

- ✓ Las muestras para incluir en parafina deben idealmente ser fijadas dentro de los primeros 30 minutos tras la recolección, con una solución de formalina.
- ✓ En general, la fijación con solución de formalina debe durar entre 12 a 24 horas máximo.
- ✓ Una vez hecha la inclusión en parafina, la muestra se debe almacenar en seco y a temperatura ambiente o menor, por sobre la temperatura de congelación (4°C-20°C máximo).
- ✓ Resultados óptimos se pueden obtener al mantener las muestras en tacos de parafina a temperaturas de 4°C a 10°C, y utilizar muestras recientemente incluidas en parafina para las extracciones y posterior análisis, por ejemplo, qPCR.
- ✓ Para el estudio de GIST, se incluyen:
 - Determinación por inmunohistoquímica de c-KIT (CD117) y CD-34.
 - De forma complementaria, se pueden incluir en el estudio inmunohistoquímico: DOG-1, S-100, desmina, SMA, SDHB, recuento de mitosis en 50 HPF, Ki67.
 - Estudio molecular de genes KIT (exones 9, 11, 13 y 17) y PDGFRA (exones 12, 14 y 18) según indicación médica.

Recomendaciones para estandarización

- ✓ **Revisión del tejido en FFPE por el patólogo.**
 - Confirmar el diagnóstico de GIST.
 - Selección de áreas con mayor cantidad de células tumorales.
 - Definir en las áreas seleccionadas el porcentaje (%) de células tumorales, células inflamatorias y necrosis.
- ✓ **Contenido mínimo de células neoplásicas: 30%**
- ✓ **Controlar las condiciones pre-analíticas de las muestras de tumor.**
- ✓ **Hay que considerar que la tasa de rechazo de muestras FFPE puede ascender a 30-40%.**
- ✓ **Factores que influyen sobre la preservación de biomoléculas:**
 - Colección de muestra, transporte y almacenamiento:
 - Tiempo de isquemia fría, temperatura, tiempo de manipulación, tamaño del espécimen.
 - Proceso de fijación/inclusión:
 - Solución para fijación, temperatura (4°C).
 - Tiempo (< 72 hrs).
 - Parafina (de alta pureza, a temperatura estable).
 - Método de aislamiento de RNA/DNA.

Recomendaciones para manejo de muestras fijadas en parafina (FFPE)

- A) Operatorio:**
 - Isquemia tibial durante 20 a 80 min.
 - Isquemia fría < 1 hr.
- B) Fijación:**
 - Formalina 10% v/v de alta pureza, tamponada (pH: 7-7.2), durante 6 hrs. mínimo a 24 hrs. máximo.
 - Volumen muestra:fijador 1:10 a 1:20.
 - No descalcificar con ácido para prevenir alteraciones de la muestra.
- C) Inclusión:**
 - Parafina de bajo punto de fusión (55-63°C).
 - Evitar el uso de aditivos en los reactivos (por ejemplo: cera).
- D) Corte:**
 - Microtomo limpio y navaja nueva para utilizar por cada caso a procesar.
 - Desgastar superficie antes de recoger el corte
 - Secar a 60°C durante 1 hr.
- E) Almacenamiento:**
 - Mantener tacos a temperatura ambiente (15-25°C).
 - Humedad controlada, estable y en ambiente libre de polvo.
 - En caso de mantener cortes, no se recomienda utilizarlos si están almacenados durante más de dos días.



Cabe notar que algunas de estas recomendaciones podrían no ser 100% iguales, en el sentido de que podrían variar dependiendo del kit de extracción de DNA para FFPE que sea utilizado. Para evitar sesgos, es importante estandarizar estrictamente estas variables en cada centro de acuerdo con el kit de extracción disponible, lo que va de la mano con la utilización del mismo kit idealmente en todas las extracciones. Lo mismo es válido para los análisis inmunohistoquímicos.