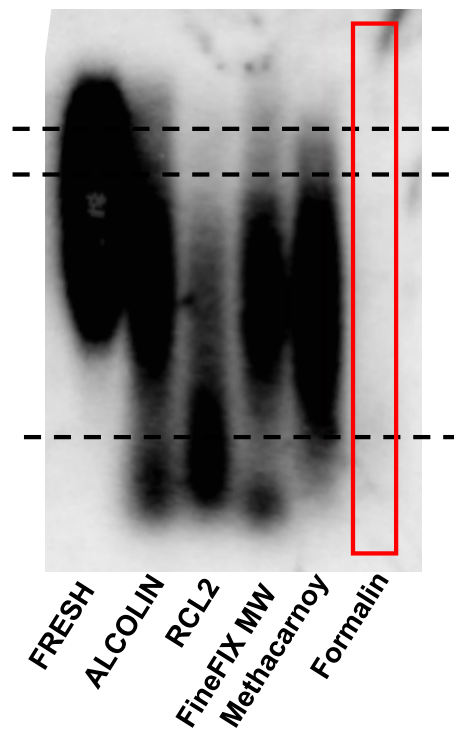
## RNA

Lenght (bases)	Formalin	RSH
77	5/5	5/5
170	5/5	5/5
200	0/5	5/5
450	0/5	5/5
600	0/5	3/5

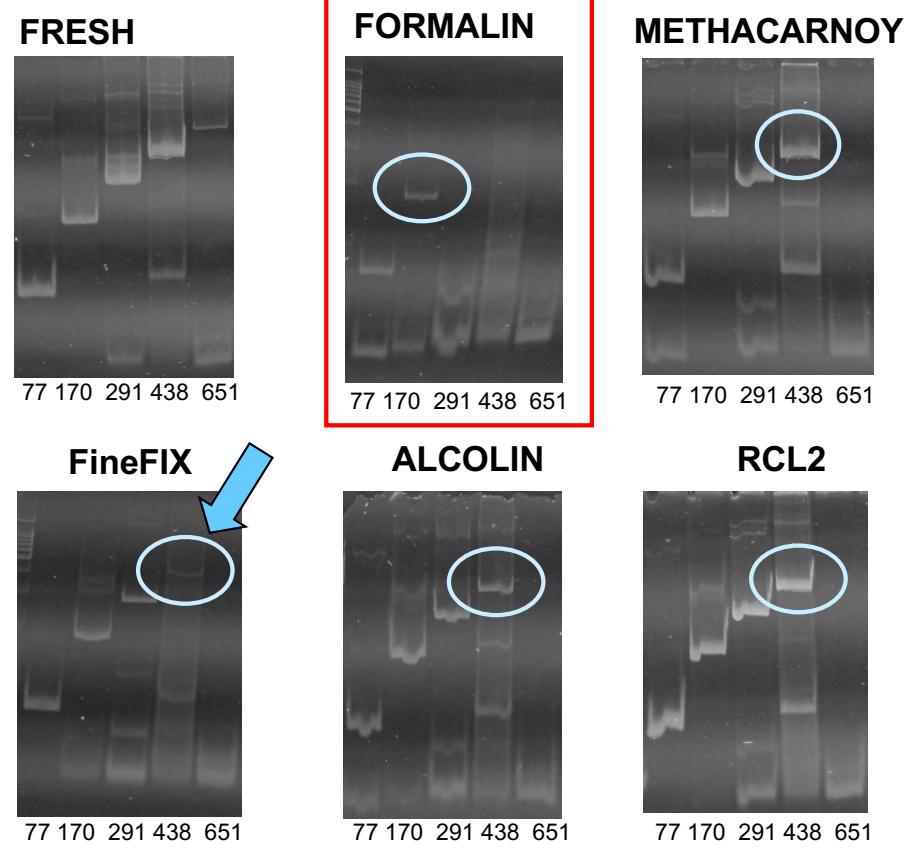
## Differenze con i metodi convenzionali

- La fissazione è ottimizzata e viene condotta prima della processazione istologica
- Deidratazione in uno step singolo al posto di 2 fino a 6 usati nelle procedure convenzionali.
- Non si usano alcoli idratati
- JFC è poco attivo a RT. L'intermedio utilizzato nella tecnica tradizionale comporta da 2 a 4 cambi. Qui 1.
- Deidratazione e chiarificazione in un unico step, combinando intermedio e mezzo di deidratazione.
- Con tale metodo il bagno di paraffina raggiunge 82° C, circa 20° in più della tecnica tradizionale. Basta un unico bagno.

