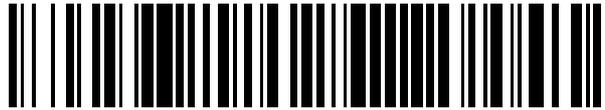


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 277**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2010 E 10705985 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2291540**

54 Título: **Dispositivo microfluídico funcionalizado para inmunofluorescencia**

30 Prioridad:

26.01.2009 WO PCT/EP2009/000465

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.03.2014

73 Titular/es:

**TETHIS S.R.L. (100.0%)
Via Giovannino De Grassi 11
20123 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**CARBONE, ROBERTA;
BARBORINI, EMANUELE y
BANDIERA, DARIO**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 446 277 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

Dispositivo microfluídico funcionalizado para inmunofluorescencia

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo de ensayos analíticos basados en fluorescencia y, en particular, a un dispositivo que puede usarse en ensayos de FISH. Así mismo, se abarca un método para realizar de manera eficiente dicho ensayo mediante el uso del dispositivo de la invención.

10

Técnica anterior

[0002] La microfluídica es una ciencia multidisciplinar reciente que trata de volúmenes de líquidos muy pequeños, desde microlitros hasta femtolitros. Su primera aplicación se refería a cabezales de impresión de chorro, pero ha demostrado ser adecuada para el desarrollo de tecnología de "laboratorio en-un-chip", especialmente en el campo de la biotecnología, en la que las muestras se caracterizan por tamaños muy pequeños. La biología molecular, el análisis enzimático, el análisis genómico, la proteómica, la patología clínica, el diagnóstico, el análisis ambiental, etc. son todos ellos campos de posible aprovechamiento de la microfluídica. A tales dimensiones de microescala, los fluidos pueden mostrar un comportamiento muy diferente, en comparación con la macroescala, una característica que debe tenerse en cuenta cuando se diseñan dispositivos microfluídicos o experimentos que hacen uso de los mismos. Por ejemplo, la tensión superficial, la disipación de energía, la difusión y la resistencia fluidica, pueden influir enormemente en el resultado de los experimentos.

15

20

[0003] Por estos motivos, los protocolos ordinarios o habituales de estos ensayos no pueden usarse directamente en dispositivos microfluídicos, sino que, en cambio, deben diseñarse procedimientos especiales antes de su implementación.

25

[0004] Las ventajas relacionadas con el uso de la microfluídica se originan en el manejo más sencillo permitido por tales dispositivos, el mayor control del flujo permitido, el tiempo de análisis reducido, el alto control concedido tanto sobre la concentración como sobre las interacciones moleculares, el incomparable ahorro en costes para reactivos y productos de desecho, haciendo de este modo su uso más respetuoso con el medioambiente y proporcionando la capacidad de procesar más muestras con menos espacio debido a una reducida obstaculización de los instrumentos.

30

[0005] Las ventajas anteriores permiten que se automaticen experimentos que incluyen el uso de dispositivos microfluídicos, lo que sería muy interesante desde el punto de vista industrial.

35

[0006] La biotecnología de microchip, en particular, se está beneficiando al máximo de la microfluídica, gracias al nuevo flujo de trabajo integrado desarrollado.

40

[0007] Los dispositivos de laboratorio en-un-chip son chips de pocos milímetros cuadrados a pocos centímetros cuadrados sobre los que se reproducen los bioensayos a una escala mucho menor, en forma de circuitos microfluídicos.

45

[0008] Los dispositivos de laboratorio en-un-chip, o circuitos microfluídicos para su uso en dichos dispositivos, se describen ampliamente en la bibliografía.

[0009] La patente de los Estados Unidos con Nº 6.613.560 divulga dispositivos miniaturizados para llevar a cabo procesos químicos y bioquímicos, en particular un microrreactor para llevar a cabo amplificación de ADN; este documento afronta el problema de una adsorción indeseada de la muestra bajo análisis por las paredes del microrreactor, y propone el uso de microrreactores hechos (o con superficies cubiertas) con materiales que muestran una adsorción reducida de los compuestos presentes en la muestra.

50

[0010] La solicitud de patente internacional WO 95/22051 divulga un dispositivo de célula de flujo que tiene, en sus canales, unos reactivos inmovilizados que producen una respuesta eléctrica u ópticamente detectable frente a un analito que puede estar contenido en una muestra de ensayo. La solicitud de patente europea EP 1542010 divulga un dispositivo microfluídico que comprende una zona de reacción, diseñada para alojar una reacción entre al menos una especie presente en la muestra y al menos una sustancia específica, fijada en la zona, que puede provocar una interacción de manera específica o no específica con una o más sustancias predeterminadas (especies diana). La fijación segura de la sustancia específica a las paredes del circuito microfluídico se obtiene por medio de una película intermedia, inmovilizada (formada generalmente por un compuesto orgánico) formada previamente sobre dichas paredes.

55

60

[0011] Los dispositivos de laboratorio en-un-chip se encuentran ya disponibles para su uso en una variedad de técnicas analíticas, tales como electroforesis, cromatografía, tinción, citometría de fluorescencia, análisis de proteínas, reacción en cadena de la polimerasa, análisis de sangre, etc. y, como aplicación adicional, Hibridación *In*

65

Situ con Fluorescencia (Fluorescence In Situ Hybridisation) (FISH). Como referencia general con respecto a FISH, véase, por ejemplo, “*Cytogenetic and FISH techniques in Myeloid Malignancies*”, L. J. Campbell, *Methods in Molecular Medicine*, 2006, Vol. 125, páginas 13-26.

5 **[0012]** Más en detalle, FISH es una herramienta muy sensible usada en diagnóstico para la detección de alteraciones del genoma.

10 **[0013]** FISH representa una herramienta de diagnóstico muy prometedora para la identificación transposiciones o anomalías cromosómicas, que no pueden detectarse con otras técnicas convencionales. Por ejemplo, el análisis de alteraciones en los cromosomas puede ser predictivo de una enfermedad futura o de una respuesta a terapia.

15 **[0014]** Como primera etapa, FISH requiere la inmovilización celular sobre un soporte, tal como, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio para microscopio; después de eso, las células experimentan una digestión de proteína con el fin de eliminar proteínas citoplasmáticas y cromosómicas, permitiendo de ese modo un “acceso” mejorado al ADN cromosómico, que necesita desnaturalizarse, por ejemplo mediante incubación con soluciones a base de formaldehído. Después de la deshidratación celular con series de soluciones a base de etanol, se añaden sondas de ADN. La desnaturalización se realiza entonces a aproximadamente 75 °C durante 2-5 min y se permite la incubación. Un tratamiento con una solución post-hibridación adecuada permite evitar uniones perturbadoras no específicas debidas a hibridación cruzada. Sitios de anomalía en la secuencia cromosómica se hacen de este modo
20 evidentes mediante obtención de imágenes de fluorescencia.

[0015] Antes de FISH, el análisis de ADN hacía uso de métodos escasamente rentables, mientras que, hoy en día, FISH permite a los investigadores investigar rápidamente y entender la base de muchas enfermedades y cánceres.

25 **[0016]** Por ejemplo, FISH encuentra ya aplicación en pruebas de médula ósea para detectar tumores hematológicos, tales como leucemia, linfoma y mieloma, en pruebas de tumor sólido, ganglios linfáticos y sangre periférica, en diagnóstico genético preimplantacional, en cribados de anomalías genéticas prenatales y en postnatales.

30 **[0017]** Como ventaja general, FISH puede aplicarse directamente a muestras tumorales, tales como biopsias, secciones o material incrustado en parafina, proporcionando resolución hasta el nivel de células individuales, permitiendo la detección de acontecimientos raros en una muestra celular adecuada. A pesar de las posibles ventajas ofrecidas por esta técnica, su adopción práctica ha estado obstaculizada hasta el momento por varios
35 inconvenientes.

[0018] En primer lugar, FISH es extremadamente cara, tanto en lo que se refiere a los costes de reactivos como al tiempo hombre y tiempo máquina necesarios para realizar el protocolo y el análisis de imagen. Este límite impide que FISH sea un método de cribado masivo.

40 **[0019]** Un enfoque adecuado para superar este límite sería el desarrollo de un protocolo miniaturizado aprovechando las características de los dispositivos microfluídicos.

45 **[0020]** Sin embargo, un límite adicional de protocolos y dispositivos de FISH que puede predecirse es la baja eficiencia de la adhesión celular en dispositivos microfluídicos; esto se debe al hecho de que, debido a las secciones transversales muy limitadas de los canales microfluídicos, deben aplicarse presiones relativamente altas a las muestras de líquido, con el fin de hacer que éstas se muevan en el dispositivo, lo que, a su vez, lleva a velocidades de flujo relativamente altas. Por ejemplo, el artículo “*FISH and chips: chromosomal analysis on microfluidic platforms*”, V. J. Sieben y col., IET Nanobiotechnologies, 2007, 1 (3) páginas 27-35, describe un protocolo de adhesión convencional mediante citocentrifugación que, sin embargo, sólo obtiene un rendimiento de retención de los analitos diana en el canal del dispositivo microfluídico del 20 %. Esta característica podría aumentar la tasa de
50 “falsos negativos” cuando se buscan alteraciones raras.

[0021] Un dispositivo microfluídico que puede inmovilizar eficazmente células, adecuado para realizar ensayos de FISH, ayudaría a extender el uso de la técnica.

55 **[0022]** Varios documentos de la técnica anterior tienen la tarea de mejorar la retención de analitos en los canales de dispositivos microfluídicos.

