

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 169**

51 Int. Cl.:
C12M 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03768547 .6**
96 Fecha de presentación: **30.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1563055**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **MÉTODO Y APARATO DE EMPOTRAMIENTO RÁPIDO DE BLOQUES CON CÉLULAS.**

30 Prioridad:
31.10.2002 US 422768 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2012

73 Titular/es:
**University of Massachusetts
225 Franklin Street
Boston, MA 02110, US**

72 Inventor/es:
FISCHER, Andrew, H.

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 372 169 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

5 Método y aparato de empotramiento rápido de bloques con células

CAMPO DEL INVENTO

10 El presente invento se refiere a dispositivos para preparar células para su examen microscópico y para conseguir las células para ensayos moleculares e inmunológicos. Más particularmente, el invento se refiere a un aparato para empotrar células y fragmentos de tejido dentro de un sustrato sólido, tal como parafina, para permitir su corte con un microtomo para evaluación microscópica, y para su almacenaje en estado estable.

ANTECEDENTES

15 Muchos procesos de enfermedad solamente pueden diagnosticarse sobre la base de exámenes histológicos o citológicos utilizando un microscopio óptico. Por ejemplo, si bien la presencia de un tumor puede detectarse utilizando dispositivos radiológicos, la determinación de si un tumor es benigno o maligno exige la interpretación de un patólogo acerca del aspecto de las células utilizando microscopía óptica. Sin embargo, antes de llegar a esta etapa, primero debe recuperarse, recogerse y tratarse la muestra de tejido para el examen microscópico. Hay varias técnicas disponibles para recuperar y recoger biopsias o muestras celulares de un paciente. Resulta beneficioso para los pacientes el empleo de técnicas mínimamente invasivas para la obtención de muestras celulares o biopsias. Por ejemplo, pueden obtenerse pequeños fragmentos de tejido mediante una biopsia por aspiración con una aguja fina o raspando superficies de una cavidad del cuerpo accesible mediante técnicas endoscópicas mínimamente invasivas. Una vez recuperadas, las células han de ser tratadas luego para prepararlas para microscopía. Se conocen una variedad de técnicas de tratamiento, incluyendo la técnica Cytospin® y la técnica Thin-Prep® para depositar fragmentos de tejido directamente sobre el portaobjetos de un microscopio. El documento JP-A-2000-146782 describe formas de gestionar una presión de aspiración cuando se crean especímenes citológicos en un filtro en una técnica tal como la técnica ThinPrep®.

30 Otra técnica, comúnmente denominada preparación de bloques con células, ofrece varias ventajas con respecto al depósito directo de fragmentos de tejido. El procedimiento de preparación de bloques con células inmoviliza las células o los pequeños fragmentos de tejido en un soporte sólido, típicamente cera de parafina. Uno de tales procedimientos de preparación de bloques con células se describe en el documento US-A-5817032. Se cortan entonces secciones delgadas del bloque con células con un microtomo y las secciones se montan en un portaobjetos de un microscopio con el fin de someterlas a examen. Las secciones resultantes del bloque con células presentan la información diagnóstica en una forma que complementa las técnicas de depósito directo. Por ejemplo, las disposiciones arquitectónicas de las células unas con respecto a otras se presentan mejor en sección a partir de un bloque con células que en el caso de células depositadas directamente en el portaobjetos de un microscopio. Los bloques de células también permiten llevar a cabo importantes ensayos de diagnóstico inmunológicos y moleculares sobre las muestras de células, los cuales no resultaría práctico realizar o serían difíciles de llevar a cabo sobre preparaciones directas. Además, parece que los bloques de células preservan las células en forma conveniente a temperatura ambiente por tiempo indefinido, facilitando por tanto la investigación biomédica.

45 El método de preparación de bloques con células requiere que los fragmentos de células se "empotren" en un medio sólido, más comúnmente cera de parafina. El "empotramiento" requiere los siguientes pasos genéricos: (1) de las células hay que eliminar todas las moléculas de agua, típicamente con alcohol (el agua es miscible con el alcohol); (2) luego, debe eliminarse todo el alcohol, así como todas las sustancias grasas y reemplazarlos, típicamente, por xileno (el xileno es miscible con el alcohol pero no con el agua); (3) debe eliminarse el xileno y reemplazarlo con cera (la cera es miscible con el xileno pero no con la mayoría de alcoholes ni con el agua); y (4) las células en cera fundida deben organizarse entonces manualmente y endurecerse en el lado inferior de una casete para tejido, de manera que pueda cortarse una sección del bloque de cera con el tejido empotrado utilizando un microtomo. Los primeros tres de estos pasos se ejecutan, comúnmente mediante un "dispositivo de tratamiento de tejido", que es una máquina que hace circular alcohol, xileno y cera fundida, en secuencia, en una cámara que contiene la casete para tejido. Las casetes de tejido cumplen, típicamente, el doble propósito de contener la muestra de células durante el proceso de empotramiento y de proporcionar un mecanismo de unión para mantener el bloque de cera en la máquina del microtomo de modo que la muestra de células subsiguientemente empotrada en cera en la superficie inferior de la casete, pueda ser cortada en secciones delgadas.

60 Antes de que pueda tener lugar el "empotramiento", la muestra de células debe ser manipulada para concentrar las células y facilitar su transferencia en todo el proceso de empotramiento. Un procedimiento comúnmente seguido para preparar tales bloques de células, es la técnica de coagulación, descrita por Yang y otros en Acta Cytologica, 42: 703-706 (1998). La técnica de coagulación supone los siguientes pasos genéricos: (1) se centrifuga una muestra de células durante 10 minutos; (2) el sobrenadante se vierte manualmente dejando un botón de células concentradas; (3) se añaden manualmente fibrina y trombina, obtenidas de suministros de un banco de sangre, al botón de células y se realiza una incubación durante 15 minutos con agitación manual ocasional para atrapar el botón de células

las en la fibrina coagulante; (4) la muestra de células coagulada se retira manualmente con cuidado del tubo de centrifugado para evitar perder células debido al estriado del coágulo a lo largo del costado del tubo o la rotura del coágulo en piezas pequeñas no utilizables en la práctica; (5) la muestra de células coagulada es transferida manualmente a un papel para lentes que, luego, es plegado y colocado manualmente en una casete para tejido; (6) la casete para tejido se pone entonces manualmente en un dispositivo automático de tratamiento de tejido que, entonces, hace pasar de forma cíclica alcohol, xileno y parafina caliente por la máquina (como se ha descrito en el párrafo precedente) y se ajusta, típicamente, para que funcione durante la noche; (7) a la mañana siguiente, se retira manualmente la casete de la parafina líquida del dispositivo de tratamiento de tejido y se abre; (8) se abre el papel para lentes y se retira por rascado el coágulo de células del papel para lentes y se le pone, manualmente, en un molde de secciones de tejido; y (9) se añade suavemente parafina al molde mientras se intenta mantener, manualmente, el coágulo de células contra la superficie inferior del molde que, eventualmente, se cortará. (10) Se invierte entonces la casete para tejido sobre el molde para que sirva como portador para la máquina de microtomo y se endurece en la cera junto con el coágulo de células. (11) Se separa entonces del molde la casete para tejido, con los fragmentos de células empotrados en cera incluidos. En este punto, el bloque de cera está listo para cortarlo con un microtomo. Muchos de estos once pasos son comunes a otras técnicas existentes para la producción de bloques de células.

