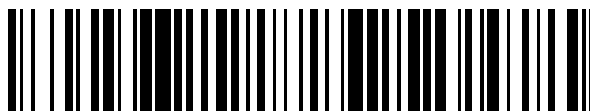


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 064**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014 PCT/EP2014/054009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14131906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014 E 14708231 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2961268**

54 Título: **Fijación y estabilización de muestras**

30 Prioridad:

01.03.2013 GB 201303666

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

15.04.2019

73 Titular/es:

**GOLDSBOROUGH, ANDREW SIMON (50.0%)
11 rue Francois Coppee
33400 Talence, FR y
BATES, MALCOLM ROBERT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOLDSBOROUGH, ANDREW SIMON y
BATES, MALCOLM ROBERT**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 709 064 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

Fijación y estabilización de muestras5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de un disolvente eutéctico profundo para inhibir la degradación de una biomolécula, al uso de un disolvente eutéctico profundo como fijador de virus, células o tejidos, y a un aparato para la fijación de células o tejidos y/o para Inhibiendo la degradación de una biomolécula.

10

Antecedentes de la invención

La extracción de biomoléculas intactas de una muestra biológica es una parte esencial de muchos procedimientos de diagnóstico clínico y de laboratorio. La inestabilidad de biomoléculas tales como los ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos es bien conocida y su integridad depende de un gran número de parámetros, tales como el estado fisiológico de la muestra antes de retirarla de su entorno original, con qué rapidez se extrajo la muestra de su fuente, la velocidad de enfriamiento de la muestra, la temperatura de almacenamiento de la muestra y el método de purificación de biomoléculas. Es bien sabido que el tratamiento de la muestra biológica antes y durante la purificación de biomoléculas puede acarrear cambios muy importantes en la globalidad y la integridad del analito de la muestra. Por ejemplo, es bien sabido que el ARN en particular es una molécula extremadamente lábil que se daña completa e irreversiblemente en cuestión de minutos si no se maneja correctamente. Aunque el ARN es quizás una de las biomoléculas más lábiles, las proteínas que incluyen modificaciones postraduccionales, los lípidos, las moléculas pequeñas de menos de 2000 daltons que son esenciales para el análisis metabólico y el ADN también pueden estar sujetos a procesos de degradación sustanciales.

25

Aunque las enzimas celulares endógenas son responsables de la mayoría de los procesos degradativos, el analito siempre tenderá a hidrolizarse espontáneamente durante el almacenamiento o el procesamiento, y este proceso depende en gran medida de condiciones de almacenamiento tales como la temperatura, el contenido de agua, el pH, la luz y la estabilidad y el peso molecular de la molécula de analito, pero también puede depender de la calidad de los reactivos utilizados.

30

Uno de los enfoques más comunes y simples para un almacenamiento satisfactorio es reducir la temperatura de la muestra biológica. En general, las muestras se almacenan a temperaturas inferiores a la temperatura ambiente (20-24°C); soluciones de proteínas a 4°C o -20°C, ácidos nucleicos en congeladores a -20°C o -80°C, en hielo seco o en nitrógeno líquido. Se pueden agregar agentes antimicrobianos tales como azida de sodio para controlar el crecimiento microbiano.

35

Es bien sabido que el ARN es particularmente sensible a la degradación por enzimas, hidrólisis espontánea, hidrólisis catalizada por catión metálico divalente, sensibilidad a los álcalis y entrecruzamiento en muestras de FFPE (fijadas con formalina incluidas en parafina). Muchas soluciones de metales tales como plomo, magnesio y manganeso son muy destructivas para el ARN y, de hecho, son esenciales no solo para la actividad de la ribozima sino también para la nucleasa, tales como la ADNasa I, la nucleasa de judía mungo y la nucleasa S1. El hierro (2+) ha sido implicado en la oxidación de nucleobases como parte de la reacción de Fenton que conduce a ARNr y ARNm deteriorados traduccionalmente (Honda et al., (2005) J. Biol. Chem. 280, 20978-20986), por ejemplo, la conversión de guanina en 8-oxo-guanina. Se han revisado otras posibles funciones catalíticas de los iones metálicos en las escisiones enzimáticas y no enzimáticas de los enlaces fosfodiéster (Yarus, M. (1993) FASEB J. 7, 31-39). De hecho, quelantes tales como EDTA y EGTA se añaden frecuentemente a ARN o soluciones de lisis de ARN con el fin de reducir la degradación del ARN mediante la eliminación de iones metálicos. Las ribonucleasas ("ARNasas") son un gran grupo de enzimas ubicuas asociadas con muchas fuentes, incluyendo microbios, piel humana, polvo y el contenido de células y tejidos. También se liberan fácilmente de las vesículas intracelulares durante la congelación-descongelación. Se sabe que ciertos tejidos, incluido el páncreas, son particularmente ricos en ARNasa A. La ARNasa A es una de las enzimas más estables conocidas, que recupera fácilmente su actividad enzimática después de, por ejemplo, la desnaturalización con sal caotrópica lo que hace que sea extremadamente difícil de destruir. Se requiere una alta concentración de un caótropro tal como la guanidina (4-6M) para destruir la actividad de la ARNasa (Thompson. J. y Gillespie. D. Anal Biochem. (1987) 163:281-91).

55

Existen varios métodos para inhibir la actividad de las ARNasas, tales como el uso de; (i) inhibidores peptídicos de ribonucleasa ("RNasin"), un reactivo costoso solo disponible en pequeñas cantidades y específico para ARNasa A, B y C, (ii) agentes reductores tales como el ditiotretitol y el β-mercaptoetanol que rompen los enlaces disulfuro en la enzima ARNasa, pero el efecto es limitado y temporal, además de ser tóxico y volátil, (iii) proteasas tales como la proteinasa K para digerir las ARNasas, pero el transporte de proteinasas en kits y su acción generalmente lenta permite que las biomoléculas del analito se degraden, (iv) reducción de la temperatura por debajo de la temperatura activa de la enzima; por lo general, las muestras de tejidos y celulares se almacenan a -80°C o en nitrógeno líquido, (v) anticuerpos anti-ARNasa, (vi) precipitación de las proteínas celulares incluyendo ARNasas, ADN y ARN usando

60

disolventes tales como acetona o sales cosmotrópicas tales como sulfato de amonio, una preparación comercializada de sulfato de amonio, es conocida como RNAlater™ (Sigma-Aldrich, EE.UU.; LifeTechnologies, EE.UU.; Qiagen, Alemania), (vii) detergentes para estabilizar los ácidos nucleicos en la sangre completa, tales como los que se encuentran en el ADN de PAXgene™ y Kit de extracción de ARN (PreAnalytix, Alemania), (viii) sales caotrópicas, (ix) alcoholes tales como los que se encuentran en el reactivo de estabilización de tejidos PAXgene™ (PreAnalytix, Alemania). Una gama de tales mezclas caotrópicas se exponen en TNA Isolation and Analysis, Editor. Jones (1994) Capítulo 2.

El objetivo principal del almacenamiento de la muestra es minimizar cualquier cambio en la biomolécula del analito que pueda introducirse como resultado del procedimiento pre-analítico y la purificación de la muestra para que el resultado analítico se asemeje lo más posible a la complejidad y diversidad original *in vivo* de las biomoléculas, mejorando así la precisión, sensibilidad y especificidad del ensayo. Si bien existen varios métodos y productos disponibles para reducir la variación pre-analítica, todos tienen varios inconvenientes que hacen que su uso sea problemático o subóptimo. Los procedimientos que son eficaces para estabilizar una clase de biomoléculas a menudo son ineficaces para estabilizar otras, por lo que el técnico está obligado a elegir un reactivo y un procedimiento especializados para cada analito de biomoléculas. Por ejemplo, el sistema PAXgene™ (PreAnalytix) (Patentes de Estados Unidos Núm. 6.602.718 y 6.617.170) se puede utilizar para ácidos nucleicos pero no para proteínas y requiere etapas de purificación prolongadas con múltiples tampones de lavado, mientras que los cócteles de inhibidores de proteasas ayudan a proteger las proteínas de la degradación pero no los ácidos nucleicos. El kit de estabilización de tejidos PAXgene™ requiere dos tratamientos separados del tejido e implica agentes químicos tóxicos e inflamables. El tratamiento RNAlater™ de los tejidos reduce su utilidad para la inmunohistoquímica, la histología y aumenta la dureza del tejido sin proteger completamente el ARN, sin embargo, se ha adoptado como el modelo de referencia para la preservación del ARN.

No siempre es posible purificar el ARN en el momento o el lugar donde se extrae la muestra, por ejemplo, una biopsia de un quirófano de un hospital o una muestra de sangre del consultorio de un médico. En estos casos, la muestra debe almacenarse con mucho cuidado antes de la extracción de ARN, que se puede realizar en tan solo 30 minutos, pero que suele ocurrir solo después de varias horas o días después del procesamiento en el laboratorio de patología del hospital. A menudo, el tiempo y la temperatura de la etapa pre-analítica están mal registrados, lo que lleva a un conocimiento ambiguo de la calidad de la muestra. Como consecuencia, ha sido necesario desarrollar condiciones de almacenamiento de muestras separadas para cada tipo de tejido y uso final del ARN. Como ya se ha indicado, esto generalmente implica el uso de una solución de estabilización específica tal como RNAlater o PAXgene o la congelación inmediata de la muestra en nitrógeno líquido. Al menos en el caso del reactivo de estabilización PAXgene, la eliminación incompleta del estabilizador tendrá un impacto negativo en los rendimientos de ARN durante la purificación (PAXgene Blood RNA Kit Handbook, junio de 2005).

El almacenamiento del tejido puede efectuarse mediante la fijación del tejido mediante un fijador. La "fijación" se refiere al aumento de la resistencia mecánica, el endurecimiento, la conservación y el aumento de la estabilidad de la muestra biológica tratada, tal como células frescas, biopsia o tejido, y mantiene la muestra en un estado lo más similar posible a la de la muestra fresca original *in situ*, en su estado natural. La fijación se utiliza comúnmente en patología, histología, histoquímica, citoquímica, estudios anatómicos y estudio de células, y generalmente precede a etapas adicionales tales como almacenamiento, inclusión, tinción, inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica. El proceso de fijación idealmente inhibe enzimas tales como las nucleasas y proteasas, detiene el crecimiento microbiano en la muestra y mantiene tanto la morfología tisular como la ultraestructura celular tal como el aparato de golgi, el núcleo, el retículo endoplásmico, las mitocondrias, los lisosomas y las membranas citoplasmáticas. Como ejemplo, la conservación de la morfología celular correcta es importante para que un patólogo pueda diagnosticar la presencia, el tipo y el grado de cáncer en un paciente, pero para hacer esto correctamente, la muestra también debe poder teñirse o etiquetarse correctamente con anticuerpos para inmunohistoquímica. Comúnmente, la muestra se trata con una solución acuosa al 1-5% de formalina (formaldehído) paraformaldehído o glutaldehído durante 1-24 horas a temperatura ambiente para permitir el entrecruzamiento de proteínas y otros componentes celulares y a continuación, después de seccionar el tejido, se tiñe con tinción de hematoxilina y eosina (H y E). Aunque también se puede utilizar glutaraldehído, su velocidad de penetración en el tejido es más lenta que con el formaldehído (que penetra a aproximadamente 1 mm por hora cuando se añaden 18-20 volúmenes con respecto al volumen del tejido). Si bien el ARN también se puede conservar de esta manera, en general se degrada mucho durante o después de la fijación con formalina, lo que hace que el análisis de la expresión génica sea altamente problemático y produzca la formación de artefactos. Un problema específico es que el analito de ARN se entrecruza con otras biomoléculas, tales como proteínas, por lo que, posteriormente, se debe liberar antes del análisis; este procedimiento generalmente es muy riguroso y requiere períodos prolongados a temperaturas elevadas, lo que conduce a una degradación significativa del ARN. Otro problema de la fijación es mantener analitos solubles tales como el ARN y las proteínas en la célula para que puedan integrarse, por ejemplo, mediante hibridación *in situ* o inmunohistoquímica. Otro problema más con la fijación con formalina, en particular, es que la modificación covalente de las proteínas celulares da como resultado la pérdida de inmunoreconocimiento antigénico que puede hacer que las técnicas de inmunohistoquímica sean difíciles o imposibles dependiendo del anticuerpo. Como ejemplo adicional, los tejidos fijados con formalina se incluyen rutinariamente en cera de parafina para permitir que el bloque de tejido

se corte en secciones finas y se examine microscópicamente (FFPE). Otros métodos comunes de fijación de tejidos implican el uso de metanol, etanol o acetona que dan como resultado la precipitación de proteínas en lugar del entrecruzamiento. Son particularmente necesarios métodos para reparar los tejidos, mantener una buena calidad de ARN y al mismo tiempo permitir la tinción inmunohistoquímica. Es bien sabido que los fijadores de uso común tales como el formaldehído, el paraformaldehído, el glutaldehído y el metanol son carcinógenos potencialmente tóxicos, mientras que el etanol y la acetona son altamente inflamables. El fijador ideal debería funcionar en una amplia variedad de tejidos, incluyendo neural, linfoide y graso, preservar grandes trozos de tejido y ser compatible con técnicas inmunohistoquímicas, histoquímicas y de hibridación *in situ* y otras técnicas especializadas. También debe ser compatible con los procedimientos automatizados de fijación de tejidos. Una revisión con protocolos detallados ha sido publicada por Bancroft (2008) 'Theory and Practice of Histological Techniques' and by Stanta (2011) 'Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues' mientras que los ejemplos representativos de tejidos fijados y teñidos se pueden encontrar en Ross y Pawlina (2011) 'Histology A Text and Atlas'.

Domínguez de Maria y otros (Current Opinion in Chemical Biology, vol. 15, núm. 2, pág. 220-225) describe líquidos iónicos en biotransformaciones.

Zhao et al (Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 72, núm. 3, pág. 163-167) describe la activación de proteasas en disolventes eutécticos profundos.

Mamajanov et al (Angewandte Chemie Int. Ed., Vol. 122, núm. 36, pág. 6454-6458) describe ADN y ARN en medios anhidros.

Compendio

En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un disolvente eutéctico profundo para inhibir la degradación de una biomolécula, en donde la biomolécula se selecciona entre un ARN y un ADN, opcionalmente en donde la biomolécula está presente en una muestra o tejido, opcionalmente en donde la muestra o tejido comprende un tejido sólido, plasma, suero o sangre completa, adicionalmente de manera opcional en donde la sangre completa incluye una célula tumoral circulante.

Sorprendentemente, se ha descubierto que es posible estabilizar biomoléculas tales como ARN, ADN y proteínas en muestras biológicas con disolventes eutécticos profundos (DES). También se ha descubierto que las mezclas de DES se pueden utilizar para reparar y preservar la morfología celular en muestras biológicas tales como bloques de tejido, biopsias de cáncer y sangre completa. En la presente memoria se describen métodos para estabilizar y preservar biomoléculas, células completas, tejidos y muestras biológicas utilizando mezclas de DES. La muestra o tejido puede comprender un tejido sólido o un tejido no sólido.

Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que muchas mezclas de DES son capaces de estabilizar y conservar el ARN, otras biomoléculas tales como proteínas y ADN, células y estructuras tisulares. El uso de componentes individuales de DES solos en una solución acuosa tal como Cloruro de colina (6M) o la Urea (5M) no permite la estabilización del ARN ni la fijación celular, solo cuando los componentes se combinan en un DES tal como Cloruro de colina:Urea preservan y estabilizan (Tabla 1). Los autores de la presente invención han encontrado solo, por ejemplo, que la mezcla de Cloruro de colina con Trifluoroacetamida es particularmente eficaz para estabilizar el ARN en las células mientras mantiene la morfología celular. Los autores de la presente invención también han encontrado que la mezcla de cloruro de colina con sorbitol es particularmente eficaz para estabilizar el ARN en tejidos completos. Sin embargo, es útil un número extremadamente grande de otras combinaciones y proporciones de componentes de DES.

Se ha informado sobre la separación de componentes de mezclas por líquidos iónicos naturales y DES naturales (documento WO 2011/155829) pero no se ha informado sobre el efecto del DES sobre la estabilización de biomoléculas o células. De hecho en el documento US 2009/0117628A1 se ha demostrado que las reacciones enzimáticas pueden llevarse a cabo en un DES, y que «una variedad de reacciones enzimáticas son activas en una variedad de DES», lo que indica que las nucleasas y proteasas y otras enzimas catabólicas serían igualmente activas. Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que el ARN y otras biomoléculas se estabilizan en mezclas de DES y la morfología celular se fija, lo que demuestra que el citoesqueleto también está estabilizado.

Los DES son mezclas de dos o más componentes que cuando se combinan tienen un punto eutéctico, que es la temperatura de solidificación o congelación (Fp). El punto eutéctico de los componentes combinados es generalmente mucho más bajo que cualquiera de los componentes individualmente o en cualquier otra proporción de mezcla y se produce a una temperatura única sin separación de los componentes individuales durante la solidificación. Las propiedades de los DES han sido descritas por A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Chem. Comun. 7 (2003) 70-71., A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 9142-9147, [7] G. Imperato, E. Eibler, J. Niedermaier, B. König, Chem.

Comun. 9 (2005) 1170-1172, S. Gore, S. Baskaran, B. Koenig, Green Chem. 13 (2011) 1009-1013, J.T. Gorke, F. Srienc, R.J. Kazlauskas, Chem. Commun. 10 (2008) 1235-1237, A.P. Abbott, J. Collins, I. Dalrymple, R.C. Harris, R. Mistry, F. Qiu, J. Scheirer, W.R. Wise, Aust. J. Chem. 62 (2009) 341-347, Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W.C.E. Arends, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Plant Physiol. 156 (2011) 1701-1705 y
 5 revisadas por Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jérôme F. Chem Soc Rev. 2012 7 de noviembre; 41(21): 7108-46.

Los DES industriales se han utilizado para el revestimiento electroquímico, aplicaciones de minería y lubricantes de perforación (documento US2009/0247432), aplicaciones enzimáticas industriales (documento US2009/0117628A1),
 10 preparación de compuestos inorgánicos (D. Freudenmann, S. Wolf, M. Wolff y C. Feldmann, Angew. Chem., Int. Ed., (2011), 50, 11050-11060) o compuestos orgánicos (S. Gore, S. Baskaran y B. Koenig, Green Chem., (2011), 13, 1009-1013), extracciones biológicas (documento WO 2011/155829), en electroquímica como electrolitos para células solares sensibilizadas por colorante y electropulido de metales (H.-R. Jhong, D. Shan-Hill, C.-C. Wan, Y.-Y. Wang y T.-C. Wei, Electrochem. Commun., (2009), 11, 209-211), depósito electrolítico (E. Gómez, P. Cojocar, L. Magagnin y E. Valles, J. Electroanalytical Chem., (2011), 658, 18-24), depuración de biodiesel (K. Shahbaz, F. S. Mjalli, M. A. Hashim y I. M. AlNashef, Energy Fuels, (2011), 25, 2671-2678), solubilización de fármacos (H. G. Morrison, C. C. Sun y S. Neervannan, Int. J. Pharm., (2009), 378, 136-139), solubilización de óxidos metálicos (A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D. L. Davies y R. K. Rasheed, J. Am. Chem. Soc., (2004), 126, 9142-9147) y solubilización de CO₂ (X. Li, M. Hou, B. Han, X. Wang y L. Zou, J. Chem. Eng. Data, (2008), 53, 548-550). Van Spronsen et al.
 15 establecen el uso de DES de origen natural, tales como varias combinaciones de aminoácidos, azúcares y ácidos carboxílicos para extracción en el documento WO2011/155829 pero no menciona su uso para la estabilización o la fijación de células y tejidos. Los DES descritos son para fines de extracción en lugar de estabilización y fijación.

Los DES no se consideran líquidos iónicos porque (i) no están completamente compuestos de especies iónicas y (ii) también pueden obtenerse de especies no iónicas, (iii) son mezclas y no compuestos. En comparación con los líquidos iónicos tradicionales, los DES derivados de, por ejemplo, Cloruro de colina tienen varias ventajas tales como
 25 (1) bajo coste, (2) son químicamente inertes al agua, (3) son fáciles de preparar simplemente mezclando dos o más componentes, (4) la mayoría son biodegradables y no tóxicos, (5) tiene baja volatilidad incluso cuando se calientan y (6) no son inflamables. Todos los DES son líquidos por debajo de 150°C y muchos son líquidos entre la temperatura ambiente y 70°C, con algunos ejemplos notables que son líquidos por debajo de 0°C.

Con frecuencia, se obtiene un DES mezclando una sal de haluro de amonio cuaternario con una sal de metal como ZnCl₂ o un donador de enlaces de hidrógeno tal como la Urea, que tiene la capacidad de formar un complejo con el anión haluro de la sal de amonio cuaternario. Sin embargo, se ha encontrado que también hay excepciones, como cuando no hay un anión haluro presente en el DES tal como en la Betaína:Trifluoroacetamida. Según se utiliza en la presente memoria, el término "betaína" se refiere a N,N,N-trimetilglicina, a menos que se especifique lo contrario.
 35

Los disolventes eutécticos profundos descritos en la presente memoria pueden incluir un componente que tiene un grupo amonio cuaternario.
 40

El componente que tiene un grupo amonio cuaternario puede ser un componente zwitteriónico que comprende adicionalmente un grupo carboxilato. Un componente bipolar preferido es la betaína (N, N, N-trimetilglicina).
 45

Alternativamente, el componente que incluye un grupo amonio cuaternario puede estar en forma de una sal con un contraión apropiado. El contraión es adecuadamente un haluro, y es preferiblemente cloruro, bromuro o yoduro, lo más preferiblemente cloruro. Otros contraiones adecuados incluyen nitrato, tetrafluoroborato y similares. Cuando el componente está en forma de una sal, el contraión preferiblemente no comprende un grupo carboxilato.
 50

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para estabilizar ARN en una muestra que contiene ARN, cuyo método comprende poner en contacto la muestra con una mezcla que contiene DES para formar una composición que contiene ARN estabilizado.
 55

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para estabilizar ADN en una muestra que contiene ADN, cuyo método comprende poner en contacto la muestra con una mezcla que contiene DES para formar una composición que contiene ADN estabilizado.
 60

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para estabilizar proteínas que incluyen fosoproteínas en una muestra que contiene péptido, cuyo método comprende poner en contacto la muestra con una mezcla que contiene DES para formar una composición que contiene proteína estabilizada.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para fijar la morfología nativa de una célula y estabilizar el ARN, el ADN y/o las proteínas en una muestra bacteriana, fúngica, animal o vegetal, tal como E. coli, Levadura, Nematodo, Drosophila, Pez cebra, Ratón, Rata, Arabidopsis thaliana, Arroz, Trigo, Maíz, Tabaco y/o Patata.

- 5 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para fijar y estabilizar la morfología nativa de una célula, en una muestra que contiene células, tal como un órgano, tejido, biopsia, célula tumoral circulante (CTC), muestra de sangre, muestra de plasma, muestra de suero, células de cultivo tisular, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, muestra médica, óvulo, embrión o tejido adulto, o muestra FFPE, cuyo método comprende poner en contacto la muestra que contiene la célula con una mezcla que contiene DES para formar un fijador y un estabilizador de la estructura celular y morfología compatible con recuento celular, detección de CTC, inmunohistoquímica, histoquímica, tinción y coloración, citometría de flujo, espectrometría de masas, hibridación *in situ*, microdissección de captura láser y análisis moleculares de, por ejemplo, ARN, ADN y/o proteínas.
- 10 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para fijar y estabilizar la morfología nativa de una célula, en una muestra que contiene células, por lo que el contenido de proteínas y la localización celular de proteínas pueden determinarse mediante el uso de un colorante, un anticuerpo o un aptámero, cuyo método comprende poner en contacto la muestra que contiene células con una mezcla que contiene DES para formar un fijador y un estabilizador de la estructura y morfología de las células y, al mismo tiempo o posteriormente, la muestra se pone en contacto con un colorante, un anticuerpo o un aptámero.
- 15 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para fijar y estabilizar la morfología nativa de una célula en una muestra que contiene células, por lo que el contenido de ARN y su localización celular se pueden determinar mediante el uso de una sonda marcada o no marcada, tal como un oligonucleótido, un cebador, un PNA, un LNA, un ADN, una secuencia de bADN o ARN, una secuencia de ácido nucleico complementaria natural o sintética, cuyo método comprende poner en contacto la muestra que contiene la célula con una mezcla que contiene DES para formar un fijador y un estabilizador de la estructura y morfología de la célula y al mismo tiempo o posteriormente, poner en contacto la muestra con una secuencia de hibridación natural o sintética para el análisis molecular.
- 20 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un kit para estabilizar ARN, ADN y/o proteína en una muestra biológica, cuyo kit comprende al menos un recipiente que contiene una mezcla de DES. El kit comprende adicionalmente instrucciones para poner en contacto la muestra con una mezcla de DES mediante la cual el ARN, el ADN y/o la proteína en la muestra biológica se estabiliza contra la degradación.
- 25 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un kit para estabilizar la estructura celular en una muestra biológica, cuyo kit comprende al menos un recipiente que contiene una mezcla de DES. El kit comprende adicionalmente instrucciones para poner en contacto la muestra con una mezcla de DES, por lo que la mezcla de DES sirve como fijador y/o estabilizador de la estructura celular para estudios microscópicos y/o histológicos como tinción y coloración, ISH y/o IHC.
- 30 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un kit para fijar morfología y estructuras celulares y tisulares en una muestra biológica, cuyo kit comprende al menos un recipiente que contiene un fijador DES y/o una mezcla estabilizadora y, opcionalmente, en donde el recipiente es permeable y tiene una altura máxima de 10 mm en el que se sumerge y fija y/o estabiliza la muestra. Las paredes del recipiente permeable pueden ser un tamiz o rejilla o estar provistas de ranuras que permiten el paso inicial y el acceso de la mezcla de DES a la muestra de tejido o célula, y/o el contacto subsiguiente con parafina líquida.
- 35 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una combinación de una mezcla de DES con un aditivo como fijador y estabilizador de biomoléculas que incluyen ARN, ADN y/o proteínas.
- 40 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona una composición que contiene ARN estabilizado, que comprende ARN y una mezcla de DES.
- 45 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona una composición que contiene ADN estabilizado, que comprende ADN y una mezcla de DES.
- 50 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona una composición estabilizada que contiene proteínas, que comprende proteínas y una mezcla de DES.
- 55 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de la estructura celular y/o histología y/o morfología del tejido, y un estabilizador de ARN, ADN y/o proteínas.
- 60 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de la estructura celular y/o histología y/o morfología del tejido, para su posterior inclusión en parafina y corte con microtomos, y opcionalmente tinción, hibridación *in situ* y/o inmunohistoquímica.
- En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de la estructura celular y/o histología y/o morfología del tejido, para el posterior corte con el criostato congelado y,

opcionalmente, tinción, hibridación *in situ* y/o inmunohistoquímica.

5 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de la estructura celular y/o histología y morfología del tejido, para la posterior microdissección por captura de láser (LCM) y opcionalmente la recuperación de proteínas, ADN y ARN.

10 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de biomoléculas y/o células en plasma, suero y sangre para el análisis de diagnóstico posterior que incluye células tumorales circulantes y/o glóbulos blancos y/o sangre completa, incluyendo captura de células, recuento y/o tipificación, tinción y/o coloración, espectrometría de masas, hibridación *in situ* y/o inmunohistoquímica. Opcionalmente se puede llevar a cabo la recuperación de proteínas, ADN y ARN.