60 **[0023]** El documento “*Enforced Adhesion of Hematopoietic Cells to Culture Dish Induces Endomitosis and Polyploidy*”, X. Huang y col., *Cell Cycle*, 4(6), páginas 801-805, divulga el uso de sustratos funcionalizados con poli-D-lisina para potenciar la adhesión celular; sustratos con un recubrimiento de poli-D-lisina, comercialmente disponibles por ejemplo de BD Biosciences, se consideran en la actualidad el estado de la técnica para la adhesión celular y se usan comúnmente en este campo de investigación.

65 **[0024]** La solicitud de patente internacional WO 2008/031228, en nombre de la Universidad de Alberta, divulga un protocolo de fijación que permite investigar un porcentaje de células adheridas hasta el 75 % del total. La

inmovilización de células en los canales microfluídicos se obtiene aumentando la temperatura en el intervalo entre 50 y 95 °C durante un periodo de tiempo, determinado mediante intervención de un operador humano, suficiente para permitir la inmovilización de una porción de una población de células de interés. Como consecuencia, a pesar de la mejora en el porcentaje de células adheridas, el método de este documento experimenta aún los límites de que la etapa de inmovilización debe controlarse por un operador humano, y de que las temperaturas relativamente altas necesarias en esta etapa podrían dañar algunas células. Además de esto, la solicitud describe dos realizaciones de dispositivo microfluídico, denominadas "Microchip" y "Circulating Microchip" (microchip de circulación), respectivamente. La realización denominada "Microchip" se forma por un portaobjetos de vidrio para microscopio de 0,5 mm de grosor que porta los microfluidos y un cubreobjetos de 0,17 mm de espesor, declarado necesario para crear una distancia de trabajo mínima para obtención de imágenes de alta resolución. Ambos componentes del dispositivo son extremadamente frágiles y requieren una manipulación extremadamente cuidadosa durante el montaje, impidiendo una ampliación a escala fácil del dispositivo en escenarios industriales. La realización denominada "Circulating Microchip" se forma por dos portaobjetos de vidrio para microscopio de 1,1 mm de grosor y por una capa de PDMS central de 0,254 mm de grosor. Esta realización supera los problemas de fragilidad de "Microchip", pero su grosor no permite el uso de una lente de 100X para la adquisición de imágenes, impidiendo de ese modo obtener imágenes de alta resolución, tal como se requiere por las normas de FISH actuales.

[0025] La solicitud de patente europea EP 1215186 divulga un soporte que se dice que es útil para inmovilizar oligonucleótidos, que puede usarse en la fabricación de dispositivos microfluídicos; este soporte tiene la superficie funcionalizada con un óxido seleccionado entre HfO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 y sus mezclas, tratado después de su deposición con el fin de hacer que su superficie sea hidrófila. Sin embargo, este documento no hace mención a la inmovilización de células.

[0026] La solicitud de patente internacional WO 00/33084 divulga una amplia gama de dispositivos para su uso en diagnóstico, en los que la superficie activa está funcionalizada con compuestos orgánicos, posiblemente dispuestos sobre un óxido de "red gelificada". Este documento no proporciona información alguna sobre rendimientos de retención actuales de células.

[0027] Por consiguiente, es necesario un dispositivo y método de FISH que supere las desventajas de los métodos de la técnica anterior, tanto clásico como microfluídico.

[0028] En particular, sería deseable diseñar un dispositivo y un proceso, que fueran económicos, fáciles de manejar, aumentar a escala y de realizar, rápidos de llevarse a cabo y, así mismo, eficientes.

Sumario de la invención

[0029] La presente invención se refiere a un dispositivo microfluídico mejorado, que puede usarse de manera adecuada y ventajosa en técnicas analíticas basadas en fluorescencia. Así mismo se divulga un protocolo adaptado para usar dicho dispositivo, que da como resultado unos resultados sorprendentes e inesperados.

[0030] El primer objeto de la invención es un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1.

[0031] Un objeto adicional de la invención es el uso del dispositivo de la invención para realizar ensayos analíticos basados en fluorescencia.

[0032] Como un objeto aún adicional, la presente invención se refiere a un método para realizar ensayos analíticos basados en fluorescencia usando el dispositivo microfluídico de la invención.

Breve descripción de las figuras

[0033]

La figura 1 muestra las vistas en planta y la vista en sección de una parte microfluídica a modo de ejemplo; la figura 2 muestra un dispositivo montado de la invención en diferentes fases de montaje; la figura 3 muestra esquemáticamente los resultados de pruebas de adhesión de células cultivadas (U937) sobre un portaobjetos funcionalizado de acuerdo con la invención, y sobre portaobjetos no de la invención; la figura 4 muestra esquemáticamente los resultados de pruebas de adhesión de células cultivadas (U937) sobre un portaobjetos funcionalizado de acuerdo con la invención, y sobre portaobjetos no de la invención, después de un pase microfluídico completo (procedimiento de tensión de corte prolongada); las figuras 5A, 5B y 5C muestran esquemáticamente los resultados de pruebas de adhesión de células hematopoyéticas primarias sobre portaobjetos funcionalizados con diferentes óxidos de metal nanoestructurados de acuerdo con la invención, y sobre portaobjetos y óxidos de metal no de la invención; la figura 6 muestra el resultado de la prueba de adhesión sobre dos dispositivos de la invención; las figuras 7 y 8 muestran células cultivadas (U937) después de pruebas de FISH en microcanal usando dispositivos de la invención.

Descripción detallada de la invención

- 5 [0034] En un primer aspecto de la misma, la invención se refiere a un dispositivo microfluídico. El dispositivo de la presente invención encuentra aplicación en el campo de ensayos analíticos basados en fluorescencia y, en particular, puede usarse para realizar ensayos de FISH.
- [0035] Con respecto a los dispositivos conocidos, el dispositivo que se divulga en el presente documento tiene varias ventajas, que se apreciarán por el experto en la técnica.
- 10 [0036] El dispositivo microfluídico mejorado de la presente invención se forma acoplando al menos un portaobjetos y una parte en la que está presente una ranura, de modo que la unión de estos (al menos) dos elementos define un microcanal en el dispositivo. Aunque pueden preverse otras configuraciones, la estructura más común para estos dispositivos es aquella en la que la ranura no se extiende a lo largo de toda la longitud de la parte en la que está presente, y se accede al microcanal desde la superficie superior del dispositivo, a través de orificios de paso formados en la parte (y en otros elementos posibles que constituyen el dispositivo completo); el resto de la descripción se hará con referencia a esta estructura común.
- 15 [0037] Dentro de la presente invención puede usarse cualquier portaobjetos adecuado, por ejemplo hecho de materiales transparentes tales como vidrio, cuarzo o algunos plásticos. El vidrio, en particular, es el material preferido por su comportamiento químico inerte, su transparencia, su bajo coste, su escasa porosidad, su hidrofilia y su estabilidad de larga duración. Por conveniencia, puede hacerse uso de un portaobjetos para microscopio convencional, que es, preferiblemente en forma de una lámina delgada de vidrio, tal como borosilicato, sílice fundida o incluso sosa-cal, de un tamaño de aproximadamente 25 x 76 x 1 mm.
- 20 [0038] El portaobjetos usado dentro de la presente invención tiene al menos la zona que en el dispositivo completo forma una pared del microcanal, funcionalizada con un óxido de metal nanoestructurado, con el fin de mejorar la adhesión celular; en lo sucesivo, los óxidos de metal nanoestructurados se denominarán ns-MO_x, donde M significa un metal.
- 25 [0039] Entre los ns-MO_x, los preferidos son óxido de Zn (ns-ZnO), óxido de Zr (ns-ZrO₂) y, en particular, óxido de Ti (ns-TiO₂), en forma de películas nanoestructuradas delgadas. Estas películas de óxido están constituidas por nanopartículas con una distribución de tamaño que cubre el intervalo desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 nm, centrado dentro de 5 y 15 nm, como se observa con Microscopía Electrónica de Transmisión (*Transmission Electron Microscopy*) (TEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (*Atomic Force Microscopy*) (AFM).
- 30 [0040] Las nanopartículas se ensamblan al azar para generar una estructura porosa con una densidad de masa de desde aproximadamente 1/2 hasta aproximadamente 1/10, de la densidad de masa del óxido a granel correspondiente, como se mide mediante Microbalanza de Cristal de Cuarzo (*Quartz Crystal Microbalance*) (QCM) y AFM; en el caso de ns-TiO₂, la densidad de masa habitualmente es aproximadamente 1/7 de la densidad de masa de TiO₂ denso.
- 35 [0041] Estos materiales están constituidos por nanopartículas tanto nanocristalinas como amorfas, como revelan TEM y Difracción de Rayos (*X-Ray Diffraction*) (XRD). En el caso de ns-TiO₂, se ha observado (espectroscopía Raman) que coexisten las fases de anatasa y rutilo.
- [0042] Las películas, cuando se depositan con un grosor de 50 nm, son transparentes para longitudes de onda en la región visible.
- 40 [0043] En el caso particular de ns-TiO₂, la absorción óptica se vuelve apreciable a aproximadamente 320 nm, en la región UV (espectroscopía UV-VIS). A partir de características límite de absorción, se evalúa la banda prohibida óptica (modelo de Tauc) entre 3,2 y 3,6 eV. El índice de refracción de ns-TiO₂ tiene un valor entre 1,6 y 1,8, muy por debajo del valor de TiO₂ a granel (2,5 en anatasa, 2,9 en rutilo), debido a una porosidad a escala nanométrica (modelo de Lorentz-Lorenz).
- 45 [0044] Las películas nanoestructuradas de la invención tienen un grosor comprendido entre 20 nm y 200 nm, preferiblemente entre 40 nm y 60 nm, con una rugosidad superficial entre 2 nm y 30 nm, preferiblemente entre 5 nm y 15 nm.
- 50 [0045] Películas delgadas de estos ns-MO_x pueden depositarse sobre el portaobjetos de soporte mediante varias técnicas, tales como bombardeo catódico o Deposición por Láser pulsado (*Pulsed Laser Deposition*) (PLD); sin embargo, la técnica preferida es a través del uso de una Fuente de Grupos de Microplasma Pulsado (*Pulsed Microplasma Cluster Source*) (PMCS). Esta técnica permite la deposición de películas nanoestructuradas y se basa en la ablación de material de un cátodo ubicado dentro de una fuente a través de plasma generado por un flujo de gas inyectado en la cámara de fuente interconectada con un sistema de vacío. La diferencia de presión entre la fuente y la cámara de vacío permite la extracción del material nanoparticulado. Para una referencia general a la
- 55 [0045] Películas delgadas de estos ns-MO_x pueden depositarse sobre el portaobjetos de soporte mediante varias técnicas, tales como bombardeo catódico o Deposición por Láser pulsado (*Pulsed Laser Deposition*) (PLD); sin embargo, la técnica preferida es a través del uso de una Fuente de Grupos de Microplasma Pulsado (*Pulsed Microplasma Cluster Source*) (PMCS). Esta técnica permite la deposición de películas nanoestructuradas y se basa en la ablación de material de un cátodo ubicado dentro de una fuente a través de plasma generado por un flujo de gas inyectado en la cámara de fuente interconectada con un sistema de vacío. La diferencia de presión entre la fuente y la cámara de vacío permite la extracción del material nanoparticulado. Para una referencia general a la
- 60 [0045] Películas delgadas de estos ns-MO_x pueden depositarse sobre el portaobjetos de soporte mediante varias técnicas, tales como bombardeo catódico o Deposición por Láser pulsado (*Pulsed Laser Deposition*) (PLD); sin embargo, la técnica preferida es a través del uso de una Fuente de Grupos de Microplasma Pulsado (*Pulsed Microplasma Cluster Source*) (PMCS). Esta técnica permite la deposición de películas nanoestructuradas y se basa en la ablación de material de un cátodo ubicado dentro de una fuente a través de plasma generado por un flujo de gas inyectado en la cámara de fuente interconectada con un sistema de vacío. La diferencia de presión entre la fuente y la cámara de vacío permite la extracción del material nanoparticulado. Para una referencia general a la
- 65 [0045] Películas delgadas de estos ns-MO_x pueden depositarse sobre el portaobjetos de soporte mediante varias técnicas, tales como bombardeo catódico o Deposición por Láser pulsado (*Pulsed Laser Deposition*) (PLD); sin embargo, la técnica preferida es a través del uso de una Fuente de Grupos de Microplasma Pulsado (*Pulsed Microplasma Cluster Source*) (PMCS). Esta técnica permite la deposición de películas nanoestructuradas y se basa en la ablación de material de un cátodo ubicado dentro de una fuente a través de plasma generado por un flujo de gas inyectado en la cámara de fuente interconectada con un sistema de vacío. La diferencia de presión entre la fuente y la cámara de vacío permite la extracción del material nanoparticulado. Para una referencia general a la

