(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 704 989**

(51) Int. Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2013** **PCT/IB2013/051245**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013** **WO13128322**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013** **E 13720547 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 2819783**

(54) Título: **Dispositivo de procesamiento de muestras con portaobjetos desmontable**

(30) Prioridad:

27.02.2012 CH 256122012

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2019

(73) Titular/es:

ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE (EPFL) (100.0%)
EPFL-TTO, EPFL Innovation Park J
1015 Lausanne, CH

(72) Inventor/es:

CIFTLIK, ATA TUNA y
GIJS, MARTIN

(74) Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 704 989 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 de procesamiento de muestras con portaobjetos desmontable

Antecedentes de la invención

En la oncología moderna, el análisis de biomarcadores es una herramienta indispensable para el diagnóstico y pronóstico del cáncer. La inmunohistoquímica (IHC) se ha empleado como una herramienta clave para los análisis de biomarcadores de cáncer durante los exámenes de patología habituales para tejidos en laboratorios médicos. IHC es una técnica aprobada por muchas autoridades locales e internacionales como Food and Drug Administration para el análisis de biomarcadores en muestras de tejidos y. En general, determinados biomarcadores, que en realidad son antígenos, se buscan con anticuerpos primarios específicos que tienen afinidad con el biomarcador objetivo. Más tarde, los anticuerpos secundarios específicos que se conjugan con una etiqueta y tienen afinidad con los anticuerpos primarios se usan para el etiquetado específico. Esta etiqueta es comúnmente un marcador fluorescente o de color, y en el caso de la fluorescencia, la técnica se llama inmunohistofluorescencia (IHF).

Por otro lado, IHC e IHF no se pueden aplicar inmediatamente a los tejidos de la muestra, pero se necesitan algunas etapas de preprocesamiento. El preprocesamiento comienza con una etapa de fijación, en la que las muestras histológicas sospechosas que se han tomado de pacientes primero se someten a un procedimiento que preserva las proteínas y antígenos dentro del tejido, así como la morfología del tejido. Si bien existen muchas técnicas de fijación, la etapa de fijación se realiza mediante la crio-fijación, una etapa de enfriamiento muy rápido que implica el uso de nitrógeno líquido o la fijación de formaldehído. Más tarde, los tejidos se someten al proceso de microtomía, en el que se cortan en secciones delgadas (4 µm-10 µm) y se inmovilizan en portaobjetos de vidrio convencional. Para su posterior y prolongada conservación, las secciones de tejido crio-fijadas (CF) se mantienen congeladas, mientras que los tejidos fijados con formaldehído se preservan mediante una capa de cera de parafina. Esta última se denomina sección de tejido "fijada en parafina fijada con formalina (FFPE)". Después de la etapa de fijación, los tejidos crio-fijados pueden someterse directamente a un procedimiento de IHC después de llevarlos a temperatura ambiente, mientras que los tejidos FFPE necesitan un procesamiento adicional. Estos incluyen la eliminación química de la parafina y otra etapa llamada recuperación de antígenos[1]. La etapa de recuperación del antígeno ayuda a la recuperación de los antígenos que se entrecruzaron mediante formaldehído usando diferentes medios, incluidos el calentamiento y las reacciones enzimáticas. [1] La recuperación de antígenos también se denomina “recuperación de epítopos” en muchos recursos. Además, si el calentamiento de las muestras está involucrado durante la recuperación del antígeno, también se puede denominar recuperación del antígeno inducida por el calor o mediada por el calor.

Además del procesamiento manual en los laboratorios, la importancia de la técnica y la necesidad de un diagnóstico habitual ha desencadenado el desarrollo de procesadores de tejidos comerciales para la automatización del proceso de IHC. Estos instrumentos son capaces de procesar una sección de tejido desde la recuperación de antígenos hasta la tinción y se emplean habitualmente en los laboratorios médicos para el diagnóstico y pronóstico. Para los instrumentos convencionales, el tiempo de proceso varía de 3 a 24 horas y generalmente son capaces de procesar múltiples portaobjetos.

Larga duración del proceso

En lugar de avanzar en la técnica, se puede decir que los procesadores de tejido existentes solo automatizan y paralelizan el proceso manual para mejorar el rendimiento y la reproducibilidad hasta cierto punto. Uno de los problemas inmediatos es la larga duración del ciclo de procesamiento. En general, los procesos se ejecutan durante una noche y se puede obtener un tejido procesado y teñido no antes del día siguiente. Este es actualmente un gran obstáculo de los procesos actuales de IHC, ya que el período de tiempo necesario no permite realizar un análisis durante las intervenciones quirúrgicas. Sin embargo, si la IHC pudiera realizarse durante las intervenciones, los protocolos de tratamiento quirúrgico se pueden ajustar mediante el uso inmediato del resultado de la IHC. Un ejemplo muy importante es el diagnóstico de cáncer y sus etapas de tratamiento posteriores. Cuando un paciente ha sido diagnosticado con un cáncer, el procedimiento habitual es generalmente realizar una biopsia de tejido para el tejido sospechoso. A continuación, estas muestras se someten a un análisis de IHC para ver si la sospecha de cáncer es cierta. Si la respuesta es sí, entonces se realiza una segunda cirugía para limpiar todo el tumor del cuerpo, una etapa crítica ya que incluso una sola célula cancerosa viva puede crecer nuevamente hasta convertirse en un tumor. Desafortunadamente, hasta ahora, no se ha presentado una técnica para verificar que el tumor esté completamente limpio. Por lo tanto, en ocasiones, los pacientes pueden necesitar cirugía o quimioterapia adicionales para limpiar estas células que pueden haber quedado. Cuando se cuenta, el número de cirugías varía de 1 a 3, lo que aumenta los riesgos, los costos y la ansiedad de los pacientes, así como una pérdida significativa de recursos de salud como el tiempo de los médicos y la disponibilidad de salas de cirugía.

El tiempo formal para que un procedimiento se llame intraoperatorio es de menos de 20 minutos. Hasta ahora, solo se ha introducido un sistema IHC para reducir el tiempo necesario para IHC. Esta tecnología se basa en un fenómeno, llamado mecanismo de "ola" y emplea el movimiento articulado "ondulado" de dos portaobjetos adyacentes, uno de los cuales lleva el corte de tejido (PCT/US2006/015020 y el documento WO/2006/116037). La

técnica puede reducir el período de tinción de los portaobjetos crio-fijados hasta 15 minutos y, por lo tanto, se puede llamar intraoperatorio. Por otro lado, estos 15 minutos no incluyen la fijación, la observación y el tiempo de formación de imágenes, en los que, por una decisión, pueden necesitar al menos unos 15 minutos más, lo que excede la condición intraoperatoria. Por lo tanto, la duración del protocolo de tinción debe reducirse a menos de 5 minutos para que el proceso total de IHC sea 'intraoperatorio'. Además, aunque el procesamiento de tejidos crio-fijados es más fácil, los tejidos FFPE son más populares debido a varias razones. Primero, en el procedimiento de crio-fijación, la preservación de tejidos y el archivo son más costosos debido al equipo necesario. De manera más sorprendente, los tejidos crio-fijados muestran falsos negativos o falsos positivos con más frecuencia que los tejidos con FFPE. Por lo tanto, FFPE es más conveniente mientras que la crio-fijación puede proporcionar resultados más rápidos. El tiempo de procesamiento informado para una sección de tejido FFPE usando un mecanismo de "onda" es de 70 minutos, un período de tiempo cercano al de los procesadores de tejidos automatizados convencionales.

Precisión limitada en el análisis cuantitativo

Además del aspecto intraoperatorio, la precisión de los resultados obtenidos con cualquier tecnología hasta ahora es limitada, cuando se trata de casos que requieren un análisis cuantitativo de la expresión de biomarcadores usando el alcance de la señal obtenida por inmunohistoquímica, como se requiere durante determinados ensayos. Las técnicas convencionales pueden producir resultados ambiguos hasta en un 20 % de los casos cuando se requiere dicho análisis semicuantitativo, y no se puede lograr un resultado de diagnóstico final usando solo la inmunohistoquímica. Por lo tanto, el patrón actual es someter estos casos a un análisis genético subsiguiente (hibridación *in situ*) para lograr un resultado de diagnóstico final, añadiendo un costo y tiempo sustanciales (unos pocos días) al proceso de diagnóstico.

La inexactitud del análisis inmunohistoquímico cuantitativo tiene su origen en la intensidad de una señal inmunohistoquímica, que no es necesariamente proporcional al grado de expresión del antígeno debido a reacciones de unión no específicas, así como a efectos impredecibles de la degeneración tisular, variaciones en la fijación tisular, incrustación en parafina y recuperación de epítopos inducidos por calor. La IHC convencional es una operación de macroescala, en la que se requieren tiempos de reacción en el intervalo de 30 minutos a horas para lograr una exposición uniforme de los antígenos de superficie a los reactivos biológicos y la reproducibilidad del resultado. Esto se origina a partir de largos tiempos de difusión, la falta de precisión en el control y la dosificación de los reactivos, así como las limitadas velocidades de intercambio de fluidos. Además, los largos ensayos y los tiempos de exposición de los anticuerpos pueden dar como resultado una adsorción significativa y una unión no específica de los anticuerpos, de manera que la señal inmunohistoquímica resultante ya no es una función lineal de la concentración del biomarcador objetivo en el tejido. La puntuación de estos niveles de expresión de biomarcadores cualitativos se sometió a menudo a la interpretación y experiencia del patólogo.

Sin embargo, si se pudiera asegurar la proporcionalidad entre los niveles de expresión del biomarcador y la señal inmunohistoquímica, la señal inmunohistoquímica será cuantitativa y la discriminación entre muestras positivas y negativas se puede hacer con mucha mayor precisión.

De hecho, esta no proporcionalidad entre los antígenos objetivo y la señal obtenida de un inmunoensayo no solo es específica de la inmunohistoquímica diagnóstica o de la inmunohistoquímica en general. Este problema existe en todas las configuraciones en las que un objetivo inmovilizado está presente en la superficie y uno o más reactivos del detector se unen a este objetivo a una velocidad limitada por la velocidad de difusión de los reactivos del detector. Estos pueden incluir, pero sin limitación, inmunocitoquímica, hibridación de ADN, cuantificación de ARN, aptámero y sondas oligoméricas. Además, los mecanismos de impedimento estérico también pueden contribuir a esta no proporcionalidad y comprometen un eventual ensayo cuantitativo.

Requisito para invertir en infraestructura, equipamiento y personal capacitado

Los equipos automatizados de vanguardia tienen algunos otros inconvenientes además de los problemas intrínsecos de la larga duración del proceso y la precisión limitada. Los IHC automatizados comerciales modernos son voluminosos, se suministran en un banco o se colocan en la parte superior del banco. Por lo tanto, están lejos de ser portátiles y de mano. Si bien ser portátil no es un requisito, por ejemplo, para una operación intraoperatoria, esto puede aumentar la accesibilidad en lugares remotos en los que falta un entorno de laboratorio o electricidad.

En general, las clínicas con poco presupuesto y las que están ubicadas en lugares remotos no cuentan con la infraestructura, el equipo y la experiencia necesarios para poder realizar este tipo de diagnóstico. De hecho, es extremadamente costoso formar y mantener un laboratorio de este tipo para una clínica de tamaño pequeño, que requiere una inversión de alrededor de 890. 000 euros (1 millón de CHF) en infraestructura y equipo, y más de 265000 euros (300000 CHF) por año para personal capacitado. Por lo tanto, la inversión necesaria para formar un laboratorio que pueda realizar inmunohistoquímica es uno de los principales obstáculos que impiden el acceso de una gran cantidad de pacientes en todo el mundo a esta tecnología de diagnóstico.

Un problema importante adicional causado por la estructura actual de un laboratorio dictado por equipos de vanguardia es el problema de la personalización, que aparece en particular cuando se usa para nuevos

descubrimientos de biomarcadores e investigaciones relacionadas. La adaptación de los equipos de diagnóstico a gran escala existentes para su uso con moléculas y biomarcadores recién descubiertos es costosa y consume mucho tiempo. Esto se origina de la contradicción entre la flexibilidad requerida en la investigación y el descubrimiento y el alcance de la paralelización y el rendimiento requerido por un laboratorio de diagnóstico central. Además, las instalaciones centrales se resisten a dicha personalización porque están sobrecargadas con el trabajo de diagnóstico actual o dicha personalización puede afectar la reproducibilidad posterior. Por lo tanto, las tareas de investigación que implican inmunohistoquímica se realizan en general de forma manual. Sin embargo, cuando se piensa en la gran cantidad de ensayos requeridos para validar los resultados y los requisitos para la reproducibilidad, el tiempo total necesario para completar dichos estudios puede abarcar unos pocos años, lo que afecta significativamente a la investigación total y a los costos de desarrollo de descubrimiento del biomarcador.

