

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 420**

51 Int. Cl.:

G01N 1/36

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014** **PCT/US2014/022003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14150049**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014** **E 14713721 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2972194**

54 Título: **Aparato y método de manipulación de muestras biológicas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361794699 P
25.02.2014 US 201414189894

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.10.2017

73 Titular/es:

SAKURA FINETEK U.S.A., INC. (100.0%)
1750 West 214th Street
Torrance, CA 90501, US

72 Inventor/es:

MCCORMICK, JAMES B.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 637 420 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

Aparato y método de manipulación de muestras biológicas

5 **Campo**

La invención se refiere a la inclusión de tejidos para examen histológico y, más particularmente, se refiere a aparatos y a métodos mejorados para incluir muestras tisulares en cera o similares en la preparación para seccionamiento con microtomo y examen microscópico.

10

Antecedentes

Los procedimientos convencionales para preparar muestras tisulares para examen microscópico implican múltiples procesos que finalizan con la muestra infiltrada con parafina, la inclusión de la muestra tisular en cera de parafina y el seccionamiento de la muestra tisular incluida en parafina de forma muy delgada con un microtomo. Típicamente, antes de la inclusión, la muestra tisular se trata para fijar, deshidratar, limpiar y saturar la muestra tisular con diversos fluidos, incluyendo formaldehído y agua, etanol, xileno.

Inicialmente, un material de inclusión fundido, tal como un compuesto de cera de parafina, se vierte en una cavidad de un molde para rellenar parcialmente la cavidad del molde. El molde se mueve hasta una estación de refrigeración donde una pared inferior de la cavidad del molde se coloca en un riel de refrigeración para solidificar o gelificar la parafina en la cavidad del molde. A continuación, la muestra tisular preparada se coloca sobre la parafina gelificada en la cavidad del molde. La colocación de la muestra tisular sobre la parafina gelificada implica orientar la muestra tisular para presentar mejor la muestra a la hoja de corte de un instrumento de microtomo. La muestra tisular se orienta de modo que secciones transversales consecutivas producidas a partir de la muestra tisular muestren características de la muestra tisular en toda la muestra tisular. Por ejemplo, una muestra tisular relativamente larga y delgada puede orientarse para prolongarse sustancialmente normal a la pared inferior de la cavidad del molde de modo que un profesional sanitario pueda visualizar las secciones transversales secuenciales y entender las características de la muestra tisular a lo largo de su longitud.

30

La parafina fundida entonces se vierte sobre la muestra tisular. Se coloca un casete o cápsula que tiene parafina sobre la misma sobre la cavidad en el molde y se vierte parafina fundida adicional sobre el casete. Después de que la parafina solidifique, se forma un bloque moldeado que incluye una parte de base del casete o cápsula y una parte de bloque de parafina que tiene la muestra tisular dispuesta dentro de la parte de bloque. De acuerdo con el procedimiento convencional, el tamaño de diversos casetes y cápsulas se ha desarrollado para procesar muestras tisulares, y ha llegado a normalizarse relativamente de modo que las partes de base de los casetes y las cápsulas sean los vehículos de las muestras a colocar dentro de un mandril en un dispositivo de seccionamiento con microtomo.

Un problema habitual con el uso de cera de parafina para incluir una muestra tisular dentro de un molde es que la cera se pega a las superficies interiores del molde después de enfriarse y resiste la retirada de la muestra incluida que se moldea desde el molde. Una solución a este problema es tratar el molde con una solución de liberación, tal como una solución de tipo jabón, pulverizando el molde con el agente de liberación antes de verter la parafina en el molde. Como se apreciará, la preparación de varias muestras tisulares implica pulverizar cada molde con la solución de liberación, lo que complica y ralentiza el proceso de preparación de las muestras tisulares. La complicación causada por la pulverización de cada molde es especialmente aguda en el contexto de las necesidades de producción, para la eficacia cuando tienen que prepararse docenas o cientos de muestras tisulares incluidas. Además, con los moldes reutilizables, la solución de liberación típicamente se aplica cada vez que se usa el molde. El uso continuo de solución de liberación aumenta el coste y la dificultad de preparar muestras tisulares y afecta de forma adversa a los beneficios financieros y ambientales de la utilización de moldes reutilizables.

En el documento US 7 234 308 se describe un molde reutilizable metálico con uno o más pocillos. El molde se mantiene dentro de un criostato a baja temperatura. El molde se retira de criostato y en un pocillo dentro del molde se coloca una muestra tisular. Se añade un medio de inclusión al pocillo alrededor de la muestra tisular. Después se coloca un mandril previamente refrigerado contra la abertura del pocillo. El molde con la muestra tisular, el medio de inclusión y el mandril se devuelven al criostato y la muestra se congela en un bloque. El molde y los contenidos se retiran y se vierte agua caliente al molde liberando el bloque con el mandril adherido del pocillo. El mandril con el molde adherido entonces está disponible para el seccionamiento u otro procesamiento.

Por el contrario, en el documento EP 0 142 575 se describe un recipiente de incubación que consiste en un marco de conformación perforado y un canal exterior que se perfora en la base y que tiene líneas de rotura predeterminadas para abrirlo por rasgado y salientes para evitar un acoplamiento demasiado profundo del marco de conformación. El último se ancla al canal exterior mediante cuentas que acoplan en las perforaciones del canal exterior, de tal manera que se evita una abertura inintencionada. En un procedimiento alternativo de inclusión y conformación, se usa un recipiente de incubación con un canal exterior que no tiene perforaciones sobre la base pero que tiene, en el lado opuesto de la base, varias barras espaciadoras que se extienden en una dirección y que,

tras el estrecho apilamiento de los recipientes de incubación, sirven como elementos espaciadores con respecto al siguiente recipiente de incubación. Los recipientes de incubación se usan erguidos sobre el borde tras completarse el proceso de infiltración del tejido biológico y se devuelven a la posición horizontal antes de la solidificación de la parafina, evitando esta posición que la parafina fluya del canal exterior cuando la parafina se vacía de la propia cámara de incubación.

Sumario

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un molde de inclusión de tejido que tiene las características de la reivindicación 1.

Se proporciona un molde para recibir una muestra tisular y material de inclusión fundido que solidifica en el molde con la muestra tisular incluida en el mismo con el molde configurado para facilitar la extracción del material solidificado que incluye la muestra tisular incluida del molde.

En una realización, se proporciona un molde para recibir una muestra tisular y material de inclusión fundido que está configurado para modificar una configuración del material de inclusión solidificado en comparación con el material de inclusión solidificado producido usando moldes convencionales. El seccionamiento del material de inclusión solidificado producido usando moldes convencionales produce bordes del material de inclusión seccionado que impiden la soldadura por impacto de las secciones según caen de una máquina de microtomo que ha realizado el seccionamiento. Para abordar este problema, se describe un molde que tiene paredes laterales de la cavidad con un ángulo de desmoldeo en el intervalo de aproximadamente cero a aproximadamente 2 grados que son más agresivos que los moldes convencionales. El molde produce una parte de bloque del material de inclusión endurecido (con la muestra tisular en el mismo) con una sección transversal más uniforme a lo largo de la profundidad de la cavidad del molde. La sección transversal más uniforme de la parte de bloque de material de inclusión endurecido produce bordes exteriores más cuadrados de secciones de la parte de bloque una vez que la parte de bloque se ha seccionado usando un instrumento de microtomo. Los bordes más cuadrados son ventajosos porque dichos bordes permiten soldaduras por impacto de mayor resistencia entre las secciones de la parte de bloque según caen del instrumento del microtomo y de ese modo mejoran la formación de ristas de las secciones de parte de bloque.

El molde también reduce la adhesión del material de inclusión a las superficies interiores del molde. Esta reducción en la adhesión produce una estructura cristalina más pequeña del material de inclusión endurecido de modo que las superficies exteriores tienen una textura suave de tipo vítreo y son más traslúcidas que las superficies exteriores del material de inclusión endurecido producido usando moldes tradicionales. Además, la traslucidez aumentada de las superficies exteriores del material de inclusión endurecido permite que las características de un objeto incluido, tal como una muestra tisular, se observen visualmente de forma más clara que un objeto incluido dentro de material de inclusión endurecido producido usando un molde convencional. Esto es de beneficio en la determinación visual de la totalidad de la infiltración del material de inclusión en la muestra tisular, así como la determinación visual del tamaño y la forma de la muestra tisular que se presentará al borde de corte del instrumento de microtomo.

El molde tiene un recubrimiento de barrera unido de forma íntima y permanente a una o más superficies del molde que repele la atracción del material de inclusión a la una o más, superficies de molde. El recubrimiento de barrera unido de forma permanente permite de ese modo que el molde se reutilice sin, por ejemplo, necesitar la reapiación manual de un agente de liberación al molde antes de reutilizar el molde. Esto simplifica el proceso de reutilización del molde y elimina el coste y las complicaciones de tener que pulverizar cada molde antes de su uso con un agente de liberación.

En una forma, el recubrimiento de barrera tiene propiedades oleóforas e hidróforas que resisten las fuerzas capilares o la acción que estarían presentes de lo contrario entre el material de inclusión y el material metálico del molde no recubierto. El recubrimiento de barrera es un material de nanocapa que está molecularmente unido a una o más superficies del molde. El recubrimiento de barrera es particularmente muy adecuado para mejorar el uso de la cera de parafina como material de inclusión, que muestra una afinidad por muchos tipos diferentes de materiales habitualmente usados para fabricar los moldes. Además, el recubrimiento de barrera resiste la adhesión del material de inclusión al molde, lo que reduce las imperfecciones en las superficies exteriores del material de inclusión endurecido. A causa de la reducción de las imperfecciones, las superficies exteriores del material de inclusión endurecido tienen una textura suave, de tipo vítreo y son más traslúcidas que las superficies exteriores del material de inclusión endurecido producido usando moldes convencionales. Esto es de beneficio en la determinación visual de la totalidad de la infiltración del material de inclusión en la muestra tisular, así como la determinación visual del tamaño y la forma de la muestra tisular que se presentará al borde de corte del instrumento de microtomo.

El molde tiene una cavidad con una pared inferior, paredes laterales y el recubrimiento de barrera unido de forma íntima a las superficies interiores de la pared inferior y las paredes laterales. Las paredes laterales del molde están orientadas en un ángulo respecto a la pared inferior, a veces mencionado como ángulo de desmoldeo para hacer que sea más fácil retirar la muestra tisular incluida una vez se ha endurecido el material de inclusión. Convencionalmente, se usó un ángulo de desmoldeo mayor (por ejemplo, cinco grados) para asegurar la liberación apropiada del material de inclusión después de haberse endurecido y contraído. Sin embargo, el recubrimiento de

barrera de la presente solicitud permite el uso de ángulos de desmoldeo más agresivos (por ejemplo, aproximadamente cero, uno y dos grados) que los moldes convencionales reduciendo el coeficiente de fricción entre el material de inclusión y las superficies de la cavidad del molde, lo que minimiza la adhesión del material de inclusión a las superficies de la cavidad de molde. El coeficiente reducido de fricción hace que el proceso de retirar el material de inclusión endurecido y la muestra tisular en el mismo dependa menos del ángulo de desmoldeo y permite el uso de formas de molde que son impracticables con los moldes convencionales, que requieren un ángulo de desmoldeo para las paredes laterales del molde.

Los ángulos de desmoldeo más agresivos son beneficiosos en algunas aplicaciones porque el bloque endurecido de material de inclusión puede tener una sección transversal a lo largo de las paredes laterales del molde con un ángulo de margen formado por el ángulo de desmoldeo del molde que es más cercano a cero grados que los moldes convencionales, lo que típicamente produce ángulos de margen de sección transversal de varios grados. El ángulo de margen de sección transversal de cero grados del bloque endurecido del material de inclusión produce secciones del bloque endurecido que tienen un ángulo de margen de sección transversal de casi cero grados desde una sección hasta la siguiente según pasa el bloque a través del microtomo. Indicado de forma diferente, un ángulo de desmoldeo de pared lateral de molde menos agresivo, convencional, puede producir una forma piramidal del material de inclusión endurecido (y la muestra tisular en el mismo) con una sección transversal más grande cerca del casete y una sección transversal más pequeña cerca de la pared inferior de la cavidad de molde. Por el contrario, un bloque de material de inclusión endurecido de acuerdo con un ejemplo descrito en este documento puede tener una forma más parecida a una caja con una sección transversal que es sustancialmente igual cerca del casete que cerca de la pared inferior de la cavidad de molde. Esta sección transversal más uniforme puede hacer que la posterior manipulación de las secciones consecutivas de corte de las muestras tisulares cortadas sea más fácil y más precisa, lo que es especialmente beneficioso y ayudará a que las secciones consecutivas se adhieran entre sí y formen una ristra. El efecto de ristra es importante en algunas estrategias para preparar secciones en serie consecutivas que son un requisito rutinario y la mejor práctica.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método que comprende las etapas de la reivindicación 6.