técnica de PMCS, véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea EP 1031639 o el *Journal of Physics D*, 32 (1999), L105-109. PMCS es la técnica preferida ya que demostró garantizar las características de porosidad deseadas sobre el material depositado.

5 **[0046]** Cuando se producen a través de PMCS, las características de superficie de las películas de ns-MO_x son consistentes con el proceso de crecimiento de agregación balística, mostrando en particular una rugosidad superficial que depende del grosor. Para un grosor dentro de 40-60 nm, la rugosidad superficial se encuentra entre 5 nm y 15 nm, y habitualmente entre 8 nm y 12 nm (AFM).

10 **[0047]** Las películas de ns-MO_x se tratan después de la deposición con un plasma de oxígeno (tratamiento durante 150 s a 100 W), con el fin de aumentar la humectabilidad y mejorar la capilaridad en el microcanal, favoreciendo de este modo que líquidos espontáneos fluyan al interior del microcanal.

15 **[0048]** El material preferido para la funcionalización del portaobjetos es ns-TiO₂, estequiométrico o no, preferiblemente obtenido por medio de técnica de PMCS. Dióxido de titanio es un material altamente biocompatible y bio-activo; de hecho, dicho material demostró no interferir con actividades celulares normales, tales como el crecimiento celular, ni interaccionar con reactivos usados en la preparación de cultivos celulares. Además, el dióxido de titanio nanoestructurado muestra una señal de fondo de fluorescencia muy baja (autofluorescencia), que mejora la relación señal/ruido en el caso de mediciones basadas en fluorescencia.

20 **[0049]** Un recubrimiento de dióxido de titanio nanoestructurado se divulga en el documento WO 2007/009994 en nombre del solicitante. Este documento divulga sustratos para inmovilizar virus o células; este documento, sin embargo, no hace mención del uso en el campo de la microfluídica, y no muestra indicios del hecho de que ns-MO_x pueden tener propiedades superiores, en comparación con otros materiales promotores de la adhesión conocidos, cuando se usan en este campo específico.

[0050] La parte en la que está presente la ranura es una almohadilla realizada usando diferentes materiales blandos, generalmente polímeros, tales como silicona o neopreno o PDMS (polidimetilsiloxano).

30 **[0051]** La ranura tiene habitualmente una longitud del orden de milímetros y una sección transversal con dimensiones laterales del orden de decenas o pocos cientos de micrómetros; es decir, los orificios y posibles cavidades adicionales tienen dimensiones por debajo de un milímetro. Estas características se producen habitualmente mediante grabado, que puede llevarse a cabo con diferentes técnicas conocidas en la técnica, tales como chorreo de polvo, grabado químico (por ejemplo ataque con HF), Grabado por Iones Reactivos Profundo (*Deep Reactive Ion Etching*) o grabado por plasma, con el uso o no de máscaras de grabado. En el caso de almohadillas poliméricas pueden usarse otras técnicas, tales como moldeo o colada, para formar la ranura.

35 **[0052]** La ranura puede tener geometrías de diferente sección transversal, tal como, por ejemplo, cuadrada, circular, hexagonal, etc. de acuerdo con la necesidad; la sección transversal más común es rectangular. Es decir, puede componerse también de un número variable de microcanales, por ejemplo.

40 **[0053]** La parte preferida con ranura de acuerdo con la invención es una almohadilla polimérica. Un ejemplo de almohadilla con ranura micrométrica se representa en la figura 1; en particular, en la figura, el dibujo a) muestra la almohadilla en vista desde arriba, el dibujo b) muestra la misma almohadilla en vista desde abajo, y el dibujo c) muestra una vista lateral de la almohadilla, en una sección transversal realizada a lo largo de un plano paralelo a y que incluye la ranura.

45 **[0054]** Las dimensiones de almohadilla a modo del ejemplo son 75,6 x 25,0 x 1,0 mm y dimensiones de ranura a modo del ejemplo son 300 μm x 50 μm x 10 mm; las aberturas de acceso para inyección de reactivos, gases y muestras tienen un diámetro de 0,7 mm.

50 **[0055]** El uso de un dispositivo microfluídico en lugar de un portaobjetos plano, como en la mayoría de las técnicas del estado de la técnica, da como resultado una baja cantidad de reactivos necesarios para realizar el ensayo. En particular, se requerirá una cantidad mucho menor de caras sondas de FISH, lo que sería también más seguro para el medio ambiente.

55 **[0056]** Además, en un dispositivo microfluídico de acuerdo con la invención, la superficie admisible para la adhesión es del mismo tamaño de la superficie inferior del microcanal. Esta superficie es mucho más pequeña que la funcionalmente correspondiente en un ensayo de FISH convencional: si el recubrimiento para la adhesión celular de la invención se proporciona, una cantidad similar de células se hace disponible para el análisis y esto da como resultado una cantidad minoritaria de tiempo para adquirir las imágenes resultantes, reduciendo de este modo los costes debido a la asignación de tiempo máquina.

60 **[0057]** Para la realización de FISH miniaturizada, deben usarse secuencialmente reactivos de base acuosa (o compatibles con agua) con diferente viscosidad y densidad: puesto que la reacción se produce en un microcanal, la capilaridad del microcanal es un requisito previo esencial para que los reactivos fluyan y la correcta ejecución del

análisis. Este estado se obtiene funcionalizando el portaobjetos de sustrato con una película de ns-MO_x hidrófila.

[0058] En una realización preferida de la invención, se usa una almohadilla hecha de PDMS o silicona, que se sabe que son hidrófobos, impidiendo el flujo espontáneo de líquidos dentro del microcanal. Por lo tanto, se hace necesario tratar posteriormente los recubrimientos de ns-MO_x, con el fin de convertir en hidrófilos a los mismos y favorecer de este modo el flujo de reactivos acuosos dentro del microcanal.

[0059] Mediante el tratamiento posterior de ns-MO_x, preferiblemente añadiendo carga de superficie (por ejemplo mediante tratamiento de oxígeno de plasma durante 150 s a 100 W), se obtienen recubrimientos de ns-MO_x con alta humectabilidad, tal como se mide mediante análisis de ángulo de contacto (ángulos de contacto no superiores a 10° se han obtenido de manera consistente por los inventores en el caso de recubrimientos tratados por plasma). Los inventores han observado que un tratamiento de este tipo puede conferir capilaridad en el contexto de microcanales, y verificado que los líquidos fluyen dentro del microcanal espontáneamente, sin necesidad de aspiración asistida por bomba, confirmando la capilaridad del dispositivo.