**NORTHERN BLOT with poly-dT PROBE**



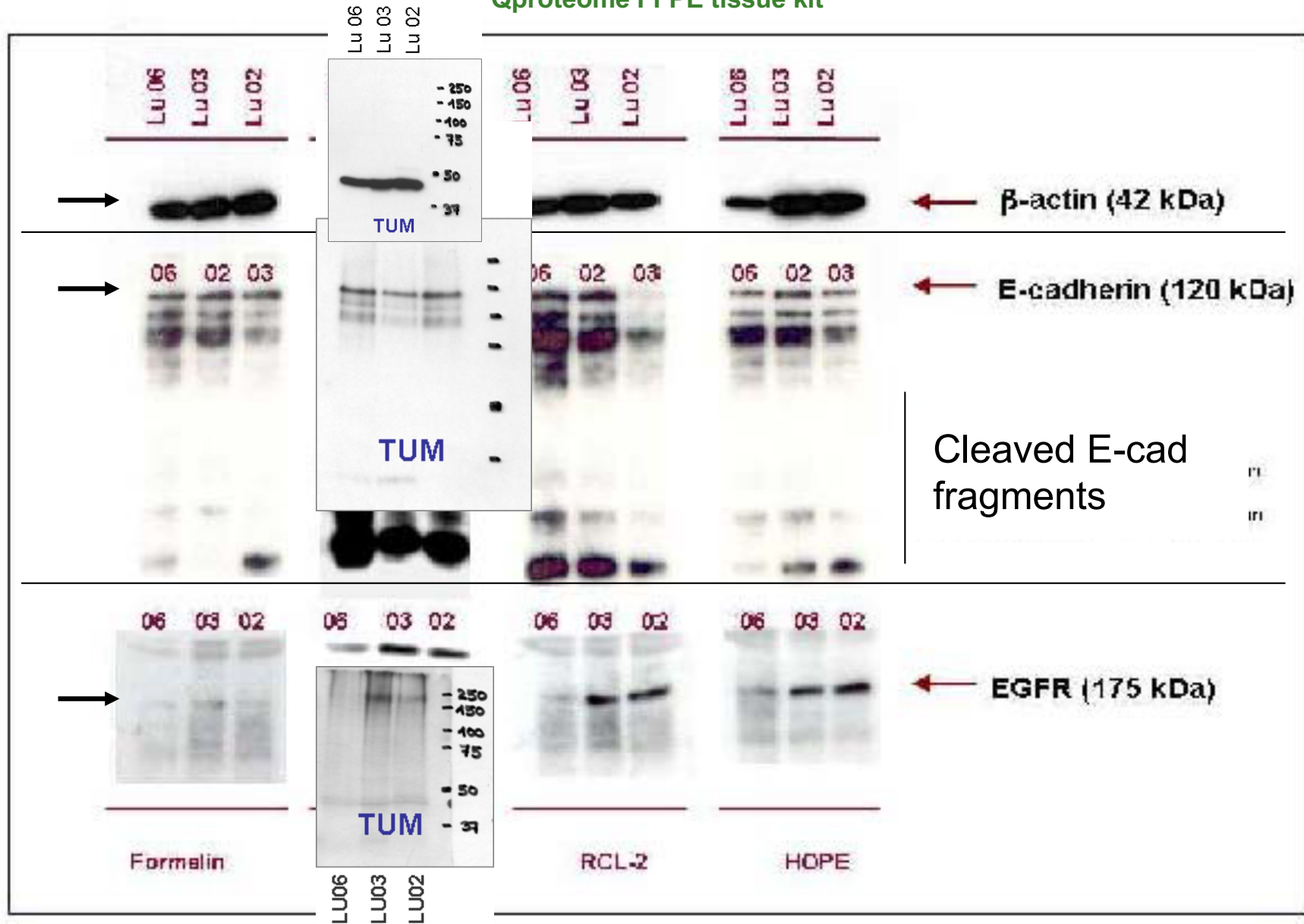
**Endpoint RT-PCR on fragments of increasing length**