La técnica anterior se puede resumir en 3 secciones diferentes que constituyen (a) dispositivos de laboratorio en un chip que realizan IHC, (b) procesadores de macro IHC automatizados representados que reducen el tiempo de proceso y (c) dispositivos de laboratorio en un chip creados para otras aplicaciones con diseños microfluídicos similares. En este caso, los investigadores resumen estos y ofrecen una comparación en términos de una figura de mérito.

Dispositivos de laboratorio en un chip que realizan IHC

Hasta ahora, había habido algunos enfoques microfluídicos a la IHC para mejorar determinados aspectos de la IHC convencional, que potencialmente pueden beneficiarse de la disminución de los tiempos de difusión y la mejora del control de intercambio fluídico. Algunos de estos tienen como objetivo reducir el tiempo total de análisis y otros tienen como objetivo realizar IHC multiplex usando múltiples canales pequeños paralelos para buscar diferentes biomarcadores objetivo en ubicaciones desplazadas espacialmente con mayores diluciones de anticuerpos. Sin embargo, en ninguno de estos estudios hubo una implicación de que un enfoque microfluídico de como resultado un aumento en la precisión del análisis cuantitativo y una disminución de los resultados diagnósticos ambiguos obtenidos por dichos análisis.

El grupo de investigadores ha representado varios dispositivos de laboratorio en un chip diseñados por ingeniería para IHC para reducir el tiempo de salida. Los investigadores han demostrado un LOC de primera generación en PDMS, que permite un análisis relativamente rápido de los tejidos (20 min frente a las 2 h convencionales) [V. Fernández-Moreira y col. Analist, no: 135, pp. 42-52, 2010]. Desafortunadamente, este dispositivo mostró una velocidad de análisis y un área de detección limitadas. El sistema no pudo mantener altas presiones, lo que resultó en un caudal volumétrico operacional máximo de alrededor de 50 nl/s. El engorroso montaje y desmontaje del sistema (integración manual) aumentó significativamente el tiempo de análisis y el volumen muerto. Además, solo una parte del corte de tejido podría estar expuesta (menos de un 10 % de la superficie), lo que limita el área de detección de TS.

Más tarde, los investigadores demostraron un dispositivo de segunda generación (A. T Ciftlik y col. , Proc. of 14th Int. Conf. en sistemas miniaturizados para química y ciencias de la vida (microTAS '10), pp. 699-701, octubre de 2010) producido nuevamente en PDMS, aumentando el área y disminuyendo los tiempos de incubación a 3, 5 minutos. Por otro lado, este dispositivo sufrió una serie de problemas que comprometen en gran medida la precisión del análisis cuantitativo y su comercialización a bajo costo. La baja precisión se origina en la reacción eventual de antígeno-anticuerpo controlada por difusión que se produce dentro de la cámara, lo que también hace que el uso de fluorescencia resuelta en el tiempo sea indispensable. La estructura de la sección transversal de la cámara y los canales de microfluidos conectados a ella forman una estructura como se ilustra en la figura 1. En la sección transversal, la cámara es un rectángulo ancho y poco profundo, y la sección de tejido forma el lado ancho. Los canales de microfluidos son tuberías de aproximadamente 50 µm de alto, y estos canales están conectados a la cámara en los bordes poco profundos en el lado derecho e izquierdo, más cerca del lado ancho superior, que se encuentra opuesto a la sección de tejido. En un diseño de este tipo, cuando se induce un flujo de fluido usando las entradas y salidas definidas en los lados poco profundos y más cerca de los bordes anchos superiores, la magnitud del flujo de fluido es significativa solo alrededor de la superficie superior, mientras que es mucho menor alrededor de la sección de tejido. Por lo tanto, el transporte de los reactivos del protocolo IHC a la superficie del tejido aún depende en gran medida de la lenta difusión de las moléculas desde la superficie superior. Además, el diseño determina que la altura de la cámara siempre debe ser más alta que la altura de los canales de microfluidos, y esta condición hace que el papel limitante de la difusión en el transporte de los anticuerpos sea aún más significativo. Este diseño anterior se traduce en una cámara que no se puede realizar de menos de 250 µm, lo que aumenta los tiempos de difusión en un factor de 25, en comparación con una cámara de 50 µm de altura (véase el párrafo 0029). De manera más sorprendente, el transporte limitado por difusión lenta de los reactivos del protocolo a la superficie del tejido compromete la proporcionalidad entre la señal obtenida y el grado de expresión del antígeno en la superficie del tejido, lo que hace imposible una evaluación cuantitativa exitosa de la señal inmunohistoquímica.

El uso de cortos tiempos de incubación en un sistema de difusión tan limitada (como se describe en el párrafo 0016 y en los documentos citados) solo fue posible cuando se usaron equipos y materiales avanzados de formación de imágenes. Debido a estos largos tiempos de difusión, solo una pequeña fracción de los anticuerpos primarios y secundarios puede alcanzar la superficie de la sección del tejido cuando se usan tiempos cortos de incubación de

reactivos en el protocolo, y solo fue posible detectar señales tan bajas por fluorescencia resuelta en el tiempo. La fluorescencia resuelta en el tiempo es una técnica de formación de imágenes avanzada, en la que la excitación con fluoróforo y el registro de la emisión se realizan en periodos de tiempo no superpuestos haciendo uso de anticuerpos especiales conjugados con marcador de resolución en el tiempo (lantánidos) que pueden seguir emitiendo mucho tiempo después de la excitación. El multiplexado en el tiempo de los procesos de excitación y emisión elimina en gran medida la señal de fondo autofluorescente que se origina en el tejido y el material circundante, y hace que se detecten fácilmente cantidades muy pequeñas de anticuerpos unidos (primarios y secundarios) en el tejido. Al usar equipos de formación de imágenes fluorescentes convencionales y fluoróforos comerciales, no sería posible detectar esta señal. Sin embargo, tanto los fluoróforos como el equipo de microscopía para marcadores de resolución temporal (lantánidos) son muy caros y no convencionales, y los anticuerpos de diagnóstico conjugados no están disponibles en el mercado. Como consecuencia, el requisito de microscopía de resolución temporal constituye otro obstáculo que impide la implementación comercial exitosa y de bajo costo de este dispositivo, que, por lo tanto, no puede funcionar cuando se emplean reactivos de tinción convencionales como fluoróforos y cromógenos.

Además de los problemas relacionados con el diseño que se enumeran anteriormente (párrafos 0016-0017 y el documento citado), también hay una serie de inconvenientes debido al uso de PDMS como material estructural. El módulo de PDMS de Young relativamente bajo hace que los canales sean susceptibles a una deformación sustancial bajo presiones fluídicas más altas. Es decir, las características de flujo pueden cambiar bajo presiones y caudales variables de un protocolo. Además, en este diseño anterior, el sellado de la sección de tejido integrada se realiza usando PDMS que forma las paredes de los microcanales de entrada/salida subyacentes. Nuevamente, debido al bajo módulo de PDMS de Young, la fuerza requerida para un mejor sellado del portaobjetos de tejido puede deformar fácilmente estos canales, hasta el punto de que estén bloqueados y el funcionamiento del dispositivo sea imposible. Estas variaciones en las dimensiones de diseño y los caudales debido a la fácil deformación de los canales pueden introducir variaciones en la señal de IHC resultante y, cuando se usan para diagnóstico, pueden comprometer en gran medida la reproducibilidad de los resultados. Además, las propiedades térmicas de PDMS evitan el uso de temperaturas por encima de 70 °C, y PDMS no es químicamente compatible con los muchos reactivos, la línea Xileno, que pueden estar involucrados en los protocolos de IHC. Otro inconveniente de este dispositivo es que solo acepta formas de portaobjetos de sección de tejido no convencional, lo que constituye una personalización y, por lo tanto, un problema de costo en el problema de comercialización de esta estructura como dispositivo de diagnóstico.

Para concluir, el sistema descrito en los párrafos 0016-0018 solo mejora el tiempo de protocolo del ensayo inmunohistoquímico, pero esto a costa del uso de la fluorescencia resuelta en el tiempo, que es un método costoso y en su mayoría inaccesible en términos de materiales e infraestructura requeridos. Además, la minimización del tiempo de ensayo no elimina el transporte de reactivos controlado por difusión a la superficie del tejido, y la capacidad de realizar el análisis cuantitativo que se puede hacer con este sistema no difiere de un ajuste convencional: no es posible cuantificar los biomarcadores de tejido. Por último, pero no menos importante, el bajo módulo de Young del sistema compromete enormemente la reproducibilidad debido a posibles deformaciones en las estructuras microfluídicas que forman el sistema.

Otro enfoque presentado en la bibliografía es la llamada plataforma de microfluidos IHC multiplexados (MMIHC) (MS Kim y col. , Biomaterials, Vol: 32, Iss: 5, pp. 1396-1403, 2011yM. S. Kim y col. PLoS ONE, vol : 5(5): pp. E10441, 2010), que tiene múltiples canales pequeños para buscar diferentes marcadores en ubicaciones espacialmente diferentes. Con un tiempo de respuesta de 90 minutos, el dispositivo aún se encuentra en el intervalo de tiempo de los procesadores IHC automatizados. Además, el dispositivo puede manchar aproximadamente el 1, 5 % del área TS, lo que es un inconveniente para la generalización de la técnica. Aunque los autores han demostrado, para el caso específico del cáncer de mama, que incluso para esta área pequeña hay aproximadamente un 85 % de correlación con un TS totalmente teñido, que no se puede lograr una correlación suficiente. También es un trabajo engorroso realizar este estudio de correlación para cada caso diferente. Por otro lado, los autores han demostrado que pueden disminuir las concentraciones de anticuerpos primarios en un factor 10, que es un paso importante para reducir el consumo de anticuerpos costosos.

Procesadores IHC macroautomatizados comerciales que reducen el tiempo de proceso

Como se introdujo anteriormente, el único procesador en el mercado con un tiempo de proceso IHC bajo es el sistema "onda"(PCT/US2006/015020 y el documento WO/2006/116037). Esta tecnología se basa en un fenómeno, llamado mecanismo de "onda", y emplea el movimiento articulado "ondulado" de dos portaobjetos adyacentes, uno de los cuales lleva el corte de tejido (Celerus Diagnostics). Puede reducir el período de tinción de los portaobjetos crio-fijados hasta 15 minutos y, por lo tanto, puede llamarse intraoperatorio. Por otro lado, estos 15 minutos no incluyen la fijación, la observación y el tiempo de formación de imágenes, en los que, por una decisión, pueden necesitar al menos unos 15 minutos más, lo que excede la condición intraoperatoria.

Dispositivos de laboratorio en un chip creados para otras aplicaciones con diseños de microfluidos similares

Los dispositivos basados en orificios verticales que aceptan portaobjetos con muestras inmovilizadas se pueden

encontrar en la bibliografía. Mcneely y col. (PCT/US2002/07113 y el documento WO/2002/072264) introdujo un dispositivo de este tipo creado para el procesamiento de micromatrices de ADN. En lugar de una cámara de área amplia como es necesario en IHC, este dispositivo de procesamiento de micromatrices de ADN tiene múltiples orificios verticales y una red de canales de microfluidos para suministrar reactivos a cada punto pequeño en el que existe un elemento de la micromatriz de ADN. También se presentó un dispositivo similar llamado "sonda microfluídica" (A. Queval y col. Lab Chip, vol: 10, pp. 326-334, 2010y los documentos de patente PCT/IB2010/052018 y WO/2010/128483) en el que los orificios de microfluidos verticales están dispuestos dentro de un punto muy pequeño (100 um en diagonal) para teñir determinados puntos en un tejido o monocapa celular, en el que este cabezal de la sonda se puede mover espacialmente. En otra patente de Delamarche y col. (PCT/IB2003/005350y el documento WO/2004/050246) se ha introducido un dispositivo para hacer fluir un líquido sobre una superficie, donde se usan orificios verticales y un espaciador para formar una cámara en la superficie.

También están presentes la hibridación de ADN adicional (documento US/2006/0003440) y los dispositivos de secuenciación (PCT/US2010/047392 y el documento WO/2011/026136) realizados con técnicas similares, que también consisten en orificios verticales que se conectan a canales de microfluidos con ADN inmovilizado. Adey (PCT/US02/24616 y el documento WO/2003/015922) ha descrito otro dispositivo que tiene una cámara de bajo volumen para el procesamiento de ADN y ARN con una membrana flexible de desviación para cambiar la altura de la cámara dependiendo de la aplicación. Kim y col. (PCT/US2008/074865 y el documento WO/2009/029845) también describen un dispositivo para microfluidos de área amplia, que tiene un orificio de entrada semicircular y una distribución uniforme de orificios de salida de forma triangular.

Entre los estudios con orificios de microfluidos verticales, no se ha representado un dispositivo de distribución de reactivos de área amplia y uniforme que funcione en tiempos muy cortos con resistividad a alta presión. En ninguno de los dispositivos y estudios anteriores, hubo una implicación de que un enfoque microfluídico da como resultado un aumento en la precisión del análisis cuantitativo de objetivos inmovilizados y una disminución de los resultados ambiguos obtenidos por dichos análisis. Además, los procesadores IHC de laboratorio en un chip, ya sean semimanuales, como en el caso de MMIHC en el que solo se realiza la incubación de anticuerpos primarios en un chip, pueden teñir solo una proporción del TS o tienen altos costos de reactivos.