[0060] La primera realización más sencilla del dispositivo microfluídico de la invención, comprende un portaobjetos de vidrio para microscopio funcionalizado que está acoplado con una almohadilla de PDMS o silicona provista de una ranura micrométrica. El acoplamiento puede aprovechar al menos parcialmente la adhesión espontánea adhesión entre PDMS o silicona y vidrio. Esta adhesión es sin embargo reversible, permitiendo una fácil separación de las dos partes en el final del ensayo.

[0061] El ensamblaje se realizará de manera que el microcanal esté ubicado en correspondencia con la zona funcionalizada sobre la superficie del portaobjetos. Gracias al acoplamiento reversible entre portaobjetos y almohadilla, esta última puede retirarse al final de la fase de hibridación de manera que las imágenes de fluorescencia pueden adquirirse directamente sobre el portaobjetos de vidrio sin que sea necesaria una manipulación adicional de la muestra.

[0062] De manera inesperada, se ha observado que dicha primera etapa de acoplamiento y dicha última etapa de separación no afectan en medida alguna a la adhesión de las células sobre la capa funcionalizada del portaobjetos ni antes ni después de realizarse el ensayo de FISH.

[0063] Una vez desacoplado, el portaobjetos puede colocarse por lo tanto directamente "bajo" un microscopio, con el objetivo del microscopio orientado hacia el lado del portaobjetos sobre el que está fijada la muestra. Esto permite establecer correctamente la distancia de trabajo, permitiendo la adquisición de imágenes con un objetivo de 100X, llegando de este modo a la resolución de imagen requerida por las normas de práctica habitual de FISH.

[0064] Al mismo tiempo, la posibilidad de usar, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio para microscopio convencional de 1 mm de grosor permite obtener un dispositivo suficientemente robusto para manejarse fácilmente.

[0065] Como se divulga en lo anterior, la figura 2 representa una vista desde arriba de un dispositivo montado de la invención en diferentes fases de montaje. En la figura, el dibujo a) representa un soporte; el dibujo b) es el soporte con el portaobjetos funcionalizado, en el que la zona central representada en una sombra más oscura es la zona funcionalizada; el dibujo c) es el soporte con el portaobjetos funcionalizado y la almohadilla microfluídica dispuesta sobre el último; el dibujo d) es el dispositivo montado final con cierre provisto de puertos de acceso para los microfluidos.

[0066] Debido a la adhesión espontánea entre PDMS o silicona y vidrio, el montaje descrito podría ser innecesario si se usara una almohadilla microfluídica hecha de uno de estos polímeros. No obstante, es necesario proporcionar compresión entre partes si no se usan polímeros de este tipo.

[0067] Todos los portaobjetos usados en las realizaciones anteriores pueden ser cualquier portaobjetos adecuado, tales como, por ejemplo, portaobjetos de vidrio como portaobjetos de vidrio para microscopio.

[0068] El dispositivo de la invención demostró inesperadamente solucionar problemas importantes de las tecnologías que se divulgan en la técnica anterior.

[0069] De hecho, la adhesión de las células al sustrato funcionalizado demostró ser del 90 % o más de las células iniciales, lo que es sorprendente con respecto al estado de la técnica. De manera inesperada, estos porcentajes de adhesión se han obtenido también cuando se trata con células hematopoyéticas, tales como U937, que son células derivadas de linfoma, comúnmente definidas como células no adherentes. Como consecuencia, pueden usarse incluso muestras con un bajo número de células, con una expectación razonable de reproducibilidad y adquisición de información suficiente.

[0070] Esto es de gran preocupación, especialmente cuando no pueden tratarse muestras grandes, tal como, por ejemplo, con muestras de células tumorales circulantes.

[0071] De nuevo, la identificación de alteraciones celulares raras sería igualmente posible debido a la pérdida muy limitada de células a partir de la muestra durante el procesamiento, reduciendo de este modo el riesgo de falsos negativos.

5 **[0072]** Además, puesto que las células adheridas al portaobjetos mantienen su configuración 3D, en lugar de extenderse y presionarse sobre el portaobjetos como en las prácticas tradicionales, pueden obtenerse imágenes tridimensionales (3D) recogiendo datos a diferentes distancias desde la muestra. Esta ventaja es también de gran preocupación cuando se trata con alteraciones celulares raras o con muestras de bajo número de células, permitiendo discriminar señales también en el eje z, permitiendo de este modo no rechazar información posiblemente interesante para problemas geométricos.

[0073] Como segundo objeto de la presente invención, se proporciona un método para usar el dispositivo de la invención en ensayos analíticos basados en fluorescencia y, en particular, para realizar FISH.

15 **[0074]** Para los fines de esta invención puede usarse, en particular, una suspensión celular constituida por células de muestras biológicas, cultivadas *in vitro*, extraídas de tejidos o de fluidos.

[0075] Se ha implementado un protocolo adaptado, permitiendo obtener efectos inesperados y sorprendentes con respecto a cualquier otro método y/o materiales usados anteriores.

20 **[0076]** De hecho, el método permite analizar incluso muestras de tamaño pequeño y baja densidad, con concentración de tan sólo alrededor de 10 células/ml.

[0077] Más en detalle, el ensayo puede realizarse sobre diferentes tipos de células, tal como por ejemplo células tumorales, células tumorales circulantes, células hematopoyéticas, células epiteliales, amniocitos y en general cualquier tipo de células de mamífero y no de mamífero primarias o cultivadas, o bien vivas o bien fijadas previamente con cualquier agente de fijación celular adecuado, clasificándose comúnmente como células adherentes o células no adherentes como se mencionó anteriormente. Células adherentes o no adherentes, vivas o fijadas, pueden inmovilizarse al portaobjetos funcionalizado en muy diferente medida.

30 **[0078]** En una realización preferida, los ensayos analíticos basados en fluorescencia de la invención se realizan sobre células U937 vivas, que se definen comúnmente como células no adherentes.

[0079] Permitiendo el uso de una suspensión de células vivas, el método de la invención no requiere ningún tratamiento previo de las células con agentes de fijación, ni lisis de la célula, permitiendo de este modo el uso de células íntegras. Esto es de preocupación particular, en cuanto al tiempo, coste y volumen de reactivos tóxicos; además, de este modo puede realizarse un análisis de las condiciones fisiológicas de las células.

40 **[0080]** El método que se divulga en la presente invención es particularmente adecuado para realizarse usando el dispositivo de la invención.

[0081] La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

45 **[0082]** Este ejemplo trata de la preparación y el montaje de dispositivos microfluídicos con un microcanal de acuerdo con la invención.

a) Funcionalización del portaobjetos de base con un ns-MO_x

50 **[0083]** Un portaobjetos de vidrio para microscopio limpiado por ultrasonidos (por ejemplo Schott Nexterion D) se coloca en la cámara de deposición de un sistema de vacío equipado con una PMCS. La exposición del portaobjetos al haz agrupado generado por PMCS tiene lugar a través de una máscara de plantilla adecuada, que está situada entre la fuente y el portaobjetos, con el fin de permitir la deposición del material deseado sólo sobre zonas limitadas del portaobjetos. Para obtener un grosor uniforme de la capa depositada, el portaobjetos se explora continuamente delante del haz agrupado; para monitorizar el grosor de la capa en crecimiento se expone una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) también al haz agrupado. La deposición se realiza a temperatura ambiente, a una presión típica de 10⁻⁶ torr, y dura alrededor de 1 min por portaobjetos, dada una distancia de fuente a portaobjetos de alrededor de 1 m. El material elegido para la funcionalización del portaobjetos es TiO₂. La película de ns-TiO₂ resultante tiene un grosor promedio de aproximadamente 50 nm.

60 **[0084]** Después de la fase de deposición, el portaobjetos se expone a un plasma de oxígeno durante 150 s a 100 W.

65 b) Acoplamiento de la ranura con el portaobjetos

[0085] Se proporciona una almohadilla de PDMS del tipo mostrado en la figura 1, en la que está presente una ranura micrométrica de 1 cm de longitud, 300 μm de anchura y 50 μm de altura. La almohadilla y el portaobjetos funcionalizado se acoplan usando un centrador mecánico adecuado, proporcionando la colocación de la ranura sobre la zona funcionalizada del portaobjetos, formando de este modo un microcanal de acuerdo con la invención.

5

[0086] La adhesión entre las dos partes se obtiene ejerciendo una leve presión.

EJEMPLO 2 (COMPARATIVO)

[0087] Un dispositivo microfluídico se produce uniendo una almohadilla de PDMS igual a la usada en el ejemplo 1 con un portaobjetos de vidrio para microscopio no funcionalizado; en este caso también se obtiene adhesión entre la almohadilla y el portaobjetos aplicando simplemente una leve presión a las dos partes.

10

EJEMPLO 3 (COMPARATIVO)

15

[0088] El procedimiento del ejemplo 2 se repite, usando en este caso un portaobjetos funcionalizado con una capa de película de TiO_2 denso, no nanoestructurado, obtenida a través de un método de deposición de bombardeo catódico convencional; la película resultante tiene un grosor de aproximadamente 50 nm. En este caso también se obtiene adhesión entre el portaobjetos y la almohadilla presionando las dos partes.