All alcoholic fixatives are conservative of mRNA integrity (up to 438bp)

# Protein extraction from formalin-, FineFix-, RCL-2-, and HOPE-fixed and paraffin-embedded **lung cancer** samples from Graz

Qproteome FFPE tissue kit



Courtesy of IMPACTS group

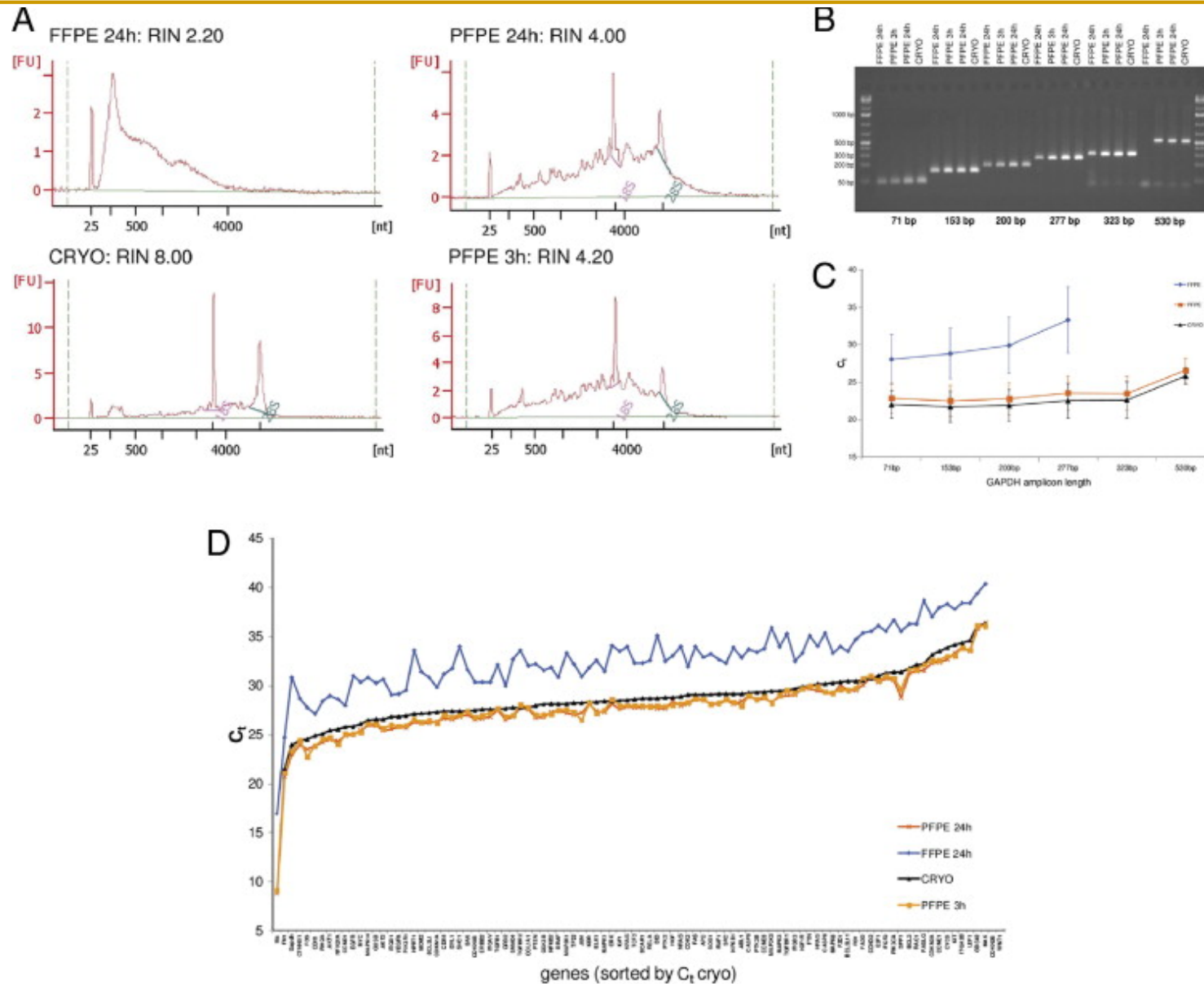


Figure 3. **RNA preservation and gene expression.** A: Representative results for RNA integrity determined on an Agilent Bioanalyzer 2100 platform. The electropherogram of RNA from FFPE tissue shows strongly degraded RNA. For PFPE tissue (fixed for 3 or 24 hours, ...