Otro procedimiento popular para preparar bloques de células es la técnica de la bolsa de colodión, descrita por Fahy y Bedrossian en *Laboratory Medicine*, 74(2): 94-96 (1993). La técnica de la bolsa de colodión incluye los once pasos antes mencionados a excepción de los pasos 1-4, que son reemplazados por lo siguiente: Se vierte manualmente colodión en un tubo de centrifuga para revestir el tubo. La muestra de células obtenida del paciente es centrifugada entonces en el tubo revestido. Se retira por vertido el sobrenadante y se extrae del tubo el delgado revestimiento de colodión con el botón de células concentradas incluido y empotrado, como en los pasos 5-11 anteriores. La técnica del colodión tiene una ventaja con respecto a la técnica del coágulo al evitar la dilución de las células con fibrina y trombina. Con la técnica del colodión, no es necesario esperar a que se forme el coágulo de células, como ocurre con la técnica del coágulo, y las células no son susceptibles a perderse cuando se las retira del tubo de centrifuga. Sin embargo, la técnica del colodión es sustancialmente más peligrosa que la técnica del coágulo, debido a la naturaleza inflamable del colodión y su disolvente de éter.

Aún otra técnica para preparar bloques de células la describen Díaz-Rosario y Kabawat en *Cancer*, 90:265-272 (2000). En esta técnica, la muestra de células se filtra inicialmente y la muestra filtrada se retira por rascado del filtro y es transferida sobre papel para lentes que, luego, es doblado y colocado en una casete para tejido y transferido a un dispositivo de tratamiento de tejido, siguiéndose a continuación los anteriores pasos 6-11.

Las técnicas corrientemente disponibles para la preparación de bloques de células, tales como las previamente descritas, adolecen de varios problemas que las hacen complicadas, costosas, susceptibles a la contaminación o a los errores de identificación, y resultan ineficaces para mostrar células de diagnóstico en las secciones de microtomo finales. Por ejemplo, muchas de las técnicas requieren que los fragmentos de células empotrados en cera sean transferidos manualmente a una casete para tejido necesaria para contener el bloque de cera en el microtomo durante el seccionamiento. Esta transferencia manual a la casete para tejido ocupa una cantidad de tiempo considerable, como ocurre con el paso de transferir las células desde un tubo de muestras a un dispositivo de tratamiento de tejido. Muchos de los fragmentos de células se desperdician durante la transferencia y/o los pasos de empotramiento. En el pasado, las técnicas mediante las que se intentaba mejorar la concentración de células en el material seccionable y evitar el desperdicio de las células han demostrado ser menos que ideales, dado que las técnicas implican, necesariamente, la dilución de la sección del microtomo con sustancias portadoras de tal manera que se cuenta con relativamente pocas células o no se reducen las pérdidas de células en los pasos previos al empotramiento.

En cualquier caso, las corrientes técnicas de creación de bloques con células tardan, típicamente, de 8 a 16 horas en completarse debido a que la extracción de agua, alcohol, grasas y xileno en el dispositivo de tratamiento de tejido lleva tiempo. Si bien se cuenta con métodos para acelerar el paso de tratamiento del tejido (paso 6 anterior), por ejemplo utilizando radiación con microondas, presión de vacío, temperaturas elevadas y agentes químicos de difusión más rápida, estos métodos adolecen de su propio conjunto de problemas. Estas técnicas solamente reducen en forma modesta el tiempo de tratamiento del tejido (paso 6 anterior) pero son relativamente tediosas a la hora de establecerlas en el laboratorio. Además, estas técnicas no mejoran la eficacia de los otros pasos del tratamiento. La capacidad de producir bloques con células en el mismo día permitiría obtener diagnósticos más rápidos, con un mayor ahorro de costes en todo el sistema sanitario.

Otro inconveniente de las técnicas de bloques con células anteriormente descritas es que son, también, susceptibles a los errores de identificación de una muestra, ya que la muestra ha de moverse manualmente entre el tubo de muestra, el papel de lentes (o colodión y otras sustancias portadoras), la casete para tejido y el molde para tejido. Además de la susceptibilidad a una identificación errónea total también es posible, con las técnicas existentes, que se produzca una contaminación cruzada entre la muestra del paciente y células y biomoléculas (incluyendo células cancerosas) de otras fuentes. Es decir, en la técnica de los coágulos de fibrina, las células del paciente se mezclan con plasma en lotes procedente de otros pacientes con el fin de formar un coágulo. Durante las transferencia de las células a la casete para tejido y desde ella, puede producirse la contaminación de las células de un caso a otro en los fórceps utilizados para manejar manualmente los botones de células. Como en los dispositivos de tratamiento de tejidos se sumergen, simultáneamente, múltiples casetes para tejido en un baño común de reactivos, la posibilidad

de que se produzca una contaminación cruzada con células cancerosas de un paciente del botón de células de otra muestra (lo que los patólogos denominan "flotadores") es un problema importante, bien reconocido.

Todavía otra desventaja de los pasos corrientes ejecutados en un dispositivo de tratamiento de tejidos es que estos pasos son difíciles de normalizar. Ello se debe a que una máquina de tratamiento de tejidos hace circular, típicamente, los reactivos de empotramiento para muchas muestras de laboratorio a la vez. Un bloque con células listo para ser colocado en un dispositivo de tratamiento de tejido a las 9:00 a.m. estaría expuesto, necesariamente, a condiciones diferentes por una muestra situada en el mismo dispositivo de tratamiento a las 9:30 a.m. Las técnicas moleculares emergentes requieren un tratamiento normalizado para conseguir un comportamiento óptimo.

Dado que la microscopía óptica es, corrientemente, la "regla de oro" para el diagnóstico de muchas enfermedades, los avances en la comprensión de la biología molecular de las enfermedades y de sus tratamientos exige, en general, disponer de la capacidad para, simultáneamente, estudiar las características microscópicas de las células mientras se preservan sus moléculas constituyentes para investigación. La preservación simultánea de la morfología y de los constituyentes bioquímicos de una célula supone, corrientemente, la aparición de varios problemas para los investigadores y los patólogos de diagnóstico (revisado en "Efecto de fijadores y tratamiento de tejidos en el contenido y la integridad de ácidos nucleicos", de Srinivasan M, Sedmak D, y Jewell S., en Am. J. Pathol., 2002; 161:1961-71). La congelación de los tejidos preserva los ácidos nucleicos y las proteínas (si bien es inevitable cierta autólisis durante la descongelación del tejido), pero el tejido congelado presenta obstáculos a la valoración morfológica. Algunos obstáculos incluyen "artefactos de congelación" que deforman la morfología y obstaculizan el diagnóstico clásico mediante microscopía óptica, dificultades técnicas al cortar secciones delgadas de tejido congelado, incapacidad para cortar una sección histológica de ciertos tipos de tejidos congelados (por ejemplo, tejidos que contengan abundantes grasas), un almacenamiento complicado y costoso de las muestras de tejidos congelados, imposibilidad práctica de congelar muestras de tejido muy pequeñas, y el gasto que suponen los microtomos especiales necesarios para cortar tejidos congelados. Las muestras de células empotradas en parafina proporcionan una morfología excelente y las biomoléculas tales como los ácidos nucleicos y las proteínas parecen ser muy estables en el caso de almacenamiento a largo plazo, incluso a temperatura ambiente, siempre que las biomoléculas sobrevivan a los pasos de empotramiento. Desafortunadamente, la fijación por formaldehído, ampliamente utilizado como fijador en la producción de bloques de tejido empotrado en parafina, provoca extensos daños en los ácidos nucleicos y las proteínas. Aunque existen técnicas de empotramiento en parafina que no utilizan formaldehído, estas técnicas siguen planteando problemas. Los problemas incluyen el lento régimen de difusión de los reactivos de empotramiento que permite la degradación de las biomoléculas, la variación de un día para otro, de las condiciones de fijación cuando se utiliza un reactivo de empotramiento en masa durante muchos días para empotrar muestras, y el potencial de contaminación de las células de una muestra con otras, ya que en las técnicas de empotramiento en parafina, las muestras se someten juntas a baños en las cubas de los reactivos.