En una realización, el método incluye proporcionar un molde que tiene un recubrimiento de barrera unido al mismo, verter un material de inclusión fundido en el molde y en contacto con el recubrimiento de barrera y colocar una muestra tisular en el material de inclusión. Después se vierte material de inclusión fundido adicional sobre la muestra tisular para rellenar una cavidad del molde. El recubrimiento de barrera tiene una propiedad oleófila que resiste las fuerzas capilares presentes en el material de inclusión. Como el recubrimiento resiste las fuerzas capilares del material de inclusión vertido en el molde, las fuerzas capilares se redirigen de vuelta al material de inclusión que eleva un menisco del material de inclusión que se ha vertido sobre el tejido en el molde. Indicado de forma diferente, la resistencia del recubrimiento de barrera a las fuerzas capilares del material de inclusión produce un menisco positivo que generalmente es convexo y puede coronar hacia fuera por encima de la cavidad del molde. Por el contrario, la parafina vertida en un molde convencional tiene un menisco negativo que se arquea hacia abajo en la cavidad del molde.

A continuación, un casete calentado hasta una temperatura en o por encima del punto de fusión del material de inclusión se introduce en el molde y en contacto con el menisco de coronación hacia fuera del material de inclusión. En la mayoría de los casos, el menisco de coronación hacia fuera proporciona suficiente volumen para llenar las perforaciones en la parte inferior del casete y soldar el casete a la muestra tisular dentro del material de inclusión solidificado después de que el casete se haya introducido en el molde. Esto proporciona un aumento significativo en la eficacia porque el operario o la máquina que realiza la inclusión puede que no necesite verter posteriormente material de inclusión adicional sobre el casete para soldar la muestra tisular al casete. Otra ventaja del menisco de coronación hacia fuera es que el nivel de llenado del molde puede determinarse visualmente más fácilmente por el técnico que con los moldes convencionales, cuyas paredes laterales oscurecen visualmente el menisco negativo de arqueado hacia dentro de los mismos.

En una estrategia alternativa, puede usarse un procedimiento de llenado de un vertido para llenar la cavidad del molde en lugar de llenar parcialmente la cavidad con material de inclusión y colocar la muestra tisular en el material de inclusión. Específicamente, el material de inclusión fundido se vierte en el molde hasta que el menisco positivo del material de inclusión corona hacia fuera desde la cavidad del molde. A continuación, la pared inferior de la cavidad del molde se enfría (tal como usando un riel de refrigeración) para que empiece a solidificar el material de inclusión cerca de la pared inferior de la cavidad. La muestra tisular puede hacerse avanzar en el menisco de coronación hacia arriba a través del material de inclusión aún fundido en el mismo, y colocado sobre el material de inclusión endurecido cerca de la pared inferior de la cavidad. Por tanto, un único vertido del material de inclusión puede ser suficiente para llenar la cavidad y proporcionar suficiente material de inclusión para soldar el casete al material de inclusión.

El método incluye adicionalmente solidificar o endurecer el material de inclusión alrededor de la muestra tisular y su casete acoplado. El material de inclusión solidificado o endurecido se suelda al casete y la muestra tisular incluida en el molde, después se retiran como uno del molde de inclusión. Algunos materiales de inclusión, tales como cera

de parafina, son adherentes o pegajosos cuando se funden y se vuelven menos adherentes según se enfrían y endurecen. El recubrimiento de barrea del molde, como se describe en este documento, inhibe el acoplamiento por fricción del material de inclusión a las superficies del molde desde el momento en que el material de inclusión se vierte en el molde. El recubrimiento oleófilo del molde resiste el material de inclusión adherente y, por lo tanto, reduce el coeficiente de fricción entre el material de inclusión y la cavidad del molde cuando se funde el material de inclusión, se endurece parcialmente y se endurece completamente. Como hay menos acoplamiento por fricción entre el material de inclusión y el molde, un usuario puede extraer el casete soldado en unión a la muestra tisular incluida del molde antes de que el material de inclusión cristalice o se endurezca completamente. Esto proporciona una mejora significativa en la eficacia ya que el usuario no tiene que esperar que el material de inclusión cristalice completamente antes de extraer el casete y la muestra tisular incluida asociada del molde. Por ejemplo, se ha descubierto que este método reduce el tiempo implicado en la preparación de una muestra tisular incluida en aproximadamente un 5 % hasta aproximadamente un 25 % sobre las estrategias tradicionales. Esta mejora acelera el proceso de conseguir un diagnóstico prematuro de la muestra tisular y puede acelerar el tratamiento de un paciente. La eficacia mejorada también es ventajosa en el contexto de máquinas automatizadas para producir muestras tisulares incluidas, donde la reducción del tiempo empleado en endurecer el material de inclusión puede aumentar el rendimiento de la máquina.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** es una vista en perspectiva desde arriba de un casete y molde de inclusión para su uso con el casete;
 La **figura 2A** es una vista lateral esquemática de un molde tradicional con una muestra tisular distribuida en cera de parafina dentro del molde y un menisco negativo de arqueado hacia dentro de la cera de parafina;
 La **figura 2B** es una vista lateral esquemática de un molde que tiene una parte interior con un recubrimiento de barrera unido al mismo, una muestra tisular distribuida en el material de inclusión dentro del molde y un menisco positivo de coronación hacia fuera del material de inclusión;
 La **figura 2C** es una vista en perspectiva desde arriba de un molde que tiene un recubrimiento de barrera similar al molde de la **figura 2B** y muestra un menisco de coronación hacia fuera del material de inclusión;
 La **figura 2D** es una vista lateral esquemática del molde de la **figura 2B** que muestra un casete que se introduce en el molde;
 La **figura 2E** es una vista lateral esquemática del molde de la **figura 2B** que muestra el casete en contacto con el material de inclusión;
 La **figura 3** es una vista lateral esquemática del molde de la **figura 2B** que muestra el material de inclusión que se ha contraído para estar fuera de contacto con las paredes laterales del molde;
 La **figura 4** es una vista lateral esquemática del molde de la **figura 2B** que muestra el casete y la muestra tisular incluida extraídos del molde;
 La **figura 5** es una vista lateral esquemática de otra realización de un molde similar al molde de la **figura 2B** excepto que el molde de la **figura 5** tiene paredes laterales sustancialmente verticales;
 La **figura 6** es una vista lateral esquemática del molde de la **figura 5** que muestra el casete y la muestra tisular incluida, extraídos del molde antes de que el material de inclusión se haya contraído;
 La **figura 7A** es una vista lateral en perspectiva desde arriba de una muestra tisular incluida y la construcción de casete que muestra una parte con forma parcialmente piramidal del material de inclusión endurecido;
 La **figura 7B** es una vista en planta general desde arriba de una muestra tisular incluida y la construcción de casete similar a la **figura 7A** formada usando un molde que tiene un recubrimiento de barrera;
 La **figura 7C** es una vista en planta general desde arriba de una muestra tisular incluida y la construcción de casete similar a la **figura 7B** pero formada usando un molde tradicional, la construcción de la **figura 7C** que tiene una superficie exterior más rugosa y que es menos traslúcida que la construcción de la **figura 7B**;
 La **figura 8** es una vista en perspectiva desde arriba de una muestra tisular incluida y la construcción de casete que muestra una parte con forma generalmente en caja del material de inclusión endurecido;
 La **figura 9** es una vista en perspectiva lateral de la muestra tisular incluida y la construcción de casete de la **figura 8** sujeta en un mandril y que se está cortando por una hoja de microtomo para formar una ristra de secciones tisulares incluidas;
 La **figura 10** es un diagrama de flujo de un método para preparar muestras tisulares para examen histológico;
 La **figura 11** es un diagrama de flujo de un método de procesamiento de muestras tisulares; y
 La **figura 12** es una vista en perspectiva de una máquina para realizar al menos una parte del método de la **figura 11**.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Con referencia a la **figura 1**, se divulga un dispositivo 10 de manipulación de muestras tisulares que tiene un casete 12 y un molde 14 configurado para recibir el casete 12. El molde 14 tiene una cavidad 16 en que se introduce (por ejemplo, se vierte) un material de inclusión fundido, tal como cera de parafina 20 y se inserta una muestra tisular 22 (véase la **figura 2B**). La cavidad 16 tiene paredes laterales 30 y una pared inferior 32 con un recubrimiento de barrera, tal como el recubrimiento 40, unido a las mismas que repele la atracción de la cera de parafina 20 a las paredes laterales 30 y la pared inferior 32. Con referencia a la ilustración esquemática de la **figura 2B**, el molde 14 tiene una parte interior 42 y una parte exterior 44, estando el recubrimiento 40 íntimamente unido con el material del

molde 14 en la parte interior 42. Como el recubrimiento 40 está íntimamente unido a la parte interior 42 del molde, el molde 14 puede usarse para preparar una muestra tisular incluida sin la necesidad de pulverizar un agente de liberación en el molde 14 antes de cada uso (como se hacía en algunas estrategias anteriores). En una forma, el recubrimiento 40 se une tanto a la parte interior como a la parte exterior 42, 44 del molde 14 a través de un proceso que implica pulverizar el molde 14 con el recubrimiento 40 o sumergir el molde 14 en el recubrimiento 40.

El recubrimiento 40 reduce el coeficiente de fricción entre la parafina 20 y la cavidad 16 y permite que el casete 12 y la muestra tisular incluida 22 se extraigan de la cavidad 16 antes de que la parafina 20 se haya endurecido completamente, lo que reduce el tiempo de inactividad durante la producción de la muestra tisular incluida 22. Además, como el coeficiente de fricción se reduce, el recubrimiento 40 reduce la dependencia del uso de ángulos de desmoldeo más grandes para conseguir la liberación de la parafina endurecida 20 del molde 14. El recubrimiento 40, por lo tanto, permite el uso de ángulos de desmoldeo más agresivos y una mayor diversidad de formas de molde.

El recubrimiento 40 se configura para resistir la acción capilar de la parafina 20 una vez que la parafina 20 se ha vertido en el molde 14, como se muestra en la **figura 2B**. Las fuerzas capilares se redirigen de vuelta a la parafina 20 lo que aumenta el menisco 21 de la parafina 20 que se ha vertido sobre la muestra tisular 22 en el molde 14. El menisco 21 corona hacia fuera desde la cavidad 16 del molde y tiene un aspecto generalmente convexo, como se muestra en la **figura 2B**. Por el contrario, un molde tradicional 14A (véase la **figura 2A**) sin el recubrimiento de barrera 40 produce un menisco negativo arqueado hacia dentro de la parafina 20 porque las fuerzas capilares entre la parafina 20 y las superficies del molde 14 tiran de la parafina 20 hacia arriba a lo largo de las superficies interiores del molde 14.

El menisco de coronación hacia fuera 21 produce una parte elevada 23 de la parafina 20 (elevada, en un ejemplo, por encima de la cavidad 16 del molde). El menisco de coronación hacia fuera 21 con la parte elevada 23 de la parafina 20 se sitúa para entrar en contacto y llenar las perforaciones 25 en el casete 12 (véase la **figura 1**) según se introduce el casete 12 en la dirección 27 en el molde 14, como se muestra en las **figuras 2D y 2E**. Por tanto, vertiendo parafina 20 en el molde 14 para elevar la parte 23 de menisco coronado hacia fuera hasta una altura predeterminada dentro del molde 14, el casete 12 puede introducirse en el molde 14 y soldarse a la parafina 20 que se está endureciendo sin la necesidad de verter parafina 20 adicional sobre el casete 12. Esto proporciona un aumento en la eficacia de la preparación de muestras tisulares de inclusión porque el usuario o la máquina que realiza el proceso, puede fijar el casete 12 a la parafina 20 con menos vertidos de parafina 20.

Otra ventaja del molde 14 es que proporciona una captación mejorada de la parafina 20 en el casete 12 cuando el casete 12 se desciende en el molde 14. Más específicamente, el molde 14 tiene una parte de bandeja superior 41 y paredes exteriores 43 rectas de la parte de bandeja superior 41 que forman una cavidad superior 45 con el tamaño adecuado para recibir el casete 12, como se muestra en las **figuras 2B y 2D**. La parte de bandeja superior 41 y las paredes exteriores 43 incluyen la parte interior 42 que tiene el recubrimiento de barrera 40 unido a la misma. Como el recubrimiento de barrera 40 resiste las fuerzas capilares de la parafina 20, las paredes exteriores 43 producen una fuerza de repulsión sobre la parafina 20 en una dirección hacia el centro de la cavidad superior 45 y la parte de bandeja superior 41 produce una fuerza de repulsión sobre la parafina 20 en una dirección hacia arriba desde el molde 14. Estas fuerzas de repulsión se combinan para dirigir la parafina 20 generalmente en la dirección 47 hacia el centro del casete 12, como se muestra en la **figura 2E**. Esto mejora la captación de la parafina 20 dirigiendo la parafina 20 hacia las perforaciones 25 en el centro del casete 12 y desde el área entre las paredes exteriores rectas 43 del molde y las secciones de pared lateral 49 no perforadas del casete 12 (véase la **figura 1**).

El molde 14 también proporciona resistencia mejorada a derrame de la parafina 20 cuando el casete 12 se introduce en el molde 14. Con referencia a las **figuras 2D y 2E**, la inserción del casete 12 descendiendo en el molde 14 aumenta la presión hidráulica sobre la parafina 20. La parafina 20 tiende a tomar una trayectoria de mínima resistencia en respuesta al aumento en la presión hidráulica. Por ejemplo, la parafina 20 puede fluir hacia las áreas del casete 12 y el molde 14 donde las fuerzas capilares entre la parafina 20 y el casete 12 o el molde 14 son máximas. Por tanto, las perforaciones relativamente pequeñas 25 del casete 12 y el material del casete 12 producen fuerzas capilares con la parafina 20 que extrae la parafina 20 hacia arriba en las perforaciones 25 del casete.