15 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de exosomas, otros tipos de vesículas, microvesículas, cuerpos subcelulares y partículas tales como micelas, liposomas, endosomas, residuos celulares, membranas celulares, núcleos celulares, componentes citoplásmicos tales como un compartimento endocítico, aparato de golgi, retículo endoplásmico y/o mitocondrias. Adicionalmente, se refiere con la estabilización de ARN, ADN y/o proteínas contenidas en exosomas derivados de sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos corporales para su almacenamiento, transporte y manejo para una prueba de diagnóstico tales como extracción, análisis y/o identificación de miARN o ARNm contenido dentro de un exosoma u otra microvesícula extracelular.

20

25 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de partículas y moléculas pre-purificadas tales como partículas virales, bacteriófagos, ARN, ADN, proteínas tales como enzimas y anticuerpos, lípidos y grasas y/o carbohidratos. Pre-purificada se define en la presente memoria como una muestra que consiste en más del 80% de la partícula o molécula de interés.

30 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de biomoléculas, bacterias, hongos y/u otros patógenos tales como Leishmania, Trypanosoma y/o Plasmodium en plasma, suero, capa leucocitaria y/o sangre para posteriores análisis de diagnóstico de patógenos, incluidos diagnósticos bacterianos y/o virales.

35 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona el uso de una mezcla de DES como estabilizador de virus, partículas virales, ácidos nucleicos virales y/o proteínas tales como Influenza, VPH, VIH, VHB, VHC, Virus de la Fiebre Aftosa, Influenza, SARS y/o Virus del Nilo Occidental, en muestras biológicas tales como esputo, frotis, plasma, suero, capa leucocitaria y/o sangre para su posterior análisis de diagnóstico viral.

40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un aparato adecuado para la fijación de células o tejidos y/o para inhibir la degradación de una biomolécula, cuyo aparato comprende: una primera capa de disolvente eutéctico profundo formada por un primer disolvente eutéctico profundo; y una cavidad en la primera capa de disolvente eutéctico profundo para recibir una muestra que comprende la biomolécula; en donde el primer disolvente eutéctico profundo es un sólido o un gel. El aparato puede comprender adicionalmente una segunda capa de disolvente eutéctico profundo formada por un segundo disolvente eutéctico profundo, en donde la segunda capa de disolvente eutéctico profundo encierra la cavidad; y en donde el segundo disolvente eutéctico profundo es un sólido o un gel.

45

El primer y/o segundo disolvente eutéctico profundo pueden ser un disolvente eutéctico profundo como se define en la presente memoria y preferiblemente comprenden un componente seleccionado de 3,3,3-trifluoropropanamida, 2,2-difluoro-2-fenilacetamida, urea y tiourea.

50 El primer y/o segundo disolvente eutéctico profundo también pueden comprender un componente seleccionado entre cloruro de colina, yoduro de butirilcolina y N,N,N-trimetilglicina.

55 El aparato adecuado para la fijación celular o tisular y/o para inhibir la degradación de una biomolécula de acuerdo con la invención comprende una primera capa de disolvente eutéctico profundo formada por un primer disolvente eutéctico profundo. El primer disolvente eutéctico profundo es un sólido o un gel. Adecuadamente, los componentes del disolvente eutéctico profundo se seleccionan de manera que el disolvente eutéctico profundo sea sólido en las condiciones de uso deseadas, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 25°C y una presión de aproximadamente 1 atm. Alternativamente o adicionalmente, el disolvente eutéctico profundo se puede mezclar con un material de matriz que es un sólido o un gel en las condiciones de uso deseadas.

60

Los disolventes eutécticos profundos particularmente preferidos para uso como primer disolvente eutéctico profundo incluyen cloruro de colina:3,3,3-trifluoropropanamida, opcionalmente a una razón molar de aproximadamente 1:2; cloruro de colina:2,2-difluoro-2-fenilacetamida, opcionalmente a una razón molar de aproximadamente 1:1; cloruro de colina:trehalosa, opcionalmente a una razón molar de aproximadamente 1:1 y yoduro de butirilcolina:urea,

opcionalmente a una razón molar de aproximadamente 1:2.

Si el aparato comprende un segundo disolvente eutéctico profundo, el primer y segundo disolventes eutécticos profundos pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, el segundo disolvente eutéctico profundo se selecciona entre cloruro de colina:3,3,3-trifluoropropanamida, opcionalmente a una razón molar de aproximadamente 1:2; cloruro de colina:2,2-difluoro-2-fenilacetamida, opcionalmente a una razón molar de aproximadamente 1:1; cloruro de colina:trehalosa, opcionalmente a una razón molar de aproximadamente 1:1; y yoduro de butirilcolina:urea, opcionalmente a una razón molar de aproximadamente 1:2.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un kit en donde el disolvente eutéctico profundo es un disolvente eutéctico profundo como se define en la presente memoria.

La mejora de la calidad y la integridad del ARN suele ser notable, ya que es una de las moléculas más frágiles de la célula debido a su longitud y sensibilidad química a la agresión ambiental. Por lo común, como regla general, se puede considerar que si las moléculas de ARNr de la célula están intactas, el ARNm, el ADN, las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y los metabolitos pequeños también estarán intactos, sin embargo, si el ARNr se degrada, las otras biomoléculas también se pueden degradar o no dependiendo de la sensibilidad química particular de cada biomolécula. Existen algunas excepciones, por ejemplo que el tejido o la célula sean particularmente ricos en ciertas enzimas, tales como ARNasas, DNAsas, lipasas, esterasas, proteasas o fosfatasa, que conducirán a una degradación o modificación específica de una clase particular de biomoléculas.

El ARN al que se hace referencia puede encontrarse, obtenerse o asociarse con una muestra tal como un virus, una célula, una célula tumoral circulante, un líquido cefalorraquídeo, un lavado broncoalveolar, un suero, un plasma, una sangre, exosomas, otras microvesículas, muestras conservadas como bloques o secciones de FFPE, biopsias, tejidos sólidos o líquidos u otras muestras biológicas. También puede ser una molécula que contiene nucleósidos o nucleótidos, tal como un cAMP, ATP, GTP, monómeros, dímeros y oligómeros de desoxi- y ribo-nucleótidos, desoxi- o ribo-oligonucleótidos, ADN plasmídico, ADN genómico, ADN mitocondrial, ARN tal como microARN (miARN), Piwi-ARN, ARNip, ARNt, viroides, ARN circulante, ARN no codificante hs o dh circular, ARNhn, ARNm, ARNr tal como las especies de ARNr 5S, 5,8S, 16S, 18S, 23S y 28S, y ARN viral derivado de, por ejemplo, VHC, Virus de la Enfermedad del Nilo Occidental, Virus de la Fiebre Aftosa, Influenza, SARS o ARN del VIH y/o ARN extracelular (ARNex).

También puede ser una molécula derivada de un procedimiento orgánico sintético, tal como un oligo-sintetizador, una mezcla de ARN y ADN, una quimera de ARN y ADN, el producto de una reacción enzimática tal como una transcripción de ARN *in vitro*, ARN amplificado (ARNa), ribozimas, aptámeros, amplificación por PCR, amplificación por círculo rodante (RCA) o reacción en cadena de la ligasa (LCR), un patrón de control interno o ARN de control.

Los métodos de análisis de ARN que se beneficiarían de esta invención incluyen traducción de proteínas *in vitro* o *in vivo* de moldes de ARNm, polimerización de ARN dependiente de ARN, polimerización de ARN dependiente de ADN, análisis de corte y empalme de ARN, análisis de plegamiento de ARN, producción de aptámeros y ribozimas, mediciones de densidad óptica (DO), estudios de interacción de ARN: proteínas, electroforesis y sedimentación de ARN, incluidos patrones de peso molecular, productos bioconjugados de ARN, ligación de ARN, estudios de plegamiento de ARN, huella de ARN, estudios estructurales de RMN de ARN, síntesis de oligonucleótidos de ARN, ARN *in situ*, hibridación *in situ* (ISH), hibridación fluorescente *in situ* (FISH), secuenciación de ARN, transcripción inversa (RT), RT-PCR, RT-qPCR, ensayos de protección de nucleasas, técnicas de hibridación tales como la transferencia Northern, ADNb y micromatrices que incluyen la preparación de sondas, marcaje de ácido nucleico fluorescente, NASBA, ARNi, técnicas miARN tales como la extracción y cuantificación y aquellos métodos que requieren control de calidad y/o mediciones cuantitativas o cualitativas de ARN.

La inestabilidad se refiere a una alteración en el peso molecular o una alteración de la estructura química de la molécula de ARN, tal inestabilidad está asociada con el manejo, almacenamiento, transporte y/o el análisis real de la molécula de analito. La inestabilidad de la biomolécula a menudo depende de la actividad de las enzimas catabólicas naturales y, en particular, de las ARNasas que pueden alterar sustancialmente el peso molecular del ARN o implicar alteraciones de peso molecular mucho más pequeñas de la molécula de analito original. Tales ARNasas pueden tener un origen en la muestra biológica, por ejemplo, pueden liberarse progresivamente después del manejo de la muestra o pueden liberarse masivamente como resultado de un manejo inadecuado del tejido cuando, por ejemplo, se ha congelado y descongelado, un procedimiento que generalmente conduce a la ruptura de las vesículas intracelulares que contienen proteasas y nucleasas que, en consecuencia, inundan el citoplasma, lo que lleva a tasas muy altas de degradación del analito. Alternativamente, la enzima degradativa puede provenir de la contaminación externa del entorno de la muestra, tal como la contaminación microbiana o el deterioro de la muestra. La inestabilidad del analito generalmente se asocia con una reducción en la sensibilidad o el rendimiento del procedimiento analítico, ya sea el analito una proteína, un ácido nucleico, un carbohidrato, un lípido o un metabolito.

'Degradación' se refiere a los cambios físicos o químicos que se producen como consecuencia de la inestabilidad de

los biomoléculas y/o analitos. En cuanto a algunos ejemplos de degradación relacionada con los ácidos nucleicos, la degradación se puede referir a la desaminación de nucleobases tal como la conversión de citosina en uracilo, la oxidación de nucleobases tales como guanina, la pérdida de grupos metilo de la metilcitosina, la pérdida de una o más nucleobases, tal como la que se produce durante la depuración, la escisión de los enlaces fosfodiéster que conduce a la escisión de la cadena y la pérdida de uno o más nucleótidos de la mayor parte de la molécula de ácido nucleico. No se refiere solo a los cambios de la estructura secundaria o terciaria de la molécula.

"Integridad" se refiere a la integridad de una molécula y, por lo tanto, es lo opuesta a la degradación.

"Degradación sustancial" se refiere a una muestra que contiene al menos la mitad de las moléculas de analito que han sido escindidas o que han experimentado una reducción de su peso molecular en 5% o más. Los métodos para determinar la degradación son bien conocidos y dependen de la molécula de analito (véase Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.) Cold Spring Harbor University Press, NY). La determinación del peso molecular y, por lo tanto, el grado de degradación de los ácidos nucleicos se realiza comúnmente mediante desnaturalización o electroforesis en gel nativo y puede incluir transferencia Southern o Northern con una sonda de hibridación marcada. La cuantificación de ARN puede incluir el análisis utilizando un chip de ARN y el sistema Agilent Bioanalyser 2100™ y el cálculo del 'Número de Integridad del ARN' (RIN). La degradación del ácido nucleico también se puede cuantificar convenientemente mediante Q-PCR para el ADN, y RT-qPCR para el ARN utilizando, por ejemplo, un Lightcycler™ (Roche) y sondas de amplificación adecuadas. El cálculo de las razones de amplificación de RT-qPCR de los extremos 3'/5' de un ARNm, con frecuencia β -actina, después de la transcripción inversa utilizando un cebador oligo dT también se utiliza comúnmente para evaluar la degradación del ARN. Otros métodos incluyen ARNseq del contenido completo de ARNm de una célula o tejido, o la comparación de las señales de hibridación relativas de oligonucleótidos que representan los sitios 3' a 5' del ARNm después del análisis utilizando Affymetrix® GeneChips®. Los ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios más pequeños, de menos de 100 nucleótidos de longitud, tales como oligonucleótidos y miARN, se cuantifican con mayor precisión mediante espectrometría de masas tal como MALDI-TOF MS, esta técnica tiene la ventaja adicional de poder determinar también eventos de degradación que no alteran significativamente el peso molecular del analito, tales como la depuración o desaminación de las nucleobases. La mayoría de los análisis de miARN se llevan a cabo mediante RT-qPCR dedicado. A pesar de la sofisticación de los métodos para determinar el grado de degradación del ARN, es evidente que ciertas secuencias de ARNm son mucho más sensibles a la degradación que otras y puesto que los ARNr 18 y 28S son relativamente estables a la degradación, son solo un marcador sustituto deficiente para la extensión de la degradación del ARNm. Actualmente, el análisis preciso de la degradación del ARNm se realiza mejor utilizando RT-qPCR como se explicó anteriormente. Para una descripción detallada de los métodos para evaluar la degradación del ARN como resultado de los métodos de purificación de ARN, véase Muyal et al., (2009) *Diag. Camino*. 4:9.

Una "muestra pura" de ARN o ADN se refiere a una solución de ácido nucleico en agua donde la razón OD260/280 es 1,7 o superior.

Aunque, en general, la inestabilidad y la degradación están asociadas con una reducción en el peso molecular total de la molécula en estudio ("el analito"), por el contrario, puede relacionarse con un aumento en el peso molecular de un complejo que se añade progresivamente durante, por ejemplo, el almacenamiento. Un ejemplo de esto último sería la complejación o agregación de proteínas en ácidos nucleicos durante el almacenamiento de un tejido completo o el entrecruzamiento químico de las moléculas durante el procesamiento de una muestra, tal como con tejido incluido en parafina fijado con formalina ("FFPE").

"Estabilización" se refiere a las condiciones que conducen a una reducción general en la cantidad de degradación de una molécula de analito en comparación con el control. Tal control puede ser las condiciones utilizadas sin el uso de la invención, por ejemplo, el almacenamiento sin ningún estabilizador (Figura 11), pero la tasa de degradación del ARN generalmente es demasiado alta para ser una comparación útil, por lo tanto, un mejor control es el disponible comercialmente RNAlater utilizado según las instrucciones del fabricante (Núm. de Cat. 76106, Qiagen, Alemania). El control puede ser un fragmento de tejido extirpado, tal como una biopsia, una muestra de sangre o suero o un fragmento de tejido almacenado en RNAlater, por ejemplo, a 4, 20 o 37°C durante 1 - 16 h, o 1 - 45 días.

La rotura del tejido se refiere al procedimiento de descomponer una muestra de tejido grande en partículas que son lo suficientemente pequeñas como para ser lisadas por la adición de una solución caotrópica. La rotura descompone la muestra en pedazos lo suficientemente pequeños para permitir la liberación eficaz del analito para la consiguiente extracción y purificación del ARN.

Se puede llevar a cabo una etapa de "inactivación de ARNasa" para inactivar suficientemente la ARNasa y permitir la posterior estabilización con una mezcla de DES sin una degradación significativa del ARN. En la técnica se conocen numerosos métodos para inactivar las ARNasas, tales como la degradación enzimática con proteasas tales como la tripsina, la quimotripsina, la papaína o la proteinasa K, la reducción del enlace disulfuro con β -mercaptoetanol (Chirgwin, et al., "Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in

Ribonuclease," *Biochemistry*, 18:5294-5299, 1979), ditiotretitol, ditioeritritol, glutatión o TCEP, adición de la proteína RNasin (Life Technologies, EE.UU.), ARNsecure™ (Life Technologies, EE.UU.), tratamiento con un caótopo tal como guanidina HCl, tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, "Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidine Isothiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction," *Anal. Biochem.*, 162:156-159, 1987; Sambrook, et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", pág. 7.16-7.52, 1989), urea, formamida, formaldehído o yodoacetato de sodio, tratamiento con un detergente tal como Tween-20, Triton X-100, NP-40, SLS o SDS, EDTA, EGTA, citrato de sodio, calor o desnaturalización ácida, inhibición con complejos de vanadil ribonucleósidos (Berger y Birkenmeier, 1979) o entrecruzamiento con glutaraldehído. La muestra de tejido se trata inicialmente de tal manera que la actividad de la ARNasa se reduce a al menos 50, 75 o más preferiblemente 100% de su actividad no tratada antes del tratamiento con mezcla de DES como se describe en uno de los Ejemplos de la presente memoria. La actividad de la ARNasa residual antes del tratamiento se puede verificar un kit ARNasaAlert™ (Life Technologies, EE.UU.). Los métodos para inactivar las ARNasas en tejidos se exponen en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.777.210 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2009/0286304.

A modo de ejemplo, pero sin limitación, el DES se realiza mezclando, o mezclando y calentando uno o más componentes que pueden elegirse del grupo: Nitrato de colina, Tetrafluoroborato de colina, Hidróxido de colina, Bitartrato de colina, Dihidrogenocitrato de colina, p-Toluenosulfonato de colina, Bicarbonato de colina, Cloruro de colina, Bromuro de colina, Yoduro de colina, Fluoruro de colina, Cloruro de clorocolina, Bromuro de yodocolina, Hidróxido de acetilcolina, Bitartrato de acetilcolina, Dihidrogenocitrato de acetilcolina, p-Toluenosulfonato de acetilcolina, Bicarbonato de acetilcolina, Cloruro de acetilcolina, Bromuro de acetilcolina, Yoduro de acetilcolina, Fluoruro de acetilcolina, Cloruro de cloroacetilcolina, Bromuro de bromoacetilcolina, Yoduro de yodoacetilcolina, Hidróxido de butirilcolina, Bitartrato de butirilcolina, Dihidrogenocitrato de butirilcolina, p-Toluenosulfonato de butirilcolina, Bicarbonato de butirilcolina, Cloruro de butirilcolina, Bromuro de butirilcolina, Yoduro de butirilcolina, Fluoruro de butirilcolina, Cloruro de CloroButirilcolina, Bromuro de BromoButirilcolina, Yoduro de YodoButirilcolina, Cloruro de acetiltiocolina, L-Carnitina, D-Carnitina, Betaína, Sarcosina, N-óxido de trimetilamina, Betaína HCl, Cetilbetaína, Fluoruro de cetiltrimetilamonio, Cloruro de cetiltrimetilamonio, Bromuro de cetiltrimetilamonio, Laurilbetaína, Cloruro de N,N-dimetil-etanolamonio, Cloruro de N,N-dietil-etanolamonio, Cloruro de beta-metilcolina, Cloruro de fosfocolina, Citrato de colina, Cloruro de benzoilcolina, Laurilsulfobetaína, Cloruro de benciltrimetilamonio, Cloruro de metiltrifenilfosfonio, Bromuro de metiltrifenilfosfonio, Yoduro de metiltrifenilfosfonio, Fluoruro de metiltrifenilfosfonio, Cloruro de N-dietil-etanolamonio, Cloruro de etilamonio, Cloruro de tetrametilamonio, Bromuro de tetrametilamonio, Yoduro de tetrametilamonio, Fluoruro de tetrametilamonio, Cloruro de tetraetilamonio, Bromuro de tetraetilamonio, Yoduro de tetraetilamonio, Fluoruro de tetraetilamonio, Cloruro de tetrabutilamonio, Bromuro de tetrabutilamonio, Yoduro de tetrabutilamonio, Fluoruro de tetrabutilamonio, Cloruro de (2-cloroetil)trimetilamonio, Cloruro de terbio (III), Cloruro de cinc (II), Bromuro de cinc (II), Óxido de circonio (III), Cloruro de hierro (III), Cloruro de estaño (II), Cloruro de cobre (II), Cloruro de magnesio (II); con uno o más de otros componentes que también pueden formar un DES, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, uno o más de los siguientes agentes químicos seleccionados del grupo: Urea, Formamida, Tiourea, 1-Metilurea, 1,1-Dimetilurea, 1,3-Dimetilurea, Carbohidrazida, Tetrametilurea, 1,3-bis(hidroximetil)urea, Benzamida, Reactivo T de Girard, Lactamida, Bromoacetamida, Dibromoacetamida, Tribromoacetamida, Bromofluoroacetamida, Bromodifluoroacetamida, Bromoclorofluoroacetamida, Yodoacetamida, Diyodoacetamida, Triyodoacetamida, 2-Metil-2,2-difluoroacetamida, 2-Metil-2-fluoroacetamida, 2,2-Dimetil-2-fluoroacetamida, 2-Etil-2,2-difluoroacetamida, 2-Etil-2-fluoroacetamida, 2,2-Dietil-2-fluoroacetamida, 2-Propil-2,2-difluoroacetamida, 2-Propil-2-fluoroacetamida, 2,2-Propil-2-fluoroacetamida, 2-Fluoropropionamida, 3-Fluoropropionamida, 2,2-Difluoropropionamida, 2,3-Difluoropropionamida, 3,3-Difluoropropionamida, 3,3,3-Trifluoropropionamida, 2-Fluoro-3,3,3-trifluoropropionamida, 2-Cloro-3,3,3-trifluoropropionamida, 2,2-Cloro-3,3,3-trifluoropropionamida, 2-Bromo-3,3,3-trifluoropropionamida, 2,2-Bromo-3,3,3-trifluoropropionamida, Pentafluoropropionamida, Heptafluoropropionamida, Trimetilacetamida, 1-(Trifluoroacetil)imidazol, N,O-Bis(trifluoroacetil)hidroxilamina, Bistrifluoroacetamida, N-Metil-fluoroacetamida, N-Metil-difluoroacetamida, N-Metil-trifluoroacetamida, N-Metil-clorofluoroacetamida, N-Metil-clorodifluoroacetamida, N-Metil-cloroacetamida, N-Metil-dicloroacetamida, N-Metil-diclorofluoroacetamida, N-Metil-tricloroacetamida, N-Metil-bromoacetamida, N-Metil-dibromoacetamida, N-Metil-tribromoacetamida, N-Metil-bromofluoroacetamida, N-Metil-bromodifluoroacetamida, N-Metil-bromoclorofluoroacetamida, N-Metil-yodoacetamida, N-Metil-diyodoacetamida, N-Metil-triyodoacetamida, N-Metil-2-metil-2,2-difluoroacetamida, N-Metil-2-metil-2-fluoroacetamida, N-Metil-2,2-dimetil-2-fluoroacetamida, N-Metil-2-etil-2,2-difluoroacetamida, N-Metil-2-etil-2-fluoroacetamida, N-Metil-2,2-dietil-2-fluoroacetamida, N-Metil-2-propil-2,2-difluoroacetamida, N-Metil-2-propil-2-fluoroacetamida, N-Metil-2,2-propil-2-fluoroacetamida, N-Metil-2-fluoropropionamida, N-Metil-3-fluoropropionamida, N-Metil-2,2-difluoropropionamida, N-Metil-2,3-difluoropropionamida, N-Metil-3,3-difluoropropionamida, N-Metil-3,3,3-trifluoropropionamida, N-Metil-2-fluoro-3,3,3-trifluoropropionamida, N-Metil-2-cloro-3,3,3-trifluoropropionamida, N-Metil-2,2-cloro-3,3,3-trifluoropropionamida, N-Metil-2-bromo-3,3,3-trifluoropropionamida, N-Metil-2,2-bromo-3,3,3-trifluoropropionamida, N-Metil-pentafluoropropionamida, N-Metil-heptafluorobutiramida, N,N-Dimetil-2,2,2-trifluoroacetamida, N-Etil-2,2,2-trifluoroacetamida, N,N-Dietil-2,2,2-trifluoroacetamida, N-(Hidroximetil)Trifluoroacetamida, Etiltrifluoroacetato, Ditiotretitol, Ditioeritritol, Beta-mercaptoetanol, Penicilamina, Tiopronina, Acrilamida, Metanol, Etanol, Propanol, Butanol, Formaldehído, Glutaraldehído, Taurina, Ácido aconítico, Ácido adípico, Ácido benzoico, Ácido cítrico, Ácido malónico, Ácido málico, Ácido DL-maleico, Ácido oxálico, Ácido fenilacético, Ácido fenilpropiónico, Ácido succínico, Ácido levulínico, Ácido tartárico, Ácido gálico, Ácido p-toluenosulfónico, Glicina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina,

Serina, Treonina, Tirosina, Cisteína, Metionina, Ácido aspártico, Asparragina, Ácido glutámico, Glutamina, Arginina, Lisina, Histidina, Fenilalanina, Triptófano, Prolina, Etilenglicol, Trietilenglicol, Glicerol, Resorcinol, Fenol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,4-Butanodiol, 1,5-Pentanodiol, 1,6-Hexanodiol, 1,8-Octanodiol, 1,12-Dodecanodiol, m-Cresol, Imidazol, 1-Metilimidazol, 4-Metilimidazol, N-Metilpirrolidona, N-Etilpirrolidona, N-Bencilpirrolidona, 2-imidazolindona, tetrahidro-2-pirimidiona, Guanidina, Guanidina HCl, Isotiocianato de guanidina, Sulfato de guanidina, Acetato de amonio, Bicarbonato de amonio, Cloruro de amonio, Citrato de amonio dibásico, Formiato de amonio, Yoduro de amonio, Nitrato de amonio, Fosfato de amonio monobásico, Fosfato de amonio dibásico, Sulfamato de amonio, Sulfato de amonio, Tartrato de amonio dibásico, Isotiocianato de amonio, Benzoato de amonio, Bromuro de amonio, Fluoruro de amonio, Hidrogenosulfato de amonio, Trifluoroacetato de amonio, Tiosulfato de amonio, Adonitol, Ribitol, Ramnosa, Trehalosa, Trehalosa, D-Sorbitol, L-Sorbitol, Sorbosa, Xilitol, Glucosa, Sacarosa, Lactosa, Fructosa, Maltosa, Manosa, Manitol, Arabinosa, Galactosa, Rafinosa, Inositol, Eritritol o Xilosa.

Se apreciará que algunos compuestos descritos en la presente memoria pueden ser ionizables, es decir, algunos compuestos pueden ser ácidos débiles, bases débiles o anfóteros. Se pretende que las representaciones de las formas libres de los compuestos ionizables abarquen las formas ionizadas correspondientes. Por ejemplo, las representaciones de grupos ácido carboxílico abarcan los grupos carboxilato correspondientes.

Cabe señalar que ciertos componentes tales como el cloruro de cinc pueden formar un DES no solo con cloruro de colina, sino también con urea; tanto el cloruro de colina como el cloruro de cinc aparecen en el mismo grupo de componentes anterior, por lo tanto, ciertas mezclas de DES se pueden preparar a partir de productos químicos dentro del mismo grupo.

También se debe tener en cuenta que la lista anterior no es exhaustiva, y que los componentes del DES no están particularmente limitados a ningún tipo de molécula o propiedad, excepto que el enlace de hidrógeno entre los componentes de DES es frecuente pero no es un requisito absoluto.

Los disolventes eutécticos profundos utilizados de acuerdo con la presente invención están preferiblemente sustancialmente libres de ácidos orgánicos. En particular, los disolventes eutécticos profundos utilizados de acuerdo con la presente invención están preferiblemente sustancialmente exentos de ácidos orgánicos seleccionados entre ácido málico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido láctico, ácido acético, ácido aconítico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido glucurónico, ácido neurámico y ácido siálico. Alternativa o adicionalmente, R_6 , R_7 y R_8 como se muestra en las Fórmulas II y III, se seleccionan de manera que el compuesto resultante no comprenda un grupo ácido carboxílico. En una disposición preferida, cuando R_6 es OH, R_7 no es carbonilo. En otra disposición preferida, cuando R_7 es $-Z-C(O)R_8$, R_8 no es OH.