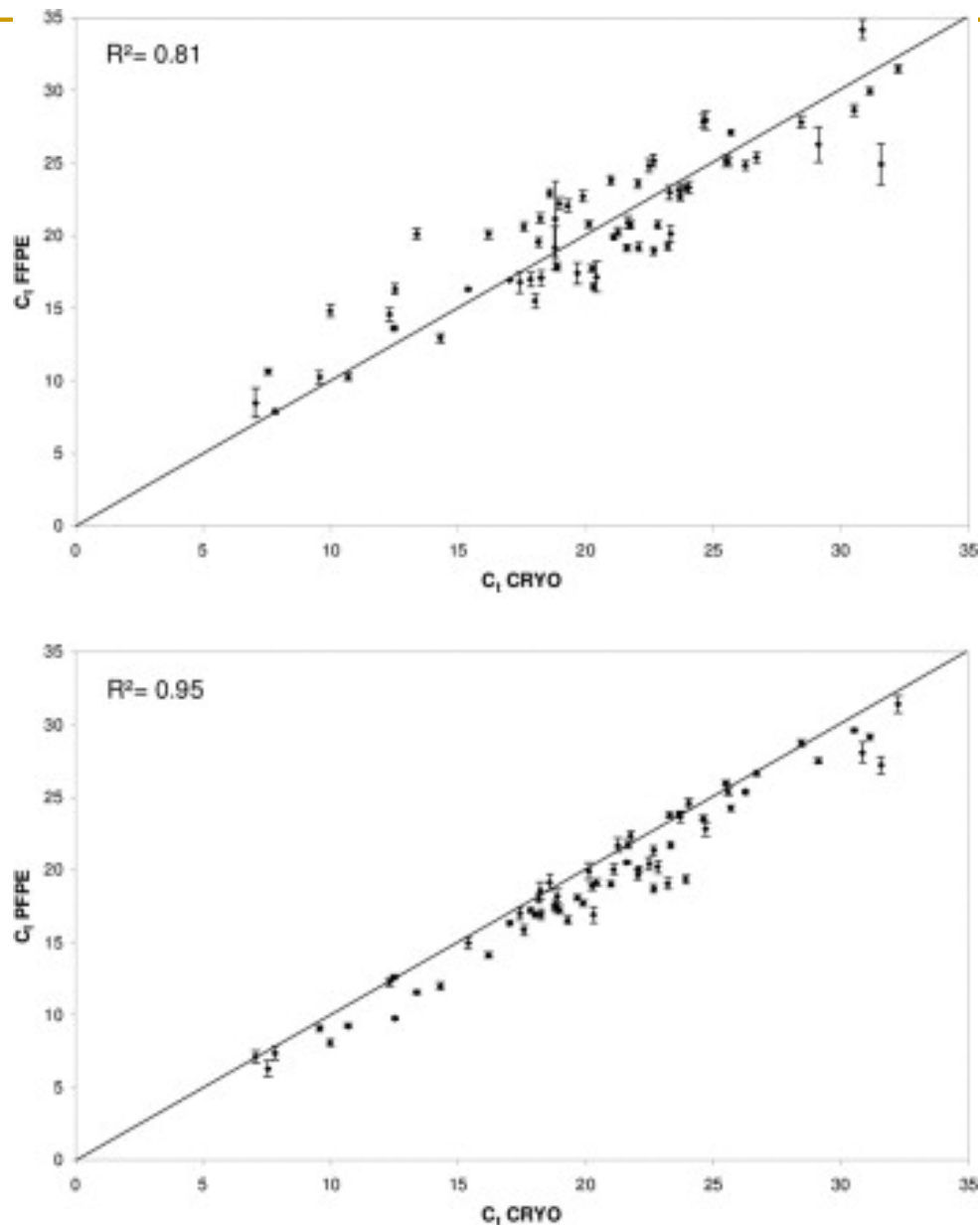


Figure 4. **Correlation of miRNA expression between FFPE, FFPE, and snap-frozen samples.** miRNAs from corresponding aliquots of three colon cancer cases were quantified by qRT-PCR on a TaqMan ABI Prism 7700 sequence detection system. miRNAs 10a, 16, 29a, 30b, 103...