El aumento en la presión hidráulica causado por el descenso del casete 12 en el molde 14 también tiende a dirigir la parafina 20 cerca de las paredes exteriores 43 hacia arriba en un hueco 51 (véase la **figura 2E**) entre el casete 12 y las paredes exteriores 43. En moldes convencionales tales como el molde 14A, esta presión hidráulica dirige la parafina 20 hacia arriba a través del hueco 51 y causa que la parafina 20 se derrame de los laterales del molde 14A si hay suficiente parafina 20 presente en el molde 14. Un aumento en la presión hidráulica en la parafina 20 causado por el descenso del casete 12 en el molde 14, en combinación con las fuerzas capilares entre el casete 12, el molde 14 y la parafina 20 en el hueco 51, extrae la parafina 20 hacia arriba en el hueco 51 en el molde convencional 14A y causa que la parafina 20 se derrame de los laterales del molde 14A.

Sin embargo, el molde 14 como se describe en este documento que tiene paredes exteriores 43 y el recubrimiento de barrera 40 posee propiedades oleóforas y/o hidróforas que aplican una fuerza de repulsión sobre la parafina 20 hacia el centro de la cavidad superior 45, como se analiza anteriormente. Esta acción resiste el flujo de la parafina 20 en y a lo largo del hueco 51 y en su lugar dirige el flujo hacia dentro hacia las perforaciones 25 del casete.

Además, el recubrimiento de barrera 40 reduce las fuerzas capilares producidas entre el molde 14 y la parafina 20 dentro del hueco 51. Esto aumenta la resistencia la parafina 20 que viaja hacia arriba a través del hueco 51 (reduciendo las fuerzas capilares) y derramando hacia fuera del molde 14 tras descender el casete 12 en el molde 14 de modo que la parafina 20 en su lugar se extraiga en las perforaciones 25 del casete 12. Por tanto, el molde 14 resiste el derrame de la parafina 20 cuando el casete 12 se introduce en el molde 14 y mejora la facilidad de uso del molde 14.

Otra ventaja más del menisco de coronación 21 hacia fuera o positivo es que mejora la facilidad y precisión de juzgar visualmente cuando el molde 14 se ha llenado suficientemente con parafina 20. Esto es contrario a los moldes convencionales 14A, donde las paredes del molde pueden oscurecer visualmente el menisco de arqueado hacia dentro de la parafina 20.

El molde 14 se fabrica preferiblemente de un material de acero inoxidable pulido, aunque pueden usarse otros materiales, tales como uno o más metales, aleaciones, cerámicas y plásticos. El recubrimiento 40 se une permanentemente al molde 14, tiene propiedades oleóforas y/o hidróforas y retiene sus propiedades resistentes a la parafina a través de muchos usos del molde 14. El recubrimiento 40 tiene una energía superficial que resiste las fuerzas capilares en la parafina 20, redirige las fuerzas capilares de vuelta a la parafina 20 e inhibe que la parafina 20 se una con el material del molde 14. La energía superficial del recubrimiento 40 se consigue mediante la aplicación de una molécula a nanoescala que crea una unión molecular permanente al molde 14.

El recubrimiento 40 puede producirse con varias formulaciones diferentes, incluyendo diferentes composiciones y tamaños de nanopartícula. El recubrimiento 40 puede incluir vidriado fusionado (por ejemplo, sílice/vidrio), fluorocarbonos orgánicos fusionados y líquidos (es decir, silicona y teflón) y materiales oleóforos que poseen una energía superficial que rechaza una diversidad de moléculas de materiales animales, vegetales, químicos orgánicos y de hidrocarburos petroquímicos.

El recubrimiento 40 puede aplicarse al molde 14 pulverizando una o más superficies del molde 14 con el recubrimiento 40. En otra estrategia el molde 14 se sumerge en un recipiente en el que se ha distribuido el recubrimiento de barrera 40 líquido. Cuando se realiza la inmersión, el material de recubrimiento se ve atraído por unión molecular al molde 14 y el exceso de material de recubrimiento, es decir, el material que no se ha unido al molde 14, cae del molde 14 según se extrae del material de recubrimiento. El molde completo 14 puede sumergirse en el material de recubrimiento líquido de modo que todas las superficies del mismo se cubran con el material de recubrimiento.

En una forma, el recubrimiento 40 es un tratamiento a nanoescala proporcionado por Aculon, Inc. El tratamiento a nanoescala utiliza películas de nanoescala muy ordenadas llamadas monocapas autoensambladas de fosfatos (SAMP). El recubrimiento 40 puede incluir uno o más componentes, tales como un primer material que proporciona las propiedades oleóforas y/o hidróforas y un segundo material que ceba el molde 14 para la unión con el primer material.

Con referencia a la **figura 2E**, el dispositivo 10 de manipulación de muestras tisulares se muestra inmediatamente después de haber colocado la muestra tisular 22 en la cavidad 16, de haber vertido la parafina 20 fundida sobre la muestra tisular 22 y de haber colocado el casete 12 en el molde 14.

Las paredes laterales 30 de la cavidad del molde se prolongan a un ángulo de desmoldeo 50 respecto a una proyección perpendicular desde una pared inferior de la cavidad 16 (como se ilustra, un eje vertical 52 de la cavidad 16). Según se enfría la parafina 20, se endurece en una parte 60 con forma generalmente de bloque y el volumen de la parafina 20 disminuye en aproximadamente un 8 %, como se muestra en la **figura 3**. La disminución en el volumen de la parafina 20 causa que las superficies laterales 62 de la parte 60 de bloque de cera endurecida se separen de las superficies interiores 64 de las paredes laterales 30 de la cavidad hasta una orientación en la que hay un ángulo de separación 66 entre las superficies laterales 62 de la parte de bloque de cera y las superficies interiores 64 de la pared lateral de la cavidad, como se muestra en la **figura 3**.

El casete 12, entonces puede elevarse en la dirección 70 desde el molde 14 lo que extrae la parte 60 de bloque de cera endurecida y la muestra tisular 22 incluida en el mismo desde la cavidad 16, como se muestra en la **figura 4**. Como el recubrimiento 40 está íntimamente unido a la parte interior 42 del molde 14, el molde 14 puede reutilizarse para preparar otra muestra tisular 22 incluida sin la necesidad de aplicar un agente de liberación, como en algunas estrategias anteriores.

Con referencia a las **figuras 5 y 6**, se muestra otro dispositivo 100 de manipulación de muestras tisulares que es sustancialmente similar al dispositivo 10 de manipulación de muestras tisulares analizado anteriormente. El dispositivo 100 incluye un casete 102 y un molde 104 para recibir una muestra tisular 106 y la cera de parafina 20. El molde 104 tiene una pared inferior 110 y paredes laterales 112 rectas desde la pared inferior 110 a un ángulo incluido 113 respecto a la pared inferior 110. El ángulo 113 puede estar en el intervalo de por ejemplo, aproximadamente noventa a aproximadamente noventa y dos grados. Estas orientaciones de las paredes laterales 112 proporcionan ángulos de desmoldeo del molde en el intervalo de aproximadamente cero a aproximadamente

dos grados, que son más agresivos que los diseños convencionales. Como el molde 14, el molde 104 tiene una parte interior 120 con el recubrimiento 40 unido íntimamente al material del molde 104. El molde 104 también tiene una parte exterior 122 opuesta a la parte interior 120, estando unido el recubrimiento 40 a la parte exterior 122 en algunas estrategias.

Como se muestra en la **figura 6**, el molde 104 tiene las paredes laterales 112 orientadas a un ángulo de desmoldeo más agresivo que las paredes laterales 30 del molde 14, que tienen ángulos de desmoldeo similares a los moldes convencionales. Las paredes laterales 112 producen una orientación más perpendicular de las superficies laterales e inferior 130, 132 de una parte 134 con forma de bloque de la parafina 20 endurecida. Esto causa que la parte 134 de bloque tenga una forma más parecida a una caja que la parte 60 de bloque formada por el molde 14 (y moldes convencionales que tienen ángulos de desmoldeo similares), como se muestra en las **figuras 7A y 8**. El ángulo de desmoldeo más agresivo del molde 104, y la forma cúbica resultante de la parte 134 de bloque, proporciona una sección transversal más uniforme de la parte 134 de bloque a lo largo de una longitud 140 de la parte 134 de bloque (o que se mide a lo largo de la pared lateral 112 del molde). La sección transversal más uniforme de la parte de bloque 134 produce secciones 142 de bloque de muestras tisulares incluidas de tamaño más uniforme según la parte 134 de bloque se corta por un microtomo 145 en secciones consecutivas 142, como se muestra en la **figura 9**. Estas secciones 142 de bloque de muestras tisulares incluidas de tamaño más uniforme pueden manipularse más fácilmente que las partes de muestra tisular incluidas producidas por el seccionamiento de la parte 60 de bloque de parafina producida por el molde 14.

Más específicamente, las superficies laterales 130 de la parte 134 de bloque de parafina producidas por el molde 104 generalmente son ortogonales a una superficie inferior 150 del casete 102, mientras que las paredes laterales 62 de la parte 60 de bloque de parafina producidas por el molde 104 están orientadas de forma más oblicua a su superficie inferior 152 del casete respectivo, como se muestra en las **figuras 7A y 8**. Por tanto, cuando la parte 60 de bloque (o partes de bloque de material de inclusión producido usando un molde convencional) se secciona, las secciones del bloque cortado desde una parte 160 final anterior tendrán un área de sección transversal más grande que las secciones del bloque cortado a partir de una parte final posterior 162 (véase la **figura 7A**). Por el contrario, las secciones 142 de bloque de muestras tisulares incluidas producidas usando el molde 104 tendrán un área de sección transversal sustancialmente uniforme en toda la parte 134 de bloque, como se muestra en la **figura 9**. El área de sección transversal más uniforme de las secciones 142 de bloque de muestras tisulares incluidas permite que una maquinaria automatizada manipule las secciones 142 para utilizar tolerancias más ajustadas porque la maquinaria tiene que acomodar menos variación en las secciones 142. Por tanto, la combinación del recubrimiento 40 que se une íntimamente con la parte interior 120 del molde 104 y el uso de ángulos de desmoldeo más agresivos, que pueden usarse a causa del recubrimiento 40, mejora la uniformidad de las secciones 142 de muestras tisulares incluidas seccionadas y puede mejorar las tolerancias en todo el procesamiento posterior de las secciones de muestras tisulares incluidas.

Otra ventaja proporcionada por el molde 104 es la "formación de ristas" mejorada o la adhesión por impacto de las secciones 142 una vez que las secciones 142 han salido de la máquina de microtomo 145, como se muestra en la **figura 9**. Indicado de manera diferente el molde 104 mejora la capacidad de las secciones 142 de adherirse entre sí después del seccionamiento. Se ha descubierto que la adhesión de una sección 142 a la siguiente es una función del impacto y las geometrías superficiales de la superficie cortada exterior de una sección 142 contra la siguiente sección 142. Cuanto más perpendicular o cuadrada sea la orientación relativa de las superficies laterales e inferior 130, 132 de la parte 134 de bloque, mayor será el área de contacto y más perfecta será la soldadura por impacto de las superficies planas de acoplamiento 172, 174 de las secciones 142 después de que las secciones 142 hayan salido de la máquina de microtomo 145 (véase la **figura 9**). Esto proporciona la geometría óptima para que las superficies 172, 174 se adhieran juntas y las secciones 142 formen una ristra 147 después del seccionamiento de la parte 134 de bloque.

Una ventaja compartida por ambos moldes 14, 104 es que las esquinas 144, 161 de las partes 60, 134 de bloque de parafina pueden hacerse con radios más pequeños de curvatura que los moldes convencionales (véanse las **figuras 7A y 8**). Mientras que los moldes convencionales pueden usar radios en el intervalo de 5-10 mm para facilitar la liberación de la cera de parafina, los moldes 14, 104 pueden utilizar esquinas que tienen radios en el intervalo de aproximadamente 2-3 mm porque el recubrimiento de barrera 40 hace que la liberación de la parafina 20 endurecida dependa menos del rendimiento de la parafina 20. Los radios más pequeños de la curvatura de esquinas permitidos por los moldes 14, 104 también hace que la manipulación posterior al microtomo de las muestras tisulares incluidas sea más fácil porque la parafina 170 endurecida adyacente (véase la **figura 9**) es más rectangular y tiene esquinas más cuadradas que las estrategias convencionales.