Existe, por tanto, la necesidad de una técnica de preparación de bloques con células que sea capaz de implantar fragmentos de células en un área concentrada dentro del bloque con células, sin perder células, tal que una única sección del bloque de cera con células muestre una proporción sustancial de todos los fragmentos de células sin dilución con fibrina ni con otras moléculas portadoras. Asimismo, es deseable una técnica que evite, o elimine, los errores de identificación de un bloque con células, la contaminación de un bloque con células con otro bloque con células y que requiera menos reactivos de empotramiento y un menor tiempo que las técnicas corrientemente disponibles y que permita la preservación normalizada de biomoléculas con fines de estudio de diagnóstico e investigación.

SUMARIO DEL INVENTO

El presente invento se define en la siguiente reivindicación 1 y las reivindicaciones dependientes están dirigidas a características opcionales. En lo que sigue se describe un aparato que utiliza una técnica de tratamiento por flujo directo y empotramiento para empotrar rápidamente las células. Este tratamiento por flujo directo hace máxima la eficacia de recuperación de las células y de las extracciones durante el empotramiento, disminuyendo por tanto la cantidad de muestras celulares requeridas, reduciendo al mínimo el tiempo necesario para el tratamiento y reduciendo al mínimo la cantidad de reactivos necesarios para el empotramiento. El aparato también pone automáticamente las células en el plano del bloque con células donde es necesario realizar la sección sin diluirlas con sustancias portadoras. Además, el aparato reduce al mínimo, o elimina, el potencial de incurrir en errores de identificación de un bloque con células o de que se produzca contaminación cruzada entre dos muestras de células diferentes. Finalmente, el uso del aparato permite la preparación a medida y la normalización de la preservación de las células o de las condiciones de empotramiento de las células para facilitar la investigación celular.

El aparato puede incluir una casete para tejido que cumpla la doble función de capturar la muestra de células y, también, proporcionar una vía a través de la cual puedan circular los reactivos de empotramiento. Puede proporcionarse una vía para el flujo de células para entregar fragmentos de células desde una muestra de células recogida, típicamente, en solución acuosa o en un conservante líquido de células, a través de la casete para tejido hasta un filtro que atrape las células y los fragmentos de tejido. El aparato puede incluir, también, una vía para el flujo de reactivos configurada para hacer pasar en secuencia los reactivos de empotramiento y, luego, finalmente, la parafina, a través de la casete para tejido y a través de la muestra de células depositada en el filtro. Cuando se enfría la para-

- 5 fina, puede desprenderse el filtro de las células empotradas en la parafina y puede tirarse de una junta prevista entre el filtro y la casete para tejido, separándola de la casete para tejido. Esta técnica deja un disco de cera que sobresale de la casete para tejido, con las células empotradas dispuestas en el plano por el que puede cortarse una sección de tejido utilizando un microtomo estándar. Situando el filtro en el plano de la sección de tejido, se elimina el proceso de empotramiento manual y se reduce el tiempo requerido para que un técnico encuentre el plano de las células en el bloque formado por empotramiento. Dado que no se utiliza otro material de matriz de soporte, los fragmentos de células no son "diluidos" en la matriz y, por tanto, cada sección de tejido puede mostrar una concentración superior de células.
- 10 El aparato puede ser hecho funcionar manualmente o de forma totalmente automática. En lo que sigue se describe un método para hacer funcionar y automatizar el aparato del presente invento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 El invento puede comprenderse más completamente a partir de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunto con los dibujos anejos, en los que:
- la fig. 1 es una vista detallada de un aparato para formar por empotramiento un bloque con células;
- 20 la fig. 2 es una vista detallada de otra realización de un aparato para formar por empotramiento un bloque con células;
- la fig. 3A es una vista en perspectiva de una casete para tejido;
- 25 la fig. 3B es una vista de arriba hacia abajo de la casete para tejido de la fig. 3A;
- la fig. 3C es una vista de abajo hacia arriba de la casete para tejido de la fig. 3A; y
- 30 la fig. 4 es una vista lateral de la casete para tejido de la fig. 3A, tomada por la línea A-A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

- 35 El presente invento proporciona un aparato para preparar rápidamente un bloque con células para seccionarlo con un microtomo. El aparato 10 para formar por empotramiento un bloque con células del presente invento está diseñado como un sistema de flujo directo. Como se muestra con detalle en la fig. 1, una realización del aparato 10 comprende una vía 16 de flujo de células definida por un tubo 20 de entrada que tiene un extremo de entrada 22 configurado para colocación dentro de un recipiente 12 que contiene una muestra 14 de células en él, y un extremo de salida 24 que se conecta de forma retirable con una abertura 26 para muestras desechables. Una abrazadera 28 de tubo con solenoide puede estar dispuesta a lo largo del tubo de entrada 20 para regular el flujo de fluido por el tubo
- 40 20. El recipiente 12 puede tener cualquier forma, configuración o tamaño adecuados. Por ejemplo, y como se ilustra, el recipiente 12 puede ser un tubo desechable de centrifuga de 50 ml estándar. La muestra 14 de células puede estar en suspensión en una solución fisiológica salina, tal como una solución salina tampón de Hanks, o en un conservante líquido tal como una solución acuosa de alcohol al 50%. La suspensión de células puede ser centrifugada inmediatamente antes de iniciarse el tratamiento para poner las células en suspensión. Además, la muestra 14 de células puede ser agitada también mecánicamente durante los pasos subsiguientes con el fin de mantenerlas en suspensión, por ejemplo uniendo el recipiente 12 con la muestra de células a un agitador mecánico (no representado) o sumergiendo una varilla agitadora mecánica desechable en el recipiente 12 con la muestra de células (no mostrado).
- 50 En comunicación de fluido con la abertura 26 para las muestras, hay una abertura 110 para reactivos desechables que forma un extremo terminal de una vía 18 de flujo de reactivos del aparato 10. La vía 18 de flujo de reactivos está definida por una pluralidad de conductos o tubos de entrega de reactivos que se extienden desde la fuente de sus respectivo reactivos y que convergen luego en la abertura 110 para reactivos. Reactivos de empotramiento 82, 92 y 102 fluyen a la abertura 110 para reactivos a través de conducciones de flujo 80, 90 y 100, respectivamente, que
- 55 están en comunicación de fluido con la abertura 110 para reactivo. Cada una de las conducciones de flujo 80, 90, 100 puede incluir, también, una bomba 84, 94, 104 para controlar la entrega del reactivo y una abrazadera 86, 96, 106 de tubo, con solenoide, para garantizar una vía hermética. El alcohol contenido en un depósito 82 puede ser hecho pasar a través de la conducción 80 para el flujo de alcohol; el xileno contenido en un depósito 92 puede ser hecho pasar por una conducción 90 para el flujo de xileno, y la parafina fundida puede ser hecha pasar desde un depósito de cera 102 calentado a través de una conducción 100 calentada, para el flujo de cera, hasta la abertura
- 60 110 para reactivos. El tubo 100 calentado para el flujo de cera puede estar hecho de latón o de otros materiales conductores del calor, mientras que los tubos 80, 90 de entrega de alcohol y de xileno pueden estar hechos de un material adecuado que no sea degradado por los reactivos, tal como nilón.
- 65 Si bien se muestran y se describen tres conducciones de flujo de reactivos diferentes, se entiende que la vía 18 de flujo de reactivos puede comprender cualquier número o combinación de tubos para la entrega de reactivos.