Descripción de la invención

La invención se refiere a un dispositivo y a un proceso como se define en las reivindicaciones.

Se refiere en particular a un procesador de tejidos microfluídico (MTP) para la detección precisa de biomarcadores en inmunohistoquímica clínica. Se forma una cámara de gran área (256 mm^2) y poco profunda (<100 µm) al sujetar un portaobjetos de microscopio convencional que lleva un corte de tejido de cáncer de mama con una estructura micromecanizada de vidrio/silicio, que incorpora orificios de acceso para una exposición rápida y uniforme del corte de tejido a los biorreactivos de inmunoensayo. Los patrones de flujo microfluídico combinados con la pequeña longitud de difusión vertical en la cámara poco profunda permiten usar tiempos de incubación de biorreactivos tan cortos como 2 min. Esto permitió un análisis cuantitativo preciso al preservar la proporcionalidad entre la cantidad objetivo de superficie y la señal resultante.

Diseño de dispositivos microfluídicos

El montaje rápido de los portaobjetos de tejido (TS), que son simplemente portaobjetos de microscopio convencional con secciones de tejido inmovilizadas, en los canales de microfluidos es muy importante, ya que el tiempo total del ensayo es un parámetro crítico. Además del montaje rápido, los investigadores concibieron un sistema en el que necesitaron cambiar solo el TS, mientras que otros aspectos (el circuito de microfluidos) se mantienen sin cambios. La figura 2 muestra la representación en sección transversal del dispositivo que tiene orificios de acceso de microfluidos ubicados (a) a lo largo de los bordes de la cámara de tejido para la entrada y salida de flujo, y (b) en el centro de la cámara para la entrada de flujo y en los bordes de la cámara para la salida de flujo. El dispositivo tiene canales de microfluidos laterales para guiar y preacondicionar el fluido para su entrega al TS, usando una capa superior de microfluidos y orificios de acceso de microfluidos verticales para acceder a la cámara delgada, que se forma al sellar el TS a la parte del dispositivo del canal de microfluidos usando una junta tórica.

A diferencia de los sistemas anteriormente representados, a los que se accede directamente a la cámara desde los lados (véase los párrafos 0016-0019), estos canales de microfluidos están conectados a la cámara de tejidos mediante orificios de acceso de microfluidos verticales. Esta disposición permite el ajuste de los parámetros del canal de microfluidos de la capa superior (espesor, estructura, capacidades de retención de presión, etc.), independientemente de la formación y la estructura de la cámara del tejido. Dado que la capacidad de retención de presión de la cámara de tejido también es determinante para el tiempo de ensayo, el sellado de la cámara de microfluidos con el TS es muy crítico. En este caso, el sellado se realizó mediante una junta tórica personalizada usando moldeo de polidimetilsiloxano (PDMS). Con este diseño, la fuerza de sellado aplicada solo afecta el espesor de la cámara y la capacidad de retención de presión de la propia cámara, y este mecanismo de sellado se desacopla mecánicamente del resto del sistema microfluídico.

Además, este diseño permite que la altura de la cámara sea mucho menor que los sistemas anteriores (véase los párrafos 0016-0019). En particular, la altura de la cámara de tejido solo se determina mediante la selección del espesor de la junta tórica con respecto a la muesca de la junta tórica y también la fuerza de sellado aplicada al TS. De hecho, el espesor de la cámara es un parámetro crítico, ya que afecta directamente el tiempo de incubación de los reactivos usados en el proceso de IHC, que está dictado por la difusión lenta de las moléculas de anticuerpo relativamente grandes. Cuando el dispositivo se integra con el TS, se forma una cámara de tejido que tiene un espesor entre 50 µm y 100 µm. Para los anticuerpos de uso común como las moléculas de IgG antihumana de ratón, los investigadores han calculado que un tiempo de incubación de 1 minuto requiere una altura de cámara inferior a 100 µm. Por otra parte, es posible reducir la altura de la cámara por debajo de 50 µm, pero potencialmente puede generar un desprendimiento del tejido del TS durante los ciclos de llenado y lavado a alta presión y aumentar las duraciones de flujo total.

La capacidad de formar dichas cámaras de fluido poco profundas es clave para cambiar el mecanismo de transporte principal de la difusión a la advección. Modificar el mecanismo de transporte dominante de los reactivos en la cámara es clave para evitar las reacciones controladas por difusión, que comprometen la tinción proporcional de los objetivos inmovilizados y hacen que los análisis cuantitativos sean inexactos. No solo una altura mínima de la cámara, sino también el diseño del orificio de acceso de microfluidos contribuye a una cuantificación precisa, dirigiendo el flujo de fluido a la superficie del TS integrado como se muestra en la **figura 2**. Dicha dirección del flujo de fluido permite el transporte mediado por advección de los reactivos a la superficie del tejido y permite que se produzcan reacciones inmunohistoquímicas en el régimen controlado por reacción.

Con el fin de aumentar el área de tinción disponible del dispositivo al 100 %, se debe realizar una gran cámara con dimensiones de 16 mm por 16 mm. Una distribución uniforme de fluido dentro de dicha cámara es crítica para entregar una cantidad igual de reactivo y soluciones de lavado por unidad de tiempo a cada parte del tejido. Por lo tanto, los investigadores adoptaron una estructura de red de canal de microfluidos distribuida, que iguala el flujo en toda la cámara. La figura 3 muestra una vista desde arriba del canal de red distribuido realizado en la capa superior y también la disposición de los orificios de acceso de microfluidos. La disposición de los orificios de acceso de microfluidos tiene como objetivo realizar una distribución uniforme de los reactivos dentro de la cámara. Por otro lado, la estructura de la red de canales de microfluidos distribuidos garantiza la entrega equitativa de reactivos en toda la cámara de tejido. En principio, se puede aumentar el área de la cámara a 25 mm por 50 mm redimensionando la cámara, los canales de microfluidos y la disposición de los orificios en consecuencia.

La figura 4 muestra simulaciones del método de elementos finitos (FEM) de la convección en la cámara de tejido con canales de red distribuidos para un caudal de 10 µl/s para una altura de cámara de 50 µm (COMSOL® Multiphysics). Esta simulación sugiere que después de 2, 5 s de lavado con tampón, la concentración alcanzada del reactivo anterior es solo 10^{-12} de su concentración inicial en el peor de los casos. Por lo tanto, los investigadores no esperan ubicaciones de superficie muerta que necesiten tiempos de lavado y llenado superiores en orden de magnitud. El canal de red distribuido funciona de manera efectiva, como lo indican las simulaciones de FEM en la figura 4 solo si se combina con una cámara de tejido que sea lo suficientemente delgada como para ser considerada como bidimensional. Si bien los trabajos anteriores mostraron estructuras de red de canal de microfluidos similares (véase los párrafos 0016-0019 y la figura 1), su estructura de sección transversal impidió el suministro de reactivo directamente a la superficie TS por advección. Es decir, los reactivos se entregaron en la parte superior de la cámara opuesta a la ubicación de la superficie del tejido, y el transporte de los reactivos a la superficie del tejido estuvo completamente dominado por la difusión. En contraste, el presente dispositivo, que tiene una cámara de tejido desacoplada mecánicamente y una red de canales de microfluidos conectada a la cámara a través de orificios de acceso microfluídico, demuestra todas las ventajas del transporte advectivo simulado (véase los párrafos 0037-0038 y la figura 8).

La sección transversal del dispositivo integrado se muestra en la figura 5, en la que el sistema se compone de un adaptador macromecanizado para una fácil integración y el chip micromecanizado para microfluidos y tinción de tejidos. El dispositivo microfluídico está integrado permanentemente con la parte del adaptador, mientras que solo los TS se ensamblan y desmontan entre los análisis. Esta configuración es necesaria para acceder al dispositivo de microfluidos con adaptadores fluídicos comerciales convencionales. Además, dicha integración de la tubería externa permite la utilización de presiones de fluidos de más de 20. 000 kpa (200 bar).

Un sistema que pueda realizar un tratamiento secuencial sin contaminación cruzada entre los reactivos es muy importante para realizar protocolos de tinción biomédicos de manera confiable. En el caso de los investigadores, se necesitan ensayos de IHC con 3 reactivos para cada objetivo. Para este fin, se ha realizado una calle de entrada de microfluidos en la estructura del adaptador, que puede combinar válvulas de retención de una sola dirección disponibles en el mercado. Estas válvulas de retención son vitales para evitar la contaminación cruzada, así como para bloquear el sistema de fluido externo durante el montaje y desmontaje del TS. Durante la operación, se aplica presión a la jeringa del reactivo requerido, que abre la válvula de retención correspondiente y libera líquido dentro de la cámara de tejido, mientras que las otras jeringas se mantienen sin presión, por lo tanto, selladas de la cámara de tejido. Dicha integración también mejora el rendimiento, ya que los investigadores evitan que se vuelva a llenar el gran volumen muerto del sistema microfluídico externo en cada reemplazo. Por otro lado, si se realiza la integración de válvulas de retención miniaturizadas en el dispositivo, los volúmenes muertos y los tiempos de flujo se pueden

reducir más.

Microfabricación

En la presente invención, los dispositivos microfluídicos se fabrican mediante grabado en iones reactivos profundo de múltiples etapas (DRIE) de zanjas microfluídicas y su posterior unión con una oblea de Pyrex recubierta con Parylene-C como se ilustra en la figura 6 para lograr mayor precisión y presiones de rotura. 1) Se tomó como comienzo una oblea de silicona de 10, 16 cm (4 pulgadas) con 2, 5 µm de óxido húmedo. 2) Luego se hizo girar 5 µm de la fotoresistencia AZ9260, se expuso con la máscara DNC y se desarrolló para formar los canales. El óxido debajo se grabó con RIE (Alcatel 601E). 3) Se quitó la resistencia y se realizó una etapa de litografía adicional usando una fotoresistencia AZ9260 de 5 µm (MicroChemicals GmbH, Alemania) y una máscara de cámara. Después de la litografía, la cara frontal está grabada en DRIE (Alcatel 601E) en dos etapas. Se trataba de formar canales y cámaras a diferentes alturas. Primero, la cámara se grabó a una profundidad de 100 µm y la resistencia se retiró. 4) Después de la retirada de la resistencia, los canales se grabaron a través de la máscara dura modelada en la primera etapa. La profundidad de grabado ha variado entre 50 y 200 µm dependiendo del diseño. 5) Más tarde, esta oblea se une a una oblea de Pyrex recubierta con Parylene de 2 µm mediante un procedimiento de unión de Parylene-C de baja tensión. Tenga en cuenta que la unión anódica también se puede usar en esta etapa, pero esto puede inducir una mayor tensión y grietas. 6) Después de la unión, se aplicó una etapa de litografía adicional a la pila unida desde el lado de silicio con una resistencia AZ9260 de 8 µm de espesor. Más tarde, se realiza una etapa más de DRIE hasta que se alcanza la cámara, que también se usó para generar muescas para la fijación de la junta tórica. Finalmente, la resistencia se retira. La fabricación se finaliza cortando la oblea. La figura 7(a) muestra los canales de microfluidos en la capa superior del dispositivo después de la fabricación y el corte. La figura 7 (b) muestra los orificios de acceso de microfluidos junto con la muesca en la que se coloca la junta tórica, ubicada en el lado inferior del dispositivo.

Los materiales usados y la técnica de microfabricación en la presente invención eliminan inconvenientes previos debido al uso de PDMS. Si ySiO_2 tienen un módulo de Young mucho más alto que el PDMS, lo que hace que los canales de microfluidos sean resistentes a la deformación bajo presiones fluídicas más altas, y permiten la aplicación de presiones fluidas de hasta 16 MPa (A. T. Ciftlik y col. Lab Chip, vol: 12 pp. 396 -400). Cuando se comparan, los sistemas creados con PDMS están limitados a presiones de alrededor de 0, 7 MPa (M. A. Eddings t col. J. Micromech. Microeng. , 18, pp. 067001). Por lo tanto, en el diseño de los investigadores, las características de flujo serán estables, incluso bajo presiones y caudales mucho más altos, lo que podría estar involucrado en un protocolo IHC. Además, gracias a la alta rigidez de los materiales usados y al desacoplamiento mecánico explicado anteriormente (véase el párrafo 0028), la fuerza requerida para un mejor sellado del portaobjetos de tejido no impone ninguna restricción, y los canales de microfluidos permanecen intactos. Por lo tanto, las variaciones en las dimensiones de diseño y los caudales debidos a la deformación de los canales siguen siendo insignificantes. Por lo tanto, es posible una aplicación de protocolo precisa, y cuando se usa para el diagnóstico, esta precisión garantiza la reproducibilidad. Además, el presente dispositivo puede funcionar hasta 200 °C y es mucho más robusto en términos de compatibilidad química con los reactivos que pueden estar involucrados en los protocolos de IHC. Además acepta las formas de portaobjetos de sección de tejido convencional, que no requieren ninguna personalización, y la comercialización de esta estructura como dispositivo de diagnóstico es sencilla con los patrones usados en la práctica clínica. La figura 7 (c) muestra la incorporación de un patrón TS en el sistema integrado, y la figura 7 (d)muestra el sistema integrado con la cámara de tejido formada.