Otro beneficio de los moldes 14, 104 es que el recubrimiento de barrera 40 resiste la adhesión de la parafina 20 a los moldes 14, 104. Esta reducción en la adhesión produce una estructura cristalina más pequeña de la parafina 20 endurecida de modo que las superficies exteriores tienen una textura suave de tipo vítreo y son más traslúcidas que las superficies exteriores de la parafina 20 producida usando moldes tradicionales. Por ejemplo y con referencia a las **figuras 7B y 7C**, se muestran dos muestras de parafina endurecida 180, 182. La muestra endurecida 180 se formó usando un molde que tiene un recubrimiento de barrera de acuerdo con la divulgación de este documento mientras que la muestra endurecida 182 se formó usando un molde tradicional. Como se muestra en la **figura 7B**, la

muestra endurecida 180 tiene superficies exteriores 184 con una textura más suave que las superficies exteriores 186 de la muestra endurecida 182. Además, como las superficies exteriores 184 tienen menos imperfecciones, las superficies exteriores 184 son más traslúcidas que las superficies exteriores 186. La traslucidez aumentada de las superficies exteriores 184 permite que las características de un objeto incluido 188, tal como una muestra tisular, se observen visualmente más claramente que un objeto incluido 190 en la muestra endurecida 182. Esto es de beneficio en la determinación visual de la totalidad de la infiltración del material de inclusión en la muestra tisular, así como la determinación visual del tamaño y la forma de la muestra tisular que se presentará al borde de corte de la máquina de microtomo 145 (véase la **figura 9**).

Con referencia a la **figura 10**, se proporciona un método 200 de preparación de una muestra tisular para examen histológico con referencia al dispositivo 10 de las **figuras 1-4**. El método 200 empieza proporcionando al molde 14 el recubrimiento 40 (bloque 202). El molde 14 con el recubrimiento 40 puede fabricarse de forma externa y transportarse a un laboratorio de modo que el molde 14 simplemente se retire del almacenamiento y se use en el método 200.

El material de inclusión fundido, tal como cera de parafina 20, se vierte en el molde 14 y en contacto con el recubrimiento 40 unido a la parte interior 42 del molde 14 (bloque 204). En una estrategia, el vertido implica llenar solamente una parte de la cavidad 16, tal como un cuarto o un octavo de su volumen para colocar una sección de la cera 20 entre la muestra tisular 22 y una superficie interior de la pared inferior 32 del molde (véase la **figura 2D**). La parafina 20 puede verse desde un vaso de precipitados o depósito de distribución y en la cavidad 16 por un técnico de laboratorio. En otra estrategia, puede usarse un dispositivo de distribución para distribuir una cantidad medida de parafina 20 fundida en el molde 14.

La parafina 20 que se ha vertido en el molde 14 opcionalmente se endurece (bloque 206). El endurecimiento puede conseguirse simplemente esperando a que la cera de parafina 20 se enfríe hasta la temperatura ambiente. Como alternativa, puede usarse otro mecanismo tal como un riel o placa de refrigeración dispuesta por debajo de la pared inferior 32 del molde para enfriar la parafina 20.

El método 200 incluye adicionalmente proporcionar la muestra tisular 22 y el casete 12 (bloque 212). Proporcionar la muestra tisular 22 puede implicar el tratamiento del tejido con uno o más fluidos incluyendo etanol, sileno, formaldehído y agua para preparar la muestra tisular 20 para su procesamiento posterior. El casete 12 proporcionado se selecciona preferiblemente para que coopere con el molde 14 y sea adecuado para su uso en la manipulación de la muestra tisular 22.

A continuación, la muestra tisular 22 se coloca en la parafina 20 dentro de la cavidad 16 del molde (bloque 220). Colocar la muestra tisular 22 incluye hacer avanzar la muestra tisular 22 en la cavidad 16 y en la parafina 20 previamente vertida en el bloque 204. Si la parafina 20 se ha enfriado y endurecido parcialmente, la tensión superficial de la parafina 20 aceptará y capturará el peso de la muestra tisular 22. En una estrategia, la muestra tisular 22 puede colocarse de forma manual, por ejemplo, usando fórceps o se ha colocado dentro de casetes únicos asociados con un mecanismo automatizado.

Se vierte una cantidad de parafina 20 en el molde 14 sobre la muestra tisular 22, tal como desde un vaso de precipitados o depósito de distribución (bloque 222). Como se analiza anteriormente, el recubrimiento de barrera 40 del molde 14 redirige las fuerzas capilares dentro de la parafina 20 de vuelta a la parafina 20 y produce un menisco positivo de coronación hacia fuera 21 de la parafina 20 (véase la **figura 2A**). La cantidad de parafina 20 vertida en el bloque 222 es preferiblemente una cantidad suficiente para colocar la parte elevada 23 de la parafina 20 a una altura dentro del molde 14 donde la parte elevada 23 llenará las perforaciones 25 en el casete 12 cuando el casete 12 se introduce en el molde 14. Por tanto, un único vertido en el bloque 222 de parafina 20 puede ser suficiente para proporcionar suficiente material de parafina 20 para soldar la parafina 20 (y la muestra 22 en la misma) al casete 12, en lugar de necesitar un vertido posterior de parafina 20 adicional sobre el casete 12 como en las estrategias tradicionales.

En una estrategia alternativa, se vierte una cantidad suficiente de parafina 20 en la cavidad 16 del molde en la etapa 204 para producir un menisco positivo de coronación hacia fuera 21. La muestra tisular 22 se coloca 220 haciendo avanzar la muestra 22 a través de la parafina 20 y sobre una parte de la parafina 20 cerca de la pared inferior 32 de la cavidad, que se ha endurecido en el bloque 206. El casete 12 después se coloca en el molde 14 y en contacto con la parafina 20 (bloque 224).

En el bloque 224, el casete 12 se coloca en el molde 14 de modo que el casete 12 entra en contacto con la parafina 20. La parte elevada 23 de coronación hacia fuera de la parafina 20 llena las perforaciones 25 del casete y empieza a soldar la parafina 20 al casete 12. En un ejemplo, el menisco 21 tiene un volumen suficiente para iniciar un flujo lateral de la parafina cuando acopla con un suelo o base de un casete (casete 12) que se calienta opcionalmente hasta una temperatura por encima del punto de fusión de la parafina. El volumen acoplado del menisco, con las fuerzas capilares entre el suelo exterior del casete calentado, y la atracción física de las aberturas en el suelo del casete tienden a dirigir la parafina de forma lateral y hacia arriba en las aberturas del suelo del casete. La fuerza lateral y hacia arriba de atracción (parafina a parafina) es una acción positiva. Se cree que el volumen de menisco

que se produce por la energía superficial del recubrimiento/superficie oleófila del molde proporciona la fuerza para aproximar el casete aplicado donde múltiples aberturas de diámetro pequeño llevan el flujo hacia arriba debido a las fuerzas capilares para llenar el hueco de las aberturas. Opcionalmente, después puede verse parafina 20 adicional sobre el casete 12 para añadir parafina 20 adicional y potenciar la conexión de la parafina 20 al casete 12 una vez se ha endurecido la parafina 20.

El método 200 incluye adicionalmente el endurecimiento de la parafina 20 para incluir la muestra tisular 22 en la parafina 20 y fijar la muestra tisular 22 al casete 12 (bloque 230). El endurecimiento de la parafina 20 forma un tejido incluido y la construcción de casete (véase la **figura 7A**) y endurece al menos una parte de la parafina 20. Se apreciará que el endurecimiento de la parafina 20 puede abarcar el endurecimiento de un intervalo de cantidades de parafina, incluyendo una pequeña cantidad de parafina 20, una mayoría de la parafina 20 y sustancialmente toda la parafina 20. Cuando se endurece menos de la totalidad de la parafina 20, algunas de las partes centrales de la parafina pueden permanecer fundidas durante un corto periodo de tiempo, pero finalmente se endurecerán para permitir el seccionamiento posterior por un microtomo.

El endurecimiento de la parafina 20 puede implicar el enfriamiento de la parafina 20 desde una temperatura elevada hasta una temperatura inferior. El proceso de endurecimiento puede conseguirse, por ejemplo, permitiendo de forma pasiva que la parafina 20 se enfríe desde una temperatura elevada hasta una temperatura ambiente. En otra estrategia, puede realizarse una operación de refrigeración activa tal como colocando la pared inferior 32 de la cavidad del molde en un riel de refrigeración para enfriar la parafina 22 mediante su conducción a través de la pared inferior 32. Cuando se enfría, la parafina capturada dentro del casete aplicado proporciona el elemento de fuerte retención de fijación para que la parafina moldee el casete portador.

A continuación, la muestra tisular incluida 22 y el casete 12 se extraen del molde 16 (bloque 234). Como se analiza anteriormente, el recubrimiento 40 reduce el acoplamiento por fricción de la parafina 20 con las superficies recubiertas interiores de la cavidad 16 del molde de modo que el tejido incluido y la construcción de casete puedan extraerse de la cavidad 16 del molde antes de que la parafina 20 se haya enfriado completamente y mientras la parafina 20 es semisólida. El acoplamiento por fricción reducido permite, que la parafina 20, que aún puede ser algo pegajosa, se retire de la cavidad 16 del molde, aunque la región central de la parafina 20 aún pueda estar fundida. De esta manera, el tiempo empleado en el endurecimiento de la parafina 20 puede reducirse en aproximadamente un cinco por ciento hasta aproximadamente un veinticinco por ciento sobre las estrategias convencionales (donde la cera de parafina se enfría completamente antes de extraer la muestra tisular incluida de la cavidad del molde). El tiempo reducido empleado en el endurecimiento de la parafina 20 mejora la tasa de producción de muestras tisulares incluidas.

La muestra tisular incluida 22 entonces se corta en secciones para montarse en portaobjetos de vidrio y teñirse para su posterior examen histológico (bloque 236). El corte puede realizarse usando un microtomo 145, como se muestra en la **figura 9**.

Con referencia a las **figuras 11 y 12**, se proporciona un método para preparar muestras tisulares incluidas usando una máquina de procesamiento de muestras tisulares automatizado 400. El método incluye una parte del método que puede realizarse de una manera sustancialmente automatizada una vez que la máquina 400 se ha configurado apropiadamente y se le han proporcionado los suministros necesarios. Se apreciará que muchos aspectos del método 300 son similares a los procesos del método 200 de modo que se omitirá por motivos de brevedad un análisis detallado de estos aspectos.

La máquina 400 recibe muestras tisulares en casetes o cápsulas (bloque 304). Hay una gran diversidad de casetes o cápsulas que se han desarrollado para preparar muestras tisulares para examen histológico, y se contempla que se selecciona un molde y un casete, tal como el molde 14 y el casete 12, de acuerdo con, por ejemplo, el tamaño de la muestra tisular, el tipo de muestra tisular, el tipo de ensayo a realizar y el microtomo a usar.

La máquina 400 opcionalmente puede detectar una o más propiedades de los casetes (o cápsulas si se usan) (bloque 306). La máquina puede tener un detector interior 404 que está configurado y dispuesto para detectar los casetes recibidos por la máquina 400. Como un ejemplo a este respecto, los casetes podrían albergar cada uno un código óptico (tal como, aunque sin limitación, un código de barras o similar) que identifica el casete (tal como su forma, tamaño, localización de la muestra tisular recibida en el mismo, etc.) y el detector 404 puede incluir un lector de códigos ópticos que está configurado y dispuesto para escanear el código óptico del cartucho. Como otro ejemplo, el detector 404 podría incluir un dispositivo de captura de imágenes, tal como una cámara digital, que funciona con el hardware y el software de la máquina 400 para identificar los casetes que se reciben por la máquina 400. Como una estrategia alternativa, un usuario introduce información en la interfaz del usuario 402 (véase la **figura 11**) que se refiere a una o más propiedades de los casetes que se están cargando en la máquina 400. La máquina también podría conectarse a una red y recibir información respecto a los casetes desde un ordenador remoto, tal como un puesto de trabajo.

Se hayan determinado o no las una o más propiedades usando el detector 404 de la máquina, la información obtenida de la interfaz del usuario 402, una combinación de ambas u otra estrategia, el método 300 incluye

adicionalmente determinar los tipos de casete recibidos por la máquina 400 (bloque 308).

A continuación, los casetes se asocian con moldes que corresponden a los casetes basándose al menos en parte en la determinación de los tipos de casetes presentes en la máquina 400 (bloque 310). Los moldes tienen recubrimientos de barrera, tales como el recubrimiento 40, unidos íntimamente con una o más superficies de los moldes. Los recubrimientos de barrera pueden ser diferentes para diferentes tipos de moldes y sus casetes asociados. Los moldes pueden almacenarse dentro de la máquina 400 o, como otro ejemplo, pueden cargarse en la máquina 400 simultáneamente con los casetes.

10 La máquina 400 entonces distribuye el material de inclusión, tal como cera de parafina 20, en los moldes (bloque 312). La cantidad de material de inclusión distribuido puede basarse, en parte, en los tipos de casete determinados y los moldes asociados con los casetes.

15 La máquina 400 coloca los casetes en los moldes asociados y el material de inclusión se endurece (bloque 314 y bloque 316). Los moldes tienen recubrimientos de barrera, tales como el recubrimiento 40 analizado anteriormente, que reducen el coeficiente de fricción entre el material de inclusión y los moldes. El endurecimiento del material de inclusión, por lo tanto, puede abarcar el endurecimiento de menos de la totalidad del material de inclusión para cada molde, como se analiza anteriormente con respecto al método 200.

20 El método 300 incluye la extracción de las muestras tisulares incluidas de los moldes (bloque 318). La extracción de las muestras tisulares incluidas puede incluir retirar las muestras tisulares incluidas antes de que el material de inclusión se hay endurecido completamente. Por ejemplo, las muestras tisulares incluidas dentro de la cera de parafina pueden retirarse mientras una parte central de la parafina aún está semifundida y blanda. Los recubrimientos de barrera de los moldes permiten esta extracción acelerada de la muestra tisular incluida a causa del acoplamiento por fricción disminuido entre el material de inclusión y los moldes. Esta disminución en el tiempo empleado en el endurecimiento del material de inclusión puede aumentar el rendimiento de la máquina 400 reduciendo el tiempo empleado en el endurecimiento de las muestras tisulares incluidas dentro de los moldes.