20

EJEMPLO 4 (COMPARATIVO)

[0089] El procedimiento del ejemplo 2 se repite, usando en este caso un portaobjetos funcionalizado con una capa de poli-D-lisina incubando un portaobjetos de vidrio con una solución de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de poli-D-lisina (SIGMA) durante 30 min a temperatura ambiente, entonces lavando en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1x (DPBS), secando con aire y usando para el experimento; en este caso también se obtiene adhesión entre el portaobjetos y la almohadilla presionando las dos partes.

25

EJEMPLO 5

30

[0090] Este ejemplo ilustra los resultados de una prueba de adhesión celular llevada a cabo en los dispositivos microfluídicos de los ejemplos 1-4.

[0091] Los dispositivos microfluídicos se incuban previamente a 37 $^{\circ}\text{C}$ sobre una placa calentadora durante un periodo de 2 min.

35

[0092] Para la preparación de las muestras de prueba, se colocan células U937 cultivadas (1 ml de células de crecimiento exponencial) en un tubo de 1,5 ml y se lavan 3 veces con 1 x DPBS, se cuentan y finalmente se resuspenden a la concentración de 10000 células/ μl .

40

[0093] 1,5 μl de suspensión celular se cargan en el pocillo de entrada del microcanal de cada dispositivo microfluídico, mientras se aspira desde el pocillo de salida del microcanal con una bomba de jeringa (KDS120, KD Scientific) a 1,7 $\mu\text{l}/\text{s}$; las células se dejan entonces adherirse al fondo del microcanal durante pocos minutos e inmediatamente se fijan añadiendo una solución de metanol/ácido acético, relación 3:1. Después de la adhesión, se añade DPBS 1x para lavar el fijador mientras que se aspira con una bomba de vacío; este procedimiento somete las células a tensión de corte limitada. Al final del procedimiento, se retira la almohadilla, se tiñen los portaobjetos con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, SIGMA), y se montan para el análisis de microscopía. En el análisis, se cuenta el número de células fijadas sobre el portaobjetos. Los resultados se notifican en la figura 3: como se observa claramente a partir de esta figura, en las condiciones de prueba el número de células U937 adheridas sobre las superficies de los portaobjetos de los ejemplos comparativos 2-4 es similar, e igual a aproximadamente 600 células fijadas, en concreto, aproximadamente el 40 % de las células cargadas; por otro lado, el número de células adheridas sobre el portaobjetos funcionalizado de la invención (ejemplo 1) es aproximadamente 1400, es decir, aproximadamente un 130 % mayor que en el caso de los portaobjetos comparativos, e igual a aproximadamente el 93 % de las células cargadas.

45

50

55

EJEMPLO 6

[0094] Este ejemplo ilustra los resultados de una segunda prueba de adhesión celular llevada a cabo sobre los dispositivos microfluídicos de los ejemplos 1-4, en condiciones de tensión de corte más intensas que en el ejemplo 5.

60

[0095] El procedimiento del ejemplo 5 se repite hasta la etapa de fijación con la solución metanol/ácido acético 3:1; las muestras se someten entonces a un procedimiento, denominado en adelante “tensión de corte prolongada”, que comprende poner en contacto las células fijadas sobre portaobjetos con una serie de reactivos usados en ensayos biológicos. En particular, las siguientes soluciones se cargan secuencialmente con una pipeta, se incuban durante el

65

tiempo y temperatura indicados y se aspiraron con una bomba de vacío: tampón de citrato de sodio-solución salina 2x (SSC) durante 30 min a 37 °C, tampón con enzima (pepsina al 0,005 %, HCl 0,01 N, SIGMA) durante 15 min a 37 °C, 1x DPBS durante 5 min a temperatura ambiente (TA), post-fijador (MgCl₂ 50 mM, SIGMA), formaldehído al 0,95 % (SIGMA) en 1x DPBS durante 5 min a TA, 1x DPBS durante 5 min a TA, tres lavados posteriores con EtOH al 70 %, 85 % y 100 % (BDH) durante 1 min cada uno a TA, solución de desnaturalización (formamida al 70 %, SIGMA, en 2x SSC SIGMA) durante 5 min a 75 °C, tres lavados posteriores con EtOH al 70 %, 85 % y 100 % durante 1 min cada uno a TA.

[0096] Después de la aspiración completa de EtOH puro, se colocan los portaobjetos a 60 °C durante 2 min para secar completamente, y entonces se cargan con 0,3 µl de la mezcla de hibridación (para 15 ml: 7,5 ml de formamida ultrapura, 6,0 ml de sulfato de dextrano al 25 %, 1,5 ml de 20x SSC). Los pocillos de microcanal se sellan entonces con una gota de aceite mineral (SIGMA) para impedir la evaporación, y se incuban durante 10 min a 37 °C. Después de la incubación, se retiran las almohadillas y los portaobjetos se sumergen en jarras Coplin que contienen solución de lavado A (NP40 al 0,3 %, detergente no iónico, no desnaturalizante octil-fenoxilpolietoxietanol, en 0,4x SSC (SIGMA)) durante 2 min a 73 °C, y solución de lavado B (NP40 al 0,1 % en 2x SSC) durante 1 min a TA, se seca con aire y se monta con DAPI II (Abbott Molecular) para análisis de microscopía. Para el recuento celular, se obtienen imágenes de cada portaobjetos con filtro de DAPI y se adquiere con Scan^R, una plataforma automatizada basada en microscopio para la selección por obtención de imágenes (Olympus Europa, Alemania) equipada con una cámara Hamamatsu ORCA-AG, explorando 13 imágenes adyacentes usando un objetivo 10x; entonces se recuentan las células usando la función “analizar partículas” del software ImageJ, después, habiendo establecido un umbral apropiado y excluyendo los objetos fuera del intervalo de 15-75 píxeles cuadrados.

[0097] Los datos se exportan y analizan mediante software de Excel.

[0098] Los resultados se notifican de forma gráfica en la figura 4. Como puede verse a partir de la figura, sobre el portaobjetos de SiO₂ el número de células disminuyó drásticamente hasta ~100 células/microcanal, mientras que permaneció sustancialmente invariable sobre portaobjetos recubiertos de ns-TiO₂ y poli-D-lisina. No obstante, debido a la diferente eficiencia de inmovilización celular inicial (véase el ejemplo 5), al final de la prueba de tensión de corte prolongada, el número de células total era significativamente diferente entre ns-TiO₂ y poli-D-lisina (1400 células frente a 600 células) siendo más de dos veces mayor sobre portaobjetos recubiertos sobre ns-TiO₂.

EJEMPLO 7

[0099] Este ejemplo ilustra los resultados de una tercera prueba de adhesión celular llevada a cabo sobre los dispositivos microfluídicos de los ejemplos 1-4, llevados a cabo en las mismas condiciones del ejemplo 6, en este caso con muestra que comprende células hematopoyéticas de un donante humano.

[0100] Los dispositivos microfluídicos se condicionan previamente a 37 °C sobre una placa calentadora durante un periodo de 2 min como en el ejemplo 5.

[0101] Para la preparación de las muestras de prueba, se trata una alícuota de sangre periférica (PB) (0,5-1 ml) de donante normal, con tampón de lisis de glóbulos rojos (Red Blood Lysis) (RBL) (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 9,93 mM, EDTA 0,13 mM, de SIGMA) hasta un volumen total de 10 ml; la suspensión se mantiene a 4 °C durante 5 min, entonces se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min. Se desecha el sobrenadante y las células hematopoyéticas aisladas de este modo se resuspenden de nuevo en 10 ml de tampón RBL, entonces se centrifuga a 1800 rpm durante 5 min. Las células se resuspenden en 1 ml de 1x DPBS y se transfieren en un tubo de 1,5 ml, se lavan dos veces en 1x DPBS, y finalmente se resuspenden a una concentración de 15000-25000 células/µl. 1,5 µl de la suspensión obtenida de este modo se cargan en el pocillo de entrada del microcanal de cada dispositivo microfluídico.

[0102] 20 µl de metanol fijador de Carnoy (SIGMA)/ácido acético (Carlo Erba) 3:1 se añaden en el pocillo de entrada y se dejan difundirse en el interior para fijar las células. Después de 2 min se fijan las células. Los microcanales se someten entonces al procedimiento de tensión de corte prolongada ilustrado en el ejemplo 6. Los resultados de la prueba se representan en la figura 5: el número de células retenidas sobre el dispositivo de la invención oscila entre aproximadamente 1,8 y 2,5 veces el número de células retenidas sobre dispositivos de comparación.

EJEMPLO 8

[0103] Este ejemplo trata de la comparación del funcionamiento de dispositivos de la invención en los que la película de ns-TiO₂ se trata posteriormente o no después de la deposición.

[0104] La cara funcionalizada de un portaobjetos producida como se describe en el punto a) del ejemplo 1 se somete a un tratamiento por oxígeno de plasma durante 150 segundos a 100 W.

[0105] El portaobjetos tratado posteriormente de este modo, y un portaobjetos no tratado posteriormente, se

ensamblan con almohadillas de PDMS como en el ejemplo 1, y entonces se someten al procedimiento del ejemplo 6, usando en este caso células fijadas (U937) como muestra de prueba. Los resultados de la prueba se notifican en la figura 6, y muestran que ambos dispositivos de la invención presentan alta retención de células, pero en el caso de la película de ns-TiO₂ tratada posteriormente, éstas están distribuidas de manera más uniforme a lo largo de la superficie correspondiente a la parte inferior del microcanal. Esto favorece la interpretación de datos.

EJEMPLO 9

[0106] Este ejemplo trata de la realización de un ensayo completo de protocolo de FISH usando un dispositivo microfluídico de la invención.