Rendimiento del dispositivo y resultados clínicos

Concentración del tiempo de respuesta y caracterización de la uniformidad

La concentración se caracterizó mediante el análisis de los perfiles de intensidad de la cámara de tejido a partir de las imágenes obtenidas mediante el software de fuente abierta ImageJ. Para el análisis, los videos con 5 cuadros por segundo se convierten a escala de grises. Primero, la intensidad de concentración máxima (MxCI) se encontró experimentalmente calculando la intensidad media en toda la cámara durante un largo tiempo (100 s min) con un caudal de 40 µl/s. De manera similar, la intensidad de concentración mínima (MnCI) se encontró experimentalmente después de hacer fluir una solución tampón PBS. Estos dos valores se usan para normalizar la intensidad registrada en los experimentos y los valores normalizados se usan como concentración de reactivo, C, que varía de 0 a 1. Más tarde, los investigadores aplicaron las soluciones de reactivo y tampón aplicadas en forma de onda cuadrada con un periodo de 16 s y un ciclo de trabajo del 50 %, pero con un cambio de fase de 180°. A partir de los videos resultantes, se estudió el tiempo de respuesta de los cambios de concentración en diferentes regiones de la cámara de tejido, así como el comportamiento promedio. Las curvas de tiempo de respuesta generadas se usan para evaluar el posible rendimiento de tiempo del dispositivo de los investigadores. Por lo tanto, los investigadores usaron el ajuste de línea recta en las gráficas logarítmicas de C y 1-C. Estos ajustes dan un rendimiento de llenado y lavado en términos de décadas por segundo (dec/s), un indicador para calcular los tiempos de lavado y llenado requeridos para una pureza dada de llenado/lavado. Por otro lado, la uniformidad de la concentración en toda la cámara de tejido se calculó dividiendo la desviación estándar del histograma de píxeles del área de tinción del tejido a la profundidad de píxeles de la cámara en el instante de llenado y lavado completo.

Las gráficas de las medidas de tiempo de respuesta y uniformidad se dan en la figura 8. La figura 8 (c) muestra la respuesta de concentración de diferentes regiones de la cámara de tejido ubicadas alrededor de la entrada, el medio y la salida de la cámara, según se indica. Si bien hay un desfase evidente en la respuesta de concentración entre la entrada y la salida, el tiempo total de aplicación del reactivo es el mismo. Esto es bastante crítico para la reproducibilidad de los resultados, ya que la exposición prolongada o corta de determinadas regiones del tejido a los anticuerpos y la tinción puede dar lugar a niveles falsos de expresión del objetivo. Los investigadores también han observado que la intensidad media en toda la cámara es muy cercana a las mediciones en el centro de la cámara. Por lo tanto, para situaciones en las que se necesita un alto aumento óptico de una parte particular del corte de tejido, se puede usar el centro de la cámara, ya que el resto de la misma no se puede monitorear de todos modos. Las gráficas logarítmicas de C y 1-C, calculadas promediando la cámara de tejido completa se dan en la figura 8 **(a)** y **(b)**, en las que se muestra la media de las mejores pendientes del ajuste lineal para los ciclos de lavado y llenado. Se observa un rendimiento de llenado de -0, 40 dec/s, lo que significa que se necesitan 5 s de llenado para alcanzar el 99 % de la concentración de reactivo en el interior de la jeringa. De manera similar, el rendimiento de lavado fue de -0, 32 dec/s, lo que indica que 7 s de tampón fueron suficientes para disminuir la concentración por debajo del 1 % del valor inicial. Los investigadores pensaron que la discrepancia entre los dos se debe a la difusión de las moléculas, lo que favorece el ciclo de llenado pero compromete el lavado. La figura 8 **(d)** muestra el histograma de píxeles de la cámara en estados llenos, lo que demuestra una falta de uniformidad de concentración del 2 % en toda la cámara después de 5 s de llenado.

Optimización del tiempo de incubación para la detección proporcional de biomarcadores en un tejido canceroso

Habiendo demostrado la respuesta temporal de la cámara de microfluidos, los investigadores recurrieron al análisis de biomarcadores de diagnóstico en tejidos de cáncer de mama humano. Sobre la base del análisis anterior, se debe desarrollar un protocolo secuencial, así como un tiempo de incubación óptimo que genere imágenes de fluorescencia con una relación señal/fondo (SBR) reproduciblemente alta en casos positivos. En este estudio de optimización, los investigadores usaron 7 cortes de tejido HER2/neu positivo con expresión fuerte, que se cortaron adyacentemente de la misma muestra de tumorectomía, para diferentes tiempos de incubación (t_{inc}) de los anticuerpos primarios y secundarios para establecer las condiciones de incubación, y el tiempo de incubación se ha variado logarítmicamente, tomando 2^n minutos de incubación con n = -2, -1, 0, 1, 2, 3 y 4 para evaluar el efecto del tiempo de incubación en la señal resultante de 15 segundos a 16 minutos. Esto se hace junto con el diseño del dispositivo que sugiere una duración de difusión de 1 minuto desde el centro hasta la superficie del corte del tejido después del llenado y el conjunto anterior de tiempos de incubación constituye casos distribuidos logarítmicamente en torno al valor teórico.

La figura 9 muestra la optimización del tiempo de protocolo. (a) intensidad de fluorescencia obtenida para cortes de tejido HER2/neu positivo que se cortaron adyacentemente de la misma muestra de tumorectomía, para diferentes tiempos de incubación (t_{inc}) de los anticuerpos primarios y secundarios. (b) relación señal/fondo (SBR) con respecto al tiempo de incubación, obtenida al tomar la relación de la señal y los valores de fondo de (a). La mayor parte de la SBR se desarrolla linealmente durante los primeros 2 minutos de la incubación, lo que sugiere que las inmunorreacciones se encuentran en el régimen cinético en esta escala de tiempo. (c) velocidad de cambio de SBR por tiempo de incubación adicional. La velocidad es máxima en t_{inc}= 2 y comienza a disminuir cuando los cortes de tejido se sometieron a tiempos de incubación más largos. (d) estudio del coeficiente de variación (CV) en el nivel de valor de la señal calculado para diferentes regiones en el mismo corte de tejido que expresa el antígeno objetivo. Se observa una uniformidad de señal reproducible con un coeficiente de variación (CV) de alrededor del 2 % para los tiempos de incubación (t_{inc}) entre 2 y 8 minutos.

Después de la preparación del tejido y la recuperación del antígeno, los protocolos que se muestran en la **tabla 1**se aplican a los cortes de tejido, en los que los tiempos de llenado del reactivo y de lavado con tampón se seleccionaron como 5 s y 7 s, respectivamente. Siguiendo el protocolo aplicado en el MTP, se extraen los portaobjetos de los microscopios, los cubreobjetos y la adquisición de imágenes se ha realizado con un microscopio de barrido fluorescente. Más tarde, estas imágenes se usan para obtener los valores de la señal tomando el promedio de la intensidad de fluorescencia sobre los píxeles de la imagen que corresponden a las regiones que expresan HER2/neu ubicadas en la membrana celular de las células cancerosas. De manera similar, los valores de fondo se obtienen promediando la intensidad de fluorescencia sobre el resto de los píxeles (figura 9 (**a**). La gráfica de SBR calculada para cada tiempo de incubación como se muestra en la figura 9 (**c**), en la que se puede ver que incluso para el protocolo con n = *-2*, la señal es detectable y el SBR solo mejora de 1, 2 a 1, 90, cuando se aumenta el tiempo de incubación 64 veces para el caso HER2/neu. La mayor parte del SBR se desarrolla linealmente durante los primeros 2 minutos de la incubación, lo que sugiere que las inmunorreacciones se encuentran en el régimen cinético (reacción controlada) en esta escala de tiempo, y luego se controlan por difusión. Los investigadores también han estudiado el coeficiente de variación (CV) en el nivel de valor de señal calculado para diferentes regiones en el mismo corte de tejido que expresa el antígeno objetivo. Se observa una uniformidad de señal reproducible y, aunque disminuye con el tiempo, la CV se estabiliza después den = 1(Figura 9 (**d**)).

Los investigadores han elegido el protocolo con n = 1(2 minutos de tiempo de incubación) como protocolo eventual para usar en el estudio clínico de los investigadores. La razón principal es que paran ≤ 1, se considera que las

inmunorreacciones se encuentran en el régimen cinético y, por lo tanto, las incubaciones en esta escala de tiempo darán como resultado señales de fluorescencia linealmente proporcionales a la cantidad de antígeno expresado en los cortes de tejido. A continuación, la velocidad de aumento de SBR es máxima hasta n = 1y comienza a disminuir cuando los cortes de tejido se sometieron a tiempos de incubación más largos y, por lo tanto, el SBR por tiempo de incubación se mantiene al máximo cuando se usan = 1. (Figura 9 (**c**)). Los investigadores pueden concluir que el protocolo conn=1es el óptimo, ya que es aquel en el que las inmunorreacciones se encuentran en el régimen cinético con la máxima ganancia de SBR y también la CV mínima alcanzable en el nivel de la señal. Eso se traduce inmediatamente en 4½ minutos de tiempo total de protocolo.

Para realizar una comparación técnica cuantitativa del rendimiento con las técnicas anteriores de IHC, los investigadores diseñaron una figura de mérito, que se define como el área teñida por volumen de reactivo, tiempo de análisis y costo del reactivo. La **tabla 4**tabula los resultados, lo que indica una mejora de casi 100 veces en el tiempo y una mejora general de 1000 veces con respecto a las técnicas convencionales.

En un intento por disminuir el tiempo total gastado por objetivo, los investigares también se han cuestionado la viabilidad de un protocolo multiplex. Las mezclas de anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios se usan para dirigir a más de un receptor, lo que a su vez disminuye el tiempo total por objetivo en el ensayo IHC. La **tabla 2** muestra el momento de dicho protocolo, que se aplica a nuestros cortes de tejido de cáncer de mama. Si bien tiene el mismo tiempo total, el tiempo por objetivo se ha reducido a la mitad del protocolo no multiplexado. La figura 10 muestra un ejemplo de detección de fluorescencia múltiple de biomarcadores de cáncer de mama receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu) y receptor de estrógeno (ER) usando inmunohistoquímica con el sistema de los investigadores. Detección de fluorescencia múltiple de biomarcadores de cáncer de mama receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER2/neu) y receptor de estrógeno (ER) usando inmunohistoquímica con procesador de tejido microfluídico. La detección se realizó con el protocolo optimizado con un tiempo de incubación de 2 minutos (n = 1) y usando una mezcla de anticuerpos primarios y secundarios dirigidos contra los antígenos respectivos. **(a)**el canal azul significa contratinción nuclear conjugada con DAPI y ayuda a visualizar el núcleo de las células. **(b)**HER2 /neu se detectó con anticuerpo monoclonal de conejo antihumano primario y se visualizó con el anticuerpo secundario de IgG policlonal de cabra anticonejo marcado con Alexa-Fluor 594, representado en este caso en el canal rojo. **(c)**el receptor de estrógeno (ER) se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón antihumano primario (Clon 6F11) y se visualizó con el anticuerpo secundario de IgG policlonal de cabra antiratón conjugado con Alexa-Fluor 647, representado en este caso con el canal verde. **(d)**muestra tres canales juntos. El ancho de las imágenes corresponde a 600 µm y se obtiene al coser 6 por 6 imágenes de alta resolución usando un microscopio de barrido fluorescente.

Estudios clínicos

Con el fin de probar el sistema MTP desarrollado en un entorno real, los investigadores han realizado una serie de reacciones inmunohistoquímicas en un conjunto de 76 carcinomas de mama ductales invasivos recuperados de los archivos del instituto de patología. Después de establecer las condiciones experimentales óptimas para lainmunohistoquímicaHER2/neu en MTP, con tiempos de incubación para anticuerpos primarios y secundarios de 2 min (n = 1), los investigadores aplicaron su protocolo a los 76 carcinomas de mama ductales invasivos. La comparación de los resultados de diagnóstico entre IHC convencional y MTP-IHC se muestra en la figura 11. MTP-IHC produce un 90 % menos de resultados ambiguos en comparación con IHC convencional, y predice con precisión los resultados de la amplificación de ISH. La tabla incluida muestra la correlación cruzada de las puntuaciones de IHC y MTP-IHC convencionales para los 76 casos estudiados. Usando la técnica MTP-IHC, los investigadores no han producido un solo resultado falso positivo o falso negativo para los casos de puntuación (0) y (+) y los casos de puntuación (+++), respectivamente. Más importante aún, el número de casos de puntuación ambiguos (++) se redujo significativamente, de 27 casos a 3 casos (una reducción de casi el 90 %). 24 de los casos ambiguos de puntuación (++) que fueron diagnosticados por la IHC clásica fueron puntuados (0)/+ o (+++) por la MTP-IHC, y en cada uno de estos 24 casos, la asignación correspondió al estado de amplificación génica. Un caso que inicialmente había sido diagnosticado como caso (+++) fue reasignado a una puntuación (++). Por lo tanto, el resultado diagnóstico de HER2/neu se predice con mayor precisión cuando se usa MTP-IHC representada en lugar de IHC convencional.