30 Finalmente, el método 300 incluye la salida de las muestras tisulares incluidas (bloque 320). En una forma, las muestras tisulares incluidas podrían sacarse de la máquina 400 y después extraerse de los moldes. La muestra tisular incluida entonces puede transferirse a una máquina de microtomo para el seccionamiento.

Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones particulares de la presente invención, se apreciará que a los expertos en la materia se les pueden ocurrir numerosos cambios y modificaciones, y se pretende que todos esos cambios y modificaciones estén dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, aunque los métodos detallados anteriormente se describen usando un casete, los métodos pueden usarse con cápsulas u otros dispositivos para contener o mantener muestras tisulares. Como otro ejemplo, las operaciones del método analizadas anteriormente pueden reordenarse, combinarse, eliminarse y modificarse según se desee para una aplicación particular.

40

REIVINDICACIONES

1. Un molde de inclusión tisular (14, 104) que comprende una pared inferior (32, 110) y paredes laterales (30, 112) que definen un volumen interior y un recubrimiento de material resistente a parafina (40) sobre una parte de la pared inferior (32, 110) y las paredes laterales (30, 112), comprendiendo el material resistente a la parafina una monocapa autoensamblada de fosfatos.
2. El molde de inclusión tisular (14, 104) de la reivindicación 1, donde el material resistente a la parafina comprende un material oleóforo.
3. El molde de inclusión tisular (14, 104) de la reivindicación 1, donde las paredes laterales (30, 112) comprenden paredes laterales principales y la pared inferior (32, 110) comprende una pared inferior principal y comprende una cavidad que incluye paredes laterales secundarias y una pared inferior secundaria que definen un plano diferente a al plano de la pared inferior principal.
4. El molde de inclusión tisular (14, 104) de la reivindicación 3, donde las paredes laterales secundarias se prolongan a un ángulo de desmoldeo de 0 grados a 2 grados respecto a la proyección perpendicular de la pared inferior secundaria.
5. El molde de inclusión tisular (14, 104) de la reivindicación 3, donde el material resistente a la parafina se recubre sobre las paredes laterales secundarias y la pared inferior secundaria.
6. Un método que comprende:
 - introducir un material de inclusión (20) en un molde (14, 104) que comprende una pared inferior (32, 110) y paredes laterales (30, 112) que definen un volumen interior, donde el molde (14, 104) comprende un recubrimiento de material resistente a la parafina (40) sobre una parte de la pared inferior (32, 110) y las paredes laterales (30, 112), comprendiendo el material resistente a la parafina una monocapa autoensamblada de fosfatos; e
 - insertar una muestra tisular (22, 106) en el material de inclusión (20).
7. El método de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente insertar un casete (12, 102) en el material de inclusión (20).
8. El método de la reivindicación 7, donde la inserción de un casete (12, 102) sigue a la etapa de inserción de la muestra tisular (22, 106) y la introducción del material de inclusión (20) comprende introducir una cantidad de material de inclusión (20) de modo que el casete (12, 102) se suelde al material de inclusión (20) sin la necesidad de introducir material de inclusión (20) adicional.
9. El método de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente retirar el material de inclusión (20) del molde (14, 104).
10. El método de la reivindicación 9, donde el material de inclusión (20) tiene una propiedad de endurecerse hasta un sólido después de su introducción en el molde (14, 104) y el método comprende retirar el material de inclusión (20) del molde (14, 104) antes de que se endurezca en un sólido.
11. Un método de preparación de un molde de inclusión tisular (14, 104) que comprende recubrir una parte de una pared inferior (32, 110) y las paredes laterales (30, 112) que definen un volumen interior con un material resistente a la parafina, comprendiendo el material resistente a la parafina una monocapa autoensamblada de fosfatos.
12. El método de la reivindicación 11, donde las paredes laterales (30, 112) comprenden paredes laterales principales y la pared inferior (32, 110) comprende una pared inferior principal y comprende una cavidad que incluye las paredes laterales secundarias y una pared inferior secundaria que define un plano diferente al plano de la pared inferior principal.
13. El método de la reivindicación 12, donde las paredes laterales secundarias se prolongan a un ángulo de desmoldeo de 0 grados a 2 grados respecto a una proyección perpendicular desde la pared inferior secundaria.
14. El método de la reivindicación 12, donde el material resistente a la parafina se recubre sobre las paredes laterales secundarias y la pared inferior secundaria.
15. El método de la reivindicación 11, donde el material resistente a la parafina comprende un material oleóforo.

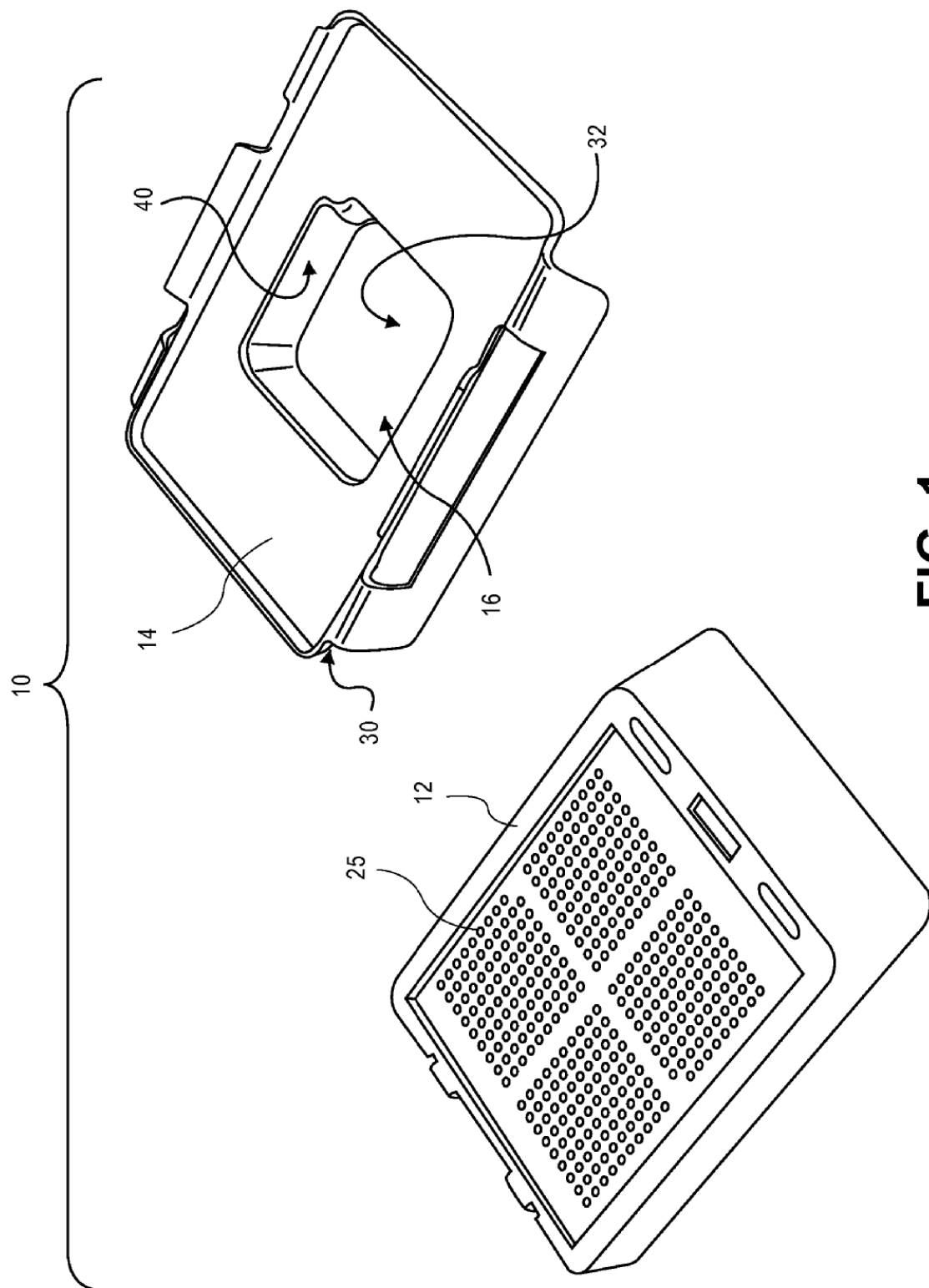


FIG. 1

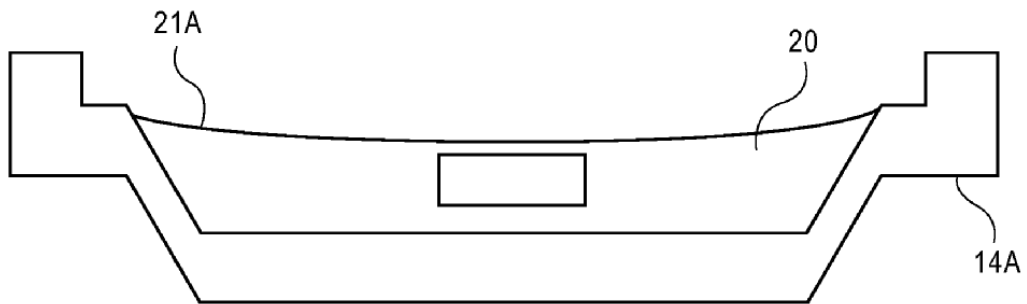


FIG. 2A
(TÉCNICA ANTERIOR)