Además, en el presente invento también pueden utilizarse diversos otros reactivos. Por ejemplo, también pueden incluirse tubos para la entrega de formalina o de soluciones ácidas descalcificadoras. Asimismo, con el aparato 10 del presente invento, pueden aplicarse tubos para la entrega de reactivos inmunohistoquímicos, permitiéndose con ello la detección de proteínas. Estos tubos pueden conectarse a la abertura 110 para reactivos del mismo modo que para el alcohol y el xileno. Además, también es posible disponer una pluralidad de tubos para la entrega de reactivos con el fin de entregar el mismo reactivo, si así se desea.

La abertura 26 para muestras, el tubo 20 de entrada de células y su extremo de salida 24 retirable y el recipiente 12 para muestras de células pueden ser, todos ellos, desechables y utilizarse para tratar únicamente una muestra. Puede disponerse un tabique en la abertura 26 para las muestras desechables con el fin de separar el extremo de salida 24 del tubo 20 de entrada de la abertura 110 para reactivos. Este tabique evitaría que la muestra de células contaminase la abertura 110 para reactivos, permitiendo el uso de la abertura 110 para reactivos en el tratamiento subsiguiente de muchas muestras de células.

Como se muestra en la fig. 1, la abertura 26 para muestras puede unirse a una casete 30 para tejido retirable. La casete 30 para tejido, ilustrada con mayor detalle en las figs. 3A-3C, incluye una abertura cilíndrica 36 que se extiende desde una superficie superior 32 a través de una superficie inferior 34 de la casete 30. La abertura cilíndrica 36 crea una vía de flujo directo para las células y los reactivos que han de entregarse. La abertura cilíndrica 36 se une a la abertura 26 para las muestras desde la superficie superior 32 de la casete 30 para permitir, por tanto, la comunicación de fluido entre la vía 18 de flujo de reactivos y la casete 30 para tejido. Dentro de la abertura cilíndrica 36 hay delgados estantes 44 para anclar el tapón de cera que se formará, finalmente, en la casete 30 (dentro de la abertura cilíndrica 36, cerca de la superficie inferior 34), aunque se entiende que también otras estructuras tales como mallas, protuberancias, nervios, gargantas o rugosidades superficiales, pueden incluirse dentro de la abertura cilíndrica 36 para conseguir una adherencia incrementada de la cera. La casete 30 para tejido está diseñada para proporcionar una rigidez estructural suficiente para eliminar la necesidad de que la cera llene por completo la casete 30, conservándose por tanto la parafina. Se comprende que la casete 30 para tejido debe construirse de un material que sea resistente a la degradación por el alcohol, el xileno o los ácidos. Materiales ilustrativos para formar la casete 30 para tejido incluyen polipropileno, polipropileno con talco, y nilón. En una realización, la casete 30 para tejido tiene una longitud comprendida en el intervalo de unos 40-50 mm y una anchura en el intervalo de unos 20-30 mm. La profundidad total de la casete 30, incluyendo la abertura 36, está comprendida en el intervalo de unos 5-15 mm. Como se muestra en la fig. 4, la abertura cilíndrica 36 de la casete 30 tiene aproximadamente 12,7 mm (0,5 pulgadas) de diámetro, medido desde la superficie inferior 32. Estas dimensiones permiten que la abertura cilíndrica ajuste en un molde de empotramiento estándar y permiten que la casete se coloque en el portador de un microtomo estándar para seccionarla.

Haciendo referencia de nuevo a la fig. 1, la abertura cilíndrica 36 que se extiende hacia fuera desde la superficie inferior 34 de la casete 30 para tejido, está conectada de forma retirable a una junta plana, anular, 42. La junta 42 puede tener aproximadamente 1,5 mm (1/16 de pulgada) de grosor y coincide, aproximadamente, con el diámetro y el grosor de la pared de la abertura cilíndrica 36 de la casete 30 para tejido. La junta 42 puede estar hecha de un material deformable, tal como caucho Vitor^{MR}, lo que permite que la junta 42 forme un cierre estanco con la casete 30 para tejido y soporte la degradación química cuando es expuesta al xileno y otros reactivos de empotramiento. La junta 42 debe ser, también, lo bastante deformable para permitir retirarla por tracción de la cera endurecida al término del proceso, sin que por ello se cambie la forma de la cera endurecida que sobresale de la casete para tejido.

La junta 42 está conectada de forma retirable a un filtro 40 de diámetro mayor que el diámetro interior de la junta 42. El filtro 40 tiene un tamaño de poros en el intervalo de, aproximadamente, 6-12 micras de diámetro para permitir que los desechos sub-celulares pasen a través del filtro 40 mientras que las células individuales de pequeño tamaño quedan atrapadas. El tamaño de los poros del filtro puede adaptarse a diferentes tipos de muestras. Por ejemplo, una muestra que se sabe que contiene gran número de glóbulos rojos y de grupos de células, podría ser tratada con un filtro con un tamaño de poros de 12 micras a fin de permitir que los glóbulos rojos individuales pasaran a través del filtro al tiempo que quedaban atrapados los fragmentos de tejido. El filtro 40 puede comprender un filtro de policarbonato (tal como, por ejemplo, Isopore^{MR}, fabricado por Millipore Corporation, de Billerica, MA, EE.UU.) que es liso e impide que las células y la cera se peguen a los filtros cuando se tira de ellos para retirarlos. Además, la junta 42, la casete 30 para tejido y el filtro 40 pueden unirse ligeramente juntos de forma que estos tres componentes puedan cargarse rápidamente en el aparato 10.

En una realización, el grosor total de la casete 30 para tejido con la junta 42 unida está comprendido en el intervalo de, aproximadamente, 5-20 mm y, preferiblemente, es de unos 10 mm. Esta configuración de perfil bajo sitúa el filtro 40 en una posición en la que estaría situada la superficie más baja de un molde de tejido estándar si la casete 40 para tejido y la junta 42 estuviesen situadas dentro de un molde de tejido estándar. La configuración de la casete 30 para tejido y del filtro 40 permite que las células depositadas sean posicionadas automáticamente en, aproximadamente, el plano en el que la hoja del microtomo cortará el bloque con células, sin necesidad de molde para tejido, ya que las células están empotradas en el bloque de cera lo más cerca posible del plano enfrentado a la hoja de corte del microtomo y lo más alejado posible del sitio de unión al microtomo. Como la junta 42 y la casete 30 para tejido pueden producirse con unas dimensiones precisas, es posible disponer de un microtomo previamente ajustado para iniciar el seccionamiento exactamente en el plano en que están situadas las células. Esto puede reducir el tiempo y

el esfuerzo de los histologistas durante el seccionamiento con el microtomo.

Como se muestra en la fig. 1, el filtro 40 descansa sobre un soporte 60 de filtro. Una superficie superior del soporte 60 de filtro orientada hacia el filtro 40 puede ser porosa en su parte central, de manera que puedan pasar fluidos a través del filtro 40 y el soporte 60 del filtro. El soporte 60 del filtro puede incluir un anillo plano, no poroso, que rodee a la parte porosa central. El filtro 40 puede colocarse sobre el soporte 60 de filtro para cubrir por completo la parte porosa del soporte 60 de filtro y extenderse algo por encima de la parte no porosa del soporte 60 de filtro. La junta 42 puede asentarse encima del borde exterior del filtro 40, sobre el anillo no poroso del soporte 60 de filtro. Con esta configuración, puede formarse un cierre estanco entre la abertura cilíndrica 36 de la casete 30 para tejido y el soporte 60 de filtro, con el propio filtro 40 emparedado entre ellos. El soporte 60 de filtro puede tener una prolongación cilíndrica que se extienda sobre la junta 42 y el extremo inferior de la abertura cilíndrica 36 de la casete 30 para tejido. Con esta configuración, puede garantizarse un correcto asiento de la casete 30 para tejido con respecto al soporte 60 de filtro, la junta 42 y el filtro 40.