[0107] Un dispositivo microfluídico preparado de acuerdo con el ejemplo 1 se usa para realizar un ensayo de FISH de acuerdo con el protocolo de la invención.

[0108] Una alícuota de células de U937 (Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC) se centrifuga a 600 g durante 5 min y se suspende en 1x DPBS a 37 °C hasta una concentración celular de 10000 células/μl.

[0109] La suspensión celular se pipetea manualmente al dispositivo usando una pipeta de laboratorio convencional y se deja incubar durante 4 min.

[0110] Se añade un agente de inmovilización que comprende un alcohol y un ácido carboxílico débil (metanol/ácido acético 3:1) y se permite que se produzca la inmovilización durante 2 min; entonces, se realiza la aspiración con una bomba de vacío. 30 μl de 2x solución SSC (preparada a partir de solución madre concentrada de 20x SSC, NaCl 3,0 M, citrato de sodio 0,3 M) precalentada a 37 °C se pipetea en el microcanal y se deja producirse la incubación durante 15 min sobre una placa calentada a 37 °C.

[0111] Después de la incubación, se pipetea una solución que contiene pepsina al 0,005 % y entonces se incuba en el microcanal durante 15 min sobre una placa calentada.

[0112] La solución de pepsina se bombea, se pipetea 1x DPBS (solución salina tampón fosfato, Lonza Group), se deja incubar durante 5 min, entonces se incuba una solución que contiene formaldehído (para 50 ml de solución: 1,3 ml de formaldehído al 37 %, 0,23 g de MgCl₂, 48,7 ml de PBS) durante 5 min, se lava con 1x DPBS y se deja incubar durante 5 min. DPBS se bombea fuera del microcanal, que se deja secar.

[0113] Una serie de soluciones al 70 %, 85 % entonces el 100 % de etanol se pipetea secuencialmente y se incuba cada una durante 1 min.

[0114] Se pipetea una solución de desnaturalización (para 50 ml de solución: 35 ml de formaldehído al 37 %, 5 ml de 20x SSC, 10 ml de H₂O a pH 7-8) precalentada a 73 °C, permitiendo la incubación durante 5 min sobre una placa calentada a 73 °C.

[0115] El dispositivo se retira entonces de la placa y se deja enfriar, después de lo cual se bombea hacia fuera la solución de desnaturalización y se repite el tratamiento con soluciones de etanol.

[0116] El dispositivo se coloca sobre una placa calentada a 45 °C y se retira completamente el etanol mediante bombeo durante aproximadamente 1 min.

[0117] El dispositivo se retira de la placa calefactora y se carga una sonda desnaturalizada marcada con Cy3. El microcanal se sella entonces con una gota de aceite mineral (Sigma) y se permite la incubación durante la noche sobre una placa mantenida a 37 °C.

[0118] Después de la incubación la almohadilla se separa del portaobjetos: el portaobjetos de vidrio se lava entonces 2 min en una jarra Coplin con una solución que contiene 0,4x SSC y NP40 al 0,3 %, precalentada a 73 °C; entonces durante 1 min con una solución que contiene 2x SSC y NP40 al 0,1 % a TA. Al final el portaobjetos se deja secar al aire durante 1 min.

[0119] Entonces se aplica un cubreobjetos de vidrio con una solución que contiene DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, SIGMA).

[0120] El portaobjetos está de este modo listo para usarse para adquirir imágenes con un objetivo 100X de inmersión en aceite (véase la figura 7 y la figura 8).

[0121] La figura 7 muestra la detección precisa sobre núcleos celulares de cromosoma X mediante sonda específica de locus marcada con Cy3 (véanse dos puntos brillantes/núcleo), mediante FISH, confirmando el funcionamiento eficaz de la prueba, incluso usando sondas de secuencia de baja abundancia para la detección genómica.

[0122] La figura 8 muestra la detección precisa sobre núcleos de cromosoma X mediante sonda específica de centrómero marcada con Cy3 (véanse dos puntos brillantes/núcleo), mediante FISH, confirmando adicionalmente el funcionamiento óptimo de la prueba.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo microfluídico que comprende un portaobjetos y una parte en la que está presente al menos una ranura, siendo dicha parte una almohadilla blanda de silicona, neopreno o polidimetilsiloxano (PDMS) y estando acoplada de manera reversible al portaobjetos, siendo dicho portaobjetos y dicha parte tales que mediante su unión se forma un microcanal, no extendiéndose dicho microcanal a lo largo de toda la longitud de la parte en la que está presente y accediéndose al mismo desde la superficie superior del dispositivo a través de orificios de paso, **caracterizado por que** al menos la zona sobre la superficie de dicho portaobjetos orientada hacia dicho microcanal está funcionalizada con una película de óxido de metal nanoestructurado hidrófilo y **por que** dicho óxido se trata con plasma para obtener un ángulo de contacto no superior a 10° .
- 10 2. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho óxido de metal nanoestructurado está constituido por nanopartículas con una distribución de tamaño que cubre el intervalo desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 nm y centrado dentro de 5 y 15 nm.
- 15 3. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho óxido se selecciona entre óxido de Ti, óxido de Zn u óxido de Zr.
- 20 4. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha película tiene un grosor comprendido entre 20 nm y 200 nm.
- 25 5. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha película tiene un grosor comprendido entre 40 nm y 60 nm y una rugosidad superficial comprendida entre 5 y 15 nm.
- 30 6. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el óxido de metal nanoestructurado tiene una estructura porosa con una densidad de masa de desde aproximadamente $1/2$ hasta aproximadamente $1/10$, de la densidad de masa del óxido a granel correspondiente.
- 35 7. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el óxido es óxido de Ti con una densidad de masa de aproximadamente $1/7$ de la densidad de masa de TiO_2 denso, banda prohibida óptica entre 3,2 y 3,6 eV e índice de refracción entre 1,6 y 1,8.
- 40 8. Un dispositivo microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha película se deposita mediante técnica de PMCS.
- 45 9. Uso del dispositivo microfluídico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en un ensayo analítico basado en fluorescencia.
- 50 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho ensayo es un ensayo de FISH.
- 55 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho ensayo de FISH se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo que comprende las etapas de:
- a) cargar una muestra celular en el microcanal del dispositivo microfluídico de las reivindicaciones 1 a 8;
 - b) dejar incubar las células;
 - c) fijar las células con una solución de un alcohol y un ácido carboxílico débil;
 - d) lavar con SSC;
 - e) lavar con una solución de pepsina;
 - f) fijar posteriormente con una solución de formaldehído;
 - g) añadir una serie de soluciones de etanol;
 - h) añadir una solución de un agente desnaturalizante;
 - i) repetir la etapa g) una vez;
 - j) añadir la sonda marcada y dejar incubar;
 - k) eliminar la parte que aloja el microcanal del portaobjetos;
 - l) lavar con una solución que comprende SSC y NP40, estando la muestra celular en forma de una suspensión celular.
- 60 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha suspensión celular es una suspensión de células no adherentes.
- 65 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dichas células no adherentes son células vivas.
14. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dichas células son células fijadas.