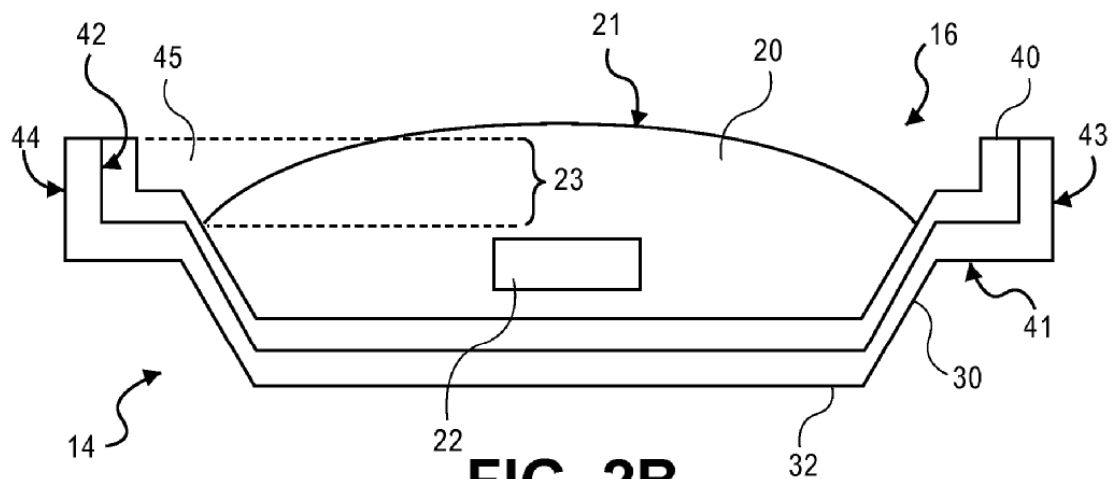


FIG. 2B

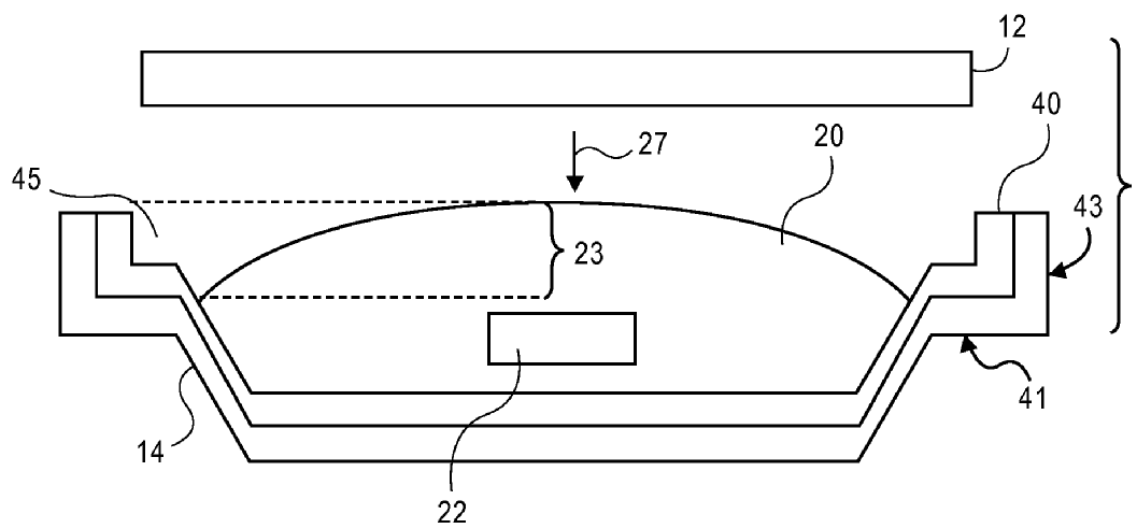


FIG. 2D

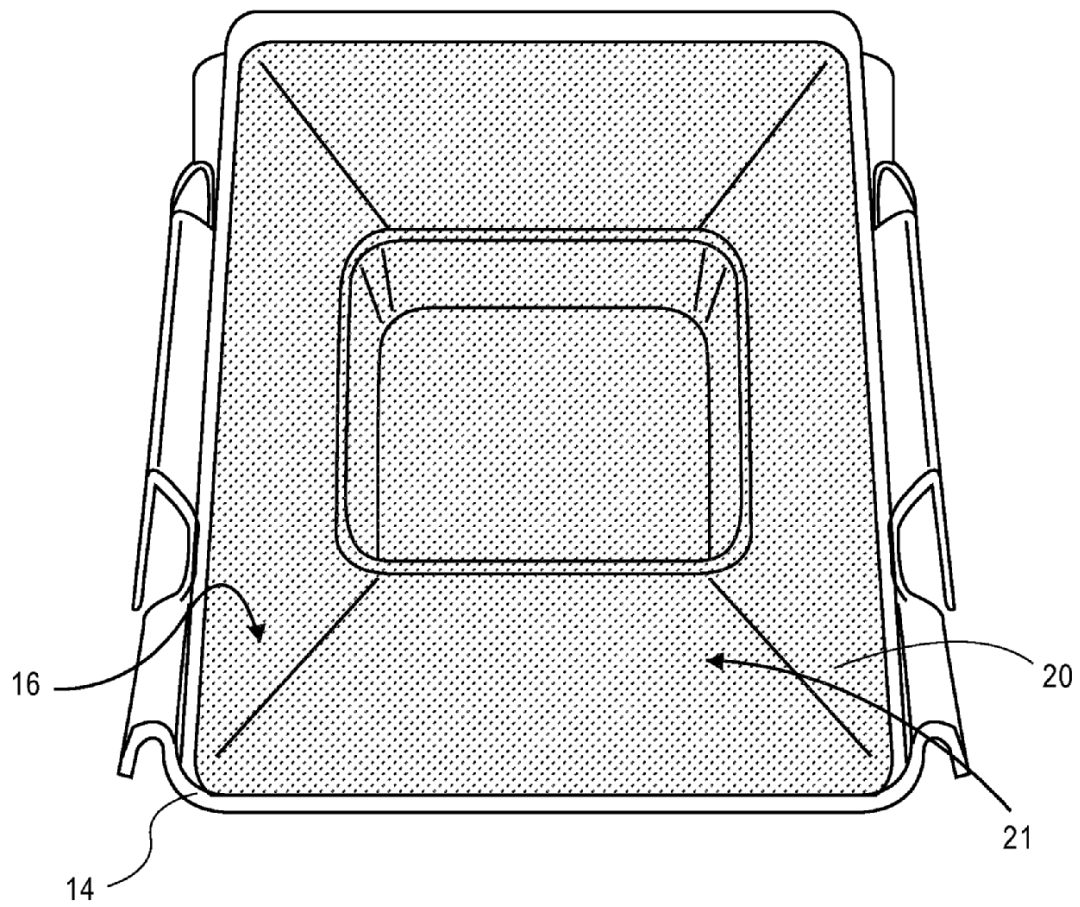


FIG. 2C

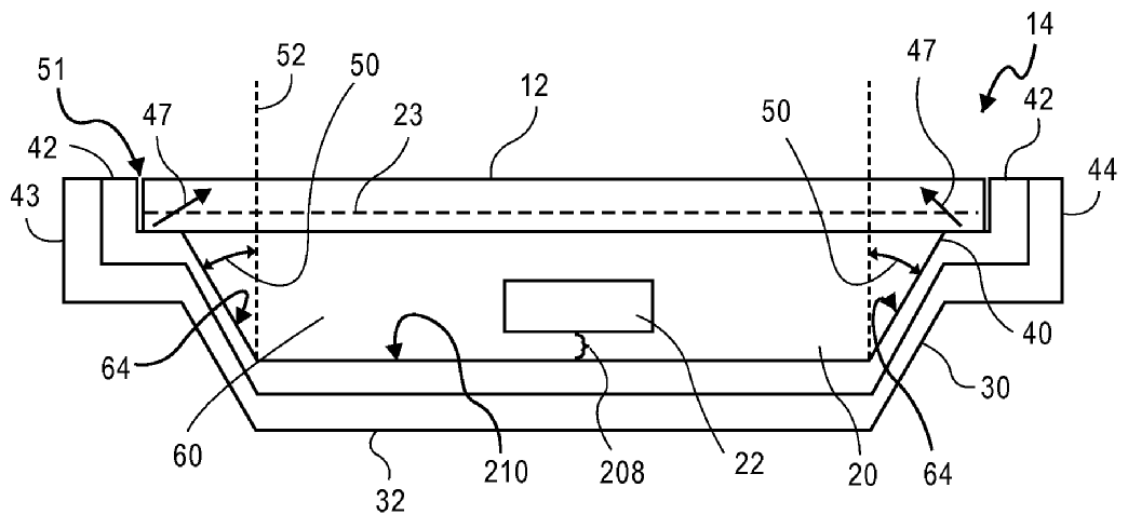


FIG. 2E

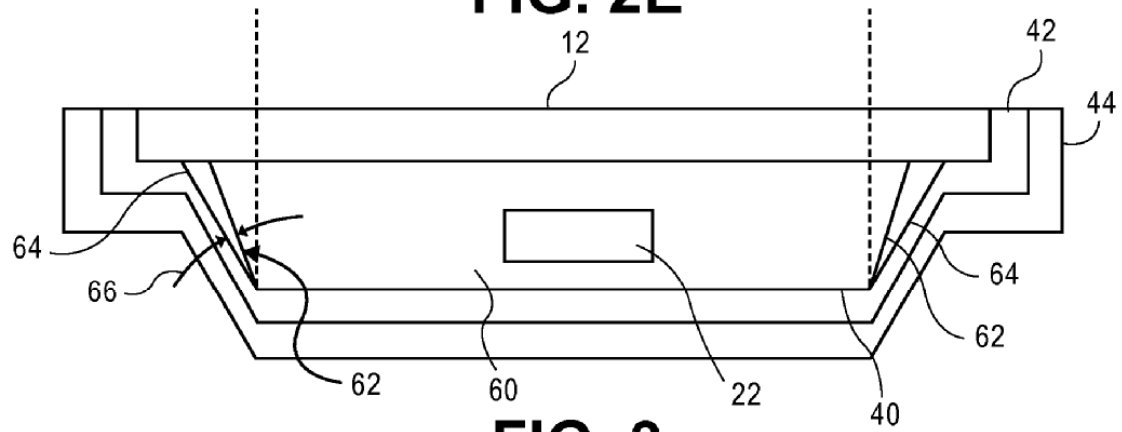


FIG. 3

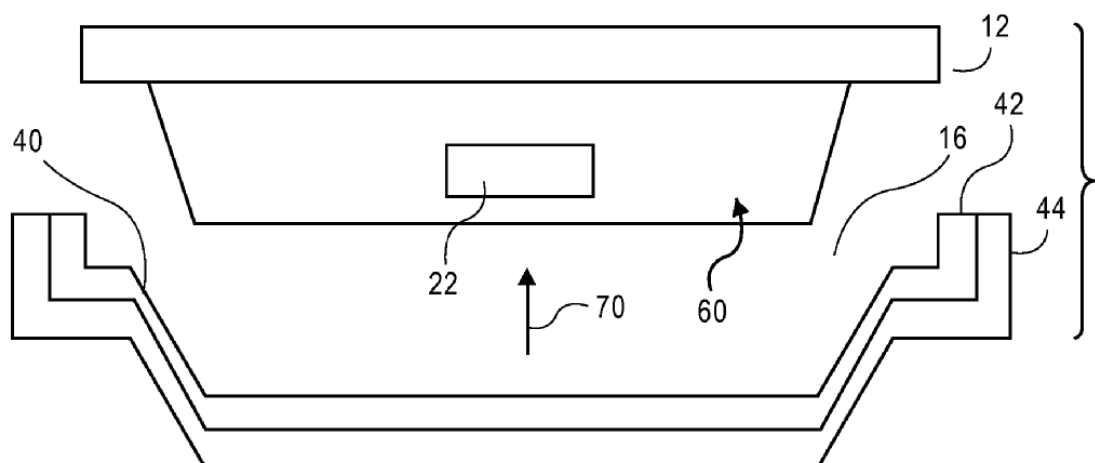
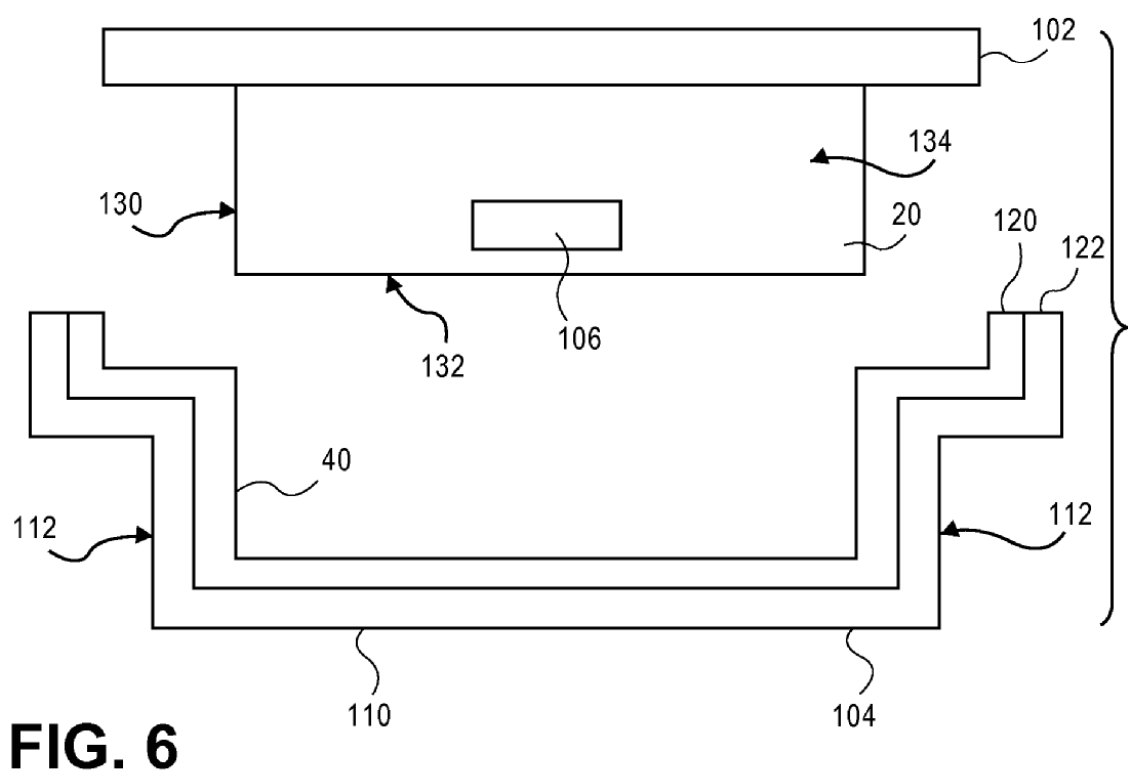
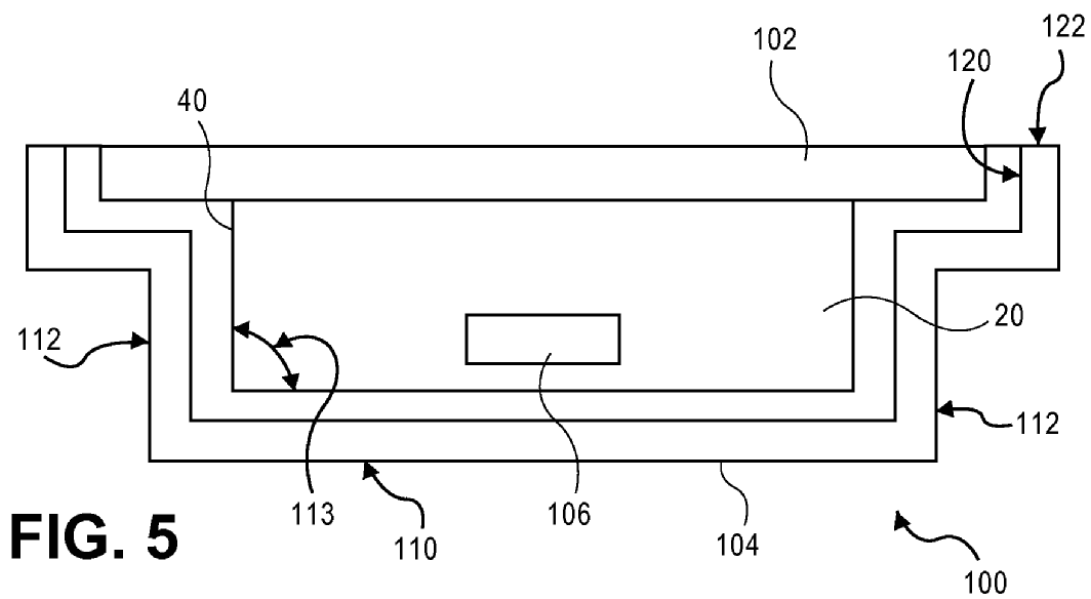