Los disolventes eutécticos profundos utilizados de acuerdo con la presente invención están preferiblemente sustancialmente libres de sales metálicas. En una disposición, los disolventes eutécticos profundos están sustancialmente libres de sales metálicas distintas de las sales de cinc o circonio. Los disolventes eutécticos profundos están preferiblemente sustancialmente libres de NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $NaHSO_3$, Na_2SO_4 , $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl, NaCl y KI. Si el disolvente eutéctico profundo comprende un azúcar o alcohol de azúcar, el disolvente eutéctico profundo preferiblemente no comprende una sal metálica.

Los disolventes eutécticos profundos utilizados de acuerdo con la presente invención están preferiblemente sustancialmente libres de azúcares o alcoholes de azúcar seleccionados entre sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, celobiosa, arabinosa, ribosa, ribulosa, galactosa, ramnosa, rafinosa, xilosa, sacarosa, manosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, xilitol, ribitol, galactitol, eritritol y adonitol. Si el disolvente eutéctico profundo comprende una sal metálica, el disolvente eutéctico profundo preferiblemente no comprende un azúcar o alcohol de azúcar.

También se debe tener en cuenta que no hay un número máximo concreto de componentes de DES en la mezcla de DES, por ejemplo, se pueden mezclar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más componentes para producir una mezcla de DES, usualmente pero necesariamente, a razones molares enteras, por ejemplo, en una mezcla de DES de dos componentes, el componente 1 y el componente 2 se pueden mezclar a las siguientes razones: 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10 (mol:mol) o, por ejemplo, en una mezcla de DES de tres componentes, el componente 1, el componente 2 y el componente 3 se pueden mezclar a estas razones: 10:1:1, 9:1:1, 8:1:1, 7:1:1, 6:1:1, 5:1:1, 4:1:1, 3:1:1, 2:1:1, 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3, 1:1:4, 1:1:5, 1:1:6, 1:1:7, 1:1:8, 1:1:9, 1:1:10 (mol:mol:mol).

El experto en la técnica entenderá que también son posibles otras razones de mezcla de los componentes, por ejemplo 20:1 o 1:30 (mol:mol) y que la razón molar concreta que conduce al punto eutéctico no es necesariamente la razón molar óptima o deseada. para el propósito particular de, por ejemplo, estabilizar el ARN y/o fijar la morfología celular. La actividad de estabilización del DES puede estar relacionada con las propiedades de enlace de hidrógeno de la mezcla de DES. No hay una restricción o limitación concreta en el número de componentes o la

proporción de mezcla para preparar una mezcla de DES útil para una aplicación concreta. Las propiedades físicas adicionales del DES, por ejemplo, la viscosidad o la densidad, se pueden modificar añadiendo un componente adicional, o alternativamente, añadiendo un "aditivo" como se establece a continuación. Algunas mezclas de DES se pueden preparar utilizando una razón molar fraccionaria, por ejemplo, se ha preparado ZnCl₂:urea a una razón 1:3.5 (mol:mol) y, de nuevo, no existen restricciones concretas a las razones molares del componente 1 y el componente 2, o del componente 1, el componente 2 y el componente 3, etc., que se utilizan, y la razón óptima de los componentes que comprenden la mezcla de DES que se utilizará para la aplicación, tal como la fijación de células, se determina empíricamente con mayor precisión. Solo a modo de ejemplo, el cloruro de colina/trifluoroacetamida se puede mezclar a una razón molar de 2:1, 1,75:1, 1,5:1, 1,25:1, 1:1, 1:1,25, 1:1,5, 1:1,75 o 1:2 mol/mol, o sus cantidades fraccionarias adicionales, y posteriormente se prueba individualmente para determinar cuál tiene la propiedad óptima de estabilización del ARN y/o de fijación celular.

Otros factores, tales como el coste o la toxicidad, también pueden llevar al experto a reducir la proporción de un componente en particular y a reemplazarlo parcialmente con una alternativa más económica. Solo por ejemplo, una mezcla de DES de Cloruro de acetilcolina:urea (1:2 mol:mol) puede, en ciertas aplicaciones, reemplazarse parcialmente con el cloruro de colina más económico, como en el Cloruro de acetilcolina:Cloruro de colina:urea (1:1:4 mol:mol:mol).

También resultará evidente para el experto que, debido a, por ejemplo, la presencia de contaminantes en los componentes utilizados para preparar el DES, tales como agua, oxidación, absorción de CO₂, subproductos contaminantes durante la síntesis o productos de degradación de uno de los componentes, y que la razón exacta deseada, por ejemplo solo, de una mezcla 1:1 (mol:mol) puede significar prácticamente +/- 10%, pero más preferiblemente 5% e incluso más preferiblemente 1% de diferencia en la cantidad exacta del componente 1 o del componente 2. A modo de ilustración, un error de 5% podría potencialmente proporcionar las siguientes razones molares finales: 0,95:1, 1:0,95, 1,05:0,95 o 0,95:1,05 (mol:mol) y el efecto de este error generalmente solo puede determinarse empíricamente, por ejemplo, su efecto sobre la calidad del ARN como se expone en el Ejemplo 1. Generalmente, para eliminar contaminantes incluyendo agua, se puede llevar a cabo el conocido procedimiento de recristalización en etanol, seguido de un extenso vacío. y/o secado químico. Los métodos se establecen en 'Purification of Laboratory Chemicals' Butterworth-Heinemann (2012).

Típicamente, pero ciertamente no exclusivamente, un DES se prepara mezclando un aceptor de enlaces de hidrógeno de una de las siguientes clases de agentes químicos; (i) una sal de nitrógeno con un catión cargado positivamente, tal como nitrógeno primario, secundario, terciario o cuaternario; un ejemplo de una sal de nitrógeno es aquella con un haluro, tal como Cloruro de colina, (ii) una sal metálica tal como un haluro de sal de metal de transición, con un donador de enlaces de hidrógeno que puede incluir (iii) una amina, (iv) un hidroxilo, (v) un aldehído, (vi) una amida o (vii) ácido carboxílico, de este modo, se incluirían donadores de enlaces de hidrógeno tales como azúcares, ácidos carboxílicos, ureas tales como Trifluoroacetamida y alcoholes.

En una disposición, el disolvente eutéctico profundo es un disolvente eutéctico profundo tipo III o tipo IV, en donde el ARN extraído de 10 mg de una muestra de hígado de rata incubada a 24°C durante 20 días con 400 mg del disolvente eutéctico profundo tiene un número de integridad del ARN (RIN) de al menos 4,0, medido con un Agilent Bioanalyser 2100.

El número de integridad del ARN se puede medir utilizando un kit de ARN RNA 6000 Nano total (Núm. de Cat. 5067-1511, Agilent Technologies, EE.UU.) y un aparato Bioanalyser 2100 (Núm. de Cat. G2939AA, Agilent Technologies, EE.UU.)

Según se utiliza en la presente memoria, el término "disolvente eutéctico profundo tipo III" se refiere a un disolvente eutéctico profundo que tiene al menos un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente es un compuesto de amonio cuaternario o fosfonio tal como cloruro de colina o N,N,N-trimetilglicina (betaína), y en donde el segundo componente es un donador de enlaces de hidrógeno, tal como la urea o la trifluoroacetamida. Un disolvente eutéctico profundo de tipo IV es un disolvente eutéctico profundo que comprende al menos un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente es una sal metálica tal como cloruro de cinc y en donde el segundo componente es un donador de enlaces de hidrógeno, tal como la urea.

Un experto en la técnica estará familiarizado con los métodos para extraer ARN de muestras de tejido. Adecuadamente, el ARN puede extraerse utilizando un kit RNeasy Mini (Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, aunque se pueden utilizar otros métodos.

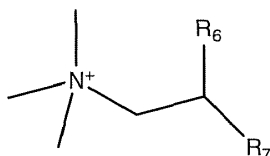
La presente invención proporciona el uso de un disolvente eutéctico profundo como fijador de virus, células o tejidos para producir un virus, célula o tejido fijados. Preferiblemente, al menos 75% de las células HeLa cultivadas en un sustrato e incubadas a 24°C durante 1 hora con el disolvente eutéctico profundo permanecen ancladas después de la sustitución del disolvente eutéctico profundo con agua e incubación a 24°C durante 1 hora.

Un experto en la técnica estará familiarizado con los métodos para determinar el número de células que permanecen unidas a un sustrato. Por ejemplo, aproximadamente 2.000 células HeLa podrían crecer en un sustrato adecuado, tal como un cubreobjetos. Un ejemplo de cubreobjetos adecuado es Cellattice™: Superficie de Cultivo Celular con Escala Micrométrica con un diámetro de 25 mm (Superficie de cubreobjetos de cultivo celular con escala micrométrica Núm. de Cat. CLS5-25D-050 Nexcelom Bioscience, EE.UU.). El sustrato se podría colocar en una placa de cultivo de tejidos y cultivar durante la noche en un tampón apropiado, tal como 2 ml de DMEM/10% de FBS. El número de células ancladas en un área definida del sustrato se puede contar manualmente utilizando una lente de microscopio objetivo 10x. El medio de cultivo tisular se puede eliminar utilizando, por ejemplo, una pipeta aspiradora y se puede reemplazar con 400 mg de un disolvente eutéctico profundo. El cultivo de tejidos se puede incubar durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir la fijación celular y a continuación eliminar el disolvente eutéctico profundo reemplazado con 2 ml de agua destilada, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y contar manualmente el número de células en un área definida de la cuadrícula. Se puede calcular el porcentaje de celdas ancladas que permanecen en el área definida en comparación con el número original.

En disposiciones particularmente preferidas, el ARN extraído de 10 mg de una muestra de hígado de rata incubada a 24°C durante 20 días con 400 mg del disolvente eutéctico profundo tiene un número de integridad de ARN (RIN) de al menos 4,0, medido utilizando un Agilent Bioanalyser 2100 y al menos 75% de células HeLa cultivadas en un sustrato e incubadas a 24°C durante 1 hora con el disolvente eutéctico profundo permanecen ancladas al sustrato después de reemplazar el disolvente eutéctico profundo por agua e incubación a 24°C durante 1 hora.

Opcionalmente, el disolvente eutéctico profundo utilizado de acuerdo con la presente invención es un disolvente eutéctico profundo tipo III, en donde el disolvente eutéctico profundo comprende un compuesto que comprende un grupo trifluorometilo. El compuesto que comprende el grupo trifluorometilo puede estar presente en el disolvente eutéctico profundo en una cantidad de al menos 5% en peso del disolvente eutéctico profundo.

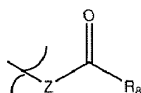
En una disposición, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente es un compuesto de Fórmula I:



en donde:

R₆ es H u OH;

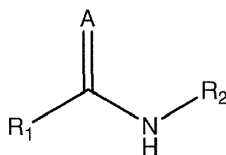
R₇ se selecciona entre H, CH₃, Cl, Br, un oxígeno carbonílico, y



Z se selecciona entre -CH₂-, O y S;

R₈ es R₁₁ o OH; y

en donde el segundo componente comprende un compuesto de Fórmula II o una sal del mismo:



en donde:

A se selecciona entre O, S y NH;

R₁ se selecciona entre H, un grupo alqueno que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, R₉, -NH₂, -NH- (CH₂)_aCH₃ y -C(R₃)(R₄)(R₅);

en donde a es 0 o un número entero de 1 a 5;

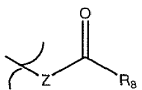
R₂ se selecciona entre H y un grupo alquilo lineal que tiene 1 a 3 átomos de carbono;

R₃ es un anillo aromático o alifático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es R₁₀;

R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o F; y

en donde cada uno de R₉, R₁₀ y R₁₁ se selecciona independientemente entre grupos alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, grupos monocloroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, y grupos mono-, di- o trifluoroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono.

- 5 Preferiblemente, en esta disposición, A se selecciona entre O, S y NH; R₁ se selecciona entre H, -CH=CH₂, R₉, -NH₂, -NHCH₃ y -C(R₃)(R₄)(R₅); R₂ se selecciona entre H y -CH₃; R₃ es un anillo aromático o alifático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es R₁₀; R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o F; y R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan cada uno independientemente entre grupos alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, grupos monocloroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono y grupos mono-, di- o trifluoroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono. Opcionalmente, R₇ se selecciona entre H, Br, un oxígeno carbonílico, y



- 15 A puede ser O o S.

R₂ puede ser H.

- 20 R₁ se puede seleccionar entre H, R₉, -CH=CH₂ y C(R₃)(R₄)(R₅). En esta disposición, se prefiere que R₁ sea R₉, donde R₉ preferiblemente tiene un átomo de carbono.

Preferiblemente, el segundo componente es acetamida o 2-cloroacetamida.

- 25 En otra disposición, R₉ es un grupo mono-, di- o tri-fluorometilo.

El segundo componente es preferiblemente trifluoroacetamida, trifluorotioacetamida o N-metiltrifluoroacetamida.

- 30 En otra disposición, R₉ tiene dos átomos de carbono, preferiblemente en donde R₉ es un grupo mono-, di- o trifluoroetilo.

Se prefiere que el segundo componente sea 2,2-difluoropropanamida o 3,3,3-trifluoropropanamida. En otra disposición, el segundo componente es formamida o acrilamida.

- 35 En una disposición adicional, R₁ es C(R₃)(R₄)(R₅), en donde R₄ y R₅ son preferiblemente F.

R₃ puede ser un anillo aromático de 6 miembros opcionalmente sustituido, tal como un grupo fenilo opcionalmente sustituido. Preferiblemente, el primer componente es 2,2-difluoro-2-fenilacetamida. Alternativamente, R₃ comprende un sustituyente, preferiblemente en la posición 2 del grupo fenilo.

- 40 El sustituyente es preferiblemente un grupo mono-, di- o tri-fluorometilo. Por lo tanto, en una disposición, el segundo componente es 2-(trifluorometil)fenilacetamida.

En otra disposición R₁ se selecciona entre -NH₂ y -NHCH₃. Preferiblemente, el segundo componente es urea, tiourea o 1,3-dimetilurea.

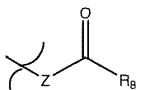
- 45 En una disposición adicional, A es NH. En esta disposición, el segundo componente puede ser guanidina, opcionalmente en donde la guanidina está presente en forma de una sal hidrosotiocianato.

En otra disposición, R₇ es H. En esta disposición, el primer componente comprende preferiblemente colina.

- 50 En otra disposición, el primer componente comprende bromocolina.

En otra disposición, el primer componente es N,N,N-trimetilglicina, opcionalmente en donde el segundo componente se selecciona entre trifluoroacetamida y urea.

- 55 En otra disposición R₇ es



En esta disposición, Z puede ser O o S y R₈ puede ser R₁₁, en donde R₁₁ tiene preferiblemente un átomo de carbono.

En esta disposición, el primer componente comprende preferiblemente acetilcolina o acetilticolina.

5 Alternativamente R₁₁ puede tener tres átomos de carbono, en donde el primer componente comprende preferiblemente butirilcolina.

10 En una disposición adicional, Z puede ser CH₂. En esta disposición, R₈ puede ser OH. En esta disposición, el segundo componente es preferiblemente carnitina.

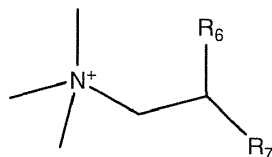
15 El primer componente puede comprender un contraión, cuyo contraión es típicamente un anión haluro pero puede ser otro anión tal como nitrato (NO₃⁻) o tetrafluoroborato (BF₄⁻). El anión haluro se puede seleccionar entre fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro, preferiblemente cloruro. En esta disposición, se prefiere que el primer componente sea cloruro de colina, opcionalmente en donde el segundo componente se selecciona entre trifluoroacetamida, trifluorotioacetamida; 3,3,3-trifluoropropanamida; 2,2-difluoro-2-fenilacetamida; tiourea y urea, preferiblemente trifluoroacetamida.

20 La razón molar del primer componente con respecto al segundo componente está en el intervalo de 1:3 a 2:1, preferiblemente en el intervalo de 1:1,5 a 1:2,5, más preferiblemente 1:2.

25 En una disposición adicional, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente es una sal haluro de colina; y en donde el segundo componente es un imidazol opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente o cada sustituyente es un grupo alquilo que tiene 1 a 3 átomos de carbono. En esta disposición, la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente está preferiblemente en el intervalo de 2,8:1 a 2:1.

30 La sal haluro de colina es preferiblemente cloruro de colina y el imidazol sustituido es preferiblemente un metil imidazol, tal como N-metilimidazol o 4-metilimidazol. También se contempla el uso de imidazoles sustituidos con bencilo, tales como 1-bencilimidazol. Alternativamente, el imidazol no está sustituido.

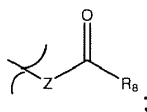
En una disposición adicional, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente comprende un compuesto de Fórmula III:



35 en donde:

R₆ es H u OH;
R₇ se selecciona entre H, CH₃, Cl, Br, un oxígeno carbonílico, y

40

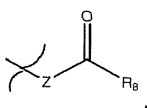


Z se selecciona entre -CH₂-, O y S;

45 en donde R₈ se selecciona entre OH, un grupo alquilo que tiene de uno a tres átomos de carbono, un grupo monocloroalquilo que tiene de uno a tres átomos de carbono, y un grupo mono-, di- o tri-fluoroalquilo que tiene de uno a tres átomos de carbono; y

en donde el segundo componente es un azúcar o un alcohol de azúcar que tiene al menos 3 átomos de carbono. R₇ se selecciona opcionalmente entre H, Br, un oxígeno carbonílico, y

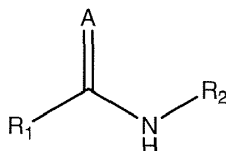
50



El alcohol de azúcar se puede seleccionar entre glicerol, trietol, xilitol, sorbitol y volemitol, preferiblemente entre glicerol, xilitol y sorbitol, y lo más preferiblemente es sorbitol. Alternativamente, el azúcar puede ser trehalosa.

En esta disposición, el segundo componente puede comprender colina, tal como cloruro de colina. La razón molar del primer componente con respecto al segundo componente puede estar en el intervalo de 1:2 a 2:1, preferiblemente en el intervalo de 1:0,8 a 1:1,2.

- 5 En una disposición adicional, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente es un haluro de cinc (II) o haluro de circonio (IV), y en donde el segundo componente es un compuesto de Fórmula IV:



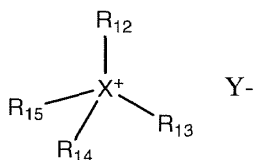
10 en donde:

- A se selecciona entre O, S y NH;
 R₁ se selecciona entre H, un grupo alqueno que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, R₉, -NH₂, -NH- (CH₂)_nCH₃, y -C(R₃)(R₄)(R₅);
 15 en donde n es 0 o un número entero de 1 a 5;
 R₂ se selecciona entre H y un grupo alquilo lineal que tiene 1 a 3 átomos de carbono;
 R₃ es un anillo aromático o alifático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es R₁₀;
 20 R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o F; y
 en donde R₉ se selecciona entre grupos alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, grupos monocloroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono y grupos mono-, di- o tri-fluoroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono.

- 25 El haluro de cinc (II) preferido es ZnCl₂. El haluro de circonio (IV) preferido es ZrCl₄. El segundo componente es preferiblemente urea. La razón molar del primer componente con respecto al segundo componente puede estar en el intervalo de 1:3 a 1:4.

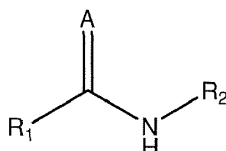
30 El segundo componente es preferiblemente urea.

- En una disposición adicional, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente es un compuesto de Fórmula V:



35 en donde:

- Y⁻ es Cl⁻ o Br⁻;
 X es N o P;
 40 R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son cada uno independientemente un grupo alquilo lineal que tiene 1 a 16 átomos de carbono, un grupo alcohol lineal que tiene 1 a 16 átomos de carbono, un grupo bencilo o un grupo fenilo;
 en donde el segundo componente es un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo:



45 en donde:

- A se selecciona entre O, S y NH;
 R₁ se selecciona entre H, -CH=CH₂, R₃, -NH₂, -NHCH₃ y -C(R₃)(R₄)(R₅);
 50 R₂ se selecciona entre H y -CH₃;

R₃ es un anillo aromático o alifático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es R₁₀; y
R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o F;

5 en donde cada uno de R₉ y R₁₀ se selecciona independientemente entre grupos alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, grupos monocloroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, y grupos mono-, di- o trifluoroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono.

10 Y⁻ puede ser Cl⁻. En disposiciones alternativas, Y⁻ puede ser cualquier contraión adecuado, tal como un haluro, nitrato o tetrafluoroborato.

X puede ser N; En esta disposición, el compuesto de Fórmula V es una sal de amonio cuaternario.

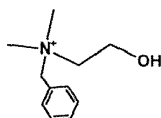
15 Opcionalmente, cada uno de R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ es independientemente un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 16 átomos de carbono, un grupo bencilo o un grupo fenilo.

20 Cada uno de R₁₂, R₁₃, R₁₄, y R₁₅ se puede seleccionar independientemente entre grupos alquilo lineales que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, y es cada uno preferiblemente un grupo metilo. En esta disposición, el primer componente es preferiblemente cloruro de tetrametilamonio.

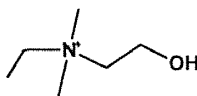
Alternativamente, cada uno de R₁₂, R₁₃, R₁₄, y R₁₅ es un grupo etilo. En esta disposición, el primer componente es preferiblemente cloruro de tetraetilamonio.

25 Alternativamente cada uno de R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ es un grupo butilo. En esta disposición, el segundo componente es cloruro de tetrabutilamonio o bromuro de tetrabutilamonio.

Alternativamente, el primer componente comprende:



30 Alternativamente, el primer componente comprende:



35 En otra disposición X puede ser P.

Al menos uno de R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ Puede ser un grupo fenilo. En esta disposición, el primer componente comprende preferiblemente metiltrifenilfosfonio y puede ser bromuro de metiltrifenilfosfonio.

40 En otra disposición A puede ser O o S.

R₁ se puede seleccionar entre -NH₂ y -NHCH₃ y el segundo componente es preferiblemente urea. Alternativamente, el segundo componente puede ser trifluorotioacetamida. Alternativamente, el segundo componente puede ser trifluoroacetamida.

45 La razón molar del primer componente con respecto al segundo componente puede ser de 1:1,5 a 1:2,5, preferiblemente de 1:1,8 a 1:2,2.

50 En una disposición adicional, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente comprende colina y en donde el segundo componente es un alcanodiol que tiene de 5 a 7 átomos de carbono. El alcanodiol es preferiblemente hexanodiol.

55 En otra disposición adicional, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente comprende colina y en donde el segundo componente comprende una N-alquil pirrolidona, en donde el grupo N-alquilo tiene 1 a 5 átomos de carbono. Preferiblemente, la N-alquil pirrolidona es N-metilpirrolidona. Preferiblemente, la colina es cloruro de colina. En esta disposición, la razón molar

del primer componente con respecto al segundo componente puede ser 1:2.

En otra disposición, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente comprende colina, y en donde el segundo componente comprende beta-mercaptoetanol. En esta disposición, la colina puede ser cloruro de colina y/o la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente puede ser aproximadamente 1:2.

En otra disposición, el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente comprende colina, y en donde el segundo componente comprende ditiotreitol. La colina puede ser cloruro de colina. La razón del primer componente con respecto al segundo componente puede ser de aproximadamente 1:2.

Las mezclas de DES se preparan de manera más simple a partir de productos químicos comercializados disponibles de compañías de reactivos químicos tales como Acros Organics (Francia), TCI (Bélgica), Fluka (Francia) y similares. Típicamente, las cantidades correctas de cada componente se añaden juntas en un tubo de polipropileno, se someten a agitación vorticial brevemente, se calientan a 100°C por medios convencionales y, si fuera necesario para componentes o aditivos difíciles de disolver, se someten a sonicación, lo que puede ser un método de mezcla extremadamente eficaz. Se debe tener cuidado con componentes tales como el Cloruro de colina, que son higroscópicos, ya que puede ser necesario un secado adicional del material a vacío o mediante recristalización. Las existencias de mezclas de DES se pueden mantener secas al vacío o por medio de desecantes como el gel de sílice. El almacenamiento es generalmente a temperatura ambiente en un tubo sellado.

También se ha encontrado que el tratamiento de tejidos de plantas y animales con una mezcla de DES tal como Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) conserva el color de las hojas, flores, sangre y tejidos, posiblemente al reducir la oxidación en comparación con las muestras no tratadas o las tratadas con RNAlater, Formol o congelación. La conservación del color puede ser útil para la correcta identificación de las muestras y/o componentes de las muestras.

Se ha encontrado que la preparación de una mezcla de DES entre el Cloruro de colina y agentes químicos volátiles/olorosos como Ditiotreitol, Ditioeritrol, Beta-mercaptoetanol o Fenol reduce notablemente la volatilidad y, por lo tanto, los efectos desagradables o peligrosos de la respiración de tales agentes químicos. Este efecto es probablemente el resultado de los enlaces de hidrógeno entre la sustancia química volátil y el cloruro de colina. No existe ninguna limitación concreta en cuanto a la combinación del componente volátil en la mezcla de DES, aparte de la necesidad de enlaces de hidrógeno entre los componentes. Este es también un medio para reducir la pérdida de otros componentes volátiles, tales como los alcoholes de bajo peso molecular, otros productos químicos orgánicos, tales como los disolventes, incluyendo DMSO y formamida. Por lo tanto, la presente descripción también incluye un medio para reducir la evaporación y/o la volatilidad de los componentes para su almacenamiento o uso en un entorno abierto. Las ventajas incluyen una mejor salud y seguridad, una menor pérdida de reactivos valiosos por evaporación, una menor inflamabilidad y una eliminación más sencilla.