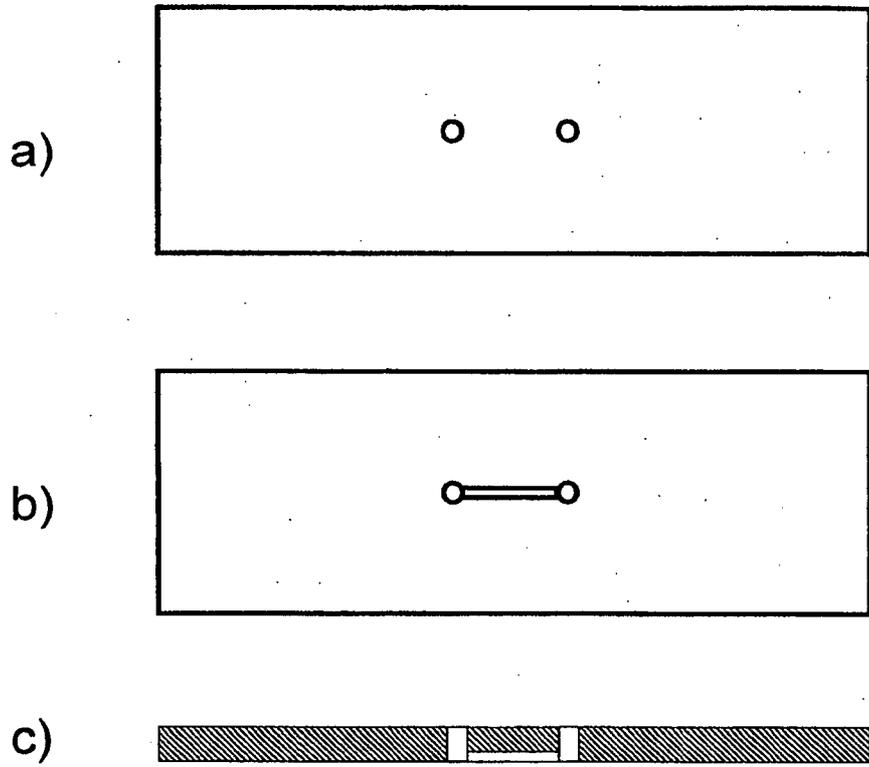


Fig. 1

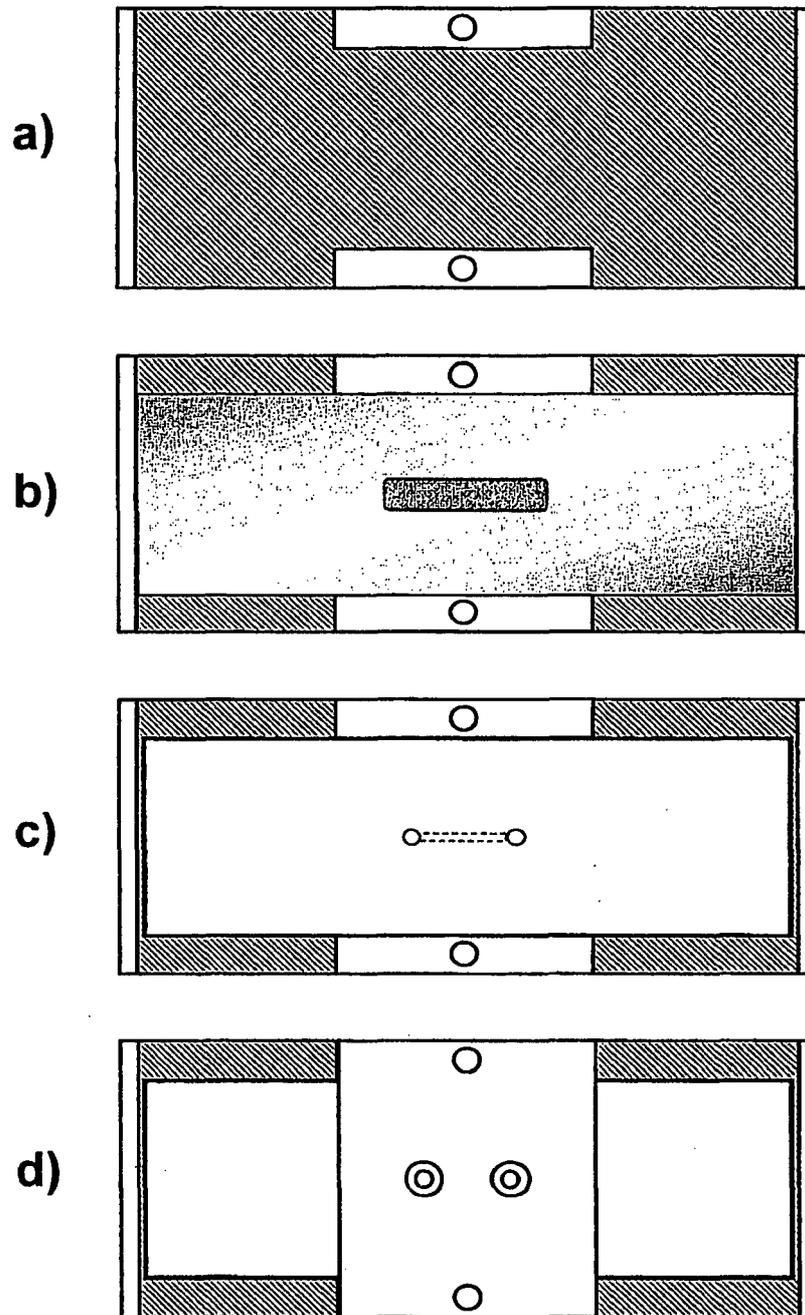


Fig. 2

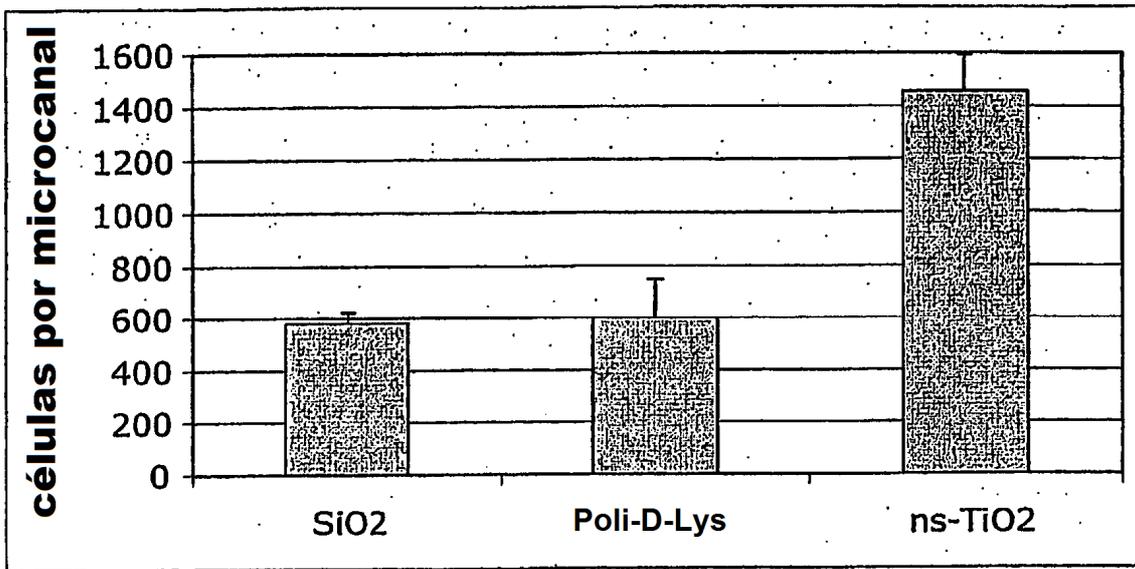


Fig. 3

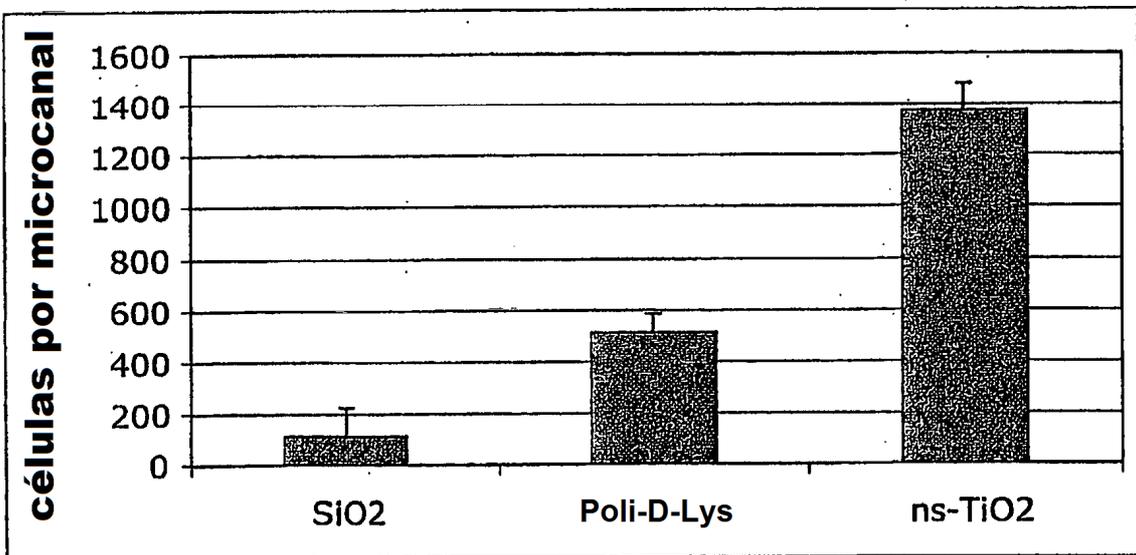


Fig. 4

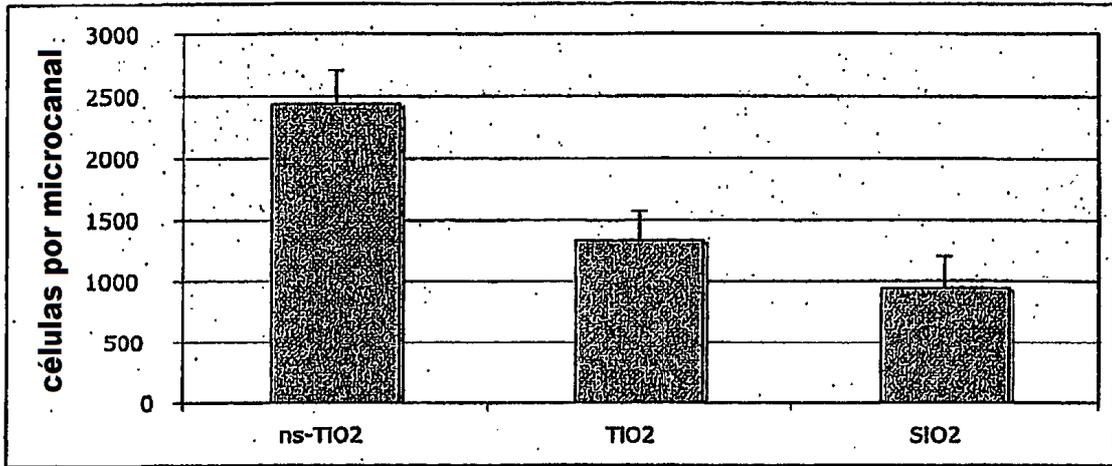