El soporte 60 de filtro incluye un elemento de calentamiento y de enfriamiento integrado. El soporte 60 de filtro también puede estar configurado de tal modo que pueda conducirse calor de manera eficiente hacia o desde el soporte 60, con el fin de mantener la parafina en estado fundido y acelerar el proceso de endurecimiento de la parafina. Por ejemplo, puede utilizarse un calentador asociado con el soporte 60 de filtro para incrementar el calor alrededor del soporte 60 durante el proceso de empotramiento, y para reducir el calor aplicado al soporte 60 cuando el empotramiento se haya completado y la cera se esté endureciendo. Otras alternativas para calentamiento y enfriamiento potenciales incluyen mantener todo el aparato 10 en una caja calentada o iluminar el filtro 40 con luz infrarroja.

El soporte 60 de filtro está conectado de manera retirable con un contenedor 50 para residuos, para capturar el fluido residual durante el proceso de empotramiento, que incluye un medio fluido que contiene la muestra de células y los reactivos de empotramiento en exceso. Los diferentes efluentes pueden separarse unos de otros moviendo mecánicamente los diferentes contenedores 50 para residuos desde debajo del soporte 60 de filtro. Alternativamente, el contenedor 50 para residuos puede comprender una pluralidad de receptáculos independientes, cada uno con su propia abrazadera con solenoide. Tal configuración permite que el flujo de un efluente particular sea desviado selectivamente a su receptáculo respectivo por medio de las abrazaderas con solenoide. Se contempla que tal procedimiento para separar los reactivos de empotramiento del efluente facilitaría el reciclado de los reactivos de empotramiento. El aparato también reduce los costes que supone deshacerse de los desechos ya que se utilizan menos reactivos (por ejemplo, aproximadamente 5 ml por bloque con células) en comparación con otros métodos, corrientemente disponibles, para la producción de bloques con células.

El proceso de preparación de un bloque con células puede llevarse a cabo manualmente merced a este invento, obteniéndose muchas de las ventajas anteriormente detalladas, que incluyen: una mayor velocidad de tratamiento debido a la mayor eficacia de extracción en un sistema de flujo directo, un menor uso de reactivos de empotramiento, un menor riesgo de errores de identificación, la eliminación de la contaminación cruzada, la eliminación del paso por el molde para tejido, y la normalización de las condiciones de empotramiento o de conservación de las células. Dado que el aparato 10 para conseguir el empotramiento de las células en un bloque utiliza un diseño de flujo directo en lugar de, simplemente, sumergir los fragmentos de células en soluciones de empotramiento, la eficacia de las extracciones se mejora de manera espectacular, dando como resultado un menor uso de reactivos, y un tratamiento extremadamente rápido. En las muestras preparadas utilizando el aparato, no se necesitaban más de 5 ml de alcohol, 5 ml de xileno y 5 ml de cera para cada bloque con células producido. El proceso de empotramiento, de realizarse manualmente, puede llevarse a cabo en unos 10 minutos. Para un proceso manual, la muestra de células y los reactivos de empotramiento podrían entregarse directamente mediante pipeta a la casete 30 para tejido o a la abertura 26 para las muestras, bajo supervisión visual. Es importante cargar sólo las células suficientes de forma que los reactivos de empotramiento pueden pasar a través de las células en el filtro 40. Esto puede hacerse manualmente añadiendo las células por goteo mientras se vigila la rapidez con que el menisco o el nivel de fluido disminuye al aplicarse una presión de valor negativo al lado de los residuos del filtro 40. Durante el funcionamiento del aparato, cuando el régimen de descenso del menisco, o nivel de fluido, disminuye perceptiblemente, existe una capa de células suficientemente gruesa para, al menos, veinte secciones de tejido de 5 micras de grosor. Se ha observado que el régimen de caída del nivel de fluido es más rápido en cada uno de los pasos de la extracción, presumiblemente porque las células se hacen progresivamente más porosas a medida que se eliminan el agua y las grasas. Es esencial impedir que el menisco de fluido pase al filtro 40 durante la ejecución manual de las operaciones de empotramiento; si pasa esto, las células se deforman.

El aparato 10 puede configurarse igualmente para funcionar automáticamente. Con el fin de automatizar parcial o totalmente la producción de bloques con células, pueden utilizarse varias estrategias. Por ejemplo, se contempla que el flujo de muestra de células y reactivos pueda controlarse con una combinación de presión positiva aplicada aguas arriba de la casete 30 para tejido a fin de empujar la muestra de células y/o los reactivos de empotramiento a través del filtro 40, o de presión negativa aplicada en el lado de los residuos de la casete 70 para tejido, con el fin de tirar de la muestra y/o de los reactivos de empotramiento a través del filtro. La fig. 1 ilustra un aparato 10 automático para realizar el empotramiento de células en bloques, en el que se aplica una presión negativa al contenedor 50 de residuos por medio de un tubo 70 de presión negativa que puede estar conectado a una fuente de vacío. La presión negativa actúa para aspirar las células desde la muestra 14 de células a través del tubo de entrada 20 y sobre el

5 filtro 40. La presión negativa también aspira los reactivos a través del filtro 40 y sobre las células para formar el bloque de cera con las células. Como se muestra, un manómetro 72 puede estar incluido con el tubo de salida para medir la presión negativa del sistema durante el funcionamiento del aparato 10. Todo el sistema, desde el recipiente 12 para muestras de células y los depósitos 82, 92 y 102 de reactivos de empotramiento, hasta el receptáculo 50 para desperdicios, puede ser estanco. En un sistema estanco de esta clase, la aplicación de una presión negativa en el extremo del receptáculo 70 para residuos permite que las abrazaderas 86, 96 y 106 de tubo con solenoide controlen si se entrega una muestra 14 de células o si los reactivos de empotramiento 82, 92 y 102 son entregados a la abertura 26 para las muestras y, después, al filtro 40.

10 En un método de hacer funcionar el aparato 10 de empotramiento de células en bloques, una muestra de fragmentos de células en solución acuosa es aspirada desde un recipiente 12 a través del filtro 40 mediante la aplicación de un vacío, o de una presión negativa, desde el recipiente 50 para residuos al tubo de entrada 20 hasta que los poros del filtro estén a punto de ser obstruidos por los fragmentos de células. Entonces, se hace pasar alcohol a través del filtro 40, seguido por xileno y parafina fundida. Después de que se enfría la parafina, el filtro 40 es desprendido de las células empotradas. Cuando se endurece la cera, se tira de la junta 42 entre el filtro 40 y la casete 30 para tejido para separarla de la casete 30 para tejido, dejando un anillo de cera de aproximadamente 1 mm de grosor que sobresale de la casete 30 para tejido. La casete 30 para tejido está diseñada para acomodar el filtro 40 de tal manera que las células depositadas sean recogidas en o muy cerca del plano por el que la hoja del microtomo cortará el bloque con células para seccionarlo. La abertura 26 para muestras desechables elimina el riesgo de contaminación cruzada entre los bloques con células, ya que los componentes que entran en contacto con la muestra de células, son desechables.