El punto eutéctico de una mezcla de DES de dos o más componentes es el punto donde la proporción del componente 1 con respecto al otro o a los otros componentes conduce a la temperatura de fusión más baja. Por ejemplo, el punto eutéctico de una mezcla de DES de Cloruro de colina:Urea es (1:2 mol:mol) con un punto de congelación (Pc) referido de 12°C. Desde un punto de vista práctico, esto significa que el DES se puede manejar como un líquido a temperatura ambiente, pero se solidificará lentamente en el refrigerador. Otras mezclas de DES, particularmente aquellas que contienen Cloruro de colina mezclada con Glicerol, Etilenglicol y Trifluoroacetamida o Ácido fenilacético tienen un Pc mucho más bajo, permaneciendo líquidas por debajo de 0°C o incluso -20°C. Aunque el manejo de líquidos brinda ciertas ventajas, tales como la facilidad para medir volúmenes exactos y mezclar, es importante tener en cuenta que esta invención no se limita de ninguna manera a las mezclas de DES que son líquidas a temperatura ambiente o cualquier otra temperatura concreta. Calentar y mezclar los componentes de un DES proporciona un medio para que los átomos y moléculas individuales establezcan enlaces de hidrógeno u otras interacciones con otros átomos y moléculas y, por lo tanto, produzcan la propiedad particular de la mezcla de DES. Una vez que esto ocurre, ya sea la mezcla de DES un líquido, un gel o un sólido, no necesariamente cambia su capacidad para, por ejemplo, estabilizar el ARN en una muestra de tejido. El contacto simple entre la muestra de tejido y la mezcla de DES se producirá incluso cuando el DES sea sólido a temperatura ambiente y se pueda producir una rápida estabilización. Aunque tradicionalmente los reactivos de estabilización de ARN son líquidos tales como RNAlater, AllProtect, PAXgene Tissue o formalina, la invención aquí descrita puede hacer uso de las propiedades de estabilización de ARN y/o fijación de células de DES líquidos, en gel o sólidos. De hecho, el uso de una forma sólida de un DES puede ser ventajoso cuando se manejan muestras de tejido; se puede formar un bloque sólido de DES calentando el sólido DES por encima de su punto eutéctico para que se derrita y a continuación vertiéndolo en un recipiente adecuado para su enfriamiento y solidificación o, moldear o cortar para que quepa en un recipiente específico y colocar la muestra de tejido en la superficie de DES sólida para lograr estabilización. Convenientemente, se pueden realizar pocillos, depresiones o ranuras en la superficie del DES sólido para que sirvan como ubicaciones de almacenamiento específicas para cada muestra, recibiendo un pocillo una muestra, etc.,

ventajosamente con el uso de un pocillo, el área de superficie en contacto entre el DES sólido y la muestra aumenta (Figura 1A), mientras que una capa adicional de un sólido o líquido DES sobre la muestra ubicada en el pocillo aumentará adicionalmente la cantidad total de DES disponible y el área de contacto con la muestra (Figura 1B). En la (Figura 1C) se muestra un tubo de recolección de sangre que contiene un líquido DES y una tapa perforable para la entrada de la sangre con una jeringa o un kit de recolección de sangre (PreAnalytix). A modo de ejemplo, las mezclas de DES que son sólidas o líquidas a temperatura ambiente se exponen en la Tabla 1.

Se puede utilizar un aditivo combinado con una mezcla de DES. El propósito del aditivo es mejorar las propiedades de la mezcla de DES, por ejemplo, la estabilización de ARN, ADN y/o proteínas y/o la fijación de células y tejidos u otra aplicación. Los efectos de diversos aditivos sobre la morfología celular, por ejemplo, se exponen en la Tabla 6. El propósito del aditivo es mejorar la propiedad de la mezcla de DES para la aplicación concreta, por ejemplo, estabilización, almacenamiento, transporte de ARN y/o fijación de células o tejidos. Solo a modo de ejemplo, el aditivo podría ser un (i) colorante o tinte para ayudar a manipular o teñir o procesar el tejido tal como la tinción H y E, Azul de Coomasie, Azul de Metileno, Xileno Cianol, Cristal Violeta, Fucsina, Naranja de Acridina, DAPI, Carmín, Eosina, Bromuro de Etidio, Marrón Bismarck, Hoechst, Verde malaquita, Verde metilo, Azul neutro, Azul Nilo, Tetróxido de osmio, Rodamina o Safranina, (ii) detergente, sal de amonio cuaternario o saponina para mejorar la penetración de la membrana plasmática celular con la mezcla de DES, tal como SDS, lauril sulfato de sodio (SLS), bromuro de cetiltributilamonio (CTAB), bromuro de tetrabutilamonio (TBAB), desoxicolato de sodio, Brij-35, Brij-58, NP-40, Triton X-100, Triton X-114, Tween-20, Tween-80, Octil beta-glucósido, CHAPS, Solanina, (iii) antimicrobiano, tal como un antibiótico o antiséptico, tal como kanamicina, estreptomina o penicilina, nitrato de sodio, nitrito de sodio o benzoato de sodio, iv) precipitante de proteínas como Ácido tricloroacético, Sulfato de amonio, Ácido sulfosalicílico, Sal de cinc tal como ZnCl₂ o ZnSO₄, (v) desecante para eliminar el exceso de agua de la mezcla de DES tal como Tamices moleculares 4A, gel de sílice, CaCl₂ o LiCl, (vi) una sonda, un ácido nucleico complementario de hibridación, un péptido, proteína, ácido nucleico o molécula marcada, un control interno, una secuencia de bloqueo o un ácido nucleico portador tal como (a) secuencias de ARN o ADN hs o dh, (b) un péptido, enzima u otra proteína tal como un anticuerpo, (c) moléculas para detectar un analito, tales como biotina, peroxidasa de rábano picante, avidina, estreptavidina, una molécula marcada fluorescentemente, tal como fluoresceína, Rojo Texas, LNA marcado con Alexa Fluor™, (d) una Baliza molecular Molecular Beacon™, una sonda Scorpion™, (vii) un antioxidante para eliminar el oxígeno de la muestra y reducir los efectos oxidativos dañinos durante el almacenamiento en, por ejemplo, las nucleobases de ARN o ADN, tal como Vitamina C o glutatiónina, (viii) un inhibidor de la ribonucleasa, tal como RNasin, SUPERase•IN™, RNaseOUT™, o un inhibidor de proteasa tal como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluorofosfato de diisopropilo (DFP), aprotinina o Pefabloc SC™, (ix) un tampón para estabilizar el pH entre 5 y 8 o más preferiblemente entre 6 y 7, utilizado en el intervalo de 0,5 a 20 mM tal como Tris-HCl, PIPES, MES, HEPES, MOPS, MOPSO, CAPS, CAPSO, BIPES, fosfato, imidazol, (x) quelantes para eliminar cationes metálicos divalentes, utilizados en el intervalo de 0,5-20 mM, tales como BAPTA, EDTA, EGTA, ácido cítrico, D-Penicilamina, (xi) oxígeno disuelto (en el intervalo de concentración final de 2-20%), y/o CO₂ (en el intervalo de concentración final de 0,01-5%), un gas no reactivo como Argón (en el intervalo de concentración final de 1-20%) y/o un tampón, nutrientes (tales como glucosa y aminoácidos) para mejorar la viabilidad de las células, tejidos y organismos, y/o (xii) un alcohol en el intervalo de 1-20% (p:p) para reducir la viscosidad del DES, tal como terc-butanol.

Un "aditivo" se define en la presente memoria como cualquier sustancia que se puede disolver en una mezcla de DES concreta, y puede estar presente en cantidades mayores, iguales o menores que la cantidad total de la mezcla de DES (peso:peso). Solo a modo de ejemplo, Cloruro de colina:Urea:Cloruro de cinc (1:2:0,5 mol:mol:mol), el ZnCl₂ es un aditivo, o Cloruro de colina:Trifluoracetamida:Urea (1:2:0,1 mol:mol:mol), la urea es un aditivo. También se debe tener en cuenta que el aditivo no tiene necesariamente ningún efecto concreto en el punto de congelación de la mezcla de DES ni forma enlaces de hidrógeno con ninguno de los componentes de DES, sino que otorga a la mezcla de DES una propiedad única.

Una lista no exhaustiva de posibles aditivos para una mezcla de DES son: Sal de amonio de ácido p-toluenosulfónico, Sal de sodio de ácido p-toluenosulfónico, Sulfato de amonio, Cloruro de amonio, Tiosulfato de amonio, Dodecilsulfato de sodio, Laurilsulfato de sodio, Benzoato de sodio, Hidróxido de dodecildimetil(3-sulfopropil)amonio, Ácido dimetilbencenosulfónico, Rojo Congo, Giemsa, DAPI, Bromuro de etidio, Tinción de Mallory, Orceína, Fucsina aldehídica, Tetróxido de osmio, Trióxido de cromo, Ácido crómico, Feulgen, Dicromato, Cloruro mercúrico, Tinción de Hematoxilina y Eosina (H y E), Formaldehído, Glutaraldehído, Acetona, Etanol, Metanol, Bromuro de metiltrifenilfosfonio, Bromuro de cetiltributilamonio (CTAB), Bromuro de tetrabutilamonio (TBAB), Desoxicolato de sodio, Brij-35, Brij-58, NP-40, Tritón X-100, Tritón X-104, Tween-20, Tween-80, Octil beta glucósido, CHAPS, Solanina, kanamicina, estreptomina o penicilina, nitrato de sodio, nitrito de sodio o benzoato de sodio, secuencias de ARN o ADN hs o dh, secuencias marcadas de ARN o ADN hs o dh, un aptámero, un péptido, enzima, anticuerpo, biotina, molécula marcada con biotina, peroxidasa de rábano picante, avidina, estreptavidina, GFP o una variante de la misma, Luciferasa, Fluoresceína, Rodamina, Rojo Texas, Rojo Texas, Alexa Fluor™, LNA, LNA marcado, una Baliza molecular "Molecular Beacon™", una sonda Scorpion™, una sonda FISH, ADNb, cebador de PCR, oligo (dT), PNA, antioxidante, RNasin, SUPERase•IN™, RNaseOUT™, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluorofosfato de diisopropilo (DFP), aprotinina o Pefabloc SC™, Tris-HCl, PIPES, MES, HEPES, MOPS,

MOPSO, CAPS, CAPSO, BIPES, fosfato, imidazol, BAPTA, EDTA, EGTA, ácido cítrico, D-Penicilamina, O₂, CO₂, N₂, Argón, propanol, terc-butanol, Ácido tricloroacético, ácido sulfosalicílico, Agua, Metanol, Etanol, Propanol, Butanol, Tetrametil urea, Imidazol, 1-Metilimidazol, 1-Etilimidazol, 1-Bencilimidazol, 4-Metilimidazol, N-Metilpirrolidona, N-Etilpirrolidona, N-Bencilpirrolidone, Guanidina, Guanidina HCl, Isotiocianato de guanidina, Ribitol, Ramnosa, Trehalosa, D-Sorbitol, L-Sorbitol, Sorbosa, Xilitol, Glucosa, Sacarosa, Lactosa, Fructosa, Maltosa, Manosa, Manitol, Arabinosa, Galactosa, Rafinosa, Inositol, Eritritol, Xilosa, Acetato de cinc, Sal de cinc de EDTA, Fosfato de cinc, Trifluoroacetato de cinc, Citrato de cinc, Sal de cinc de PTSA, Gluconato de cinc, Cloruro de cinc y/o Sulfato de cinc. Los aditivos no solubles para las mezclas de DES incluyen, pero no están limitados a, Parafina, Gel de sílice, Sulfato de sodio o Tamices Moleculares "Molecular Sieves™", Poliacrilamida, Aerogel, Poli(ácido acrílico) y/o Punto Cuántico "Quantum Dot".

Se ha encontrado que la adición de etanol u otros alcoholes tales como el metanol y el isopropanol a un Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) tiene una fuerte influencia negativa en la estabilidad del ARN (véase la Tabla 2). No se entiende por qué el etanol en particular tiene un impacto tan negativo en la estabilidad del ARN, pero un cambio en el enlace de hidrógeno de la Trifluoroacetamida con Cloruro de colina puede ser una explicación parcial. En cualquier caso, es preferible evitar el uso de etanol a una razón molar superior a 0,1 en comparación con el Componente 1 (Cloruro de colina). Sin embargo, si se desea procesar o almacenar muestras de tejido que se hayan tratado con la mezcla de DES en etanol u otro alcohol, el exceso de mezcla de DES se puede eliminar de la muestra de tejido con un papel absorbente, lavar dos veces en etanol del 100% antes de dejar el tejido durante períodos más largos, esto anula el efecto negativo sobre la estabilización del ARN. Alternativamente, se puede utilizar el mismo método para reemplazar la primera mezcla de DES por una segunda mezcla de DES, por ejemplo, se puede reemplazar una mezcla de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) por un Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) u otra mezcla de DES que puede ser preferible para ciertas aplicaciones que implican la estabilización de ARN. Alternativamente, la muestra biológica, una vez extraída de la mezcla de DES, se puede colocar en un ambiente desecante tal como en un recipiente hermético que contiene Tamices moleculares, Drierita, un azúcar seco (p.ej., trehalosa, xilitol o sorbitol), RNAsable® (Biomatrix, EE.UU.) o Cloruro de calcio para fines de almacenamiento. Otra alternativa más es colocar la muestra biológica tratada en un medio de almacenamiento líquido tal como alcohol (p.ej., metanol, etanol, propanol o butanol), RNALater (Life Technologies, EE.UU.), AllProtect (Qiagen, Alemania), tejido PAXgene, Sangre PAXgene, (PreAnalytix, Alemania), ARN GenTegra (Integenx, EE.UU.), ARN sin células BCT® (Streck, EE.UU.) o Conservante CellSave (Veridex, EE.UU.). Como otra alternativa, la muestra, después del tratamiento con la mezcla de DES, se puede transferir a una solución de un fijador de entrecruzamiento, tal como diez volúmenes de una solución al 4% de formaldehído o glutaldehído, y dejar incubando durante un tiempo apropiado, por ejemplo, 15 minutos. 24 horas. Aunque el tratamiento de la muestra con un agente de entrecruzamiento tendrá un efecto negativo sobre la calidad del ARN, el ADN y las proteínas, el tratamiento puede mejorar la rigidez de la muestra para la preparación de portaobjetos y su comportamiento en ciertos ensayos tales como la inmunohistoquímica empleando anticuerpos específicos para epítomos de proteínas tratados con formalina. Otra alternativa es tratar previamente la muestra con diez volúmenes de una solución al 4% de formaldehído o glutaldehído y dejar incubando durante un tiempo apropiado, por ejemplo, de 15 minutos a 24 horas, antes de retirar la muestra y añadirla a diez volúmenes de mezcla de DES tal como Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) durante 15 minutos a 24 horas.

Preferiblemente, se evita el uso o la presencia de agua para reducir el riesgo de hidrólisis del analito, en particular hidrólisis de ARN, ADN y proteínas. Por lo tanto, la mezcla de DES contiene 50% o menos, más preferiblemente 40% o menos, incluso más preferiblemente 30% o menos, aún más preferiblemente 20% o menos, incluso más preferiblemente 10% o menos, incluso más preferiblemente 5% o menos y lo más preferiblemente menos de 2% de agua (porcentaje en peso) para aplicaciones que requieren estabilización de ARN, ADN o proteínas. Para la estructura celular y la morfología, y la fijación del tejido, la mezcla de DES puede contener 50% o menos, más preferiblemente 40% o menos, más preferiblemente 30% o menos, más preferiblemente 20% o menos, más preferiblemente 10% o menos pero lo más preferiblemente entre 10% y 5% de agua (porcentaje en peso).

Para una estabilización óptima del ARN, se ha encontrado que es preferible la adición de un desecante a la mezcla de cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol). Los desecantes adecuados incluyen gel de sílice, poliacrilamida, sulfato de sodio, Drierite™ y tamices moleculares. Un desecante preferido para la estabilización de ARN es el tamiz Molecular tipo 4A (en polvo o en forma de gránulos, tal como Malla 4-12), utilizado con un peso de 5 a 50% en peso con la mezcla de DES, preferiblemente mezcla de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol). Una ventaja adicional es que se ha encontrado que los tamices moleculares reducen la cristalización que se produce en la mezcla de cloruro de Colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol).

Resultará evidente que se pueden preparar muchos tipos de mezclas de DES y la elección de un DES particular con el fin de preservar el ARN en una muestra estará determinada por una o más de las siguientes características preferibles del DES: (1) compatibilidad con el ARN, preferiblemente debe tener un pH entre pH 4,5 y 8,5, más preferiblemente entre pH 5 y 8, más preferiblemente entre pH 5,5 y 7,5 y más preferiblemente entre pH 6 y 7 cuando se mezcla con la muestra, (2) compatibilidad con los reactivos y el protocolo de purificación de ARN, por ejemplo, no debe interferir con la unión entre el ARN y la columna de sílice tal como RNeasy (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat.

74106, Qiagen, Alemania) o alterar la partición del ARN en fenol que contienen reactivos tales como TRIzol (Núm. de Cat. 15596018 Life Technologies, EE.UU.), (3) estabilización del ARN en la muestra de tejido con la suficiente rapidez como para alterar sustancialmente la actividad de las ribonucleasas y/o la accesibilidad del ARN a la hidrólisis. Como alternativa, el ARN se estabiliza en el tejido lo suficientemente rápido como para que el Número de Integridad del ARN (RIN) no se reduzca en más de 2 unidades de RIN, más preferiblemente no más de 1 unidades de RIN, aún más preferiblemente no más de 0,5 unidades de RIN y lo más preferiblemente menos de 0,1 unidades de RIN durante el almacenamiento inicial de 18-24 horas con la mezcla de DES a temperatura ambiente en comparación con el ARN extraído de una muestra de tejido fresco, sin almacenamiento, del mismo tipo, (4) tener una capacidad para estabilizar el ARN cuando el tejido representa al menos 10%, más preferiblemente 20% e incluso más preferiblemente al menos 50% del peso de la mezcla de DES (peso:peso), (5) no reducir el rendimiento de ARN en más del 20% en comparación con el tejido fresco, (6) proporcionar estabilización del ADN, las proteínas y los grupos fosfato de las fosfo-proteínas, (7) ser químicamente estables, no inflamables, no tóxicos para el usuario y el medio ambiente, biodegradables, no reaccionar con lejía o reactivos utilizados durante la purificación del ARN para formar compuestos tóxicos, (8) tener una vida útil de al menos 6 meses a temperatura ambiente, (9) fijar y estabilizar la morfología e histología de las células nativas, incluidos los epítomos de anticuerpos y la organización subcelular y los organelos, a la vez que estabiliza el ARN y otras biomoléculas, (10) fijar y estabilizar las células de manera que permita posteriormente aplicaciones histológicas e inmunohistoquímicas, por ejemplo, con anticuerpos y tintes como Hoechst o H y E, (11) estabilizar el ARN en muestras de FFPE para proteger y mejorar la reversión del entrecruzamiento con formalina a temperaturas superiores a 50°C y permitir la fusión y, por lo tanto, la fácil eliminación de la parafina de la muestra fijada, (12) fijar y estabilizar las células tumorales circulantes en sangre completa para permitir su purificación, detección y análisis molecular.

La estabilización del ARN en la muestra puede ser un resultado del tratamiento con DES, o una combinación del tratamiento con DES con otro proceso físico tal como la inactivación de las ribonucleasas, la precipitación de proteínas celulares y ácido nucleico como resultado del desplazamiento de las moléculas de agua o la entrada del DES disuelto en la estructura celular del tejido y que conduce a la estabilización del ARN o una combinación de estos. La modificación o alteración de los enlaces de hidrógeno en y alrededor de la célula y el ARN, mediante DES, puede ser un factor importante para la biomolécula observada y la estabilización celular como se establece en esta descripción, sin embargo, aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual las mezclas de DES pueden estabilizarse.

La muestra o el tejido que contiene el analito puede ser un (i) líquido tal como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), esputo, semen, lavado broncoalveolar (LBA), líquido amniótico, leche y orina, (ii) sólido tal como tejidos corporales (hígado, bazo, cerebro, músculo, corazón, esófago, testículo, ovarios, timo, riñones, piel, intestino, páncreas, glándulas suprarrenales, pulmones, hueso y médula ósea), (iii) clínica para un examen médico tal como una muestra de próstata, mama o cáncer, tumor o biopsia, incluida una muestra de FFPE, células tumorales circulantes, análisis de sangre, frotis clínicos, sangre seca, exosoma, microvesículas (iv) tejidos animales derivados de investigación biomédica o biología fundamental (mono, rata, ratón, pez cebra, Xenopus, Drosophila, nematodo, levadura) y de sus diversas etapas de desarrollo (huevo, embrión, larva, adulto), (v) células de tejidos y cultivos de tejidos utilizados para el descubrimiento de fármacos, (vi) microbios patógenos y no patógenos tales como hongos, arqueobacterias, bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo E. coli, Staphylococcus, Streptococcus, Mycobacterium, Pseudomonas y bacterias que causan Shigelosis, Difteria, Tétanos, Sífilis, Chlamydia, Legionella, Listeria y Lepra, (vii) viroides patógenos o no patógenos, bacteriófagos o virus que se encuentran en una variedad de muestras biológicas tales como bacterias, plantas, sangre, tejidos humanos, sangre de animales, suero, plasma y tejidos, y muestras clínicas, (viii) plantas tales como hojas, flores, polen, semillas, tallos y raíces de arroz, maíz, sorgo, palma, vides, tomate, trigo, cebada, tabaco, caña de azúcar y Arabidopsis, (ix) tejidos fijados tales como tejidos FFPE y biopsias que con frecuencia requieren protocolos especializados para extraer ácidos nucleicos de alta calidad, (x) material potencialmente patógeno asociado con amenazas de bioterrorismo tales como ántrax que puede necesitar ser transportado o no desde el sitio de descubrimiento hasta la instalación de prueba, (xi) muestras extremadamente pequeñas tales como las derivadas de muestras de Microdissección por Captura Láser (LCM), (xii) muestras de alimentos que pueden contener enfermedades transmitidas por los alimentos, (xiii) muestras de suelo. Debe observarse que la muestra no puede obtenerse únicamente de muestras obtenidas biológicamente, sino también de síntesis química o enzimática, tales como moléculas copiadas basadas en ácido nucleico o productos de amplificación tales como el ARN transcrito in vitro y productos de PCR, oligodesoxirribonucleótidos y oligoribonucleótidos, PNA y LNA. No existe una limitación concreta para el tipo de muestra que se puede utilizar con esta invención.

La descripción también es útil para la estabilización de los controles internos (CI) y patrones de ARN, ADN y proteínas, tales como los que se incluyen en los kits de diagnóstico de VIH o VHC tales como Amplicor™ (Roche Molecular Diagnostics) o para el ARN portador que se puede incluir en tales kits de diagnóstico. Para este uso, el CI de ARN se transporta y almacena comúnmente con el resto de los componentes del kit, a menudo a temperatura ambiente o a 4°C, lo que puede conducir a la degradación. La estabilización del CI de ARN o del ARN portador mejora el comportamiento del kit y mantiene su integridad durante el transporte y almacenamiento.

Útilmente la invención se puede utilizar para preservar virus de ARN de hebra sencilla y/o doble, incluyendo virus de ARN animales tales como Norwalk, Rotavirus, Poliovirus, Virus del Ébola, Virus Marburg, Virus Lassa, Hantavirus, Rabia, Influenza, Virus de la fiebre amarilla, Coronavirus, SARS, Virus del Nilo occidental, Virus de la hepatitis A, C (VHC) y virus E, Virus de la fiebre del Dengue, toga (p.ej., Rubéola), Rabdo (p.ej., Rabia y VSV), Picorna (Polio y Rinovirus), Myxo (por ejemplo, Influenza), Retro (p.ej. VIH, HTLV), bunya, corona y reovirus que tienen efectos profundos en la salud humana, incluyendo virus de tipo viroide tales como virus de la hepatitis D y virus de ARN de plantas y viroides tales como Tobus-, Luteo-, Tobamo-, Potex-, Tobra- Como-, Nepo-, Almo-, Cucumo-, Bromo-, Ilar-virus, viroide cadang-cadang de Coco y el viroide del tubérculo fusiforme de la patata, que tienen profundos efectos en la producción agrícola, pueden degradarse antes, durante o después de la extracción con fines de detección diagnóstica. La invención también se puede utilizar para estabilizar bacteriófagos de ARN monocatenario tales como el género Levivirus que incluye el fago MS2 de Enterobacteria y el género Allolevivirus que incluye el fago Q β de Enterobacteria, o un bacteriófago de ARN bicatenario tal como Cystovirus incluyendo el fago Pseudomonas Φ 6 u otros tipos de fagos tales como los utilizados como controles de ARN interno para aplicaciones de diagnóstico, tales como los utilizados en Armored ARN® (Ambion). La invención también puede utilizarse para estabilizar secuencias de ARN o ADN de control interno (CI) para su uso en kits de diagnóstico, mezclando un DES con un ácido nucleico puro.

La invención también se puede utilizar para estabilizar muestras para el análisis de miARN, ARNip y otras moléculas pequeñas de ARN de origen natural, tales como snRNA, snoRNA, ncRNA, snoRNA, piRNA y rasiRNA. También se puede utilizar para estudios, diagnósticos y terapias que implican ARN sintético de tipo ARNi.

Útilmente, la invención se puede utilizar para preservar ARN viral tal como retrovirus, p.ej.. VIH, rotavirus, VHC y Virus del Nilo Occidental en mezclas de guanidina y sangre, suero, células plasmáticas y otros tipos de muestras de importancia médica, tales como células y tejidos.

Se ha encontrado que ciertas mezclas de DES, especialmente Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) tienen una fuerte actividad antimicrobiana (Ejemplo 34), lo que hace que la muestra sea más segura para trabajar y transportar. Otras aplicaciones incluyen estabilizar y fijar muestras de suelo y/u otras muestras ambientales que pueden haber sido contaminadas deliberadamente con toxinas, virus, bacterias y/o hongos para su posterior transporte y análisis de laboratorio de ARN, ADN y/o proteínas.

Por lo tanto, esta invención se refiere a métodos para mejorar el almacenamiento, la conservación, el archivo y el transporte, para proteger el ARN de la degradación, para aumentar su estabilidad y, como consecuencia, para mejorar la sensibilidad analítica y la calidad del ensayo.

Resultará evidente para un experto en la técnica que se pueden someter a ensayo varios DES para determinar su idoneidad en esta invención añadiéndolos a la muestra en una proporción de al menos 10:1 (peso:peso) como se establece en el Ejemplo 1. Se pueden hacer comparaciones de estabilización relativa de ARN utilizando una solución de control de RNAlater (10:1 (vol:peso) utilizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Núm. de Cat. 76106, Qiagen, Alemania). Después de la incubación a, por ejemplo, 37°C durante un día o más, el ARN se extrae de acuerdo con un protocolo convencional tal como RNeasy (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania) y su integridad se analiza mediante electroforesis en gel o mediante el uso de un kit de ARN total RNA 6000 Nano (Núm. de Cat. 5067-1511, Agilent Technologies, EE.UU.) y Bioanalyser 2100 u otro método adecuado tal como RT-qPCR como se describe. Los rendimientos de ARN se pueden determinar mediante Espectrometría *uv* DO260nm y pureza mediante las proporciones OD260/230 y OD260/280 bien conocidas. Un Nanodrop ND2000 (ThermoScientific Inc., EE.UU.) es un ejemplo de un espectrómetro adecuado para dicha determinación. Una vez que las mezclas de DES adecuadas han sido identificadas, su cantidad, pureza, cantidad de agua contaminante y uso óptimos se pueden determinar mediante tales pruebas adicionales.