Fig. 5A

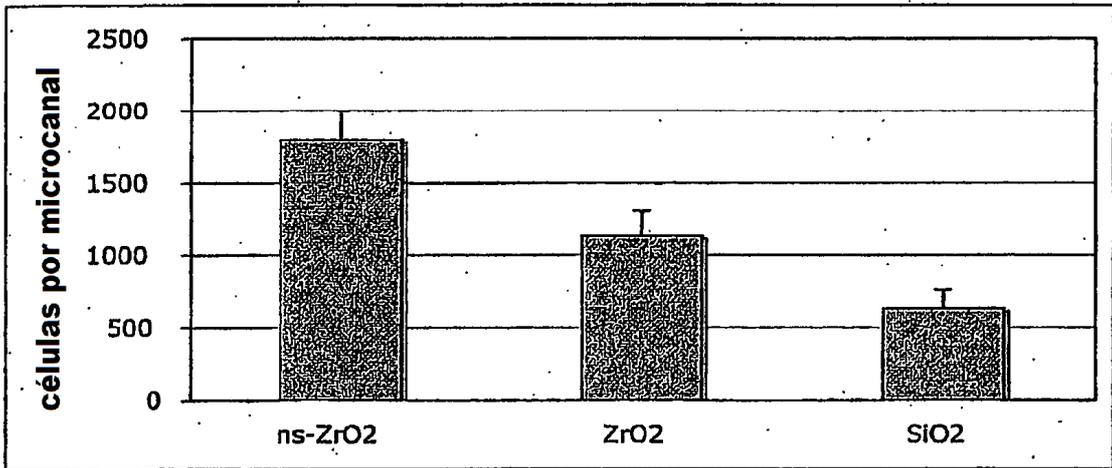


Fig. 5B

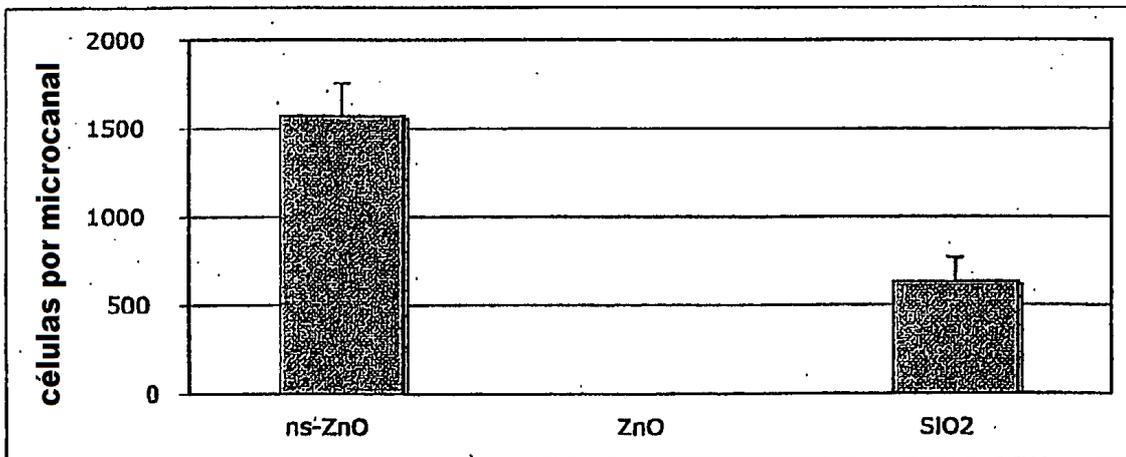


Fig. 5C

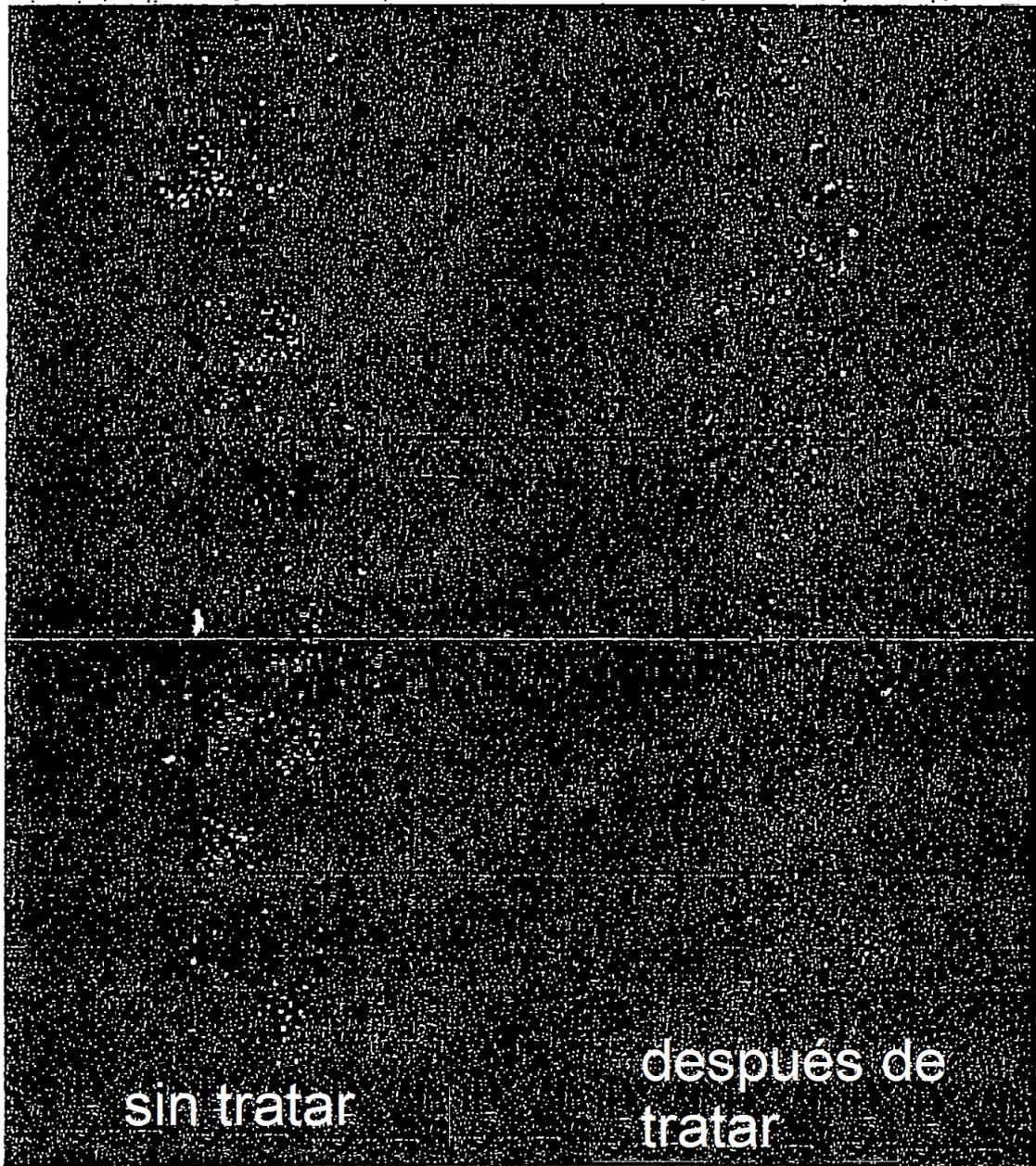


Fig. 6

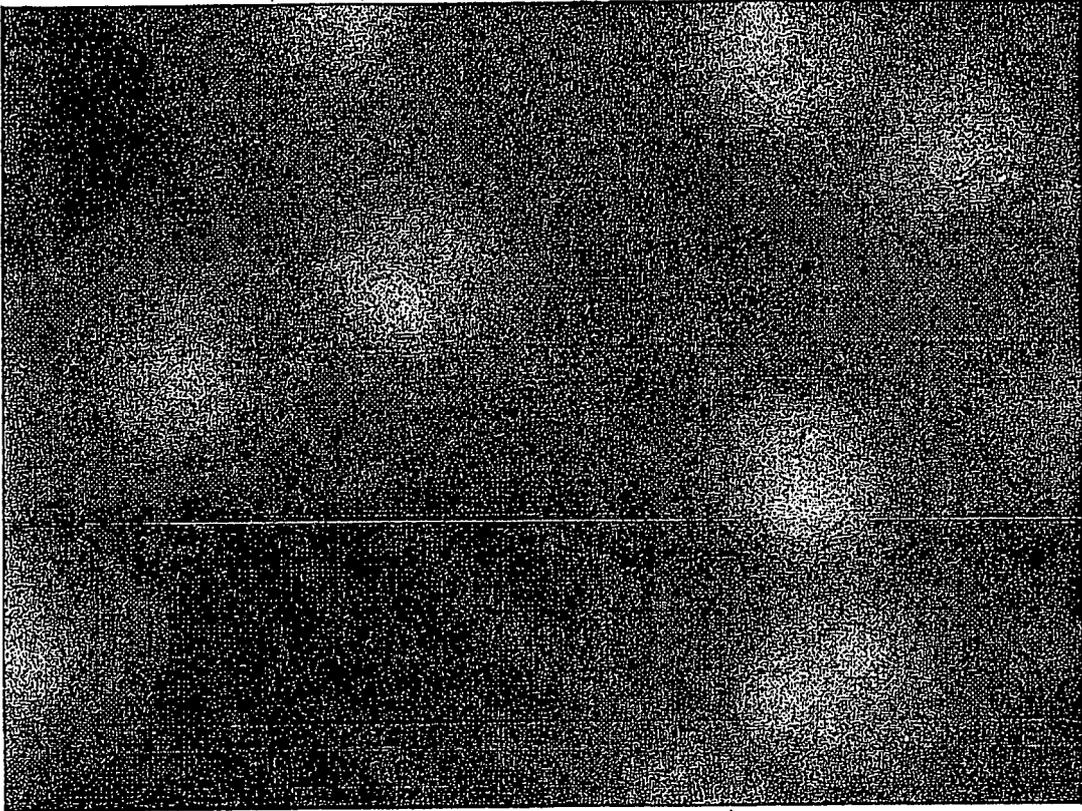


Fig. 7



Fig. 8