Áreas alternativas y prolongadas de uso

La operación fluídica de la presente invención no solo se limita a la generación de un flujo impulsado por presión. Las etapas inventivas del presente dispositivo (reducción simultánea del tiempo de incubación, mantenimiento de las reacciones del protocolo en el régimen cinético, lo que lleva a la proporcionalidad demostrada entre la señal de lectura resultante y la cantidad de antígeno objetivo, y una alta uniformidad gracias al rápido y uniforme intercambio de fluidos) también se aplican cuando el flujo de fluido es inducido por otros mecanismos de actuación, que incluyen, pero no se limitan a, el flujo electrocinético o el flujo inducido térmicamente. Por ejemplo, existen otras invenciones que emplean flujo electrocinético o inducido térmicamente (documentos WO/2011/102801 y EP 1974 814), sin embargo, en estos documentos, la etapa inventiva se encuentra en determinadas disposiciones (o diseños, formas, etc.) de electrodos específicos que inducen el flujo en sí. Dichas reivindicaciones anteriores, por lo tanto, no pueden limitar el uso de la presente invención cuando se combinan con otras técnicas para inducir el flujo de fluido dentro de dichos microcanales y dicha cámara de tejido.

De manera similar, las etapas inventivas del presente dispositivo también se aplican cuando un sistema de control de temperatura, no limitado a, pero preferentemente realizado por electrodos y sensores integrados (metal o polímero) y/o al entrar en contacto con un elemento precalentado, se combina dentro del dispositivo microfluídico y el sistema integrado descritos en la presente invención. Por ejemplo, existen otras invenciones que emplean sistemas de control de temperatura integrados y/o añadidos (documento US/2005/009101) en un sistema microfluídico, sin embargo, en estos documentos, la etapa inventiva se basa en determinadas características, diseño y/o forma de los elementos de calefacción y detección de los que se compone el sistema de control de temperatura. Dichas reivindicaciones anteriores, por lo tanto, no limitan el uso de la presente invención cuando se combinan con una técnica para realizar el control de la temperatura dentro de dichos microcanales y dicha cámara de tejido.

Una aplicación de ejemplo que requiere control de temperatura es el procesamiento directo de las secciones de tejido incluidas en parafina y fijadas con formalina (FFPE). El procesamiento de las secciones de tejido FFPE requiere la eliminación de cera de parafina (desparafinado), la rehidratación y las etapas de recuperación de antígeno que se deben realizar en el chip. De hecho, esto es posible si se pueden fabricar microcalentadores (electrodos) en el dispositivo, ya que el procedimiento de recuperación de antígenos generalmente necesita calentar los tejidos a alrededor de 95 °C. Los investigadores pueden estimar el tiempo requerido para realizar este preprocesamiento de muestras en chip en función del tiempo conocido requerido para el protocolo de tinción. La **tabla 3** resume un protocolo de recuperación de antígeno y desparafinado en el chip, lo que sugiere que dicho preprocesamiento es factible en un período adicional de 5 minutos. Por lo tanto, junto con los 2, 5 minutos requeridos para la tinción, el dispositivo tiene el potencial de realizar el procesamiento completo de las secciones de tejido FFPE en 7, 5 minutos, mientras que el procesamiento completo más rápido hasta ahora informado es el mecanismo de "onda" (PCT/US2006/015020 y el documento WO/2006/116037), teniendo un tiempo de protocolo de 70 minutos.

De manera similar, las etapas inventivas del presente dispositivo también se aplican cuando un sistema de formación de imágenes (no limitado a, pero preferentemente, incluye detectores de luz o fuentes, o un conjunto de detectores de luz, que pueden fabricarse usando tecnología de microelectrónica de silicio) para la formación de imágenes de entidades inmovilizadas dentro de la cámara se combina con el dispositivo microfluídico y el sistema integrado descrito en la presente invención. Por ejemplo, existen otras invenciones que emplean dichos sistemas de formación de imágenes (documento WO/2010/148252) en un contexto microfluídico, sin embargo, en estos documentos, la etapa inventiva se basa en determinadas características, diseño y/o forma de estos elementos y/o estructuras de los que se componen los sistemas de formación de imágenes. Dichas reivindicaciones anteriores, por lo tanto, no limitan el uso de la presente invención en combinación con una técnica para integrar un sistema de formación de imágenes dentro de los microcanales y la cámara de tejido.

De manera similar, las etapas inventivas del presente dispositivo también se aplican cuando los componentes ópticos (no limitados a, pero preferentemente, incluyen lentes, objetivos, conjuntos de microlentes, polarización y/o filtros de luz fluorescente, ubicados frente a detectores de luz y fuentes o un conjunto de estos detectores de luz y fuentes) se combinan con el dispositivo microfluídico y el sistema integrado descritos en la presente invención. Por ejemplo, existen muchas otras invenciones que emplean dichos elementos ópticos (documento WO/2010/148252) en un contexto microfluídico, sin embargo, en estos documentos, la etapa inventiva se basa en determinadas características, diseño y/o forma de estos elementos y/o estructuras de los que se componen los sistemas ópticos. Dichas reivindicaciones anteriores, por lo tanto, no limitan el uso de la presente invención en combinación con una técnica para integrar elementos ópticos dentro de los microcanales y la cámara de tejido.

El dispositivo descrito en la presente invención demostró ser útil para la detección inmunohistoquímica de biomarcadores de cáncer, con un poder discriminativo muy mejorado en términos del resultado diagnóstico (según lo confirmado por la amplificación de genes) en comparación con la inmunohistoquímica convencional (Figura 11). Esto se explica por el tiempo de incubación significativamente más corto, lo que permite beneficiarse de la proporcionalidad que gobierna los primeros minutos iniciales de incubación, en los que los anticuerpos se unen a antígenos de una manera altamente proporcional, con una velocidad de unión constante como función directa de las concentraciones de anticuerpos y antígenos. Por lo tanto, la aplicación de la presente invención no se limita a IHC, sino que se puede usar para cualquier reacción de superficie que pueda ajustarse para funcionar en el régimen cinético proporcional para lograr una reacción que sea linealmente proporcional al alcance de los objetivos que se inmovilizan sobre un soporte sólido.

El dispositivo descrito en la presente invención hace uso de una disposición arquitectónica inteligente de orificios de acceso vertical y una red de canales de microfluidos distribuida alrededor de la periferia de la cámara (Figura 3) y alta presión para garantizar un intercambio de bioreactivo rápido, completo y uniforme dentro del bajo volumen de la cámara de incubación grande (16 mm por 16 mm) pero muy poco profunda (menos de 100 um) que cubre los cortes de tejido (**Figuras 2-8**). De esta manera, el período de lavado y llenado de los biorreactivos sobre los cortes de tejido debido al flujo convectivo obtenido se mantiene en un mínimo absoluto de 5-7 segundos, mientras que las condiciones de ausencia de flujo se aseguran durante el período de incubación real. Además, los investigadores observaron que el aumento de la relación SBR en función del tiempo de incubación es más predominante durante el régimen lineal inicial de reacción limitada (Figura 9 (c)) lo que indica que un corto tiempo de incubación, en el

presente dispositivo, es en general suficiente para lograr señales de lectura suficientemente fuertes sin aumentar necesariamente las concentraciones de anticuerpos de detección.

Un tiempo de procesamiento completo de 10 minutos de los tejidos de FFPE también se adapta bien a la escala de tiempo de la utilización intraoperatoria de la técnica, así como al uso de un sistema IHC de diagnóstico automatizado y miniaturizado independiente. La disminución de los volúmenes muertos, el aumento de la presión del sistema y la realización de reactivos uniformes y flujos de tampón sobre las muestras de tejido, ayudó a reducir el tiempo de ensayo, que es lo suficientemente corto como para ser considerado como una respuesta inmediata durante la cirugía. Los cortes de tejido inmovilizados en portaobjetos de vidrio convencional se sujetan mecánicamente a una estructura microfluídica y se pueden reemplazar en un minuto, que es la única etapa de montaje necesaria para cambiar el TS. La figura de la comparación de méritos (**Tabla 4**) puso de manifiesto que la presente invención puede demostrar una mejora de 1000 veces en comparación con las técnicas existentes.

La tecnología presentada puede transformarse fácilmente en una solución de diagnóstico inmunohistoquímico completa e independiente mediante la integración de un microscopio miniaturizado. Por lo tanto, el diagnóstico se puede hacer sin infraestructura adicional, personal capacitado y prácticamente sin mantenimiento.

La presente invención, sin embargo, no se limita a los ejemplos analizados anteriormente.

Referencias citadas

Vanesa Fernández-Moreira, Bo Song, Venkataragavalu Sivagnanam, Anne-SophieChauvin, Caroline D. B. Vandevyver, Martin Gijs, Ilkka Hemmilä, Hans-Anton Lehr, and Jean-Claude G. Bünzli. Bioconjugated lanthanide luminescent helicates as multilabels for lab-on-a-chip detection of cancer biomarkers. Analyst, number 135, páginas 42-52, 2010. B.

Ata Tuna Ciftlik, Bo Song, Caroline Vandevyver, Jean-Claude Bünzli, Hans-Anton Lehr, and Martinus Gijs. Fast immunohistochemical biomarker detection device for cancer tissue slices. Proceedings of 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Groningen, Netherlands, 3-7 de octubre de 2010, 2010.

Minseok S. Kim, Seyong Kwon, Taemin Kim, Eun Sook Lee, Je-Kyun Park. Quantitative proteomic profiling of breast cancers using a multiplexed microfluidic platform for immunohistochemistry and immunocytochemistry, Biomaterials, Volume 32, Issue 5, 11 de febrero de 2011, páginas 1396-1403

Kim MS, Kim T, Kong S-Y, Kwon S, Bae CY, y col. Breast cancer diagnosis using a microfluidic multiplexed immunohistochemistry platform. PLoS ONE 5(5): e10441. doi:10. 1371/journal. pone. 0010441, 2010

Page Erickson, Michael Everman, Michael Bell, Kevin Edberg, Matthew Botke. **Enhanced fluidic method and apparatus for automated rapid immunohistochemistry.** PCT/US2006/015020, documento WO/2006/116037, 2011

Micheal Mcneely, Nis Adey, Mark Spute, Edward Ayliffe, y col. , **Method and system for microfluidic interfacing to array.** PCT/US02/07113, documento WO/2002/072264, 2002

Arthur Queval, Nageswara R. Ghattamaneni, Cécile M. Perrault, Raminder Gill, Maryam Mirzaei, R. Anne McKinney and David Juncker. Chamber and microfluidic probe for microperfusion of organotypic brain slices. Lab Chip, 2010, 10, 326-334

Emmanuel Delamarche, Ute Dreschsler, and Robert Lovchik. **Multilayer microfluidic probe head and method of fabrication thereof.** PCT/IB2010/052018, documento WO/2010/128483, 2010

Emmanuel Delamarche, David Juncker, Bruno Michel, and Heinz Schmid. **Method and device for flowing a liquid on a surface.** PCT/IB2003/005350, documento WO/2004/050246, 2004

Lamprecht Waltraud, Mathes Anton, Wenczel Gyoergy, and Streit Wolfgang. **Device and process unit for providing a hybridization chamber.** Documento US/2006/0003440, 2006

Jon Hoshizaki, Joon Mo Yang, Maryam Shariati, David Cox, Kirk Hirano y col. , **Low-volume sequencingsystem and method of use.** PCT/US2010/047392, documento WO 2011/026136, 2011

Nils Adey. **Laminated microarray interface device.** PCT/US02/24616, documento WO/2003/015922, 2003.

Gibum Kim, Todd Schwoerer. **Microfluidic apparatus for wide area microfluidics.** PCT/US2008/074865, documento WO/2009/029845, 2009

Ata Tuna Ciftlik and Martin A. M. Gijs, Parylene to silicon nitride bonding for post-integration of high pressure microfluidics to CMOS devices, Lab on a Chip, 2012, 12 (2), 396-400. doi:10. 1039/c1lc20727j.

Mark A Eddings, Michael A Johnson and Bruce K Gale, Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices, Journal of Micromechanics and Microengineering, 2008, 18, 067001.

Nathaniel Robinson and Per Erlandsson, **An electrokinetic fluidic system,** documento WO/2011/102801, 2011.