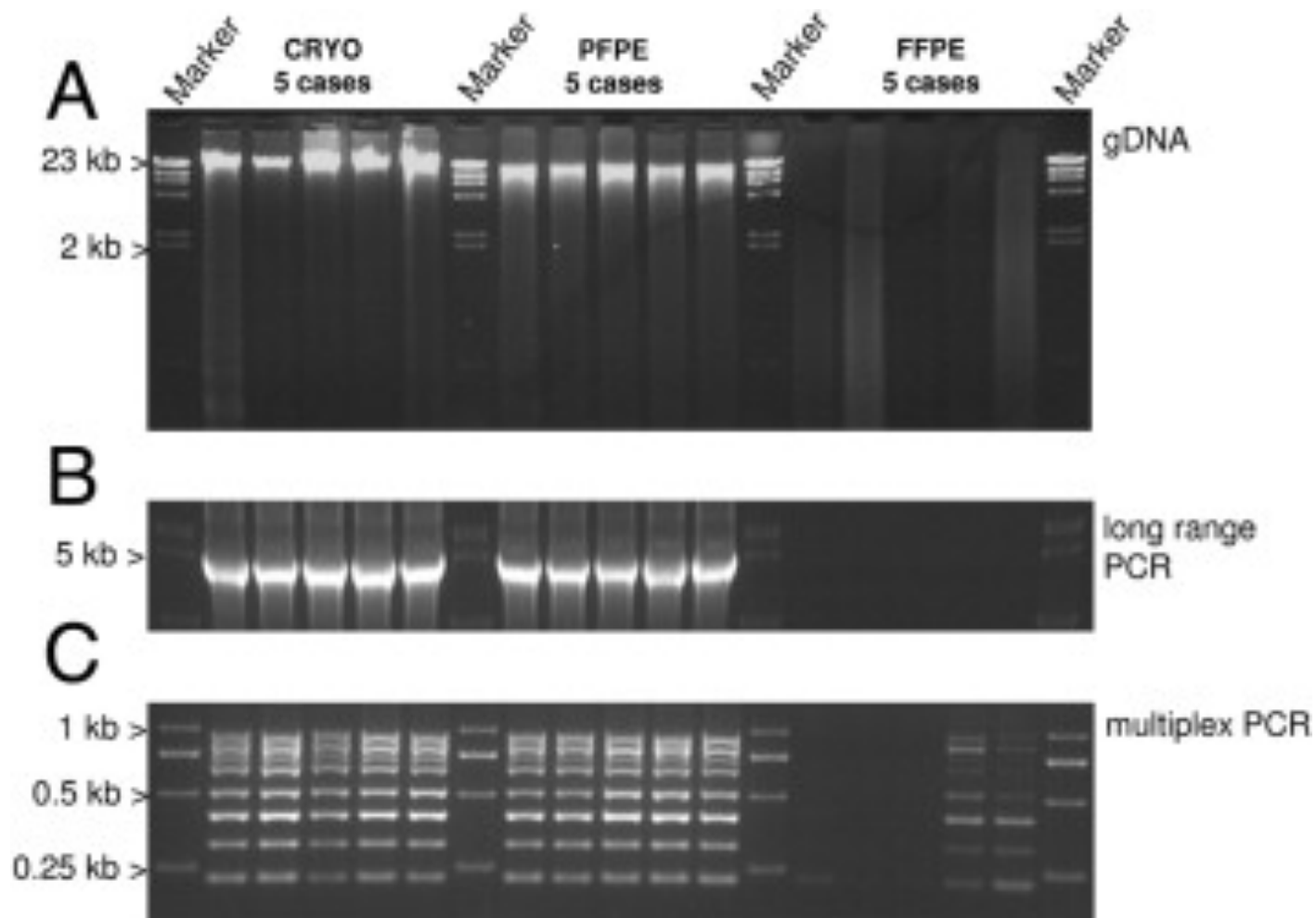


Figure 5. **DNA integrity and performance in long-range and multiplex PCR.** A: Genomic DNA extracted from corresponding FFPE, PFPE, and snap-frozen (CRYO) samples from five human colorectal cancer cases was separated on 1% agarose gels and visualized with ethidium bromide



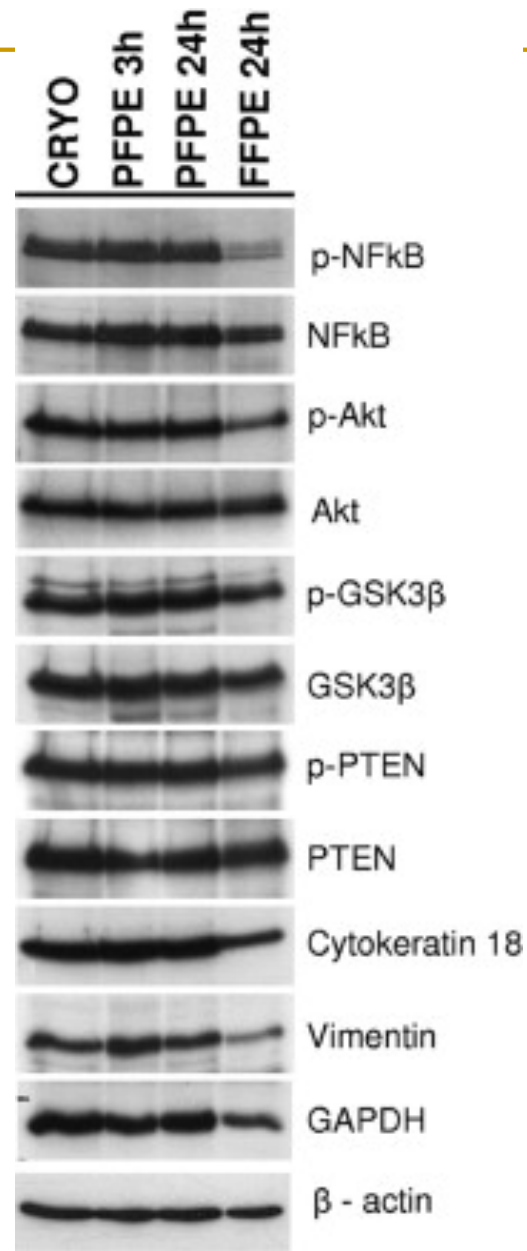
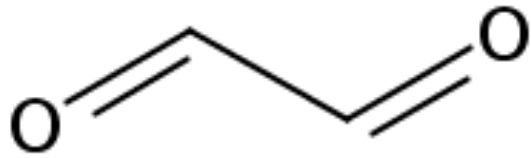


Figure 6. **Western blot analysis** of protein preservation. Proteins were extracted from corresponding snap-frozen (CRYO), PFPE (fixed for 3 or 24 hours, followed by 24 hours stabilization), and FFPE (fixed for 24 hours) human liver samples. Equal amounts (20  $\mu$ g)...



## Acid free glyoxals fixative for histological preparations

A 2% GAF solution in 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 is **stable for a few weeks**, then gradually undergoes **oxidation** producing an acidic reagent with **sub-optimal fixation properties**.

To overcome the stability problem, a stock solution containing 20% GAF in 50% ethanol (Carlo Erba, Milan, Italy) added with 0.1 g insoluble calcium carbonate (Sigma- Aldrich) in 100 ml of the solution (stock solution) can be used.

The final (working) solution employed as GAF fixative is obtained by diluting the stock solution (exempted of calcium carbonate) 1:10 in 0.11 M phosphate buffer pH 7.3.

---