15 La fig. 2 ilustra el aparato 10 automatizado para empotramiento de células en bloques, de la fig. 1, con una presión positiva adicional aplicada. En esta realización, un tubo 74 con presión positiva puede unirse al recipiente 12 que, como se muestra, tiene una tapa hermética 76. El tubo 74 con presión positiva puede estar conectado a una fuente de presión positiva para entregar una presión al recipiente 12, lo cual facilitará entonces el movimiento de las células desde la suspensión de células en el recipiente 12 a través del tubo de entrada 20 y, de allí, a través de la abertura 24 para las muestras y la casete 30, al filtro 40. Puede utilizarse una combinación de presión positiva y presión negativa para entregar la muestra de células y los reactivos de empotramiento al filtro 40. Como se muestra, el tubo de entrada 20 incluye una abrazadera 28 de tubo con solenoide para garantizar una vía hermética. En un sistema de presión positiva el solenoide 28 sirve para mantener a los fluidos evitando que corran a la muestra, o para que en un sistema de presión negativa, una presión negativa tire de la muestra en lugar de los reactivos de empotramiento.

20 Para automatizar el sistema, la entrada de la muestra y de los reactivos de empotramiento a la abertura cilíndrica 36 tiene que coincidir con la salida al receptáculo 50 para residuos, de tal modo que el menisco de los líquidos que pasen a través de la abertura cilíndrica 36 no sea llevado hacia el filtro 40 y que los reactivos no puedan rebosar de la casete 30 para tejido. En un sistema estanco adecuado, puede ser suficiente con aplicar en secuencia una presión positiva al recipiente 12 para muestras de células y las bombas 84, 104 y 104 para los reactivos de empotramiento a fin de forzar a que la muestra de células y los reactivos de empotramiento sean hechos pasar en secuencia por la abertura cilíndrica 36 y, después, por el filtro 40, para poner en práctica un proceso de empotramiento útil.

25 Alternativamente, la cantidad de muestra 14 de células y de reactivos de empotramiento entregados a la vía 36 de paso directo de las células puede vigilarse electrónicamente merced a una diversidad de técnicas y, entonces, los caudales de la muestra y de los reactivos de empotramiento pueden modularse en forma apropiada. El menisco o nivel de fluido puede vigilarse según tecnologías existentes o bien las tecnologías pueden adaptarse específicamente a este invento en particular. Por ejemplo, un mecanismo para vigilar el nivel del menisco es reflejar luz en ángulo con el menisco desde un láser o un diodo fotoemisor. Unos perceptores de luz pueden vigilar la línea de reflectancia, que cambia a medida que desciende el menisco. Los perceptores pueden estar posicionados por encima de la casete para tejido, por ejemplo junto a la abertura 26 para las muestras, o bien los perceptores pueden integrarse en la abertura 26 para las muestras.

30 Otro mecanismo para vigilar el nivel del fluido consiste en utilizar un cable de fibra óptica sumergible, desechable, tal como el proporcionado por ALA Scientific Instruments Inc., de Westbury, NY, EE.UU. como parte de sus sistema de "bloqueo de nivel". En este sistema, sale luz del cable cuando éste está en contacto con un líquido, y la caída de la intensidad luminosa es proporcional al grado de inmersión. Un cable de fibra óptica desechable podría incorporarse en la vía 16 de flujo de células de la casete 30 para tejido o en la abertura 24 para las muestras.

35 Aún otro mecanismo para vigilar el nivel del fluido consistiría en utilizar monitores de nivel de fluido del tipo de capacitancia que detectan fluidos (incluyendo líquidos no conductores) en virtud de su diferente constante dieléctrica en comparación con la del aire. Una fuente eléctrica y un perceptor podrían posicionarse justo por encima de la junta 42.

40 Todavía otro mecanismo para vigilar el nivel del fluido consistiría en situar un rayo de luz en posición horizontalmente a través de la parte inferior de la vía de flujo de las células, inmediatamente por encima de la junta 42 en una casete 30 para tejido traslúcida. Un perceptor de luz situado en el lado opuesto de la vía de flujo de las células podría detectar un cambio de intensidad de la luz cuando el menisco pasase por el rayo de luz.

Y aún otro mecanismo de vigilancia de caudales sería pesar el efluente que pasa a través del filtro. La entrega de la muestra y de los reactivos de empotramiento podría acoplarse con el peso del efluente de tal modo que la cantidad de muestra o de reactivos de empotramiento en la vía de flujo de las células de la casete para tejido se mantuviese entre dos niveles.

La carga automatizada de la cantidad apropiada de muestra 14 de células en el filtro 40 podría conseguirse mediante diversos mecanismos. En una configuración estanca adecuada con las abrazaderas 86, 96, 106 de tubo con soleoide cerradas, la aplicación de una modesta presión negativa en el extremo para residuos del invento podría entregar la muestra 14 de células al filtro 40. Un manómetro 72 podría activar la interrupción de la presión negativa cuando la presión negativa se acumulase hasta un cierto punto indicativo del bloqueo de algunos de los poros del filtro 40. El mecanismo sería similar a los descritos en las patentes norteamericanas núms. 6.225.125 y 6.010.909.

Alternativamente, la aplicación al recipiente 12 para muestras de células de un corto impulso de presión positiva, como se muestra en la fig. 2, podría forzar el paso de una cantidad alícuota de la muestra a la abertura cilíndrica 36 de la casete 30 para tejido. La cantidad de células entregada podría estimarse entonces merced al caudal a través del filtro 40. Para facilitar este proceso, en el que al filtro 40 solamente se entregan pequeñas cantidades alícuotas de la muestra de células, sería factible bombear un mayor volumen de alcohol o de solución salina con cada pequeña cantidad alícuota entregada de la muestra de células. El cambio de alcohol a xileno y a cera puede establecerse para un cierto volumen de reactivos a bombear. En estudios realizados utilizando el aparato 10 del presente invento, hemos determinado repetidamente que 5 ml de cada uno de estos reactivos son suficientes para conseguir un empotramiento apropiado. También sería factible vigilar el efluente buscando cambios del índice de refracción que indicasen que han llegado a completarse las extracciones. Es decir, pueden posicionarse refractómetros aguas abajo de la muestra de células en el contenedor 50 para residuos y podría utilizarse la diferencia existente en el índice de refracción entre el agua, el alcohol y el xileno para determinar si se ha eliminado la totalidad del reactivo (por ejemplo, agua, alcohol, xileno, etc.).

Se comprende que, si bien se han mostrado y descrito tres tubos de entrega para diferentes reactivos, la vía 18 de flujo de reactivos puede comprender cualquier número y cualquier combinación de tubos de entrega de reactivos. Por ejemplo, puede ser ventajoso incluir un depósito de solución salina con una conducción de flujo a la abertura 110 para reactivos con el fin de eliminar por lavado las proteínas de las muestras 14 de células contenidas en una solución salina fisiológica. También puede resultar útil incluir un depósito de ácido y una conducción de flujo a la abertura 110 para reactivos con el fin de poder llevar a cabo la descalcificación de una muestra. Mediante el uso del presente aparato, también puede conseguirse una pre-tinción de excelente calidad. Por ejemplo, los depósitos podrían incluir hematoxilina, eosina y agua destilada para permitir una pre-tinción de la muestra de células, ahorrando así tiempo debido a la eliminación de la necesidad de realizar la tinción de una eventual sección de parafina. También es conveniente incluir la eosina durante las extracciones con alcohol ya que la eosina hace visible la muestra de células al histologista que corta la sección de parafina, permitiéndole calibrar la calidad y la cantidad de las células en secciones cuando las está cortando con un microtomo.