En general, el factor único más importante para la optimización es la razón molar relativa de los componentes individuales en la mezcla de DES. En primer lugar, mezclar solo dos componentes de la mezcla de DES es el medio más directo para identificar aproximadamente, y por medios empíricos como se describió anteriormente, los componentes que producen el efecto deseado, tales como la estabilización del ARN, el rendimiento, la pureza y la idoneidad para aplicaciones posteriores tales como RT-PCR o hibridación. Sin embargo, también será evidente para un experto en la técnica que puede ser deseable una mezcla de más de dos componentes para mejorar o añadir nuevas propiedades a la mezcla de DES. Obviamente, hay una gran cantidad de posibles mezclas de componentes que pueden llevar a una mezcla de DES, y aunque es más fácil comenzar con la preparación, en primer lugar, de proporciones molares estequiométricas simples de los componentes de DES tal como, por ejemplo, a través de solo por ejemplo, una razón molar 2:1, 1:1 o 1:2 (mol:mol) de Cloruro de colina y Urea. Se cree que la depresión en el punto de congelación de las mezclas de DES de dos componentes está dictada, al menos en parte, por el enlace de hidrógeno entre el donador de enlace de hidrógeno disponible (p.ej., cloruro de colina) y el aceptor (p.ej., urea). Sin embargo, se debe tener en cuenta que los componentes preferidos de la mezcla de DES y su razón de mezcla óptima para una aplicación concreta, tal como la preservación de ARN o la fijación celular, no están necesariamente relacionados con la extensión de la depresión del punto de congelación observada. Por lo tanto, la identificación de

la mezcla de DES óptima para una aplicación se debe determinar empíricamente y, por consiguiente, pueden estar implicados ensayos de prueba y error. Será evidente que la identificación de la mejor mezcla para un propósito concreto de una mezcla de DES de más de dos componentes puede implicar un esfuerzo significativo. Por lo tanto, en el primer caso y con el fin de definir rápidamente las razones molares adecuadas de los componentes, se pueden utilizar razones estequiométricas como se describió anteriormente. Una vez que se han identificado las razones molares aproximadas, se puede realizar un refinamiento adicional que implica la fijación de la cantidad molar de un componente mientras se varían los otros dos o más. Cabe señalar que la molaridad de los diversos componentes del DES es variable y depende de la densidad, las razones molares y el peso molecular de los componentes individuales. A modo de ejemplo, la concentración de cloruro de colina en una mezcla de Cloruro de colina:Urea (1:2) es de aproximadamente 5 M y la de la Urea 10 M, en comparación con una concentración de Cloruro de colina de 3,6 M y una Trifluoroacetamida de 7,2 M en una mezcla de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2).

La integridad de las proteínas y las fosfo-proteínas se puede determinar mediante PAGE 2-D preparativa o analítica, espectrometría de masas, anticuerpos anti-fosfo adecuados y ELISA como se describe en *Proteome Characterization and Proteomics* (2003) editado por Timothy D. Veenstra, Richard D. Smith.

Los métodos para recuperar la muestra de una mezcla líquida viscosa de DES incluyen fijarla o unirla a un recuperador, tal como un alambre, un alfiler, un cepillo, un testigo, una malla, un inserto, atrapándolo entre dos membranas permeables o entre dos lechos poliméricos que contienen suficiente DES para permitir una eficaz estabilización y/o fijación de DES o el uso de un soporte de plástico moldeado capaz de sujetar la muestra durante el tratamiento. Preferiblemente, cualquier remanente de la mezcla de DES con la muestra de tejido es fácilmente soluble en la solución de lisis de ARN tal como RLT (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania), y no afecta al rendimiento de ARN o lo incrementa, no hace que la muestra precipite fuera de la solución y, si se traslada con la muestra de ARN, no tiene ningún efecto ni mejora las aplicaciones sensibles posteriores, tales como la RT-qPCR. Los métodos para determinar los cambios en el rendimiento y la calidad del ARN son bien conocidos e incluyen métodos espectrofotométricos, el kit de ARN total ARN 6000 Nano (Núm. de Cat. 5067-1511, Agilent Technologies, EE.UU.) con la cuantificación Agilent Bioanalyser 2100 y/o RT-qPCR.

Los resultados expuestos en esta descripción utilizando mezclas de DES son particularmente sorprendentes, ya que es bien sabido que las nucleasas tienen requisitos muy amplios para la actividad, por ejemplo, la Ribonucleasa A es una nucleasa robusta que está activa a pH 4-10, temperaturas variables tales como +4 a 60°C, concentraciones de sodio de 0 - 3M, concentraciones de caótropro de guanidina de hasta 400 mM y pueden sobrevivir a ebullición durante varios minutos (Raines (1998) Chem. Rev. 98:1045-1065). A pesar de ser muy difícil de desactivar tales enzimas, el tratamiento con muchas mezclas diferentes de DES puede tener un efecto profundo sobre la actividad de la nucleasa con la consiguiente mejora en la calidad del ARN. Una explicación es que los componentes de DES forman enlaces de hidrógeno con enzimas tales como las nucleasas y, en particular, las ribonucleasas, desplazando las moléculas de agua nativas alrededor de la enzima y conduciendo a la desnaturalización e inactivación, y/o el ARN está protegido dentro de complejos de ribonucleoproteínas tratados con DES desnaturalizados, tales como los ribosomas.

Será evidente para un experto en la técnica que la prueba de la eficiencia de un DES concreto para el almacenamiento de biomoléculas se puede llevar a cabo de varias maneras. En primer lugar, se puede añadir una cantidad conocida de DES a una cantidad fija de tejido pesado previamente, por ejemplo, 20 mg de hígado de rata congelado y descongelado e incubarse juntos durante períodos de tiempo variables, por ejemplo, 5, 10, 20, 40 y 60 horas a 37°C y después de la incubación, recuperar el tejido y recuperar el ARN u otra biomolécula mediante purificación y analizar para determinar su integridad. La calidad del ARN se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de RT-qPCR o Bioanalyser 2100 (Agilent, EE.UU.).

Preferiblemente, la mezcla de DES tiene una vida útil razonable después de la preparación, lo que significa que su actividad de estabilización no cambia significativamente durante el almacenamiento durante al menos seis meses o más a temperatura ambiente.

La agitación, el mezclado y la temperatura de la mezcla de DES con la muestra de tejido son factores importantes para la estabilización óptima del ARN. La agitación suave de la mezcla de DES alrededor de la muestra de tejido puede ayudar a aumentar la velocidad de estabilización de la muestra. Los medios para mezclar o agitar incluyen el uso de la función de mezcla del Thermomixer (Eppendorf, Alemania), una rueda o plataforma giratoria tal como LabRoller (LabNet, EE.UU.). Aunque la cantidad de degradación de ARN observada con una mezcla de DES es limitada, inevitablemente se produce cierta degradación durante el retraso entre la extracción de la muestra de su entorno normal en el animal completo y cuando la mezcla de DES puede comenzar a reducir o inhibir completamente la actividad ribonucleasa. Con respecto a esta descripción, una etapa clave es el retraso entre la adición de la mezcla de DES a la muestra y la inactivación de la ribonucleasa, y será evidente que las ribonucleasas son más activas a temperaturas de 25-37°C que a 4-16°C. Es preferible el enfriamiento previo del DES y el recipiente y el mantenimiento de esta temperatura reducida durante la etapa crítica del tratamiento del DES, aunque no es esencial para tejidos con niveles medios de ribonucleasa tales como el hígado de rata en comparación con los

tejidos que contienen niveles más altos, tales como el páncreas de rata. La calidad del ARN se puede mejorar en tejidos que tienen una alta actividad ribonucleasa utilizando una temperatura reducida, tal como 4°C, de la mezcla de DES, el recipiente y el medio ambiente.

5 La elección adecuada de una mezcla de DES para conservar ARN en muestras biológicas depende de múltiples propiedades físicas y químicas que se superponen. Idealmente, una mezcla de DES debería ser capaz de: (1) estabilizar rápida y eficazmente biomoléculas, incluyendo ARN, ADN, proteínas, proteínas modificadas post-traduccionalmente tales como fosfoproteínas, carbohidratos, lípidos y metabolitos en una muestra biológica, (2) funcionar de manera óptima para estabilizar biomoléculas tales como el ARN, cuando se añade en una razón 20:1
10 (peso/peso), más preferiblemente 15:1, aún más preferiblemente 10:1, aún más preferiblemente 8:1, aún más preferiblemente 6:1 aún más preferiblemente 4:1, aún más preferiblemente 3:1, aún más preferiblemente 2:1 y lo más preferiblemente una razón 1:1 con la muestra biológica, (3) ser un líquido a menos de 120°C, aún más preferiblemente a menos de 100°C, incluso más preferiblemente a menos de 80°C, aún más preferiblemente a menos de 60°C, y lo más preferiblemente a temperatura ambiente, (4) no ser tan viscoso que trabajar con él y/o retirarlo de una muestra sólida sea particularmente difícil y tener una viscosidad a 25°C de menos de 100000 cP,
15 incluso más preferiblemente menos de 75000 cP, incluso más preferiblemente menos de 50000 cP, incluso más preferiblemente menos de 25000 cP, incluso más preferiblemente menos de 10000 cP, incluso más preferiblemente menos de 5000 cP, incluso más preferiblemente menos de 2500 cP, incluso más preferiblemente menos de 1000 cP, incluso más preferiblemente menos de 750 cP, incluso más preferiblemente menos de 500 cP, incluso más preferiblemente menos de 250 cP, incluso más preferiblemente menos de 100 cP, incluso más preferiblemente menos de 75 cP, incluso más preferiblemente menos de 50 cP, incluso más preferiblemente menos de 25 cP, incluso más preferiblemente menos de 10 cP y lo más preferiblemente menos de 5 cP (5) tener compatibilidad con ARN y reactivos de purificación de ARN tales como guanidina HCl, tiocianato de guanidina, tampón de lisis RLT (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania) columnas de centrifugado de sílice, esferas de sílice magnéticas tales como MagNA Pure® (Roche Applied Science, Reino Unido), TRIzol® (Life Technologies, EE.UU.),
20 (6) no reducir la unión del ARN a una columna de sílice tal como RNeasy (Qiagen, Alemania) en más de 20% y no disminuir la razón espectrofotométrica DO260/280 nm en más de 0,2 en comparación con una purificación convencional, y (7) no ser tóxico ni inflamable para el usuario incluso combinado con los reactivos de purificación de ARN, (8) ser biodegradable y (9) no ser volátil.

30 Como ejemplo del uso del DES para la extracción de ARN de muestras de FFPE, es bien sabido que la fijación con formalina conduce a un entrecruzamiento múltiple entre el ARN y las proteínas, lo que hace que la posterior extracción del ARN sea problemática y la calidad del ARN sea baja. El protocolo convencional para eliminar entrecruzamientos del ARN en una muestra de FFPE es calentarlo, por ejemplo a 80°C durante 15-60 minutos, sin embargo, esto causa una mayor degradación del ARN (RNeasy FFPE Kit, Núm. de Cat. 73504, Qiagen, Alemania). Al combinar DES con los reactivos necesarios para la reversión de los entrecruzamientos, el ARN puede protegerse durante la etapa de calentamiento esencial que conduce a una muestra de ARN de mejor calidad. Como ejemplo de un DES adecuado, se puede utilizar Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2) para tratar la muestra de FFPE a 80°C para eliminar la parafina y los enlaces cruzados del ARN.

40 Otro ejemplo del uso de DES en el campo médico es para el tratamiento de sangre completa para estabilizar las células tumorales circulantes (CTC). Estas células que derivan del tumor y a continuación ingresan al torrente sanguíneo se utilizan cada vez más con fines de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos, y también como criterios de valoración para numerosas pruebas clínicas de fármacos quimioterapéuticos. Sin embargo, la estabilización de estas células en la sangre completa es problemática, por lo que el envío de la sangre del paciente puede llevar a la pérdida o dificultad para identificar correctamente las CTC y/o realizar análisis de diagnóstico molecular. Utilizando una mezcla de DES para estabilizar las CTC en sangre completa *in vitro* supera muchos de estos inconvenientes de la tecnología actual de conservación de CTC. Solo a modo de ejemplo, las CTC en sangre completa se pueden tratar con al menos seis volúmenes de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) para reparar las células y preservar el ARN. A continuación, las CTC se pueden recolectar y purificar utilizando cualquiera de varios métodos diferentes, como CellSieve™ (MD, EE.UU.).

50 La invención se describirá con más detalle, solo a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes Ejemplos y Dibujos.

55 Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A y 1B** muestran un aparato de acuerdo con la invención en el que una mezcla de DES está dispuesta en viales tapados;

60 La **Figura 1C** muestra un aparato de referencia no de acuerdo con las presentes reivindicaciones en el que una mezcla de DES está dispuesta en un vial tapado;

La **Figura 2** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en muestras de ARN extraídas de

acuerdo con la invención y la técnica anterior;

La **Figura 3** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ARN estabilizado en un DES de acuerdo con la invención en un intervalo de temperaturas;

La **Figura 4** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa sobre el ARN conservado en el tejido de acuerdo con la invención o la técnica anterior;

Las **Figuras 5A y B** muestran los resultados de la electroforesis de agarosa en ARN estabilizado en muestras de tejido de ratón utilizando un DES de acuerdo con la invención y la técnica anterior;

La **Figura 6** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa sobre ARN conservado en cantidades variables de tejido de acuerdo con la invención y la técnica anterior;

La **Figura 7** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ARN purificado a partir de sangre completa estabilizada con DES enriquecida con células HeLa;

La **Figura 8** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ARN estabilizado en sangre completa enriquecida con células HeLa durante 18 horas antes de la extracción;

La **Figura 9** muestra la estabilización del ARN en sangre completa con guanidina o cloruro de colina:trifluoroacetamida;

La **Figura 10** muestra imágenes de microscopio óptico de células HeLa fijadas con cloruro de colina:trifluoroacetamida de acuerdo con la invención;

La **Figura 11** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ARN degradado en muestras de tejido en ausencia de cualquier estabilizador;

La **Figura 12** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ADN genómico estabilizado en células HeLa de acuerdo con la invención o la técnica anterior;

La **Figura 13** muestra los resultados de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en una proteína del hígado de ratón estabilizada de acuerdo con la presente descripción o técnica anterior;

La **Figura 14** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ADN y ARN de células HeLa estabilizadas y, opcionalmente sometidas a una etapa de procesamiento antes de la purificación;

La **Figura 15** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ARN y ADN cuya integridad se mide después de la fijación de acuerdo con la invención o el estado de la técnica;

La **Figura 16** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ARN de embriones de *Drosophila melanogaster* tratados de acuerdo con la invención o la técnica anterior; y

La **Figura 17** muestra los resultados de la electroforesis en gel de agarosa en ARN de brotes de hojas de *Allium cepa* estabilizado de acuerdo con la invención o la técnica anterior.

Ejemplos

1. Estabilización del ARN en muestras de tejidos animales

A 400 µl de Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) en un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml convencional se le añadieron de 2 a 25 mg de muestra de hígado de rata y se preincubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la estabilización y/o fijación, la muestra se puede incubar en la mezcla de DES a -80, -20, 4, 20 o 37, 42 o 55°C durante una hora a varias semanas antes de la recuperación de la muestra de tejido con fórceps seguida de una purificación de ARN como se establece a continuación .

La velocidad de fijación para algunos tejidos densos, llenos de aire y/o problemáticos puede mejorarse utilizando un sistema de vacío tal como una bomba de vacío manual Nalgene (Núm. de Cat. 6132-0020, ThermoScientific, Reino Unido) durante la fijación.

La muestra se añade a continuación a un tubo nuevo que contiene 350 µl de tampón de lisis RLT, el tejido se homogeneiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania). Las porciones de 300 µl del producto lisado se purificaron inmediatamente de acuerdo con las

instrucciones del fabricante y se eluyeron en 20-50 µl de agua. El rendimiento y la pureza del ARN se compararon a continuación mediante DO 260/280nm y la integridad del ARN se determinó mediante RT-qPCR utilizando cebado con ADNc oligo dT y cebadores de PCR de β-actina (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Núm. de Cat. 204141, Qiagen, Alemania) y un LightCycler (Roche Applied Science, Francia) o mediante la obtención del Número de Integridad del ARN (RIN) mediante el uso de un kit de ARN total RNA 6000 nano (número de catálogo 5067-1511, Agilent Technologies, EE.UU.) y un aparato Bioanalyzer 2100 (Núm. de Cat. G2939AA, Agilent Technologies, EE.UU.).

Otros tipos de kits de purificación de ARN comercializados pueden reemplazar al kit RNeasy y no hay ninguna limitación concreta sobre el tipo de kit utilizado.

La muestra de hígado se puede reemplazar por otros tipos de tejidos y células, tales como hígado, bazo, cerebro, músculo, corazón, esófago, testículo, ovario, timo, riñones, piel, intestino, páncreas, glándulas suprarrenales, pulmones, médula ósea o células tales como células COS-7, NIH/3T3, HeLa, 293 y CHO o incluso muestras líquidas tales como suero, plasma o sangre.

Figura 2. A Imagen de electroforesis en gel de agarosa-EtBr al 1% de muestras de ARN de 300 ng extraídas utilizando un kit RNeasy: Calles 1-5; estabilizado con Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) o calles 6-10 estabilizado con RNAlater (Núm. de Cat. 76106, Qiagen, Alemania) en 15 mg de hígado de rata almacenado durante 5 minutos (Calles 1 + 6), 1 día (Calles 2 + 7), 3 días (Calles 3 + 8), 7 días (Calles 4 + 9) o 21 días (Calles 5 + 10). Se puede observar que después del almacenamiento a 37°C hay una estabilidad mejorada del ARN en muestras estabilizadas con Cloruro de colina:Urea en comparación con RNAlater, a modo de comparación después de 7 días, el Número de Integridad del ARN para la muestra de Cloruro de colina:Urea fue RIN=8, mientras que para las muestras estabilizadas con RNAlater el RIN=5,10.

2. Estabilización de ARN en muestras de tejidos animales utilizando otras mezclas de DES a base de cloruro de colina

A 400 µl de cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) o Cloruro de colina:Sorbitol (1:1 mol:mol) en un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml convencional se añadieron 2-25 mg de muestra de hígado de rata y se preincubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la estabilización y/o fijación, la muestra puede incubarse a -80, -20, 4, 20 o 37, 42 o 55°C durante una hora o varias semanas antes de la recuperación de la muestra de tejido con fórceps seguida de purificación de ARN como se establece en el siguiente ejemplo.

A continuación, la muestra se añade a un tubo nuevo que contiene 350 µl de tampón de lisis RLT, el tejido se homogeneiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania). Las porciones de 300 µl del lisado se purificaron inmediatamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyeron en 20-50 µl de agua. El rendimiento y la calidad del ARN se determinaron según lo establecido en el Ejemplo 1 y la Tabla 1, y para ambas mezclas DES, la integridad del ARN fue superior en comparación con RNAlater.

Una fuente apropiada de Cloruro de colina es el Núm. de Cat. 110295000, Acros Organics, Francia, el Sorbitol es el Núm. de Cat. S0065, TCI, Bélgica y de Trifluoroacetamida es Núm. de Cat. T0598, TCI, Bélgica.

3. Estabilización del ARN en muestras de tejidos animales utilizando otras mezclas de DES

A 400 µl de las siguientes mezclas de DES en un tubo de polipropileno de 2 ml se les añadieron de 5 a 15 mg de tejido de rata (reserva de tejido congelado), después de una etapa de fijación de 20 minutos, la muestra se incubó a 37°C durante 18 horas antes de la extracción/purificación de ARN utilizando un kit RNeasy Micro (Núm. de Cat. 74004, Qiagen, Alemania). Ya sea la mezcla de DES sólida o líquida a temperatura ambiente, el rendimiento del ARN después de la extracción y la calidad del ARN están en una escala de 1-10 (indicando 0 que no hay estabilización e indicando 10 que no hay degradación, en comparación con la calidad del ARN del ARN extraído inmediatamente de una muestra fresca de tejido de hígado de rata = 10). Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación (nd = no determinado, la solución 'Saturada' no es un DES).

Tabla 1. Estabilización de ARN en tejido animal utilizando una mezcla de DES de dos componentes.

	Componente 1	Componente 2	Razón mol:mol	Líquido a 24°C	Rendimiento de ARN ng/µl	Calidad de ARN 0-10
1	Cloruro de colina	Urea	2:1	No	120	8
2	Cloruro de colina	Urea	1:1	No	185	7
3	Cloruro de colina	Urea	1:2	Sí	221	7

ES 2 709 064 T3

	Componente 1	Componente 2	Razón mol:mol	Líquido a 24°C	Rendimiento de ARN ng/μl	Calidad de ARN 0-10
4*	Cloruro de colina	Agua	6M	Saturado	42	3
5*	Agua	Urea	5M	Saturado	0	0
6	Cloruro de colina	Glicerol	1:2	Sí	62	4
7	Cloruro de colina	Etilenglicol	1:2	Sí	26	3
8	Cloruro de colina	Hexanodiol	1:2	No	94	8
9	Cloruro de acetilcolina	Urea	1:2	Sí	156	9
10	Cloruro de acetilcolina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	76	5
11	Cloruro de colina	Ácido malónico	1:1	Sí	152	1
12	Cloruro de (2-cloroetil) trimetilamonio	Urea	1:2	No	172	5
13	Cloruro de colina	Trehalosa	1:1	No	285	7
14	Cloruro de colina	Xilitol	1:1	Sí	236	9
15	Cloruro de colina	Sorbitol	1:1	Sí	395	9
16	Cloruro de colina	Isotiocianato de guanidina	1:2	No	75	7
17	Urea	Isotiocianato de guanidina	1:2	No	10	0
18	Cloruro de colina	Ácido fenilacético	1:1	Sí	250	3
19	Cloruro de colina	ZnCl ₂	1:2	No	173	7
20	Carnitina	Trifluoroacetamida	1:2	Gel	87	5
21	Taurina	Trifluoroacetamida	1:2	No	6	4
22	Cloruro de tetrametilamonio	Urea	1:2	No	80	7
23	Cloruro de tetraetilamonio	Urea	1:2	No	70	7
24	Bromuro de tetrabutilamonio	Urea	1:2	No	86	5
25	Yoduro de tetrabutilamonio	Urea	1:2	No	12	1
26	Óxido de tetrametilamonio	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	19	2
27	Cloruro de colina	Imidazol	7:3	No	82	6
28	Bromuro de cetiltrimetilamonio	Urea	1:2	No	65	4
29	Cloruro de cetiltrimetilamonio	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	15	6
30	CaCl ₂	Urea	1:3.5	No	116	2
31	ZrCl ₄	Urea	1:3.5	No	154	8
32	TbCl ₃	Urea	1:3.5	No	0	0
33	ZnCl ₂	Urea	1:3.5	Sí	162	5
34	ZnCl ₂	Trifluoroacetamida	1:3.5	No	15	6
35	Cloruro de colina	N-metilpirrolidona	1:2	Sí	86	6
36	Cloruro de colina	Acetamida	1:2	No	139	6
37	Cloruro de colina	Tiourea	1:2	No	229	7

ES 2 709 064 T3

	Componente 1	Componente 2	Razón mol:mol	Líquido a 24°C	Rendimiento de ARN ng/μl	Calidad de ARN 0-10
38	Yoduro de butirilcolina	Urea	1:2	No	240	7
39	Cloruro de acetiltiocolina	Urea	1:2	No	165	6
40	Bromuro de colina	Urea	1:2	No	122	7
41	Bromuro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	129	7
42	Cloruro de colina	Monómero de acrilamida	1:2	Gel	164	7
43	Cloruro de colina	2-Cloroacetamida	1:2	Sí	196	5
44	Cloruro de colina	Bistrifluoroacetamida	1:2	Sí	2	0
45	Cloruro de colina	2,2-Difluoropropanamida	1:2	Sí	191	6
46	Cloruro de colina	2,2,2-Trifluorotioacetamida	1:2	Sí	1183	7
47	Cloruro de colina	2-(Trifluorometil)-fenilacetamida	1:2	No	94	4
48	Cloruro de colina	2,2-Difluoro-2-fenilacetamida	1:1	No	338	7
49	Cloruro de colina	2,2,2-Trifluoro-N-fenilacetamida	1:2	No	91	1
50	Cloruro de colina	3,3,3-Trifluoropropanamida	1:2	No	404	8
51	Cloruro de colina	Formamida	1:2	Sí	81	5
52	Cloruro de colina	Beta-Mercaptoetanol	1:2	Sí	395	7
53	Cloruro de colina	Ditiotreitol	1:2	Sí	202	7
54	Cloruro de colina	Ditioeritreitol	1:2	Sí	109	2
55	Cloruro de colina	Tiopronina	1:2	Sí	287	1
56	Yoduro de colina	Urea	1:2	No	89	4
57	Dihidrogenocitrato de colina	Urea	1:2	Sí	67	3
58	Bitartrato de colina	Urea	1:2	No	58	4
59	Bromuro de bromocolina	Urea	1:2	No	134	6
60	Cloruro de colina	1,3-dimetilurea	1:2	No	127	6
61	Cloruro de colina	Carbohidrazida	1:2	No	129	2
62	Cloruro de colina	1,3-bis(hidroximetil)urea	1:2	No	0	0
63	Cloruro de colina	N-metiltrifluoroacetamida	1:2	No	40	7
64	Cloruro de colina	Dimetiltrifluoroacetamida	1:2	Sí	22	4
65	Cloruro de colina	Dietiltrifluoroacetamida	1:2	Sí	67	3
66	Cloruro de colina	(1-trifluoro)acetilimidazol	1:2	Sí	22	1
67	Cloruro de colina	Trifluoroacetato de etilo	1:2	Sí	43	0
68	Cloruro de colina	Pentafluoropropionamida	1:2	No	62	4
69	Cloruro de colina	Heptafluorobutiramida	1:2	No	10	4
70	Cloruro de colina	N-Metilbis (Trifluoroacetamida)	1:2	No	14	1
71	Cloruro de colina	Lactamida	1:2	Sí	20	7
72	Cloruro de colina	2-Bromoacetamida	1:2	No	23	4

	Componente 1	Componente 2	Razón mol:mol	Líquido a 24°C	Rendimiento de ARN ng/μl	Calidad de ARN 0-10
73	Cloruro de beta-metilcolina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	19	7
74	Betaína	Urea	2:1	No	171	3
75	Betaína	Urea	1:1	Sí	175	6
76	Betaína	Urea	1:1.75	Sí	208	6
77	Betaína	Urea	1:1.95	Sí	30	7
78	Betaína	Urea	1:2	Sí	229	7
79	Betaína	Urea	1:2.14	Sí	169	7
80	Betaína	Urea	1:2.34	Sí	100	6
81	Betaína	Urea	1:3	No	86	4
82	Betaína	Urea	1:4	No	63	3
83	Betaína	ZnCl ₂	2:1	No	52	4
84*	Betaína	Agua	Sentado	Sí	0	0
85	Betaína	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	256	8
86	Carnitina	Urea	1:2	Sí	217	5
87	Reactivo T de Girards	Urea	1:2	Sí	72	1
88	Cloruro de benciltrimetilamonio	Urea	1:2	No	136	8
89	Cloruro de benciltrimetilamonio	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	35	6
90	Bromuro de metiltripenilfosfonio	Etilenglicol	1:3	Sí	106	5
91	Bromuro de metiltripenilfosfonio	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	207	4
92	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	74	9
93	Cloruro de colina	Tricloroacetamida	1:2	No	29	3
94	Urea	Isotiocianato de guanidina	1:2	No	10	0
95*	Formaldehído (4%)	-	-	-	4	0

* Ejemplo comparativo.

5 La escala cualitativa de calidad de ARN es la siguiente; 0 (altamente degradado) a 10 (máxima calidad). El análisis de ARN en la Tabla 1 y 2 se llevó a cabo de la siguiente manera; Electroforesis en gel de agarosa al 1% con TAE 0,5x teñida con bromuro de etidio, seguida de un análisis visual de una fotografía tomada con luz ultravioleta, de la integridad de las bandas de ARNr 18S y 28S. Una muestra de ARN con una Puntuación de calidad de ARN de 8 o más tiene una razón de tinción de bromuro de etidio de ARNr 18S a 28S de 1:2, mientras que una muestra de ARN con una puntuación de calidad de ARN de 5 tiene una razón de tinción de ARNr 18S a 28S de aproximadamente 1:1.