FIG. 4



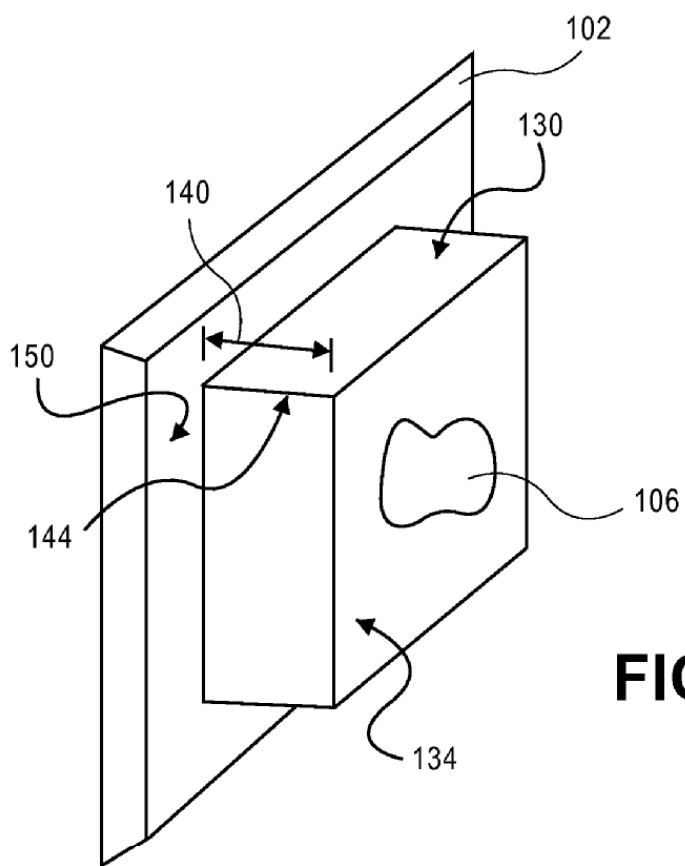


FIG. 8

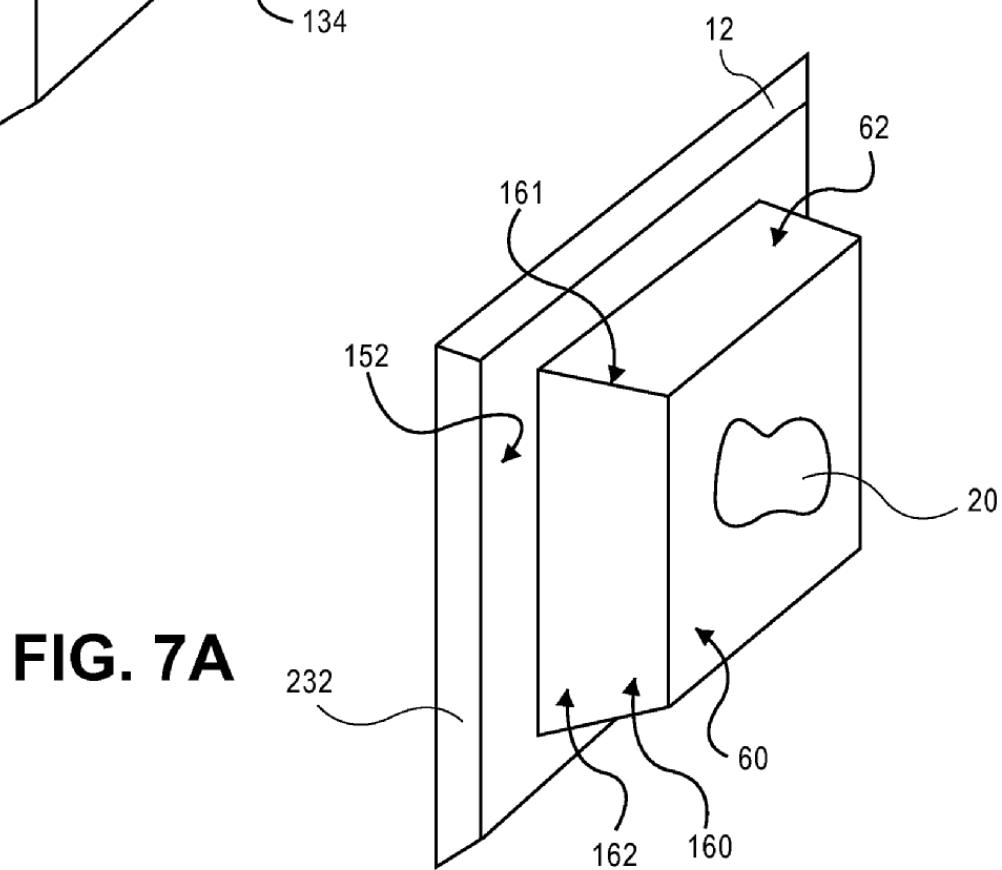


FIG. 7A

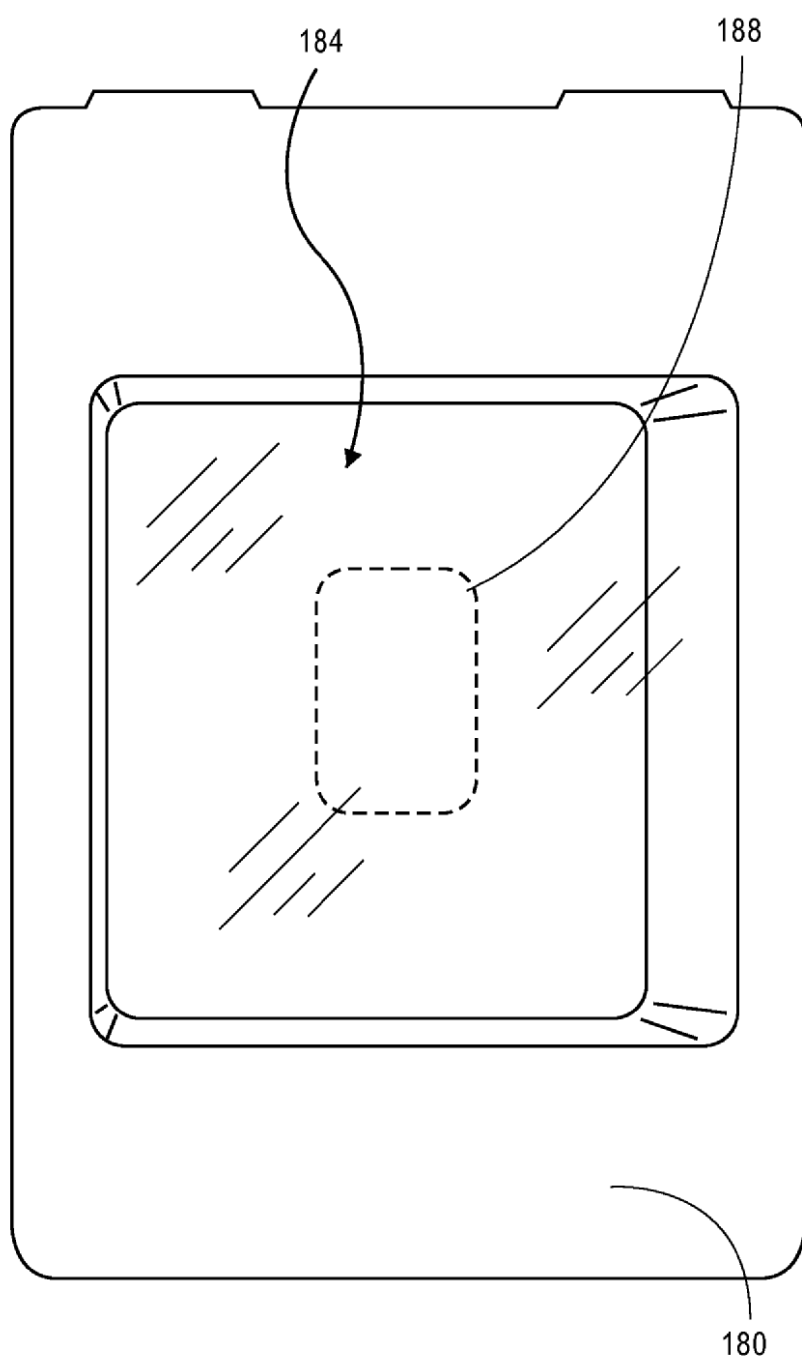


FIG. 7B

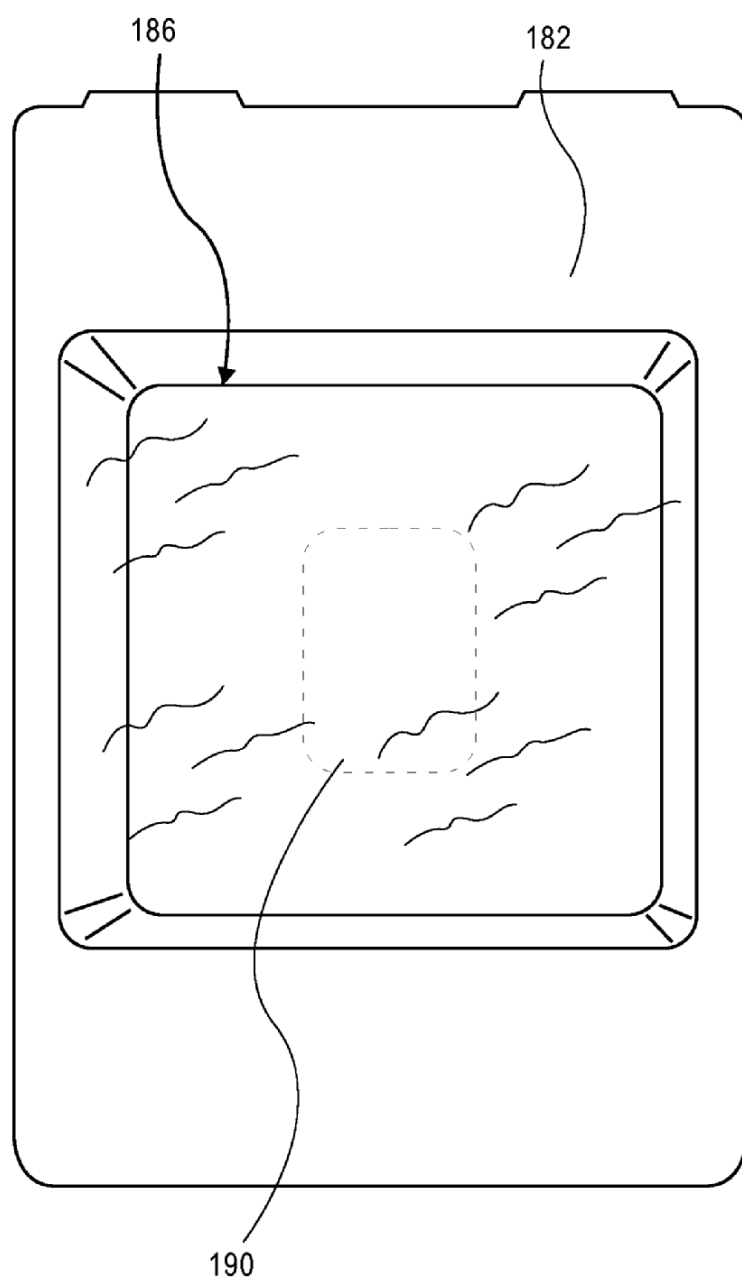


FIG. 7C
(TÉCNICA ANTERIOR)