Disponiendo el filtro en el plano de la sección del tejido, se elimina el proceso de empotramiento manual y se reduce el tiempo requerido para que un técnico encuentre el plano de las células en el bloque de empotramiento. Dado que no se utiliza ningún otro material de matriz de soporte, los fragmentos de las células no son "diluidos" con la matriz y, por tanto, cada sección de tejido puede mostrar una concentración superior de células. No obstante, en algunas situaciones, puede ser deseable disponer la muestra de células empotrada final en un molde para tejido con el fin de fundir de nuevo y volver a endurecer (paso 11 del procedimiento genérico de formación del bloque con células descrito en el aparatado de Antecedentes). Esto podría hacerse de forma automática. La función del paso de fundir nuevamente y volver a endurecer sería la de permitir que una delgada capa de cera cubriese el fondo de las células a fin de facilitar el paso de "enfrentamiento" del seccionamiento con el microtomo, lo cual supone un incremento del número de secciones utilizables que pueden cortarse a partir de un bloque con células.

Se comprende que el aparato está configurado de tal manera que los componentes puedan ser fácilmente separados unos de otros. Esto es deseable para que un técnico pueda reponer fácil y rápidamente, de manera eficaz, componentes utilizados o gastados. Además, la abertura 26 para las muestras, el tubo 20 de entrada de células y su extremo de salida 24 retirable y el recipiente 12 para muestras de células son, todos ellos, desechables. Esto permite utilizar solamente una vez cada uno de estos componentes para tratar una muestra única, impidiéndose así la contaminación mientras se tratan subsiguientes muestras de células.

Podría incluirse un lector de códigos de barras (no mostrado) para comparar la etiqueta de la muestra de células con una etiqueta de la casete para tejido, eliminándose por tanto los errores de identificación.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (10) para formar por empotramiento bloques con células por flujo directo, que comprende:

5 una vía (16) de flujo de células definida por un tubo de entrada (20) para entregar fragmentos de células desde una muestra (14) de células a una abertura (26) para muestras, encontrándose la abertura (16) para muestras en comunicación de fluido con una casete (30) para tejido que tiene, unido a ella, un filtro (40), estando configurada la vía (16) para el flujo de células de manera que, al aplicarse una presión, los fragmentos de células sean arrastrados desde la muestra (14) de células a través del tubo de entrada (20), a la abertura (26) para las muestras y sean depositados sobre el filtro (40); y

15 una vía (18) de flujo de reactivos definida por una pluralidad de tubos de entrega de reactivos para entregar los reactivos a una abertura (110) para reactivos en comunicación con la abertura (26) para muestras, en un flujo de reactivos en comunicación con la abertura (26) para muestras, estando configurada la vía (18) de flujo de reactivos de modo que, al aplicarse una presión, los reactivos sean arrastrados a través de los tubos de entrega de reactivos a la abertura (110) para reactivos y a los fragmentos de células depositados en el filtro (40),

cuyo aparato se caracteriza por:

20 una fuente (102) de parafina caliente, incluyendo la vía de flujo de reactivos un tubo calentado para la entrega de reactivos, para entregar la parafina caliente a la abertura (26) para las muestras;

y caracterizado además por

25 un soporte poroso (60) térmicamente conductor en el que descansa el filtro (40) y un calentador para aplicar calor al soporte (60) durante el proceso de empotramiento.

30 2. El aparato de la reivindicación 1, en el que el filtro (40) está emparedado entre la casete (30) y el soporte (60) para el filtro y el filtro (40) puede ser retirado de la casete (30) para dejar un disco de cera que sobresalga de la casete (30) con células empotradas en un plano por el que puede cortarse una sección de tejido, por lo que los fragmentos de células se depositan automáticamente cerca de un plano capaz de ser seccionado por un microtomo.

35 3. El aparato de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la presión aplicada a la vía (18) de flujo de reactivos es una presión negativa; o en el que la presión aplicada a la vía (18) de flujo de reactivos es una presión positiva.

40 4. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que la presión aplicada a la vía (16) de flujo para las células es una presión negativa o en el que la presión aplicada a la vía (16) de flujo para las células es una presión positiva.

5. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que la vía (18) de flujo de reactivos incluye un tubo de entrega de reactivos para entregar un reactivo seleccionado del grupo consistente en alcohol, xileno, parafina caliente, agua destilada, solución salina, ácido, hematoxilina, eosina y reactivos inmunohistoquímicos.

45 6. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que cada tubo de entrega de reactivos incluye una bomba (84, 94, 104) para regular el flujo de reactivo a través del tubo.

50 7. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que cada tubo de entrega de reactivos incluye, además, una abrazadera (86, 96, 106) de tubo con solenoide para formar una vía hermética.

8. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que el filtro comprende policarbonato.

55 9. El aparato de cualquier reivindicación precedente, en el que la casete (30) para tejido incluye además una abertura cilíndrica (36) configurada para unirla a la abertura (28) para muestras y que se extiende a través de la casete (30) configurada para unión al filtro (40).

10. El aparato de cualquier reivindicación precedente, que incluye además un contenedor (50) para residuos, para recoger al menos uno de la pluralidad de reactivos.

60 11. Aparato como se reivindica en la reivindicación 10, en el que el contenedor (50) para residuos incluye una abertura para conectar con una fuente de presión.