Koninklijke Philips Electronics NV, A **microfluidic device based up on active matrix principles,** documento EP1974814, 2008

Gary Blackburn, **Microfluidic devices comprising biochannels,** documento US/2005/009101, 2005.

Jody Vykoukal, Daynene M. Vykoukal, Gregory P. Stone, Eckhard U. Alt, **method and apparatus for quantitative microimaging,** documento WO/2010/148252, 2010.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas que comprende
- un dispositivo microfluídico,
- una disposición de los orificios de acceso de microfluidos en dicho dispositivo microfluídico para inyectar y recoger, respectivamente, fluido de una cámara de microfluidos poco profunda, configurada dicha disposición de los orificios de acceso de microfluidos para el transporte advectivo de sustancias fluidas y reactivos dentro de dicha cámara de microfluidos de manera uniforme,
- puertos de entrada y canales de microfluidos formados en el exterior de la cámara, conectados los canales de microfluidos a los orificios de acceso de microfluidos y **caracterizados por**
- una junta tórica de sellado personalizada colocada en un lado del dispositivo microfluídico, configurado el dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas de modo que un portaobjetos desmontable que contiene muestras como entidades inmovilizadas, muestras biológicas o moléculas puede ponerse en contacto con el anillo de sellado del dispositivo microfluídico para formar dicha cámara de microfluidos y teniendo dicha cámara de microfluidos de área amplia y poco profunda y resistente a alta presión al menos una pared formada por dicho portaobjetos desmontable.

2. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según la reivindicación 1, que comprende medios de generación de flujo impulsados por presión que induce una diferencia de presión entre entradas y salidas para crear un flujo de fluido dentro de la cámara de microfluidos.

3. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según la reivindicación 1, que comprende medios de generación de flujo electrocinético para crear un flujo de fluido dentro de la cámara de microfluidos, mediante la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico entre dos o más puntos de dicha cámara de microfluidos, dichos canales de microfluidos y dichos orificios de acceso de microfluidos.

4. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según la reivindicación 1, que comprende medios de generación de flujo inducidos térmicamente para crear un flujo de fluido dentro de la cámara de microfluidos mediante la inducción del flujo de fluido mediante la generación de una diferencia de temperatura entre dos o más puntos de dicha cámara de microfluidos, dichos canales de microfluidos y dichos orificios de acceso de microfluidos.

5. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un elemento de calentamiento y un sensor de temperatura para ajustar y controlar la temperatura del fluido confinado en dicha cámara de microfluidos, dichos canales de microfluidos y dichos orificios de acceso de microfluidos.

6. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incorpora detectores de luz y fuentes o un conjunto de detectores de luz y fuentes fabricados con tecnología de microelectrónica de silicio para la formación de imágenes digitales de entidades inmovilizadas en portaobjetos de vidrio para la detección de campo brillante o fluorescente.

7. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende conjuntos de microlentes, polarización y/o filtros de luz fluorescente ubicados frente a detectores de luz y fuentes o un conjunto de estos detectores de luz y fuentes.

8. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la altura de la cámara es inferior a 100 µm.

9. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos orificios de acceso de microfluidos para el flujo de entrada y el flujo de salida están ubicados a lo largo de los bordes de la cámara de microfluidos.

10. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según la reivindicación anterior, en el que dichos orificios de acceso de microfluidos comprenden orificios para el flujo de entrada dispuestos a lo largo de un borde de la cámara de microfluidos y orificios para el flujo de salida dispuestos a lo largo de un borde opuesto de la cámara de microfluidos.

11. El dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos orificios de acceso de microfluidos son verticales y se extienden entre un lado superior y un lado inferior del dispositivo microfluídico, orientándose el lado inferior hacia la cámara de microfluidos, formando dichos canales de microfluidos un canal de red distribuida en la parte superior.

12. Un método de procesamiento de muestras biológicas y químicas realizado usando el dispositivo de procesamiento de muestras biológicas y químicas según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de:

- obtener dichos portaobjetos con entidades en uno o más lados de forma manual o automática;
- establecer dicha cámara formada incorporando dichos portaobjetos a dicho dispositivo microfluídico de forma manual o automática;
- someter las entidades en dichos portaobjetos de forma secuencial a sustancias fluidas o reactivas adecuadas durante periodos predefinidos y a temperaturas predefinidas;
- someter las entidades en dichos portaobjetos de forma secuencial a sustancias fluidas o reactivas adecuadas durante periodos predefinidos y a temperaturas predefinidas para la indicación de la detección.

13. Uso de un dispositivo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para someter entidades en la superficie del portaobjetos a una sustancia reactiva o fluida adecuada o cualquier secuencia de sustancias reactivas fluidas adecuadas durante periodos predefinidos, comprendiendo dicho uso al menos una de las siguientes operaciones:
i. un proceso histoquímico
ii. un proceso citoquímico
iii. un proceso inmunohistoquímico
iv. un proceso inmunocitoquímico
v. un proceso de inmunohistofluorescencia
vi. un proceso de inmunocitofluorescencia
vii. un proceso de hibridación *in situ*
viii. un proceso de hibridación *in situ* de fluorescencia
ix. un proceso de recuperación de antígeno
x. un proceso de recuperación de epítopos
xi. un proceso de recuperación de antígeno inducido por el calor
xii un proceso de recuperación del epítopo inducido por el calor
xiii. un proceso de grabado o disolución en parafina
xiv. un proceso de tinción