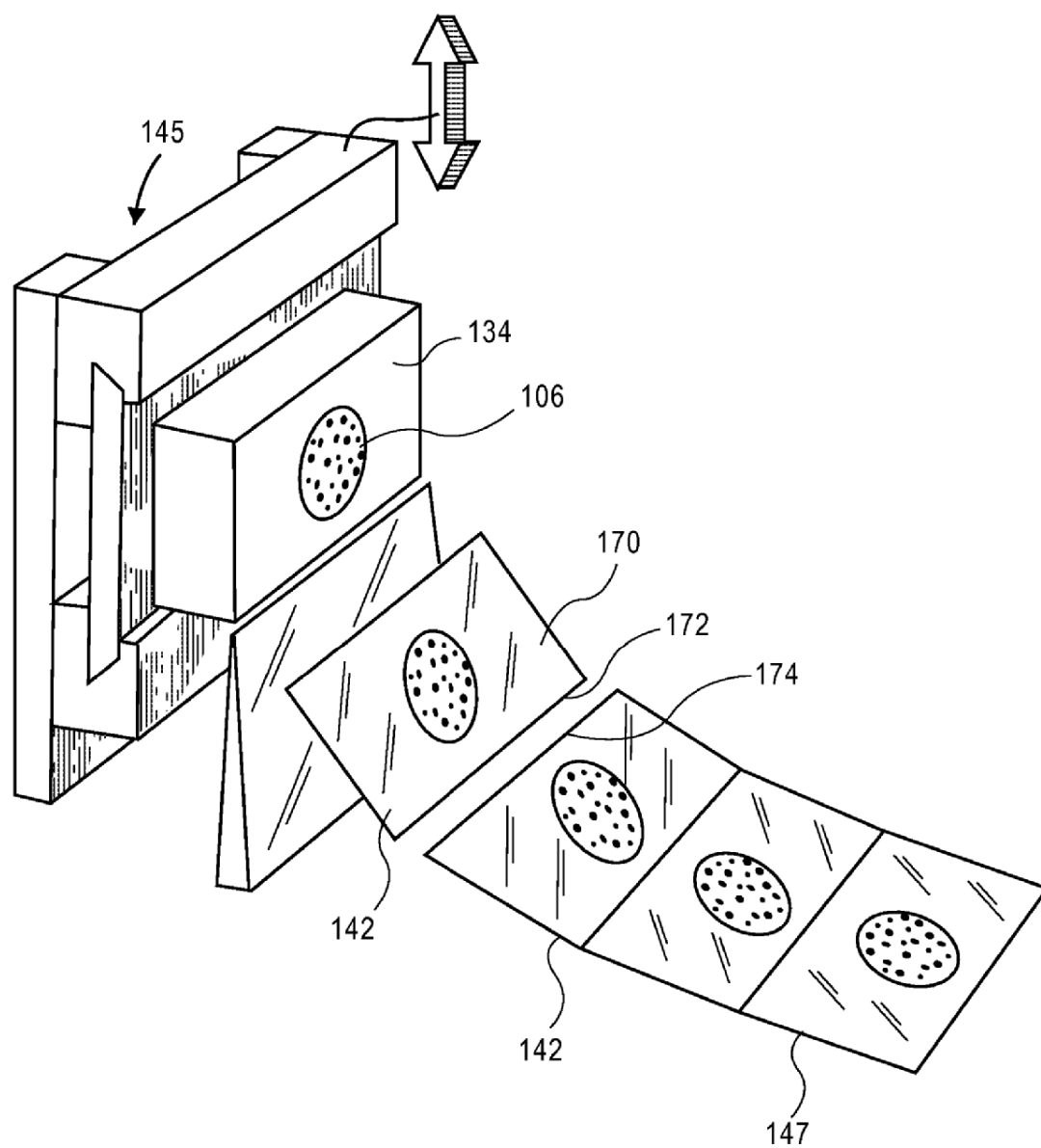


FIG. 9

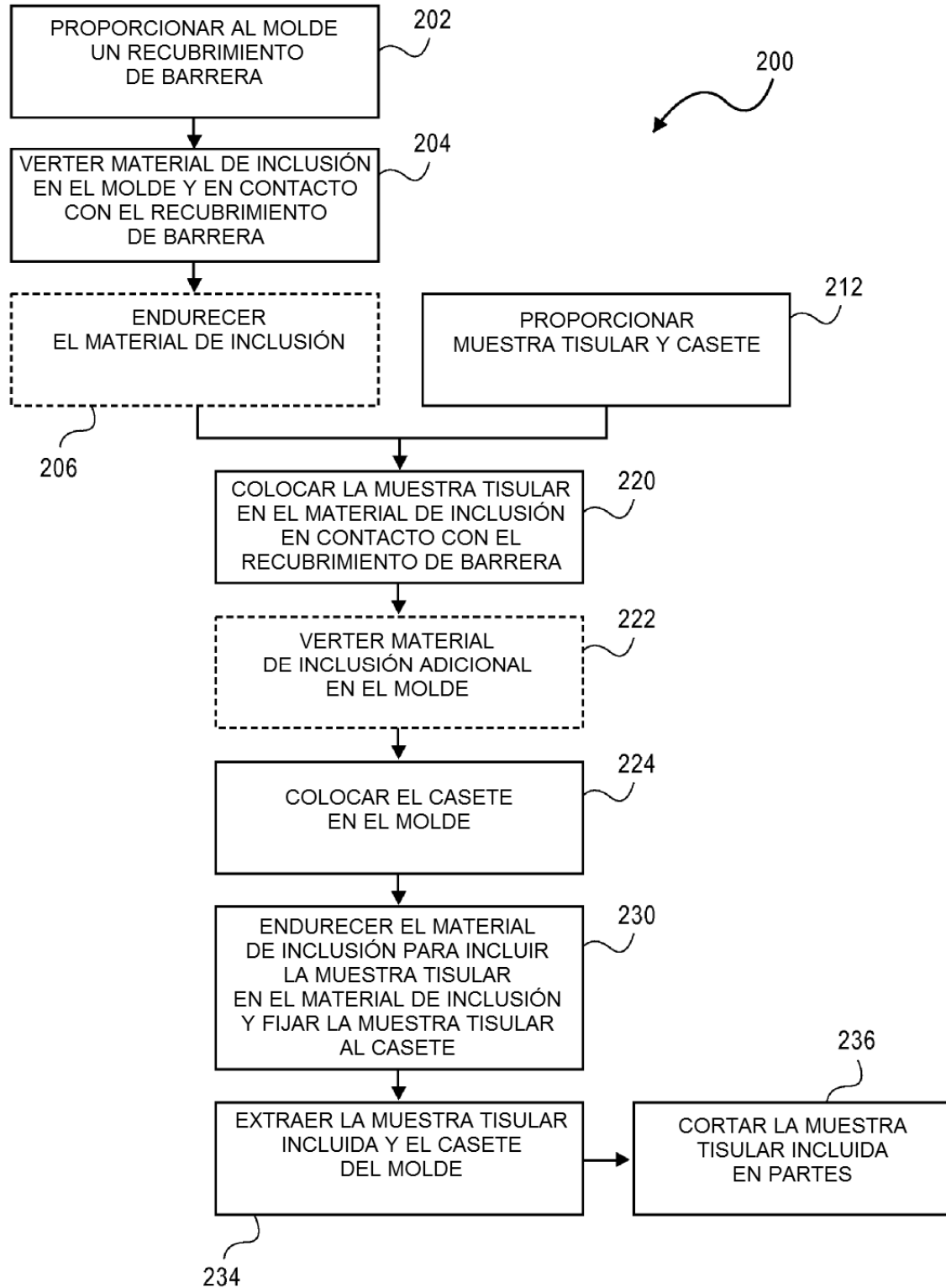


FIG. 10

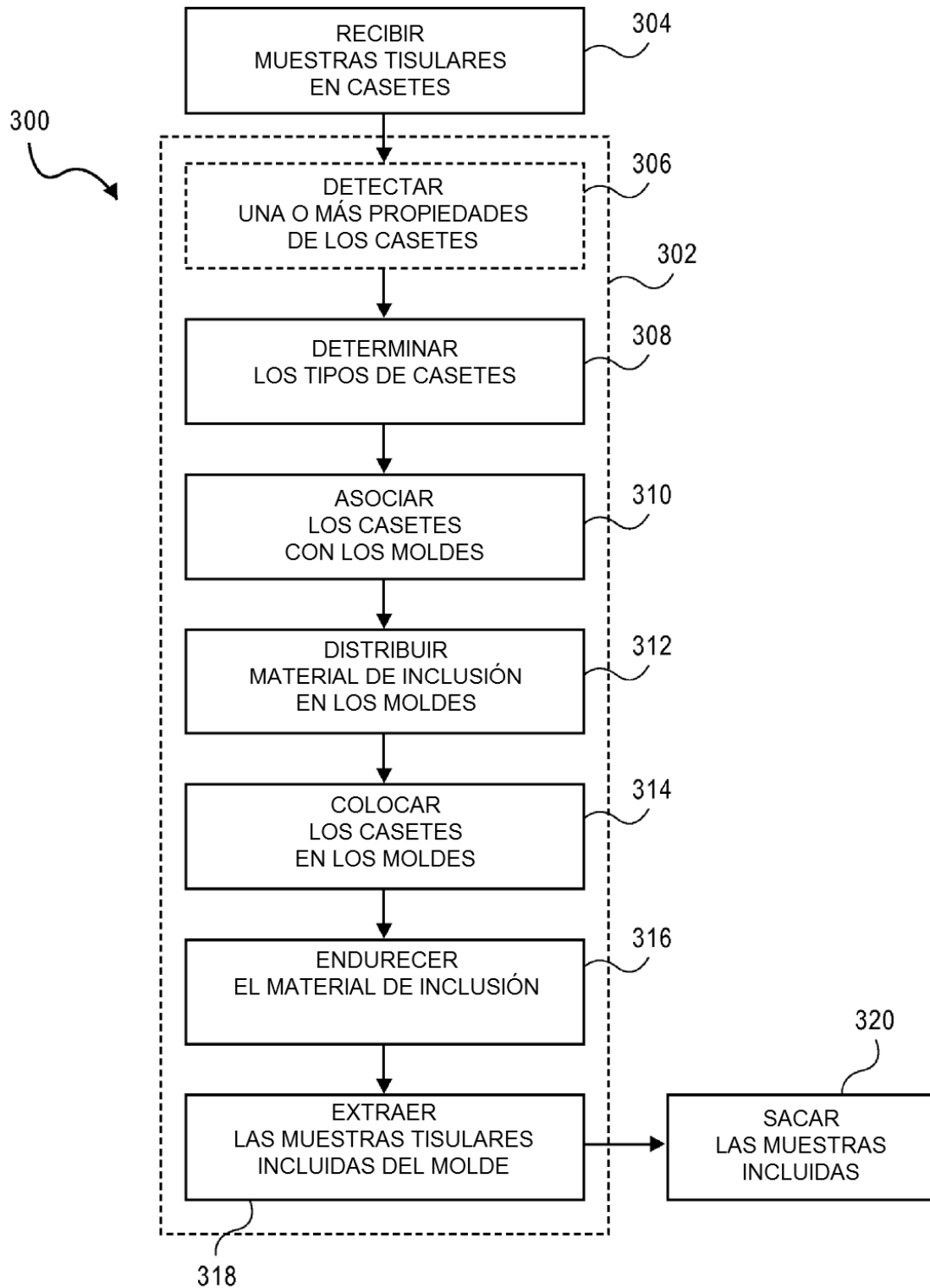


FIG. 11

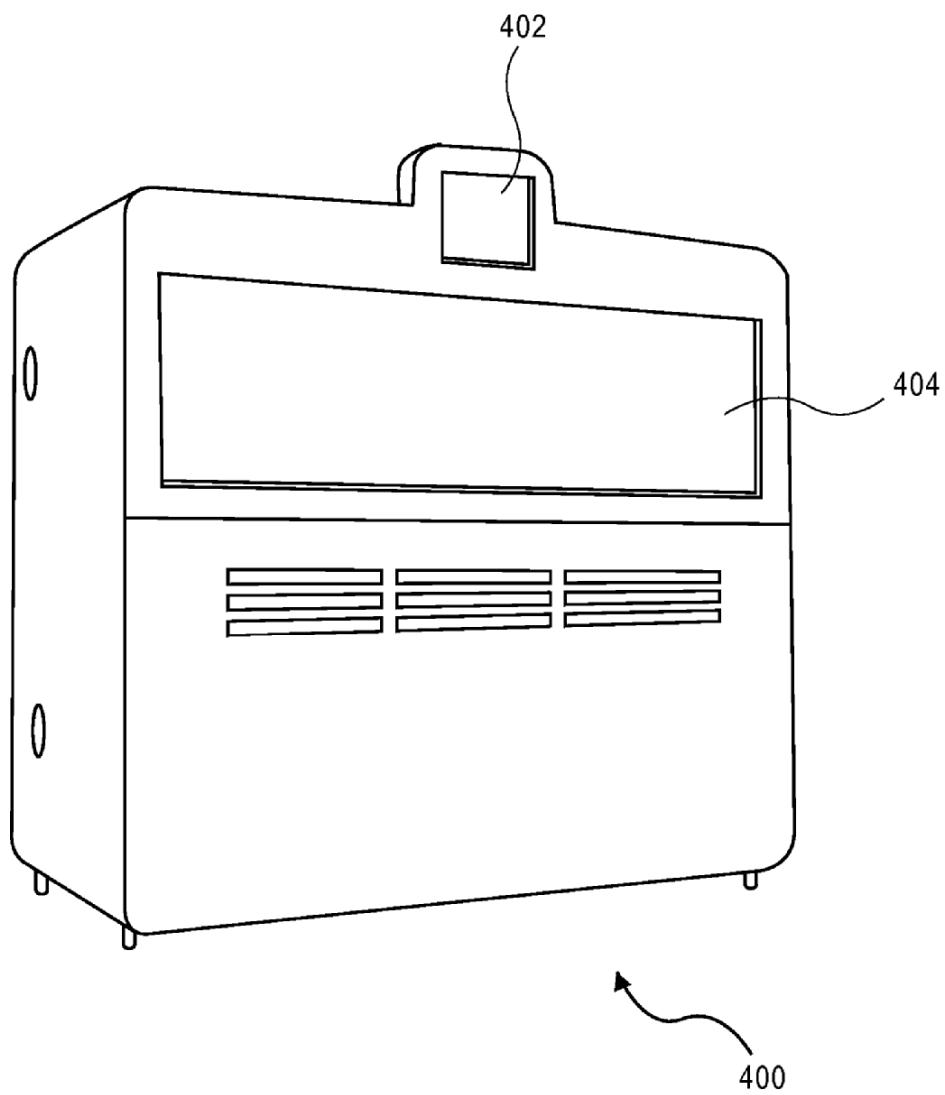


FIG. 12