Tabla 2. Mezclas de DES de dos componentes más aditivo

	Componente 1	Componente 2	Razón (mol:mol)	Aditivo (razón molar) con respecto al Componente 1)	Rendimiento de ARN (ng/μl)	Calidad de ARN
1	Cloruro de colina	Urea	1:2	-	168	8
2	Cloruro de colina	Urea	1:2	Ácido p-toluenosulfónico-amonio (0,8)	246	6
3	Cloruro de colina	Urea	1:2	Ácido p-toluenosulfónico-	60	7

ES 2 709 064 T3

	Componente 1	Componente 2	Razón (mol:mol)	Aditivo (razón molar) con respecto al Componente 1)	Rendimiento de ARN (ng/μl)	Calidad de ARN
				sodio (0,8)		
4	Cloruro de colina	Urea	1:2	Ácido dimetilbencenosulfónico (0,8)	126	7
5	Cloruro de colina	Urea	1:2	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,015)	295	6
6	Cloruro de colina	Urea	1:2	Cloruro de cinc (0,95)	0	0
7	Cloruro de colina	Urea	1:2	Cloruro de cinc (0,1)	122	8
8	Cloruro de colina	Urea	1:2	CTAB (0,125)	144	7
9	Cloruro de colina	Urea	1:2	Dodecilsulfato de sodio (0,04)	18	9
10	Cloruro de colina	Urea	1:2	Benzoato de sodio (0,8)	19	9
11	Cloruro de colina	Urea	1:2	p-Toluenosulfonato de metilo (0,1)	64	6
12	Cloruro de colina	Urea	1:2	Isotiocianato de guanidina (0,8)	19	3
13	Cloruro de colina	Urea	1:2	Tiosulfato de amonio (0,07)	99	6
14	Cloruro de colina	Urea	1:2	Hidróxido de dodecildimetil(3-sulfopropil)amonio (0,01)	122	5
15	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sorbitol (5% en peso:peso)	274	6
16	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sorbitol (10% en peso:peso)	272	5
17	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sorbitol (15% en peso:peso)	254	4
18	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sorbitol (20% en peso:peso)	96	3
19	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sorbitol (25% en peso:peso)	15	2
20	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Xilitol (5% en peso:peso)	107	6
21	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Ditiotreititol (9% en peso:peso)	150	7
22	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Cloruro de cinc (1% en peso:peso)	381	7
23	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Acetato de cinc (1% en peso:peso)	370	4
24	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sulfato de cinc, 7H ₂ O (0,02% en peso:peso)	432	8
25	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sulfato de cinc, 7H ₂ O (0,07% en peso:peso)	367	8
26	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sulfato de cinc, 7H ₂ O (0,14% en peso:peso)	433	8
27	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sulfato de cinc, 7H ₂ O (0,7% p:p)	214	8
28	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sulfato de cinc, 7H ₂ O (1% en peso:peso)	70	8
29	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sulfato de cinc anhidro (1% en peso:peso)	135	8
30	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sal de cinc de EDTA (1% en peso:peso)	214	7
31	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Gluconato de cinc (1% en peso:peso)	250	4
32	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Gel de sílice (50% vol:vol)	340	7

	Componente 1	Componente 2	Razón (mol:mol)	Aditivo (razón molar) con respecto al Componente 1)	Rendimiento de ARN (ng/μl)	Calidad de ARN
34	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Tamices moleculares 4A (50% vol:vol)	450	7
33	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Poliacrilato de sodio (50% vol:vol)	308	6
34	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Healthguards® (50% vol:vol)	454	7
35	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Etanol (0,1)	293	6
36	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Etanol (0,25)	595	4
37	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Etanol (0,5)	655	3
38	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Etanol (1)	679	1
39	Trehalosa	Ácido cítrico	1:1	Agua (1)	169	2

La escala cualitativa de calidad de ARN es la siguiente; 0 (altamente degradado) a 10 (máxima calidad). El análisis de ARN en la Tabla 1 y 2 se llevó a cabo de la siguiente manera; Electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0,5x TAE teñida con bromuro de etidio, seguida de un análisis visual de una fotografía tomada con luz ultravioleta, de la integridad de las bandas de ARNr 18S y 28S. Una muestra de ARN con una Puntuación de calidad de ARN de 8 o más tiene una razón de tinción de bromuro de etidio de ARNr 18S a 28S de 1:2, mientras que una muestra de ARN con una puntuación de calidad de ARN de 5 tiene una razón de tinción de ARNr 18S a 28S de aproximadamente 1:1.

4. Composiciones mixtas de DES con una matriz de soporte (ejemplo de referencia)

Con el fin de mejorar la separación física de una mezcla líquida de DES de la muestra almacenada, tal como un tejido o biopsia, el DES se mezcló con varias matrices de soporte. El material de la matriz no está particularmente limitado, pero debe conservar la resistencia estructural incluso cuando se mezcla con el DES y, por lo tanto, no debe disolverse ni reaccionar. Preferiblemente, la matriz de soporte se puede etiquetar directamente, por ejemplo, con un código de barras o una fecha de caducidad de vida útil por medio de una impresora o un bolígrafo de tinta.

A 3,2 g de PEG (PM8000), agarosa, poliacrilato o fibras de celulosa 3MM (Whatmann, Reino Unido) se les añadieron 10 ml de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:1 mol:mol) y se calentaron con agitación a 100°C durante 30 minutos para homogeneizar la mezcla que a continuación se vertió en un recipiente adecuado para enfriarla.

Tales mezclas compuestas tienen la ventaja de ser más fáciles de manejar que las mezclas líquidas de DES y reducir el arrastre del DES a la etapa de extracción, por ejemplo, purificación de ARN. El compuesto se puede verter, moldear, modelar, cortar, estratificar o formar en cualquier número de recipientes, como placas de 96, 24 o 6 pocillos, tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, tubos de 5, 15 o 50 ml.

5. Estabilización del ARN en tejido completo a diferentes temperaturas.

A 400 μl de Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) o RNAlater en un tubo de microcentrifuga de polipropileno de 2 ml convencional se les añadieron 10 mg de muestra de hígado de rata y se preincubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la estabilización y/o fijación, la muestra intacta se incubó a continuación en la mezcla de DES a -20, 4, 37, 50 o 65°C durante 18 horas antes de la recuperación de la muestra de tejido intacta y la purificación de ARN como se indica en el siguiente ejemplo.

A continuación, la muestra se añadió a un tubo nuevo que contenía 350 μl de tampón de lisis RLT y el ARN se extrajo del tejido homogeneizado con guanidina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania). A continuación se utilizaron porciones de 300 μl del producto lisado con guanidina para purificar inmediatamente el ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyeron en 20-50 μl de agua. El rendimiento y la calidad del ARN se determinaron según lo establecido en el Ejemplo 1, para la mezcla de estabilización de DES, la integridad del ARN fue superior a todas las temperaturas superiores a 37°C e iguales a -20 y 4°C en comparación con RNAlater. Los resultados se muestran en la Figura 3. Calles 1, 3, 5, 7, 9 Cloruro de colina:Urea (1:2), Calles 2, 4, 6, 8, 10 RNAlater.

Será evidente para un experto en la técnica que el Cloruro de colina:Urea se puede reemplazar con otras mezclas de DES tales como el cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol).

6. Estabilización a largo plazo del ARN en tejido completo a 24°C

A 400 µl de Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) o RNAlater en un tubo estándar de microcentrífuga de polipropileno de 2 ml se añadieron 10 mg de muestra de hígado de rata y se preincubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la estabilización y/o fijación, la muestra intacta se incubó a continuación en Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) a 24°C durante 0 a 19 días antes de la recuperación de la muestra de tejido intacta y la purificación de ARN como se indica en el siguiente ejemplo.

La muestra se añadió a un tubo nuevo que contenía 350 µl de tampón de lisis RLT, y el ARN se extrajo del tejido homogeneizado de guanidina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania). A continuación se utilizaron porciones de 300 µl del producto lisado de guanidina para purificar inmediatamente el ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyeron en 20 µl de agua. El rendimiento y la calidad del ARN se determinaron según lo establecido en el Ejemplo 1, para la mezcla de estabilización de DES, la integridad del ARN fue igual o superior al RNAlater en todos los puntos temporales. Los resultados se muestran en la Figura 4. Calles 1, 3, 5 Cloruro de colina:Urea (1:2), Calles 2, 4, 6 muestras tratadas con RNAlater.

7. Purificación de diferentes tipos de tejidos

A 400 µl de Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) o RNAlater en un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 2 ml convencional se les añadieron porciones de 10 mg de cerebro de ratón congelado (Calles 3 y 4) o muestras de riñón (Calles 1, 2, 5, 6) y se preincubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la estabilización y/o fijación, la muestra intacta se incubó a continuación en Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) a 37°C durante 1 a 7 días antes a la recuperación de la muestra de tejido intacto y la purificación de ARN como se describe a continuación (Figura 5A. Calles 1, 3, 5; estabilización con Cloruro de colina:Urea (1:2), Calles 2, 4, 6; estabilización con RNAlater (Qiagen, Francia) durante 24 horas (Calles 1-4) o 7 días (Calles 5 y 6)).

Alternativamente, se añadieron porciones de 10 mg de tejido de ratón previamente congelado a 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida y se incubaron a 37°C durante 18 horas antes de la purificación del ARN (Figura 5B. Calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15; estabilización con cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2), Calles 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14, 16; estabilización con RNAlater (Qiagen, Alemania).

La muestra se añadió a un tubo nuevo que contenía 350 µl de tampón de lisis RLT, y el ARN se extrajo del tejido homogeneizado con guanidina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania). A continuación se utilizaron porciones de 300 µl del producto lisado con guanidina para purificar inmediatamente el ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyeron en 20 µl de agua. El rendimiento y la calidad del ARN se determinaron según lo establecido en el Ejemplo 1, para la mezcla de estabilización de DES, la integridad del ARN fue igual o superior a la de RNAlater.

8. Purificación de diferentes cantidades de tejido

A 400 µl de Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol) o RNAlater en un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 2 ml convencional se les añadieron 15 mg (Calles 1 y 2) o 25 mg de hígado de rata (Calles 3 y 4) y se pre-incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la estabilización y/o fijación, la muestra intacta se incubó a continuación en Cloruro de colina:Urea a 37°C durante 18 horas antes de la recuperación de la muestra de tejido intacta y la purificación de ARN como se establece a continuación.

La muestra se añadió a un tubo nuevo que contenía 350 µl de tampón de lisis RLT, y el ARN se extrajo del tejido homogeneizado con guanidina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania). A continuación se utilizaron porciones de 300 µl del producto lisado de guanidina para purificar inmediatamente el ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyeron en 20 µl de agua.

El rendimiento y la calidad del ARN se determinaron según lo establecido en el Ejemplo 1, para la mezcla de estabilización de DES, la integridad del ARN fue igual o superior a RNAlater en todos los puntos temporales. Los resultados se muestran en la Figura 6. Calles 1 y 3, Cloruro de colina:Urea (1:2), Calles 2 y 4, muestras tratadas con RNAlater.

Se encontró que la mezcla de DES que contenía cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) fue significativamente más eficaz para estabilizar el ARN en tejidos frescos que el cloruro de colina:urea (1:2 mol:mol). Sin embargo, si el tejido se congela primero a -20°C o -80°C, el Cloruro de colina:Urea es igual de eficaz que el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida. No se entiende por qué el Cloruro de colina:Urea es menos eficaz para estabilizar el ARN en tejido fresco, pero se ha encontrado que la adición de ZnCl₂ o ZnSO₄ 33 mM al Cloruro de colina:Urea (2:1 mol:mol) reduce significativamente la cantidad de degradación del ARN que se produce cuando se utilizan tejidos frescos.

De manera útil, tejidos tales como hígado, riñón y músculo tratados durante al menos una hora con un DES, tal

como Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) y a continuación congelados a -80°C son significativamente más blandos que los tejidos no tratados permitiendo la penetración de una aguja de biopsia. Esto es particularmente útil cuando la muestra no debe descongelarse por completo, sino que solo se debe extraer una porción para su posterior análisis. También se debe tener en cuenta que el color de los tejidos tratados con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida, especialmente la sangre, no cambia ni se desvanece significativamente, mientras que las muestras no tratadas o tratadas con formol pierden rápidamente su intensidad de color, con o sin congelación, y tal preservación del color puede ser una importante ventaja para analizar correctamente las muestras de biopsia y los tipos de células en una muestra de biopsia.

9. Purificación de ARN de sangre completa estabilizada con DES con células HeLa

A 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) se les añadieron 50 µl de sangre humana completa enriquecida con 50 µl de 150.000 células HeLa y se mezclaron con un pipeteo suave, se dejó que la muestra se estabilizara durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de la extracción del ARN. Se mezclaron 50 µl (Calle 1) o 100 µl (Calle 2) de esta mezcla de sangre estabilizadas DES/células con 300 µl de Tampón de lisis RLT (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania) para lisar las células y extraer el ARN, la purificación se llevó a cabo de la siguiente manera.

El producto lisado de sangre con guanidina se centrifugó durante 60 segundos a 14.000 g y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 300 µl de etanol del 70%, se mezcló mediante pipeteo y a continuación se transfirió a una columna de centrifugado MinElute (RNeasy Micro Kit, Núm. de Cat. 74004, Qiagen, Alemania). La columna MinElute se lavó una vez con 700 µl de Tampón RW1 y a continuación dos veces con 500 µl de Tampón RPE, se centrifugó durante 60 segundos para secar la columna antes de la elución con 20 µl de agua según las instrucciones del fabricante. El rendimiento de ARN se determinó mediante absorbancia a DO260 nm utilizando un Nanodrop (ThermoScientific, EE.UU.) y se cargó y analizó en un gel de agarosa al 1%, 0,5X TAE.

Tabla 3. Rendimientos de ARN derivado de muestras de sangre enriquecida con células HeLa.

	Volumen de la muestra	Rendimiento total de ARN
1	50 µl	200 ng
2	100 µl	2400 ng

Los resultados se muestran en la Figura 7. Es notable que la columna de centrifugación de sílice MinElute después del paso del producto lisado de sangre con guanidina no estuviera visiblemente contaminada con hemo. La mezcla de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida - guanidina, por lo tanto, parece proteger la membrana de sílice de la contaminación no específica.

10. Estabilización del ARN en sangre completa enriquecida con células HeLa utilizando Cloruro de colina:Trifluoroacetamida

A 1000 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) se les añadieron 200 µl de sangre humana completa enriquecida con 50 µl de 1.000.000 células HeLa y se mezclaron con un pipeteo suave, la muestra se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente antes de extraer el ARN. Se mezclaron 100 µl (Figura 8; Calle 1), 150 µl (Calle 2), 200 µl (Calle 3) o 250 µl (Calle 4) de la mezcla de sangre estabilizada DES/células: 250 µl de tampón de lisis RLT (RNeasy Mini Kit, Cat No. 74106, Qiagen, Alemania) para lisar las células y extraer el ARN, la purificación se llevó a cabo de la siguiente manera.

El producto lisado de sangre con guanidina se centrifugó durante 60 segundos a 14.000 g y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 300 µl de etanol del 70%, se mezcló mediante pipeteo y a continuación se transfirió a una columna de centrifugado MinElute (RNeasy MinElute, Núm. de Cat. 74204, Qiagen, Alemania). La columna MinElute se lavó una vez con 700 µl de Tampón RW1 y a continuación dos veces con 500 µl de Tampón RPE, se centrifugó durante 60 segundos para secar la columna antes de la elución con 20 µl de agua según las instrucciones del fabricante. El rendimiento de ARN se determinó utilizando un Nanodrop (Agilent, EE.UU.) y se cargó y analizó en un gel de agarosa al 0,5%, 0,5X TAE. Los datos de DO 260/280nm demuestran que el ARN está sustancialmente libre de proteínas contaminantes, mientras que los rendimientos de ARN sugieren que las columnas MinElute están saturadas con ARN y que las columnas MinElute (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania) podrían proporcionar incluso mejores rendimientos.

Tabla 4. Rendimientos de ARN y calidad después del almacenamiento de muestras de sangre durante 18 horas.

	Volumen de la muestra	DO 260/280nm	Rendimiento total de ARN
1	100 µl	2,03	640 ng
2	150 µl	2,03	1500 ng
3	200 µl	2,01	1120 ng
4	250 µl	2,09	600 ng

La estabilización del ARN durante la noche en sangre completa también se demostró como sigue. Se mezclaron 50.000 células HeLa con 50 µl de sangre completa humana fresca y a continuación se añadieron las células y la sangre a 400 µl de Tampón RLT (Qiagen, Alemania) o 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) y se incubaron durante la noche a 24°C, el ARN se purificó según las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini, Qiagen, Alemania). El ARN se protegió significativamente en la sangre completa de la degradación por el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol), pero se degradó cuando se almacenó durante la noche en tampón RLT. El almacenamiento de ARN en la sangre completa, ya sea en una forma celular tal como glóbulos blancos o células tumorales circulantes, en una forma subcelular tal como exosomas u otras microvesículas, o dentro de las partículas virales puede llevarse a cabo añadiendo 1:8 o más preferiblemente, 1:10 de sangre completa a Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol). Alternativamente, se puede añadir ZnCl₂ o ZnSO₄ 10 mM con o sin Tamices moleculares 4A al 20% p:p al Cloruro de colina:Trifluoroacetamida para mejorar adicionalmente la estabilidad del ARN.

La Figura 9 muestra la estabilización del ARN en sangre completa con Guanidina o Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol). En el almacenamiento de muestras durante la noche a 24°C en Tampón RLT (Qiagen, Alemania) (Calle 1) o 400 µl de cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) (Calle 2), el ARN total se degrada significativamente en Guanidina pero no en Cloruro de colina:Trifluoroacetamida.

11. Estabilización de sangre completa utilizando un tubo de extracción de sangre a vacío

A un tubo de recolección de sangre de 10 ml de tereftalato de polietileno (PET) se le añadieron 7 ml de Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) estéril, y el tubo se cerró con un Hemogard™ (Becton Dickinson, EE.UU.) u otro cierre apropiado y el aire se retiró parcialmente para crear un vacío. Alternativamente, el tubo de recolección de sangre puede contener además de los 7 ml de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) ZnSO₄ para proporcionar una concentración final en la muestra de sangre diluida de 1 mM, 5 mM, 10 mM, 33 mM, 100 mM o 200 mM. Como ejemplo de un dispositivo de tubo de extracción de sangre, véase la Figura 1C. Se extrajeron aproximadamente 2 ml de sangre venosa completa al tubo utilizando un conjunto de recolección de sangre (PreAnalytix, Alemania) o mediante el llenado de una jeringa Luer-Lock y una aguja, y la transferencia de 2 ml del contenido al tubo de extracción de sangre. Después de la adición de la sangre, el tubo se invirtió 10 veces para mezclar los componentes y a continuación se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para fijar y estabilizar el ARN en glóbulos blancos, tales como linfocitos T y B, monocitos y macrófagos (p.ej. PBMC), neutrófilos, basófilos y eosinófilos (células polimorfonucleares), trombocitos y cualquier bacteria o virus como se expone en la descripción, incluidos VPH, VIH, VHC, VHB, Influenza y coronavirus implicados en el SARS. En general, los eritrocitos no permanecen intactos en esta mezcla. Otros tipos de células, tales como las células tumorales circulantes, también se pueden estabilizar y fijar con este método, lo que permite una mejor captura, análisis y almacenamiento de los CTC.

Después del almacenamiento en el tubo de recolección de sangre hasta, por ejemplo, 24 horas a 37°C, 3 días a temperatura ambiente, 1 semana a 4°C o 3 meses a -20°C, el ARN puede extraerse de la sangre estabilizada con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida de la siguiente manera: El tubo de recolección de sangre se abrió y se retiró 1 ml de la muestra estabilizada y se mezcló con 3 ml de Tampón de Lisis RLT, se centrifugó durante 60 segundos a 14.000 g, se retiró el sobrenadante y se añadió a un volumen igual de etanol del 70% antes de cargarlo en una columna RNeasy MinElute (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania) o RNeasy Midi (RNeasy Midi Kit, Núm. de cat. 75142, Qiagen, Alemania) y a continuación la columna centrifugación se lavó con Tampones RW1 y RPE y el ARN se eluyó de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit.

12. Medición de las propiedades de fijación celular de las mezclas de DES

A cada pocillo en una placa de cultivo de tejido de 12 pocillos se le añadieron 20,000 células HeLa recién tripsinizadas en 1 ml de DMEM/FBS al 5% y a continuación se dejó que las células se unieran a la superficie de la placa incubando en un incubador de cultivo de tejido apropiado durante al menos 6 horas a 37°C. A continuación se retiró el medio de cultivo de tejido con una pipeta de vacío y se añadieron 400 µl de una mezcla de DES a cada

5 pocillo mientras se examinaban los cambios morfológicos de las células en tiempo real con un microscopio óptico 20x. La placa de cultivo de tejido se devolvió a continuación a una incubadora a 37°C durante 90 minutos antes de un examen de microscopio adicional. La solución salina de fosfato tamponada de Dulbecco (DPBS) se utilizó como control no tóxico y los resultados se muestran en la siguiente tabla. La viabilidad celular se determinó mediante tinción con Azul Tripán convencional.

Tabla 5. Efectos de diversos fijadores y aditivos sobre la morfología celular.

	Fijador (mol:mol)	Efecto sobre las células	Viabilidad celular
1*	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco	Sin cambios	Sí
2	Cloruro de colina:urea (1:2)	Las células se contraen y el citoplasma es translúcido	No
3	Cloruro de colina:Xilitol (1:1)	Se desprenden, se contraen con crenación	No
4	Cloruro de colina:Sorbitol (1:1)	Se desprenden, se contraen con crenación	No
5	Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2)	Sin cambios	No
6	Cloruro de colina:Etilenglicol (1:2)	Se desprenden	No
7	Cloruro de colina:urea:ZnCl ₂ (1:2:1)	15% lisis, células opacas, sin contracción	No
8	Cloruro de colina:urea:ZnCl ₂ (10:20:1)	Células opacas y con reducción de tamaño de 80%	No
9	Cloruro de colina:urea: CTAB (8:16:1)	Citoplasma homogéneo sin contracción.	No
10	Cloruro de colina:urea: SDS (25:50:1)	Morfología razonable, sin contracción celular	No
11	Cloruro de colina:urea:p-Toluenosulfonato de metilo (3:6:1)	Morfología razonable, opaca, 80% de condensación citoplásmica	No
12	Cloruro de colina:urea:Benzoato de sodio (36:72:1)	Citoplasma hipercondensado, opaco	No
13	Cloruro de colina:isotiocianato de guanidina (2:1)	Las células se hinchan y se lisan	No
14	ZnCl ₂ :Etilenglicol (1:4)	Células altamente condensadas, desprendidas en 50%	No
15	ZnCl ₂ :Etilenglicol:Trifluoroacetamida (1:3:1)	Citoplasma altamente condensado, ruptura y heterogéneo.	No
16*	RNAlater	Formación de burbujas en el citoplasma, por lo demás intacto y opaco	No

* Ejemplo comparativo.

Tabla 6. Efectos de varias mezclas de DES con o sin aditivos sobre la morfología celular

	Componente 1	Componente 2	Razón (mol:mol)	% Aditivo final	Efecto sobre la morfología HeLa
1	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:1.8	-	++++
2	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	-	++++
3	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2.25	-	++
4	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2.5	-	++++
5	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2.75	-	++++
6	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:3	-	+++++
7	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	H ₂ O (17%)	+++++
8	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	H ₂ O (13%)	+++
9	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	H ₂ O (10%)	+++

ES 2 709 064 T3

	Componente 1	Componente 2	Razón (mol:mol)	% Aditivo final	Efecto sobre la morfología HeLa
10	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	H2O (5%)	++++
11	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	H2O (2.5%)	+++
12	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Etilenglicol (17%)	++
13	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	1,6-Hexanodiol (17%)	+++
14	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Etanol (17%)	++++
15	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Metanol (17%)	+++
16	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Dimetilformamida (17%)	+
17	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Dimetilsulfóxido (17%)	+++
18	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	N-metilpirrolidona (17%)	+++++
19	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	N-etilpirrolidona (5%)	+++++
20	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Etilenurea (5%)	++
21	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Pivalamida (5%)	+++
22	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	1,3-Dimetilurea (5%)	++
23	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	N,N'-Dimetilurea (5%)	++
24	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Isopropanol (17%)	++++
25	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Butanol (17%)	++++
26	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Glicerol (17%)	++
27	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	1-Metilimidazol (33%)	+++++
28	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	1-Metilimidazol (5%)	++
29	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	1-Etilimidazol (5%)	++
30	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	1-Bencilimidazol (2,5%)	+++++
31	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	1-Bencilimidazol (5%)	+++++
32	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Tetrametilurea (1%)	+++++
33	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Tetrametilurea (5%)	+++++
34	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Carbonato de etileno (33%)	++
35	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Imidazol 33%)	++++
36	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Acetato de litio (33%)	++
37	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	4-Formil morfolina (33%)	+++++
38	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Acetonil acetona (20%)	++
39	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Guanidina HCl (3,4%)	++
40	Cloruro de colina	Acrilamida	1:2	-	++
41	Cloruro de colina	2-Cloroacetamida	1:2	-	++
42	Cloruro de colina	Bistrifluoroacetamida	1:2	-	++++
43	Cloruro de colina	2,2-Difluoropropanamida	1:2	-	+++
44	Cloruro de colina	2,2,2-Trifluorotioacetamida	1:2	-	++
45	Cloruro de colina	Formamida	1:2	-	++
46	Cloruro de colina	Metanol	1:2	-	++

ES 2 709 064 T3

	Componente 1	Componente 2	Razón (mol:mol)	% Aditivo final	Efecto sobre la morfología HeLa
47	Cloruro de colina	Etanol	1:2	-	++
48	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sorbitol (5%)	++
49	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Xilitol (5%)	++
50	Cloruro de colina	Urea	1:2		++
51	Cloruro de colina	Urea	1:2	Cacodilato de Na (10%)	+++
52	Cloruro de colina	Urea	1:2	SDS (5%)	++
53	Cloruro de colina	Urea	1:2	Acido p-toluenosulfónico Na (6%)	+
54	Cloruro de colina	Urea	1:2	Triton TX-45 (12%)	+
55	Cloruro de colina	Urea	1:2	Benzoato de sodio (8%)	+++
56	Cloruro de colina	Urea	1:2	Isotiocianato de guanidina (7%)	+
57	Cloruro de colina	Urea	1:2	Ácido sulfosalicílico (10%)	+
58	Cloruro de colina	Urea	1:2	CTAB (8%)	++
59	Cloruro de colina	Urea	1:2	Cloruro de cinc (11%)	+++
60	Cloruro de colina	Urea	1:2	p-Toluenosulfonato de metilo (25%)	++
61	ZnCl ₂	Etilenglicol	1:4	-	+
62	ZnCl ₂	Etilenglicol: Trifluoroacetamida	1:3:1	-	+
63	ZnCl ₂	Urea	1:3.5	-	+
64	ZnCl ₂	Trifluoroacetamida	1:3.5	-	++
65	Cloruro de colina	Sorbitol	1:1	-	++++
66	Cloruro de colina	Isotiocianato de guanidina	2:1	-	+
67	Cloruro de colina	Ácido fenilacético	1:2	-	+
68	Cloruro de colina	Ácido malónico	1:2	-	+
69	Cloruro de colina	Ácido bórico	1:1.5	-	+++
70	Cloruro de acetilcolina	Urea	1:2	-	+
71	Cloruro de acetilcolina	Trifluoroacetamida	1:2	-	++
72	Bromuro de colina	Urea	1:2	-	+
73	Bromuro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	-	++++
74	Cloruro de beta-metilcolina	Trifluoroacetamida	1:2	-	+
75	Carnitina	Trifluoroacetamida	1:2	-	++
76	Taurina	Trifluoroacetamida	1:2	-	+

	Componente 1	Componente 2	Razón (mol:mol)	% Aditivo final	Efecto sobre la morfología HeLa
77	Bromuro de metiltrifenilfosfonio	Trifluoroacetamida	1:3	-	+
78	Grignard Reactivo T	Trifluoroacetamida	1:2	-	+++
79	Cloruro de cloroetiltrimetilamonio	Trifluoroacetamida	1:2	-	+++
80	Cloruro de cetiltrimetilamonio	Trifluoroacetamida	1:2	-	++
81	Óxido de tetrametilamonio	Trifluoroacetamida	1:2	-	+
82	Cloruro de colina	Tricloroacetamida	1:2	-	++
83	Cloruro de benciltrimetilamonio	Trifluoroacetamida	1:2	-	+++
84	Betaína	Trifluoroacetamida	1:2	-	+++

Efecto en la morfología de las células HeLa, escala + (peor) a +++++ (mejor).