12. Aparato como se reivindica en la reivindicación 11, en el que la abertura (50) incluye además un manómetro (72).

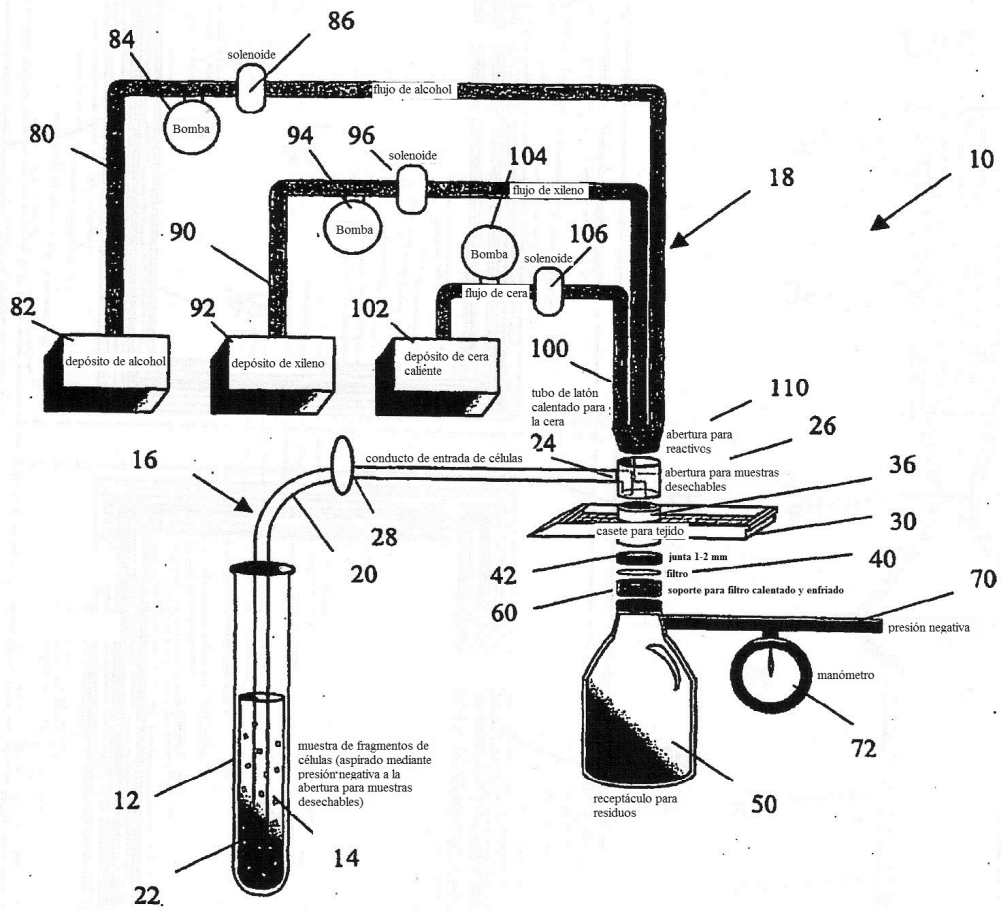


FIG. 1

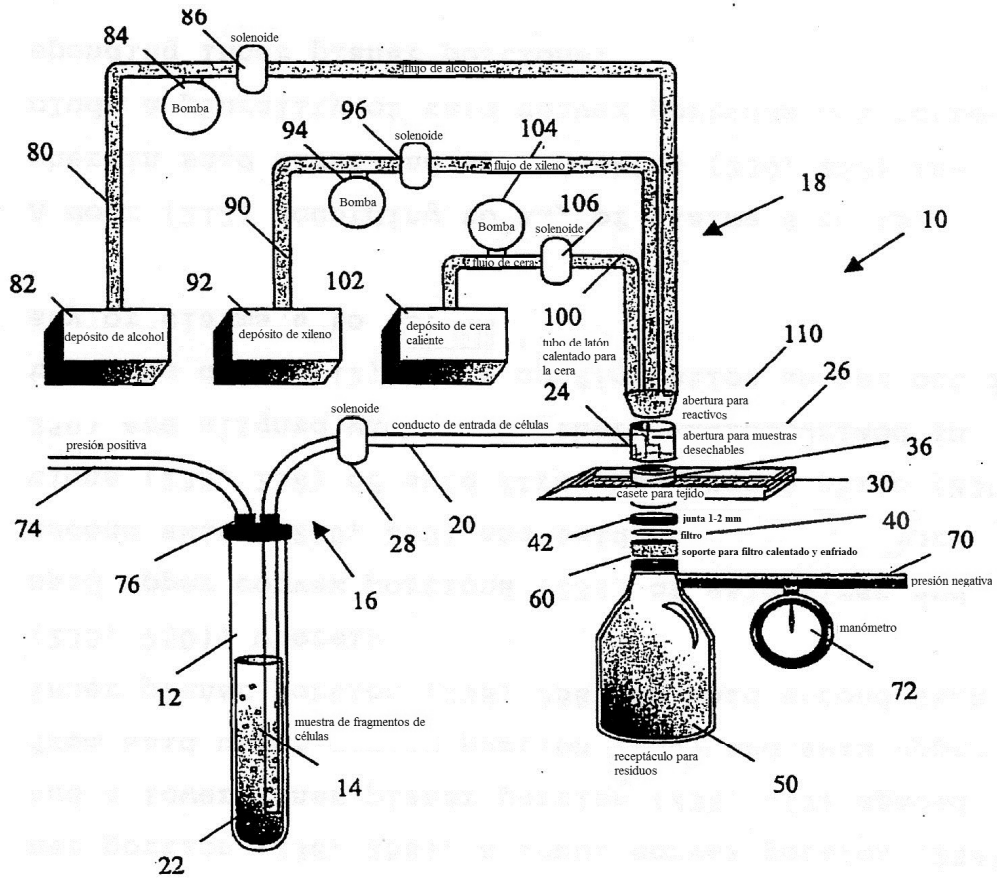


FIG. 2

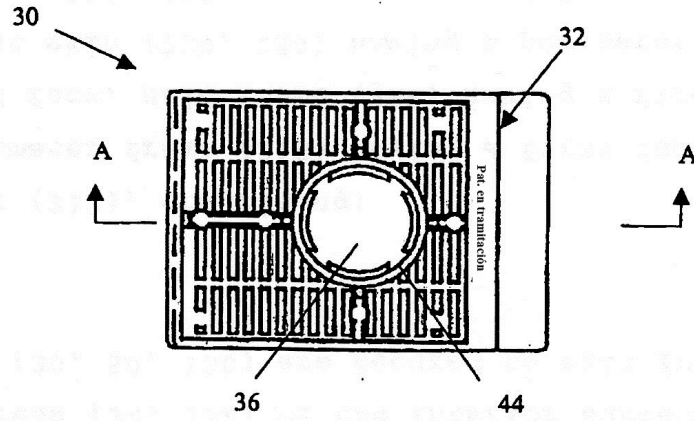


FIG. 3A

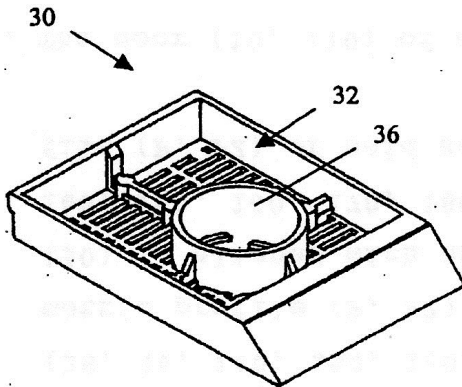


FIG. 3B

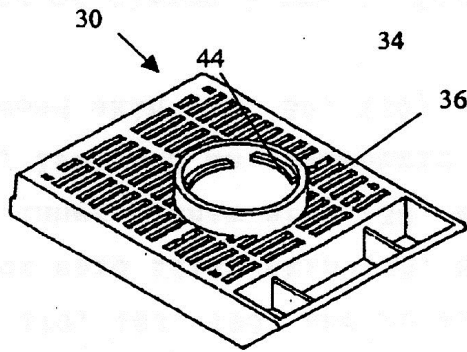


FIG. 3C

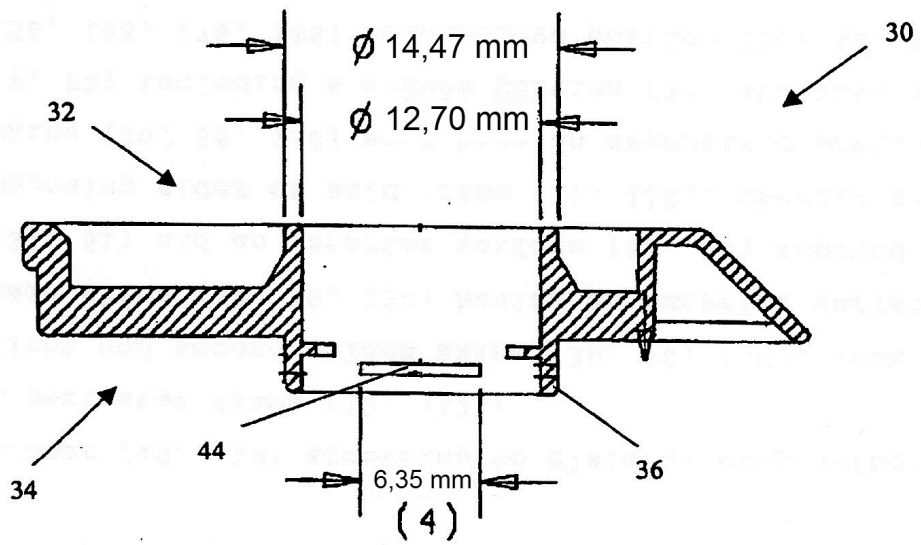


FIG. 4