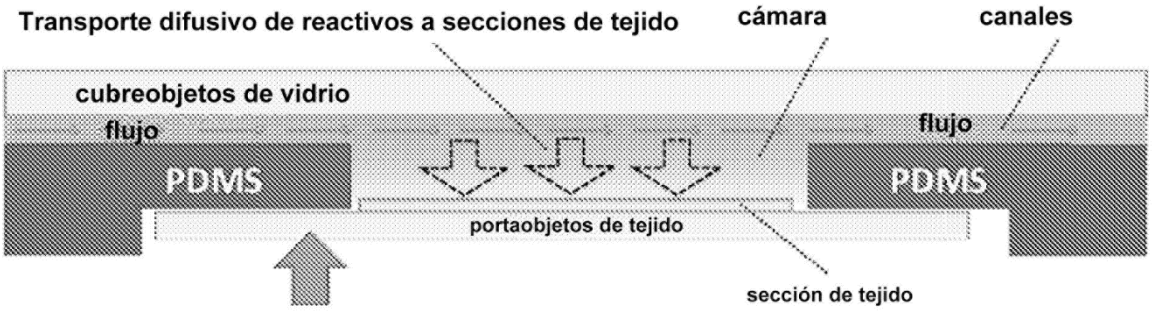


Figura 1

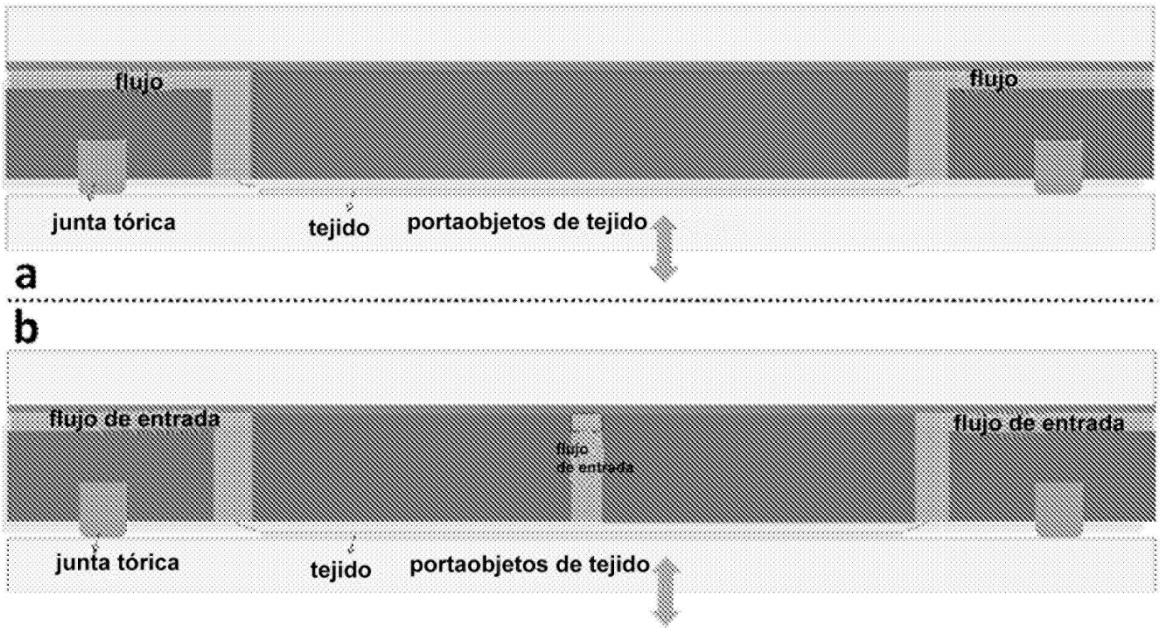


Figura 2

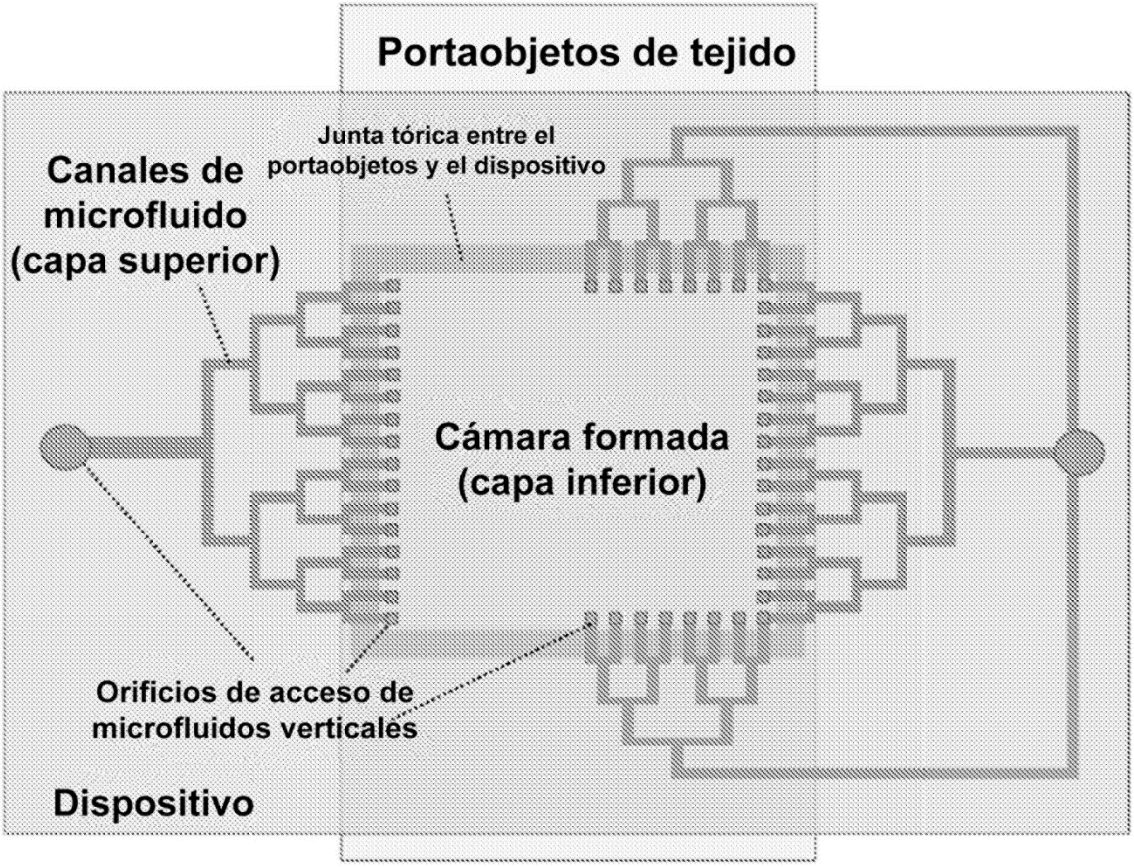


Figura 3

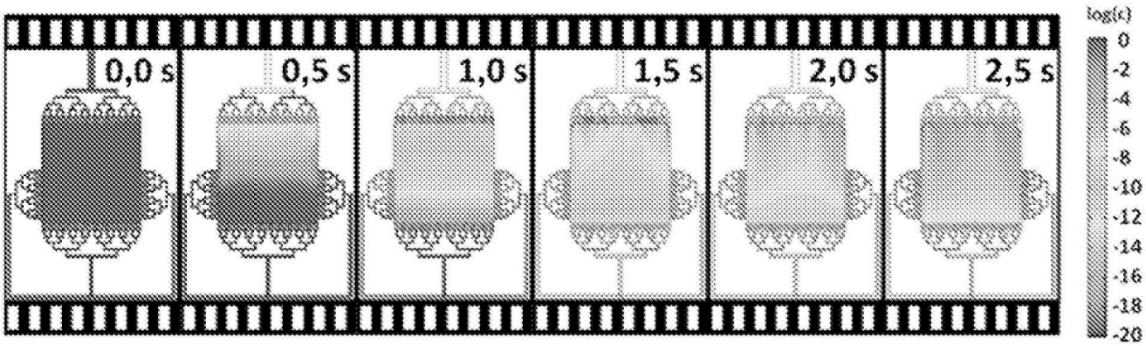


Figura 4

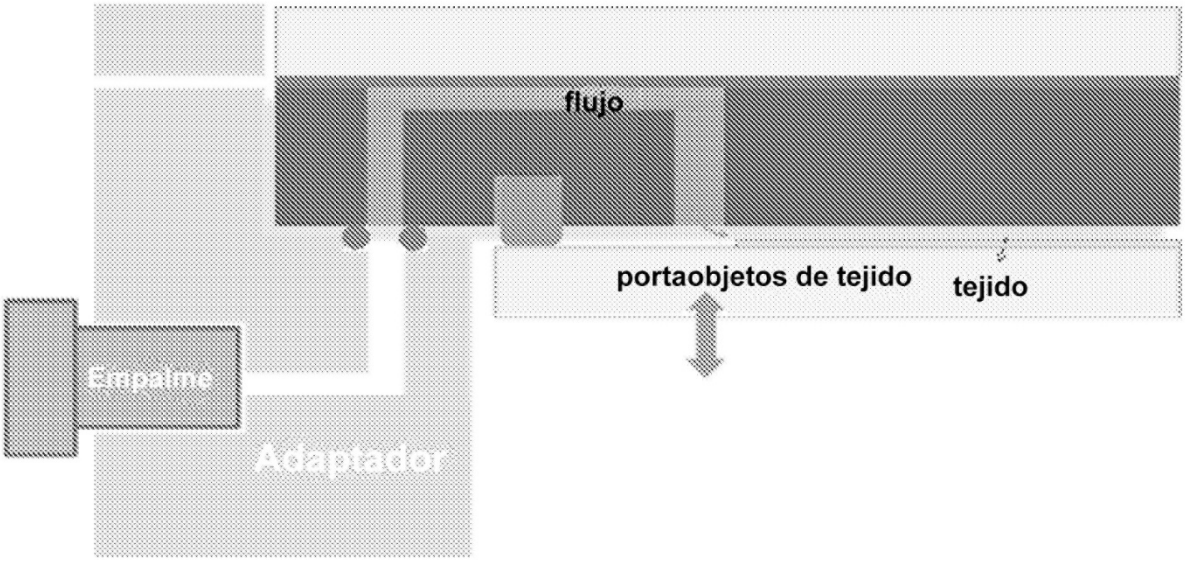


Figura 5

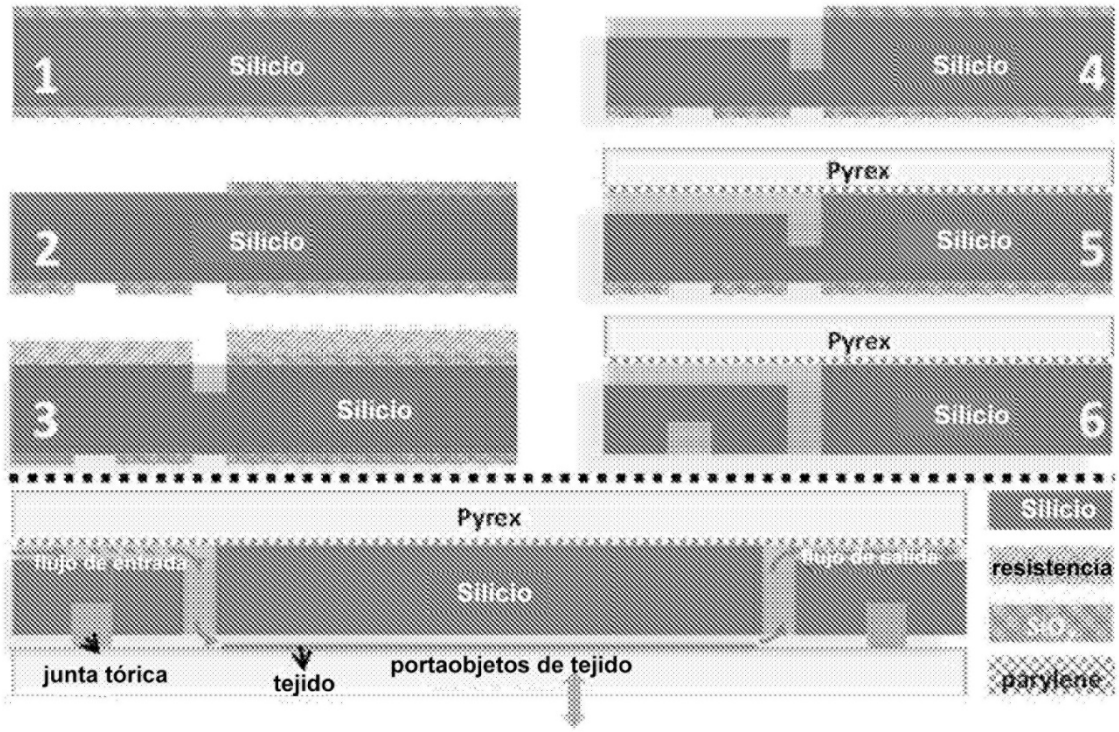


Figura 6

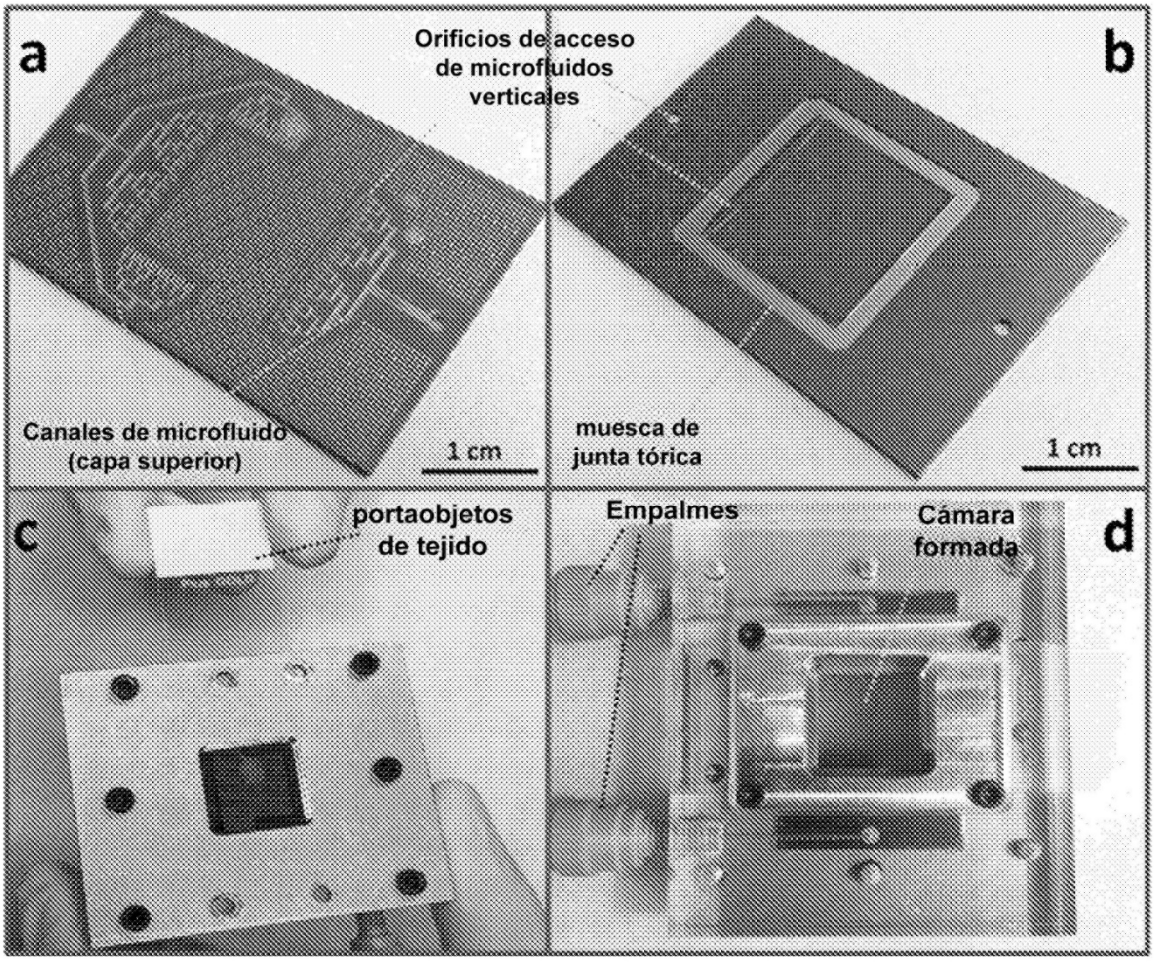

a
Orificios de acceso
de microfluidos
verticales
Canales de microfluido
(capa superior)
1 cm
b
muesca de
junta tórica
1 cm
c
portaobjetos
de tejido
Empalmes
Cámara
formada
d

Figura 7

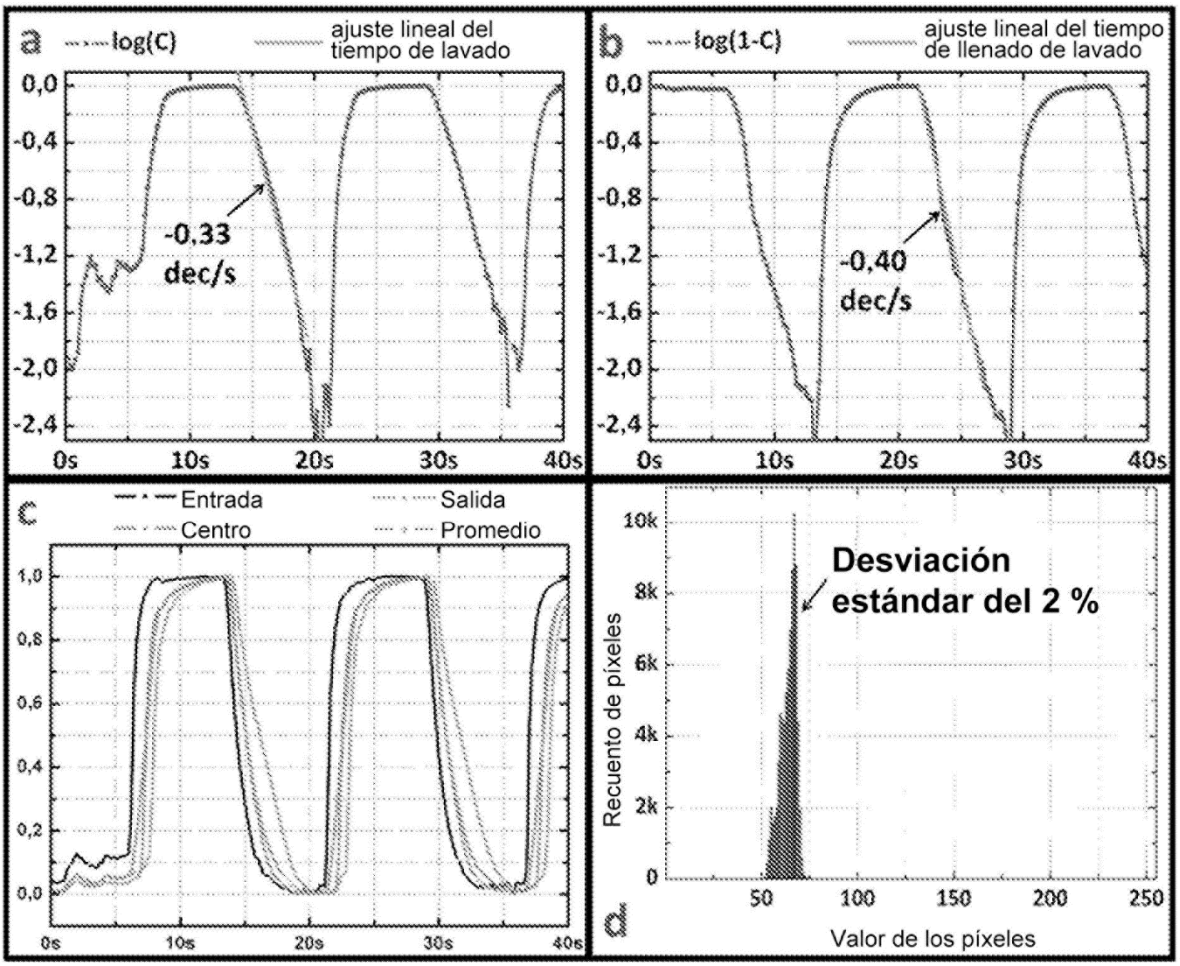

a
log(C)
ajuste lineal del tiempo de lavado
-0,33 dec/s
b
log(1-C)
ajuste lineal del tiempo de llenado de lavado
-0,40 dec/s
c
Entrada
Salida
Centro
Promedio
d
Desviación estándar del 2 %
Recuento de píxeles
Valor de los píxeles