13. Fijación celular con trifluoroacetamida que contiene mezclas de DES

5 Se cultivaron células de cultivo tisular HeLa en condiciones de cultivo tisular convencional en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos hasta la confluencia, se retiró el medio DMEM/FBS de 1 ml y se reemplazó por 0,2-1,0 ml de (A) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) o (B) Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) y se tomaron imágenes de las células con un microscopio óptico convencional 50X. Los campos representativos de las células se muestran en la Figura 10, no se observaron cambios sustanciales en la morfología celular entre las células tratadas con DPBS o Cloruro de colina:Trifluoroacetamida. Como prueba para demostrar que las células tratadas con DES se fijaron, se retiraron el DPBS o el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida y las células se lavaron con 2 ml de agua del grifo, se encontró que, después de una hora a temperatura ambiente, solo las células tratadas con DPBS se hincharon y a continuación se rompieron por el efecto osmótico del agua, mientras que las células tratadas con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida se mantuvieron prácticamente sin cambios por este tratamiento adicional, incluso después de una inmersión de 1 mes en agua a temperatura ambiente, lo que demuestra que en efecto se habían fijado. Además, como prueba de la fijación de las células, estas se trataron con 1 ml de tripsina al 0,05% durante una hora a temperatura ambiente y se encontró que, a diferencia de las células tratadas con DPBS, no había ningún efecto o una degradación visible por proteasa de las células y estas se mantuvieron intactas.

20 El cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) se puede reemplazar por Cloruro de colina:Trifluoroacetamida 1:1, 1:1.5, 1:1.75, 1:2.25, 1:2.5, 1:2.75 o 1:3 (mol:mol). Alternativamente, el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida se puede reemplazar por Betaína:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) o Cloruro de acetilcolina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol). No existe una limitación concreta para la mezcla de DES para la fijación celular, pero las mezclas que contienen trifluoroacetamida son particularmente útiles para la fijación celular y la estabilización de ARN (consulte la Tabla 1).

30 Las células de cultivo tisular y los tejidos pueden fijarse con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) a diferentes temperaturas sin que las células se lisen o se distorsionen. Se precalentaron porciones de 400 µl de cloruro de colina:trifluoroacetamida a 37°C, 100°C o 120°C, y se añadió una punta de pipeta precalentada a células HeLa en una placa de 24 pocillos. La observación inmediata por microscopio de las células después de la adición del Cloruro de colina:Trifluoroacetamida caliente mostró que, sorprendentemente, tenían una morfología muy similar a las células fijadas a temperatura ambiente. La viscosidad del Cloruro de colina:Trifluoroacetamida caliente es significativamente menor que a temperatura ambiente.

35 Específicamente, las propiedades de fijación celular del disolvente eutéctico profundo se determinaron y cuantificaron de la siguiente manera: se cultivaron aproximadamente 2.000 células HeLa en un Cellattice™ de 25 mm: Superficie de Cultivo Celular con Escala Micrométrica (Superficie de cubreobjetos de cultivo celular con escala micrométrica Núm. de Cat. CLS5-25D-050 Nexcelom Bioscience, EE.UU.) colocadas en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos y cultivadas durante la noche en 2 ml de DMEM/FBS al 10%, el número de células adheridas en un área definida de la cuadrícula se contó manualmente utilizando una lente microscópica de objetivo 10x, a

continuación se retiró el medio de cultivo de tejidos con una pipeta de aspiración y se reemplazó por 400 mg de un disolvente eutéctico profundo, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir la fijación celular y a continuación se retiró el disolvente eutéctico profundo con una pipeta de aspiración y se reemplazó por 2 ml de agua destilada, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se contó manualmente el número de células en la misma área definida de la rejilla que antes del tratamiento. Se calculó el porcentaje de células adheridas que permanecían en la cuadrícula en comparación con el número original y se encontró que al menos 75% de las células se adherieron después del tratamiento con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol). Obsérvese que las células no deben crecer hasta la confluencia, ya que se ha encontrado que un gran número de células muertas y poco adheridas se desprenden fácilmente y, por lo tanto, causan errores en el recuento de células. Será evidente para un experto en la técnica que también se pueden determinar las propiedades de fijación celular de otros disolventes eutécticos profundos utilizando este método.

14. Solubilidad de las mezclas de sal en Cloruro de colina:Urea (ejemplo de referencia)

Se encontró notablemente que el Cloruro de cinc ($ZnCl_2$) se podía disolver en el Cloruro de colina:Urea (1:2) para proporcionar una mezcla de DES de Cloruro de colina:Urea: $ZnCl_2$ de 1:2:2 (mol:mol:mol), el isotiocianato de guanidina se puede disolver en Cloruro de colina:Urea para obtener una mezcla de DES de Cloruro de colina:Urea:Isotiocianato de guanidina de 1:2:5 (mol:mol:mol) y el Acetato de amonio se puede disolver en Cloruro de colina:Urea (1:2) para dar una mezcla de DES de Cloruro de colina:Urea:Acetato de amonio de 1:2:3 (mol:mol:mol).

15. Degradación del ARN en la ausencia de un estabilizador (ejemplo comparativo)

Para determinar la velocidad de la degradación del ARN en ausencia de una mezcla de DES u otro estabilizador, se incubaron 50 mg de hígado de rata a 20°C durante (Calle 1) 0 min, (Calle 2) 1 min, (Calle 3) 2 min, (Calle 4) 5 min, o (Calle 5) 20 min antes de la purificación del ARN de acuerdo con el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 10.

Se encontró que el ARN se degradó notablemente después de 5 minutos a temperatura ambiente y se degradó significativamente después de 20 minutos. Esto proporciona un método para estimar la cantidad máxima de tiempo que puede permanecer intacto el ARN en un tejido antes de que comience a degradarse y, por lo tanto, la rapidez y eficacia con las que se puede comparar el fijador DES. Por ejemplo, el peso de las muestras de un tejido con una tasa relativamente baja de degradación del ARN, tal como músculo, puede ser mayor que el de un tejido con una tasa más alta, tal como páncreas.

16. Estabilización del ADN en muestras de tejidos animales.

A 400 μ l de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) en un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml convencional se les añadió una muestra de hígado de rata de 2 a 25 mg y se preincubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la estabilización y/o fijación, la muestra se puede incubarse a -80, -20, 4, 20 o 37, 42 o 55°C durante una hora a varias semanas antes de la recuperación de la muestra de tejido con fórceps seguida de la purificación de ARN y a continuación de ADN como se expone a continuación.

Brevemente, la muestra se lisa mecánicamente en 400 μ l de Tampón de lisis RLT y el ARN se eluye en al menos 40 μ l de agua de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania), a continuación se lava la membrana de sílice con 100 μ l de agua, se centrifuga durante 60 segundos a 10.000 xg y el flujo directo se descarta, a continuación se añaden 100 μ l de NaOH 10 mM, se incuban a 70°C durante 15 minutos para destruir el ARN residual y a continuación se centrifuga durante 60 segundos a 10.000 xg y el flujo directo que contiene el ADN se recoge y analiza utilizando un gel de agarosa al 1%.

También se pueden utilizar kits de purificación de ADN comercializados, tales como PureLink® (Núm. de Cat. 12183018A, Life Technologies, EE.UU.) y DNeasy Mini Kit, (DNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 69504, Qiagen, Alemania) y no existe Limitación sobre tipo de kit o tipo de tejido que se puede utilizar para la purificación del ADN.

La muestra de hígado se puede reemplazarse por otros tipos de tejidos y células, tales como hígado, bazo, cerebro, músculo, corazón, esófago, testículo, ovario, timo, riñones, piel, intestino, páncreas, glándulas suprarrenales, pulmones, médula ósea o células tales como células COS-7, NIH/3T3, HeLa, 293 y CHO o incluso muestras líquidas tales como suero, plasma o sangre.

Se encontró que el ADN extraído de muestras de hígado de rata que se habían fijado y estabilizado en 400 μ l de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2) en comparación con 400 μ l de RNAlater a temperatura ambiente tenía un ADN significativamente más intacto que demostraba la estabilización superior de la mezcla de DES en comparación con RNAlater, un producto que se ha recomendado para preservar el ADN y el ARN. También se puede añadir $ZnSO_4$ 1-33 mM para mejorar la estabilización del ADN.

Los resultados se muestran en la Figura 12. Sedimentos de células HeLa estabilizados en; Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) (Calles 1 y 3), RNAlater (Calles 2 y 3), durante 9 (Calles 1 y 2) o 15 días (Calles 3 y 4) a 24°C. El ADN en muestras estabilizadas con RNAlater está significativamente más degradado que con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida.

5 **17. Estabilización de proteínas en muestras de tejidos animales (un ejemplo de referencia no de acuerdo con las presentes reivindicaciones)**

10 A 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol), ZnSO₄·7H₂O 10 mM y 40 mg de Tamices moleculares 4A en un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml convencional se les añadieron 10 mg de hígado de ratón congelado y descongelado durante 4, 7 o 18 días a 24°C. Las muestras de hígado de ratón de control se incubaron en 400 µl de PBS durante 0 minutos, 36 horas, 6 días o 13 días a 24°C antes de la extracción de proteínas.

15 Las proteínas se extrajeron añadiendo 10 volúmenes de tampón de muestra 1X (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol al 5%, azul de bromofenol al 0,001%) a la muestra de hígado, triturando con un mortero para sedimentos durante 30 segundos y a continuación calentando inmediatamente la muestra durante 10 minutos a 70°C, colocando el tubo en hielo durante 5 minutos y a continuación centrifugando durante 5 minutos a 10.000 xg antes de la dosificación de proteínas mediante el método de Bradford (Bio-Rad, Francia). Se mezclaron 20 30 µg de cada proteína con tampón de Laemlli y se cargaron en un gel de acrilamida SDS-7,5% convencional y se sometieron a electroforesis durante 3 horas a 110V. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF/ECL+ de transferencia Western y se incubaron durante la noche en TBS (Tween-20 al 0,1%), leche en polvo al 5% a 4°C con una dilución 1:500 del anticuerpo primario anti-α-actina, la membrana se lavó tres veces con 25 TBS (Tween-20 al 0,1%, 5% de leche en polvo) y se incubó durante 60 minutos a 24°C con una dilución 1:100 de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con HRP, lavado y desarrollado con un Kit Supersignal Wes Pico Chemiluminiscent (Pierce, Francia).

Los resultados se muestran en la Figura 13. Hígado de ratón estabilizado en; PBS (Calles 2-4) o Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) (Calles 5-7), durante 0 minutos (Calle 1), 36 horas (Calle 2), 6 días (Calle 3), 30 13 días (Calle 4), 4 días (Calle 5), 7 días (Calle 6) o 18 días (Calle 7) a 24°C. Las proteínas IgG y actina en las muestras almacenadas en PBS están significativamente más degradadas que con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida.

35 **18. Fijación celular con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) para inmunohistoquímica (IHC)**

Las células HeLa se hicieron crecer hasta una densidad celular de 20% sobre un cubreobjetos de vidrio de 13 mm en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos, el medio de crecimiento DMEM se retiró con una pipeta de vacío, el borde se secó con un pañuelo de papel y el cubreobjetos se transfirió a una placa de 12 pocillos y se añadieron directamente 600 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) sobre el cubreobjetos y se dejó durante 60 40 minutos en una plataforma oscilante a temperatura ambiente para permitir la fijación. A continuación se retiraron el cubreobjetos y las células del fijador, se retiró el fijador en exceso con una pipeta de vacío y se secó con un pañuelo de papel, y se lavó durante 4 x 5 minutos con 2 ml de PBS. Las células se bloquearon con 2 ml de PBS/BSA al 1% en una plataforma oscilante, a continuación se añadió una dilución adecuada, tal como 1:100, del anticuerpo primario y se dejó durante la noche a 4°C. Las células se lavaron a continuación en 3 x 2 ml de PBS/BSA al 1% 45 durante 5 minutos cada vez, y se añadió una dilución adecuada, tal como 1:1000 de anti-IgG1 de ratón de cabra Alexafluor 488 (Life Technologies, Reino Unido), del anticuerpo marcado secundario y se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron en 3 x 2 ml de PBS/BSA al 1% y a continuación 3 x 2 ml de PBS y después se enjuagaron brevemente en agua antes de montar con Vectashield/DAPI (Vector Labs, Reino Unido) y observar con un microscopio adecuado.

50 Alternativamente, se puede realizar la adición de ZnSO₄ 10 mM, ZnCl₂, 5% (vol:vol) N-etilpirrolidona, 5-10% de una solución acuosa tal como agua, PBS o DMEM, 2,5% (vol:vol) de 1-Bencilimidazol o 1% (vol:vol) de Tetrametilurea al Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) antes de la fijación celular para mejorar los resultados de la inmunohistoquímica.

55 **19. Fijación de tejido de mamíferos con cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) para tinción o inmunohistoquímica (IHC)**

60 Se añadieron fragmentos de tejido de ratón recién diseccionados, tales como hígado, riñón, pulmón, cerebro, músculo liso, esquelético o cardíaco, bazo, timo, glándula salival, útero, testículo, piel, ojo, lengua, esófago, estómago, intestino, páncreas, glándulas suprarrenales, vesícula biliar, a 10 volúmenes de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) y se incubaron entre 4°C o temperatura ambiente durante al menos una hora para permitir que se produjera la penetración y la fijación del tejido. También son compatibles períodos de incubación más largos de más de una hora, por ejemplo, 4, 8, 15, 24 o 72 horas. La muestra de tejido también se

- 5 puede congelar y almacenar en la mezcla de cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) hasta que se necesite. El tiempo requerido para la fijación del tejido dependerá de una serie de factores que incluyen el tipo de tejido, el tamaño, la densidad, el contenido de grasa, la forma, el área de superficie y el tipo de fijador. La determinación del tiempo mínimo necesario para la fijación de un tejido en particular se puede llevar a cabo simplemente incubando el tejido durante diferentes períodos de tiempo y a continuación observando cómo se comporta el tejido durante el corte con el microtomo; el desgarro del tejido detectaría un tiempo de fijación insuficiente durante el paso de la cuchilla del microtomo. Un tiempo de fijación suficiente conduce a una muestra robusta para la sección con el microtomo pero también a la estabilización de ARN.
- 10 Después de la fijación en Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol), el tejido se enjuaga brevemente en 10 volúmenes de PBS antes de la deshidratación en etanol del 70% durante 45 minutos, etanol del 80% durante 45 minutos, dos veces en etanol del 100% durante 30 minutos, dos veces en tolueno durante 30 minutos antes su inclusión en parafina (punto de fusión 56-58°C) a 65°C y 100°C durante 1 hora cada uno. El bloque de parafina que contiene el tejido fijado se deja enfriar a temperatura ambiente antes de cortar con el microtomo de acuerdo con los protocolos convencionales idénticos a los utilizados para los tejidos fijados con formaldehído. Los métodos detallados son expuestos por Al-Mulla y Gohlmann (2011) en Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). El tolueno se puede reemplazar por xileno o Histosol si fuera necesario.
- 15 La adición de Sales de cinc 1-33 mM, preferiblemente 10-33 mM tales como Cloruro de cinc, Sulfato de cinc o Citrato de cinc al Cloruro de colina:Trifluoroacetamida mejora la velocidad de penetración y fijación del tejido por el fijador, mientras que la presencia adicional de Tamices moleculares de Tipo 4A mejoran la estabilización del ARN en la muestra.
- 20 La tinción de la sección de tejido con hemotoxilina y eosina se realizó de acuerdo con métodos convencionales y bien conocidos.

20. Estabilización de ARN y DNA de células HeLa con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida después de su inclusión en parafina

- 30 Se añadieron sedimentos de células HeLa (un millón de células) a 400 mg de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) que contenía ZnCl₂ 10 mM y se fijaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se procesaron inmediatamente o se siguió un protocolo convencional de inclusión en parafina; (i) 30 minutos de inmersión en 1 ml de etanol del 100%, (ii) 15 minutos con 1 ml de tolueno, a continuación una (iii) infiltración de 15 o (iv) 60 minutos con 1 ml de parafina a 55°C. El ARN y el ADN se purificaron posteriormente (RNeasy, Qiagen, Alemania) y se determinó el RIN (Agilent Bioanalyser 2100). El RIN del ARN de la célula HeLa disminuyó de 9,6 (Calle 1, control positivo) sin fijación, a 8,6 (Calle 6) después de la fijación, la deshidratación y la inclusión en parafina, lo que demuestra que aunque hubo cierta degradación del ARN durante el procesamiento, la cantidad total fue muy aceptable. También se encontró que la fijación con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida dio como resultado una degradación mucho menor del ARN que con las muestras tratadas con formaldehído (datos no mostrados). La integridad de las muestras de ADN no cambió visiblemente, lo que demuestra que el ADN también se estabiliza durante la fijación. Los resultados se muestran en la Figura 14.

21. Estabilización de ARN y ADN de tejido hepático y renal de ratón con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida después de la inclusión en parafina.

- 45 Se añadieron fragmentos de 10 mg de hígado o riñón de ratón a 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) que contenía tanto ZnSO₄ 10 mM como tamices moleculares 4A (3% (peso:peso) o a 400 µl de PBS y se incubaron durante 64 horas a 4°C o 24°C. A continuación, las muestras de tejido se procesaron de la siguiente manera: 60 minutos en etanol del 70%, 60 minutos en etanol del 80%, 60 minutos en etanol del 95%, dos veces 30 minutos en etanol del 100%, 60 minutos en etanol del 100%, dos veces 30 minutos en tolueno, 60 minutos en tolueno del 100%, 2 horas en parafina a 55°C, 5 horas en parafina a 55°C, la muestra incluida en la parafina se congeló a continuación durante aproximadamente 2 semanas a -80°C. Posteriormente, el ARN y el ADN se purificaron retirando primero el tejido integrado del bloque de parafina con un bisturí, y a continuación lisis directa en 400 µl de tampón RLT con un mini kit RNeasy (Qiagen, Alemania) y el RIN se determinó utilizando un kit de ARN total RNA 6000 Nano (Agilent Bioanalyser 2100, EE.UU.).

- 60 Los resultados se muestran en la Figura 15. Se encontró que tanto para las muestras de hígado (Calles 1-4) como de riñón (Calles 5-8), la integridad del ARN fue significativamente mejor después del tratamiento con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida, ZnSO₄ y de tamices moleculares (Calles 1, 2, 5, 6) en comparación con PBS (Calles 3, 4, 7, 8). Como ejemplo, los valores de RIN se muestran en la Figura 14 y se encontró que disminuyeron de 7,5 a 2,4 al comparar Cloruro de colina:Trifluoroacetamida, ZnSO₄ y Tamices moleculares (Calle 1) con PBS (Calle 3) a 24°C, también se encontró que la calidad del ADN era significativamente mejor después del tratamiento con Cloruro de colina:trifluoroacetamida, ZnSO₄ y tamices moleculares.

22. Estabilización del ARN de células HeLa con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida, Sulfato de cinc y Tamices moleculares

Se realizó una comparación del efecto de estabilización del ARN de añadir varias Sales de cinc y Tamices moleculares a Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) en muestras biológicas almacenadas con o sin agua añadida. Se utilizó un sedimento recién centrifugado de un millón de células HeLa como fuente de ARN, y se añadieron 400 µl de Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) a cada sedimento, a continuación se añadió agua a una concentración final de 10 o 15% (vol:vol) en presencia o ausencia de Sulfato de cinc 33 mM y Tamices moleculares tipo 4A al 33% (peso:peso) como se indica en la tabla. Las muestras se almacenaron durante 18 horas a 37°C antes de la purificación del ARN utilizando columnas de centrifugado de sílice (Invitex, Alemania) y la determinación del Número de Integridad del ARN (RIN) utilizando un Agilent Bioanalyser 2100 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si bien la adición de agua al sedimento de células HeLa/Cloruro de colina:Trifluoroacetamida reduce notablemente la integridad del ARN, la adición de Sulfato de cinc o, más preferiblemente, Sulfato de cinc y Tamices moleculares de Tipo 4A puede reducir sustancialmente la cantidad de degradación del ARN cuando el agua está presente como se indica por un aumento en el número de RIN. Este es un medio particularmente útil para mejorar la calidad del analito de la muestra cuando están presentes cantidades sustanciales de agua (por ejemplo, más de 10% de concentración final en la solución estabilizadora), tal como con muestras de tejidos más grandes, sangre, suero, plasma o material vegetal. También se puede obtener alguna mejora con muestras que contengan menos de 10% de agua cuando sea necesario un almacenamiento prolongado de la muestra.

Se ha encontrado que el Sulfato de cinc a 1-33 mM, preferiblemente 10 mM (concentración final) es ligeramente más eficaz para reducir la degradación del ARN que el Cloruro de cinc o la Sal de cinc de EDTA, pero es significativamente más efectivo que el gluconato de cinc, el acetato de cinc o el p-Toluenosulfonato de cinc (Tabla 2).

Tabla 7. Puntuaciones de RIN para ARN extraído de gránulos de células HeLa.

	Mezcla de DES (mol:mol)	Aditivo	Puntuación RIN
1	Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	-	8,4
2	Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	agua al 10%	6,2
3	Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	agua al 10% + ZnSO ₄ 33 mM	7,3
4	Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	agua al 10%+ ZnSO ₄ 33 mM + Tamices moleculares al 33%	8,2
5	Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	agua al 15%	2,9
6	Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	agua al 15%+ ZnSO ₄ 33 mM	5,3

23. Estabilización del ARN de células HeLa con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida con aditivos orgánicos

Se realizó una comparación del efecto de estabilización del ARN de la adición de N-Etilpirrolidona o Tetrametilurea a Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) en muestras biológicas almacenadas con o sin agua añadida. Se usó un sedimento recién centrifugado de un millón de células HeLa como fuente de ARN, y se añadieron 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) a cada sedimento, en presencia o ausencia de N-Etilpirrolidona al 2,5, 5%, 10 % o 20% (vol:vol), tetrametilurea al 5% o 20% (vol:vol) como se indica en la tabla. Las muestras se almacenaron durante 20 días a 24°C antes de la purificación del ARN utilizando columnas de sílice (Mini Kit de ARN InviTrap Spin Universal Núm. de Cat. 1060100200 Stratec Molecular, Alemania) y la determinación del Número de Integridad del ARN (RIN) utilizando un Agilent Bioanalyser 2100 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se encontró que tanto la N-etilpirrolidona como la tetrametilurea mejoraron la calidad del ARN en el sedimento de células HeLa después de un almacenamiento prolongado en comparación con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida solo.

Tabla 8: Rendimientos de ARN y calidad con N-Etilpirrolidona y Tetrametilurea.

Mezcla DES	Aditivo	Rendimiento de ARN ng/ul	Calidad de ARN
Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	-	219	7
Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	N-etilpirrolidona al 2,5%	92	7
Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	N-etilpirrolidona al 5%	87	8

Mezcla DES	Aditivo	Rendimiento de ARN ng/ul	Calidad de ARN
Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	N-etilpirrolidona al 10%	54	9
Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	N-etilpirrolidona al 20%	139	9
Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	Tetrametilurea al 5%	194	8
Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2)	Tetrametilurea al 20%	211	7

La escala de calidad de ARN cualitativa es la siguiente; 0 (altamente degradado) a 10 (máxima calidad). El análisis de ARN en la Tabla 1 y 2 se llevó a cabo de la siguiente manera; electroforesis en gel de agarosa al 1% con 0,5x TAE, teñida con bromuro de etidio, seguida de un análisis visual de una fotografía tomada con luz ultravioleta, de la integridad de las bandas de ARNr 18S y 28S. Una muestra de ARN con una puntuación de calidad de ARN de 8 o más tiene una razón de tinción con bromuro de etidio de ARNr 18S a 28S de 1:2, mientras que una muestra de ARN con una puntuación de calidad de ARN de 5 tiene una razón de tinción de ARNr 18S a 28S de aproximadamente 1:1.

5

10 24. Uso de diversas sales de amonio cuaternario y donadores de enlaces de hidrógeno.

No se pudo preparar un líquido DES a temperatura ambiente (24°C) mezclando Cloruro de colina con cualquiera de Prolina, Oxamida, Pivalamida, 1-Etil-2-pirrol, 4-Formilmorfolina, Acetonil acetona, Carbonato de etileno, Tetrametilurea, N -Etilimidazol, 1-Bencilimidazol y/o 1,3-Dimetil-2-imidazolidona, a una razón 1:2 mol:mol. Las siguientes sales de amonio tampoco fueron capaces de formar líquidos DES a temperatura ambiente; Fosfato de amonio y Acetato de amonio. Tanto el sulfato de amonio como el Cloruro de amonio podrían formar parcialmente, a 100°C pero no a 24°C, un líquido a una razón mol:mol de 1:2 con Isotiocianato de guanidina, Sorbitol y/o Xilitol.

15

Tabla 9: Mezclas de dos componentes que utilizan una variedad de sales de amonio cuaternario.

	Componente 1	Componente 2	Razón (mol:mol)	Líquido a 100°C	Líquido a 24°C
1	Bromuro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	Parcial
2	Cloruro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	Sí
3	Yoduro de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	No
4	Dihidrogenocitrato de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	No
5	Bitartrato de colina	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	No
6	Betaína	Trifluoroacetamida	1:2	Sí	Sí
7	Sulfato de amonio	Trifluoroacetamida	1:2	No	No
8	Sulfato de amonio	Isotiocianato de guanidina	2:1	No	No
9	Sulfato de amonio	Isotiocianato de guanidina	1:2	Parcial	No
10	Sulfato de amonio	Xilitol	1:2	Parcial	No
11	Sulfato de amonio	Sorbitol	1:2	Parcial	No
12	Cloruro de amonio	Isotiocianato de guanidina	1:2	Parcial	No
13	Cloruro de amonio	Xilitol	1:2	Sí	No
14	Cloruro de amonio	Sorbitol	1:2	Sí	No
15	Sulfato de amonio	Trifluoroacetamida	1:2	No	No

20 25. Estabilización del ARN en embriones de *Drosophila melanogaster*

Se mezclaron 10 mg de embriones de *D. melanogaster* (0-24 horas) con 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) (Calles 1-3) o RNAlater (Calles 4-6) y se incubaron a 37°C durante cualquiera de 12 horas (Calles 1, 4), 2 días (Calles 2, 5) o 45 días (Calles 3, 6) antes de la purificación del ARN (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Qiagen, Alemania). La calidad del ARN se muestra en la Figura 16, el ARN estabilizado con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida fue significativamente mejor que el del RNAlater.