Figura 8

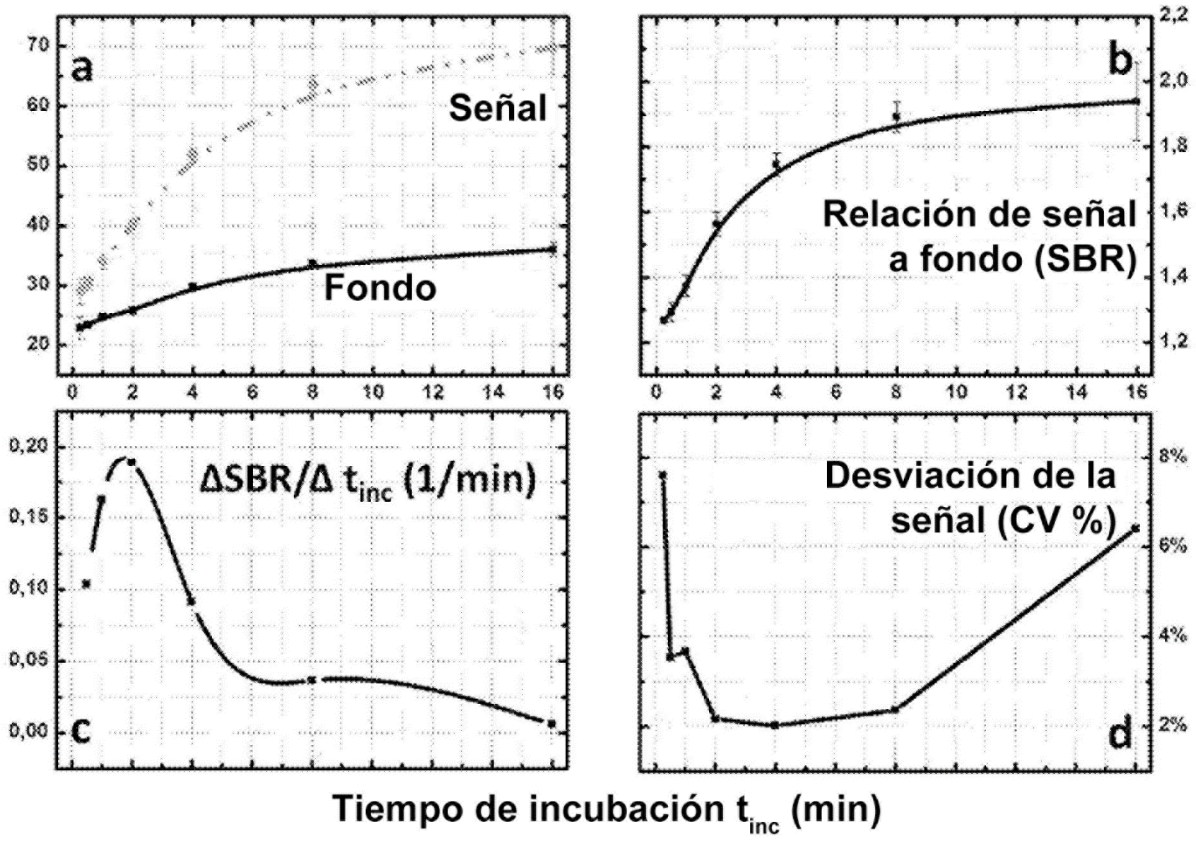

a
Señal
Fondo
b
Relación de señal
a fondo (SBR)
ΔSBR/Δ t_inc (1/min)
c
Desviación de la
señal (CV %)
d
Tiempo de incubación t_inc (min)

Figura 9

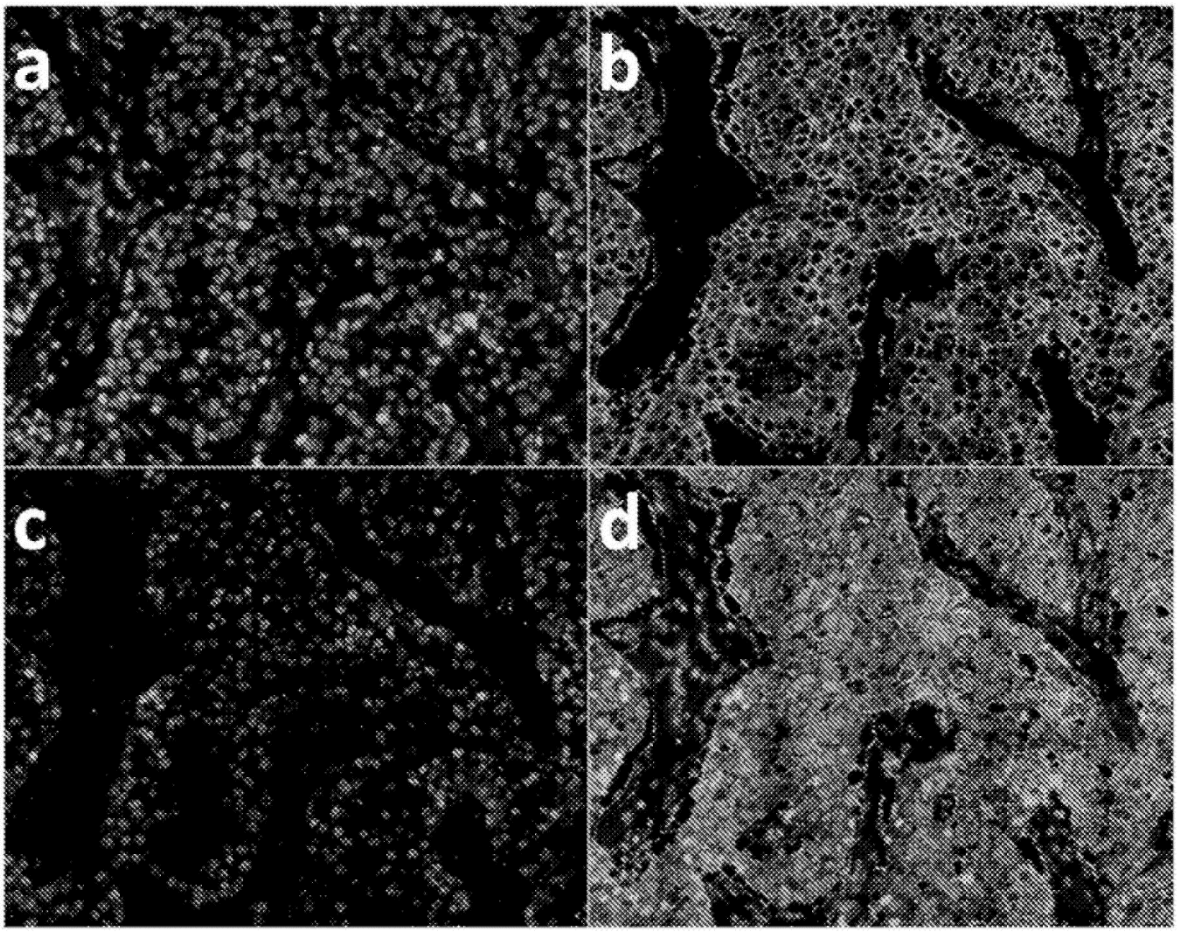
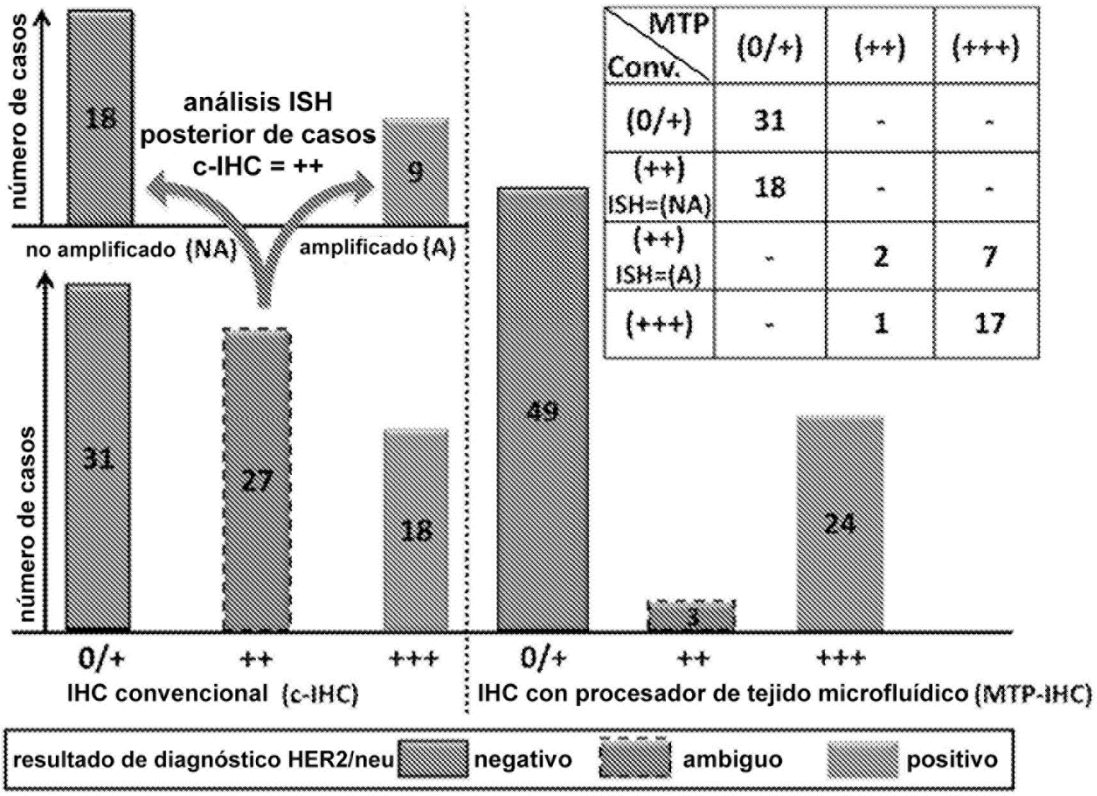


Figura 10



Conv. \ MTP	(0/+)	(++)	(+++)
(0/+)	31	-	-
(++) ISH=(NA)	18	-	-
(++) ISH=(A)	-	2	7
(+++)	-	1	17

Figura 11

Tablas

Tabla 1 - Momento del ensayo IHC aplicado en el dispositivo microfluídico para los estudios de optimización del tiempo de incubación. prAb y sdAb corresponden a los anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente. Para cada biomarcador, se estudian diferentes tiempos de incubación correspondientes a n=-2, -1, 0, 1, 2, 3, 4

Reactivo	Duración del flujo (s)	Tiempo de incubación (min)	Tiempo de etapa (s)
Tampón	7	-	7
prAb	5	2^n	$60(2^n)+5$
Tampón	7	-	7
sdAb con etiqueta fluorescente + DAPI	5	2^n	$60(2^n)+5$
Tampón	7	-	-
Total por agente	31	2^{n+1}	$60(2^{n+1})+31$

Tabla 2 - Momento de un ensayo IHC multiplexado aplicado en un dispositivo microfluídico

Reactivo	Duración del flujo (s)	Tiempo de incubación (min)	Tiempo de etapa (s)
Tampón	7	-	7
$prAb_1$ + $prAb_2$	5	120	125
Tampón	7	-	7
sdAb1 + sdAb2 con etiqueta fluorescente	5	120	125
Tampón	7	7	7
Total	31	240	**271**
Total por agente sin recuent. negat.	16	120	**136**

Tabla 3 - Momento provisional del pre-procesamiento IHC de los TC FFPE aplicado en un dispositivo microfluídico

Reactivo	Duración del flujo (s)	Tiempo de incubación (min)	Tiempo de etapa (s)
Desparafinado (Flujo de xileno)	30	-	7
Rehidratación (DI y etanol)	60		65
Solución de recuperación de antígeno y calentamiento	15	45	7
Recuperación de antígeno	-	120	65
Tampón	30	-	-
Total	135	165	**300**

Tabla 4 - Comparación del ensayo IHC convencional y de laboratorio en un chip demostrado anteriormente con el sistema presente

Sistema	Tipo de portaobjetos	Área teñida por objetivo	Reactivo	Costo por unidad de reactivo	Tiempo mínimo por objetivo (min)	Figura de mérito Área /(vol*min*costo)
Convencional	Estándar	100%	1000	2	120	4,15
1ª generación	Estándar	38%	33	10	20	52,34
MMIHC	Estándar	1,5%	30-60	0,1	90 to 154	55
"de ola"	Estándar	100%	250 to 350	2	15	132,5
2ª generación	No estándar	100%	180	10	3½	158
Este sistema no está multiplexado	Estándar	**100%**	**200**	**1**	**2½**	**2000**
Este sistema está multiplexado	Estándar	**100%**	**100**	**1**	**1¼**	**8000**