25

26. Estabilización del ARN en brotes de hojas de *Allium cepa*.

Se mezclaron 10 mg de brotes de hojas de *A. cepa* con 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) (Calles 1-3) o RNAlater (Qiagen, Alemania) (Calles 4-6) y se incubaron a 22°C durante 18 horas (Calles 1, 4), 3 días (Calles 2, 5) o 9 días (Calles 3, 6) antes de la purificación del ARN (RNeasy Mini Kit, Núm. de Cat. 74106, Alemania). La calidad del ARN se muestra en la Figura 17, el ARN estabilizado con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida fue significativamente mejor que el del RNAlater.

27. Aplicaciones de hibridación *in situ* tras la estabilización con DES.

Las muestras de tejido se prepararon y se embebieron en parafina como se indica en el Ejemplo 21 utilizando Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) y ZnSO₄ 10 mM con un tiempo de fijación de 1-24 horas a 4°C. Las muestras de tejido se procesaron después de la siguiente manera; 60 min en etanol del 70%, 60 min en etanol del 80%, 60 min en etanol del 95%, dos veces 30 min en etanol del 100%, 60 min en etanol del 100%, dos veces 30 min en tolueno, 60 min en tolueno del 100%, 2 horas en parafina a 55°C y a continuación 5 horas en parafina a 55°C. Después de la preparación en microtomo de las secciones de tejido en parafina (3-12 µm de espesor), la parafina se eliminó utilizando xileno durante 10 minutos a temperatura ambiente, las secciones de tejido se hidrataron a continuación incubando en etanol del 100%, etanol del 70%, etanol del 50%, etanol del 25% y a continuación agua durante 5 minutos cada uno. A continuación, las secciones de tejido se pueden tratar con proteinasa K (10 µg/ml) durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de enjuagar con PBS y pre-hibridar en 1 ml de tampón que contiene 500 µl de formamida ultrapura al 50%, 250 µl de 20xSSC, 50 µl de 10 µg/µl de ARNt de levadura y 20 µl de 50x de solución de Denhardt y a continuación hibridar con una sonda cromogénica o fluorescente apropiada. Los protocolos para hibridación *in situ* son bien conocidos y descritos por J. M. Bridger y K. Morris (2010), en Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH): Protocols and Applications (Methods in Molecular Biology) and Summersgill et al., (2007) Nature Protoc. 3:220-234.

28. Preparación de células para citometría de flujo.

Aproximadamente 500.000 células de cultivo tisular tales como HeLa, MCF-7, NCI60, PC3, Vero, GH3, MC3T3, ZF4 o IMR-90, si crecen en una superficie sólida, se tripsinizaron ligeramente en primer lugar para separarlas, se mezclaron con 10 ml de EMEM/FBS al 10% y se centrifugaron en un tubo de 15 ml durante 10 minutos a 900 xg (24°C). El sedimento celular se resuspendió a continuación en 100 µl de tampón DPBS y se mezcló inmediatamente con 1 ml de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) y se pipeteó suavemente con una pipeta de 10 ml para mezclar completamente. Se dejó que las células se fijaran durante 1-24 horas a 4°C o 24°C, a continuación se añadieron 14 ml de DPBS, el contenido del tubo se mezcló mediante inversión suave y se centrifugó durante 10 minutos a 900xg y el sedimento celular se resuspendió suavemente en 100 µl de DPBS y los núcleos se tiñeron añadiendo 1 ml de DAPI (3 µM) en tampón de tinción (Tris 100 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM), MgCl₂ 0,5 mM, Nonidet P-40 al 0,1%) durante 15 minutos (24°C). Las células teñidas y fijadas se pueden utilizar para citometría de flujo. Se encontró que las células fijadas con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida eran monodispersadas y podían clasificarse en las distintas etapas del ciclo celular de acuerdo con su fluorescencia.

29. Tratamiento en dos etapas de muestras biológicas

Se añadieron fragmentos de 10 mg de tejido de ratón a 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) que contenía ZnSO₄ 10 mM y tamicos moleculares 4A (3% (peso:peso) se incubaron a 24°C durante 1 hora, a continuación se retiró el tejido, se frotó brevemente con una toalla de papel para eliminar el exceso de estabilizante antes de la inmersión subsiguiente en, por ejemplo, 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol), Cloruro de colina:Urea (1:2 mol:mol), Cloruro de colina:Sorbitol (1:2 mol:mol), Cloruro de betaína:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) o paraformaldehído al 4% y a continuación se incubó y almacenó durante al menos una hora, pero preferiblemente durante la noche. Alternativamente, una cualquiera de una serie de mezclas de DES según lo establecido en esta solicitud puede servir como la primera solución de estabilización o fijación seguida de una segunda solución de estabilización o fijación. Como un ejemplo más, la fijación de tejido puede realizarse primero con, por ejemplo, paraformaldehído al 4% durante una hora a temperatura ambiente y a continuación transferir el tejido a 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) que contiene tanto ZnSO₄ 10 mM como tamicos moleculares 4A (3% (peso:peso)). Este procedimiento de dos etapas proporciona un medio por el cual, por ejemplo, el estabilizador óptimo para la morfología celular puede combinarse posteriormente con el estabilizador óptimo para ARN, ADN y proteínas. También proporciona un medio por el cual el contenido de agua que se origina en la muestra biológica puede reducirse cambiando la mezcla estabilizadora original. Será evidente para un experto en la técnica que existen muchas combinaciones de la primera y la segunda mezclas y que las opciones más apropiadas tendrán que determinarse, al menos en parte, por medios empíricos, tales como la calidad de las secciones de tejido teñidas con H y E y la calidad del ARN. También se debe tener en cuenta que las mezclas de estabilización y fijación utilizadas pueden ser líquidas o sólidas.

30. Compatibilidad de las mezclas de DES con guanidina y reactivos de purificación de fenol.

Ventajosamente, el Cloruro de colina:trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) es completamente soluble y compatible tanto

con tiocianato de guanidina como con el virus basado en HCl, tampones de lisis celular y tisular tales como los que se encuentran en estos kits de purificación de ARN; RNeasy Mini, (Qiagen, Alemania), PureLink™ (Life Technologies, EE.UU.), MagNA Pure LC ARN Isolation Kit III, High Pure ARN Tissue Kit y ARN Micro Amplicor HCV (Roche Applied Science, EE.UU.), NucleoSpin® Multi-8 Virus RAV (Macherey Nagel, Alemania), TEMPUS™ Blood ARN Tube (Applied Biosystems, EE.UU.), SV ARN Kit y PureYield™ Kit (Promega, EE.UU.), ToTALLY ARN™ (Ambion, EE.UU.), GenElute™ Mammalian Total RNA Purification (Sigma-Aldrich, EE.UU.), PAXgene™ Blood ARN Kit (PreAnalytix, Alemania) y reactivos de purificación a base de fenol tales como TRIzol (Life Technologies, EE.UU.) que permiten que muestras estabilizadas con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) se mezclen directamente con guanidina o reactivos de purificación de fenol sin necesidad de separar la muestra del Cloruro de colina:Trifluoroacetamida. Esto puede ser ventajoso cuando, por ejemplo, no es práctico separar una muestra de tejido en la que se ha introducido el fijador, o cuando células individuales tales como las células de cultivo de tejidos, la sangre o las CTC se mezclan con un volumen mucho mayor de fijador y pueden ser difíciles o imposibles de separar por centrifugación. Como punto de referencia, las células de mamíferos en RNAlater (Qiagen, Alemania) no se pueden sedimentar mediante centrifugación o el ARN purificado mezclando la célula más RNAlater con los tampones de lisis de guanidina, ya que los rendimientos de ARN disminuyen drásticamente.

Como ejemplo, se ha encontrado que el ARN que contiene muestras que contienen tan poco como 6% (Muestra 5, Tabla 10) o menos de Tampón RLT en Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol), puede, al mezclarse con un volumen de etanol del 70% ser utilizado para unir eficazmente el ARN a una membrana de columna de centrifugado de sílice (RNeasy mini, Qiagen, Alemania) con excelente rendimiento y pureza como se muestra en la Tabla 10. Se preparó un producto lisado de hígado de ratón lisado 100 mg de hígado en 1 ml del tampón RLT, a continuación se añadieron porciones de 20 µl del producto lisado al tampón RLT y a continuación el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida, antes de mezclar con etanol del 70% como se muestra en la Tabla 10 y unir a una columna RNeasy Mini Spin. El ARN se purificó a continuación de acuerdo con las instrucciones del fabricante (RNeasy mini, Qiagen, Alemania) con un volumen de elución de 50 µl de agua. Los rendimientos de ARN y la pureza se determinaron utilizando un Nanodrop ND-1000. Se descubrió sorprendentemente que el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida no solo permitía que la actividad caotrópica de la guanidina funcionara para lisar la muestra, sino que no tenía efecto en la unión del ARN a la membrana de la columna de sílice, por lo que los rendimientos no se vieron afectados o aumentaron ligeramente.

Además, el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida puede reemplazar la función esencial de unión al ARN del etanol del 70% cuando se añade al producto lisado de guanidina (20 µl), el protocolo convencional del fabricante (RNeasy Mini, Qiagen, Alemania), y como se muestra en la Tabla 11, requiere adición de un volumen de etanol del 70% a producto lisado para permitir que el ARN se una a la membrana de sílice. Sin embargo, si no se añade etanol del 70%, el ARN no se puede unir a la membrana de sílice, y si la muestra contiene Cloruro de colina:trifluoroacetamida, el ARN puede unirse incluso en ausencia de etanol, esto proporciona un medio para reducir el número de etapas y mejorar el procedimiento de purificación de ARN, por ejemplo, el kit RNeasy sin la necesidad de utilizar líquidos inflamables. Cabe señalar que ni el Cloruro de colina ni el Cloruro de colina:Urea disuelto en el tampón RLT (1:1 peso:peso) tienen esta propiedad, mientras que la Trifluoroacetamida sola disuelta en tampón RLT (1:1 peso:peso) condujo a solo 15% de rendimiento de ARN en comparación con el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida disuelto en tampón RLT (1:1 peso:peso). También se descubrió que una mezcla 1:1 de Tampón RLT: (Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) tenía muy buena actividad de lisis de células HeLa y se podía utilizar como tampón de lisis y unión a la membrana de sílice independiente, en ausencia de etanol del 70%, los rendimientos de ARN con esta nueva mezcla fueron significativamente mejores que con el Tampón RLT solo.

Sorprendentemente, se encontró que un producto lisado de células HeLa preparado en 200 µl de una mezcla 1:1 de Tampón RLT: (Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol), cuando se calienta a 65°C durante 10 minutos, seguido de la adición de 1 volumen de etanol al 70% y unión a una columna de sílice (RNeasy Mini, Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante dieron como resultado la purificación exclusiva del ARN pequeño (miARN, ARNt y ARNr 5S). Si se omitió la etapa de calentamiento, ARN total se purificó incluyendo las especies de ARNr 18 y 28S. Por lo tanto, el calentamiento ofrece un método novedoso para purificar selectivamente el ARN pequeño de un producto lisado celular. Reemplazando la trifluoroacetamida por urea en la mezcla de lisis y a continuación el calentando se produjo una degradación extrema del ARN, igual que calentando el producto lisado en ausencia de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida.

Tabla 10. Rendimientos de ARN de mezclas de guanidina/cloruro de colina:trifluoroacetamida.

	Volumen RLT (guanidina)	Volumen de cloruro de colina:trifluoroacetamida	Volumen 70% de etanol	OD 260/280nm	Rendimiento de ARN ng/ul
1*	350 µl	0 µl	350 µl	2,05	171
2	150 µl	170 µl	350 µl	2,25	192
3	100 µl	220 µl	350 µl	2,22	203

	Volumen RLT (guanidina)	Volumen de cloruro de colina:trifluoroacetamida	Volumen 70% de etanol	OD 260/280nm	Rendimiento de ARN ng/ul
4	50 µl	70 270 µl	350 µl	2,2	198
5	0 µl	330 µl	350 µl	1,53	200
6	170 µl	170 µl	0 µl	2,21	52

* Ejemplo comparativo.

Tabla 11. Rendimientos de ARN de mezclas de Guanidina/Cloruro de colina:Trifluoroacetamida en ausencia de etanol para la unión.

	Volumen RLT (guanidina)	Volumen y Tipo de DES	Volumen de Etanol del 70%	DO 260/280 nm	Rendimiento de ARN ng/ul
1*	330 µl	0 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida	0 µl	1,98	3
2	230l	90 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida	0 µl	1,84	6,5
3	150 µl	170 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida	0 µl	2,04	143
4	100 µl	220 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida	0 µl	2,04	132
5	50 µl	270 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida	0 µl	2,05	192
6	0 µl	330 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida	0 µl	2,03	247
7	150 µl	170 µl Cloruro de colina:Urea	0 µl	2,14	9

* Ejemplo comparativo.

31. Estabilización del ARN Total en bacterias

5 Se añadieron 300 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) a un sedimento de 10 mg de *Escherichia coli* DH5α y se incubó a 22°C durante 18 horas, a continuación se eliminó el líquido DES y se añadieron 400 µl de Tampón RLT al sedimento, o se añadieron 400 µl de Tampón RLT directamente al sedimento y al líquido DES, el tubo se sometió a agitación vorticial durante 20 segundos, a continuación se sometió sonicación brevemente para romper las células y se continuó con la purificación del ARN utilizando un kit RNeasy Mini de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Alemania). Se encontró que la integridad del ARNr 16 y 23S no se modificó en comparación con el ARN extraído de un sedimento bacteriano fresco. Alternativamente, se puede añadir ZnSO₄ al Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) para proporcionar una concentración final de 1-33 mM, preferiblemente 33 mM y 10% (peso:peso) También se pueden añadir tamices moleculares opcionalmente para mejorar la estabilización.

32. Mezclas de DES multicomponente

20 Se ha encontrado que se puede preparar simplemente una mezcla de DES estabilizadora de ARN mezclando más de dos componentes juntos tales como Betaína:Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (0,5:0,5:2 mol:mol:mol) en lugar de Betaína:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) o Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol). Alternativamente, se pueden preparar nuevas mezclas de DES, por ejemplo, Cloruro de colina:Urea:Trifluoroacetamida (1:1:1 mol:mol:mol) o Betaína:Urea:Trifluoroacetamida (1:1:1 mol:mol:mol) o incluso Betaína:Cloruro de colina:Urea:Trifluoroacetamida (0,5:0,5:1:1 mol:mol:mol:mol). Dichas mezclas de DES de tres o más componentes pueden tener propiedades novedosas interesantes, tales como viscosidad reducida, vida útil mejorada, estabilidad mejorada del ácido nucleico o propiedades de fijación celular basadas en las interacciones y propiedades de todos los componentes juntos en una sola mezcla de DES.

30 Como ejemplo, a un sedimento de HeLa (500,000 células) se le añadieron 400 mg de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol), Betaína:Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (0,5:0,5:2 mol:mol:mol) o Betaína:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol), conteniendo cada una ZnSO₄ 10 mM y se incubó durante la noche a 37°C seguida de purificación de ARN y ADN utilizando un kit RNeasy Mini (Qiagen, Alemania) y determinación del RIN

(Agilent Bioanalyser 2100, EE.UU.).

Resultará evidente para un experto en la técnica que son posibles muchas de estas mezclas de DES, con componentes variables y concentraciones molares, y la mezcla más apropiada para la aplicación deberá determinarse empíricamente.

Tabla 12. Comparación de ARN, rendimientos de ADN y número de integridad del ARN (RIN) de tres mezclas diferentes de DES en células HeLa incubadas durante la noche a 37°C.

	Mezcla DES (incluyendo ZnSO4 10 mM)	ARN ng/ul	ADN ng/ul	RIN
1	Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol),	251	36	9,3
2	Betaína:Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (0,5:0,5:2 mol:mol:mol)	229	42	9,5
3	Betaína:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol)	182	30	9,4

33. Mezclas acuosas de DES para la fijación celular

Se ha encontrado que las diluciones acuosas de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) son capaces de fijar células de tejido tisular y tejidos. Se añadió medio de cultivo tisular DMEM (Life Technologies, Francia) a una solución de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida para proporcionar una concentración final de DMEM de 0, 6, 12, 21 o 50%, a continuación se añadieron porciones de 400 µl de la mezcla a las células del cultivo de tejidos HeLa en una placa de 24 pocillos y se observaron con un microscopio. Se descubrió que, si bien todas las mezclas podían reparar las células sin efectos hipo- o hipertónicos sobre las células, el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida que contenía DMEM al 6% condujo a una morfología celular de la mejor calidad, superior incluso al Cloruro de colina:Trifluoroacetamida puro. Cabe señalar que las diluciones de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida con más de 15% de agua pueden hacer que la membrana celular forme microgotas y a continuación se pierda de la célula, cuyo citoplasma permanece intacto. Las diluciones acuosas de un DES proporcionan un medio simple para reducir la viscosidad y el coste, así como para mejorar potencialmente las propiedades de fijación celular, sin embargo, la presencia de agua tiene un efecto perjudicial sobre la estabilidad del ARN. Será evidente para un experto en la técnica que se puede mezclar una gran cantidad de diferentes soluciones acuosas como agua, PBS, DPBS, soluciones de azúcar o DMEM con diferentes DES y que el efecto sobre la fijación celular y la estabilidad de la biomolécula puede tener que ser comprobado empíricamente

34. Actividad antibacteriana de las mezclas de DES (ejemplo de referencia)

Los sedimentos de 1×10^9 células de E. coli DH5a se trataron con 90 µl de una dilución acuosa de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) para proporcionar una concentración final de 90%, 9% o 0,9%, durante 25 minutos a temperatura ambiente y a continuación se colocaron en una placa de agar y se incubaron durante la noche a 37°C para permitir el crecimiento de la colonia. Se encontró que el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida al 90%, pero no las diluciones al 9% o al 0,9%, detuvo todo el crecimiento bacteriano y la formación de colonias. Parece que el Cloruro de colina:Trifluoroacetamida, por lo tanto, tiene una poderosa actividad antibacteriana, y será evidente para un experto en la técnica que períodos de tratamiento más largos o diferentes mezclas de DES pueden conducir a un anti-efecto aún más fuerte. Ventajosamente, se esperaría que el crecimiento bacteriano se inhibiera en muestras de tejido almacenadas en Cloruro de colina:Trifluoroacetamida deteniendo el deterioro.

35. Preparación *in situ* de un líquido DES

Si bien generalmente es conveniente preparar una mezcla de DES antes de su uso para la fijación y la estabilización, una alternativa es añadir los dos o más componentes del DES juntos como sólidos y al mismo tiempo que la muestra. Por ejemplo, en un solo tubo, se añadieron 1,28 g de sólido de Cloruro de colina a 2 g de sólido de Trifluoroacetamida y a continuación se añadieron 50-100 µl de sangre completa o 25 mg de muestra de tejido y se dejó que los sólidos se mezclaran libremente y formaran una mezcla eutéctica (1:2 mol:mol) en presencia de la muestra biológica. Alternativamente, los dos sólidos se pueden añadir como dos capas precargadas en un recipiente adecuado, tal como un tubo de recolección de sangre, pero separados por una membrana que se rompe o se disuelve en contacto con la muestra, lo que permite que los componentes se mezclen y formen el líquido DES solo en presencia de la muestra. Otra posibilidad es tener dos compartimientos abiertos en un recipiente superior adecuadamente cerrado, cada uno de los cuales se precarga con una cantidad apropiada de, por ejemplo, Cloruro de colina y el otro Trifluoroacetamida. Al agitar o invertir, los dos componentes pueden mezclarse libremente y formar un líquido DES, si fuera necesario en presencia de la muestra.

36. Estabilización del ARN con células de cultivo de tejidos adherentes

Se cultivaron células de Fibroblastos Embrionarios Humanos (HEF) hasta 80% de confluencia (aproximadamente

5 200.000 células) en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos, se retiró el medio de crecimiento y se reemplazó por 400 µl de Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol) o RNAlater y se incubó a 37°C durante 0, 32 horas o 9 días antes de la purificación de ARN y el análisis de RIN (Agilent Bioanalyser). La Tabla 13 muestra que el ARN celular de cultivo de tejido adherente se puede conservar extremadamente bien utilizando Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol).

Tabla 13. Puntuaciones RIN para el ARN extraído de células adherentes de Fibroblastos Embrionarios Humanos (HEF) almacenadas a 37°C.

	Tratamiento	Hora	RIN
1	Control	0	9,1
2	Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol)	32 horas	9,1
3	Cloruro de colina:Trifluoroacetamida (1:2 mol:mol)	9 días	8
4	Control	0	8,8
5	RNAlater®	32 horas	9,4
6	RNAlater®	9 días	7,6

REIVINDICACIONES

1. Uso de un disolvente eutéctico profundo para inhibir la degradación de una biomolécula, en donde la biomolécula se selecciona entre un ARN y un ADN, opcionalmente en donde la biomolécula está presente en una muestra o tejido, opcionalmente en donde la muestra o tejido comprende un tejido sólido, plasma, suero o sangre completa, adicionalmente de manera opcional en donde la sangre completa incluye una célula tumoral circulante.

2. El uso de un disolvente eutéctico profundo como fijador de un virus, célula o tejido para producir un virus, célula o tejido fijado, opcionalmente:

(a) en donde el tejido es sangre completa, opcionalmente en donde la sangre completa incluye una célula tumoral circulante, o un tejido sólido; y/o

(b) que comprende adicionalmente procesar la célula o tejido fijados, cuyo procesamiento comprende uno o más métodos seleccionados entre inclusión, corte, tinción, microscopía, hibridación *in situ*, citometría de flujo, un método inmunohistoquímico y un método inmunocitoquímico.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:

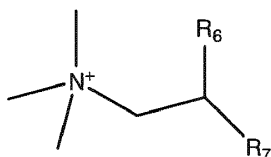
(a) el disolvente eutéctico profundo es un disolvente eutéctico profundo de tipo III o tipo IV, en donde el ARN extraído de 10 mg de una muestra de hígado de rata incubada a 24°C durante 20 días con 400 mg del disolvente eutéctico profundo tiene un número de integridad den ARN de al menos 4,0 según lo medido con un Agilent Bioanalyser 2100; y/o

(b) al menos 75% de las células HeLa cultivadas sobre un sustrato e incubadas a 24°C durante 1 hora con el disolvente eutéctico profundo permanecen adheridas al sustrato después de reemplazar el disolvente eutéctico profundo con agua e incubar a 24°C durante 1 hora; y/o

(c) el disolvente eutéctico profundo es un disolvente eutéctico profundo de tipo III, y en donde el disolvente eutéctico profundo comprende un compuesto que comprende un grupo trifluorometilo; y/o

(d) el disolvente eutéctico profundo tiene un pH en el intervalo de 5 a 7,5, en donde opcionalmente el disolvente eutéctico profundo tiene un pH en el intervalo de 6 a 7.

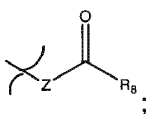
4. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente es un compuesto de Fórmula I:



en donde:

R₆ es H u OH;

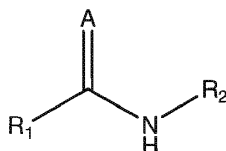
R₇ se selecciona entre H, CH₃, Cl, Br, un oxígeno carbonílico, y



Z se selecciona entre -CH₂-, O y S;

R₈ es R₁₁ o OH; y

en donde el segundo componente comprende un compuesto de Fórmula II o una sal del mismo:



en donde:

A se selecciona entre O, S y NH;

R₁ se selecciona entre H, un grupo alqueno que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, R_g, -NH₂, -NH-(CH₂)_nCH₃ y -C(R₃)(R₄)(R₅);

en donde n es 0 o un número entero de 1 a 5;

R₂ se selecciona entre H y un grupo alquilo lineal que tiene 1 a 3 átomos de carbono;

R₃ es un anillo aromático o alifático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es R₁₀;

5 R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o F; y

en donde R₉, R₁₀ y R₁₁ cada uno se selecciona independientemente entre grupos alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, grupos monocloroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, y grupos mono-, di- o trifluoroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono.

10

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:

(a) R₁ se selecciona entre H, -CH=CH₂, R₉, -NH₂, -NHCH₃ y -C(R₃)(R₄)(R₅);

R₂ se selecciona entre H y -CH₃;

15

R₃ es un anillo aromático o alifático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es R₁₀;

R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o F; y

en donde cada uno de R₉, R₁₀ y R₁₁ se selecciona independientemente entre grupos alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, grupos monocloroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono y grupos

20

mono-, di- o tri-fluoroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono; y/o

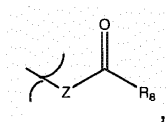
(b) en donde A es O o S o en donde A es NH; y/o

(c) en donde R₂ es H; y/o

(d) en donde R₁ se selecciona entre -NH₂ y -NHCH₃; y/o

25

(e) en donde R₇ es H o en donde R₇ es



opcionalmente:

30

(i) en donde Z es O o S y/o

(ii) en donde R₈ es R_n, opcionalmente en donde R₁₁ tiene un átomo de carbono o tres átomos de carbono; o (iii) en donde Z es CH₂, opcionalmente en donde R₈ es OH; y/o

35

(f) en donde el primer componente comprende adicionalmente un contraión, cuyo contraión es un anión haluro, opcionalmente en donde el anión haluro se selecciona entre cloruro, bromuro y yoduro, adicionalmente de manera opcional en donde el anión haluro es cloruro; y/o

(g) en donde la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente está en el intervalo 1:3 a 2:1, 1:1,5 a 1:2,5, o 1:2.

40

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde R₁ se selecciona entre H, R₉, -CH=CH₂ y C(R₃)(R₄)(R₅), opcionalmente:

(a) en donde R₁ es R₉, además opcionalmente

45

(i) en donde R₉ tiene un átomo de carbono, opcionalmente en donde R₉ es un grupo mono-, di- o trifluorometilo; o

(ii) en donde R₉ tiene dos átomos de carbono, opcionalmente en donde R₉ es un grupo mono-, di- o trifluoroetilo; o

50

(b) en donde R₁ es C(R₃)(R₄)(R₅), adicionalmente de manera opcional

(i) en donde R₄ y R₅ son F y/o

(ii) en donde R₃ es un anillo aromático de 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde R₃ es un grupo fenilo opcionalmente sustituido, adicionalmente de manera opcional, en donde el sustituyente está en la posición 2 del grupo fenilo y/o en donde el sustituyente es un grupo mono-, di- o trifluorometilo.

55

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el segundo componente se selecciona entre acetamida, 2-cloroacetamida, trifluoroacetamida, trifluorotioacetamida, N-metiltrifluoroacetamida, 2,2-difluoropropanamida, 3,3,3-trifluoropropanamida, formamida, acrilamida, 2,2-difluoro-2-fenilacetamida, 2-(trifluorometil)fenilacetamida, urea, tiourea, 1,3-dimetilurea y guanidina, opcionalmente en donde la guanidina está presente en forma de una sal hidroisotiocianato.

60

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el primer componente comprende colina, bromocolina, acetilcolina, acetiltiocolina o butirilcolina, o en donde el primer componente es carnitina.

9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde:

(a) el primer componente es N,N,N-trimetilglicina y opcionalmente, en donde el segundo componente se selecciona entre trifluoroacetamida y urea; o

(b) en donde el primer componente es cloruro de colina, opcionalmente en donde el segundo componente se selecciona entre trifluorotioacetamida; 3,3,3-trifluoropropanamida; 2,2-difluoro-2-fenilacetamida; tiourea y urea, y adicionalmente de manera opcional en donde el segundo componente es trifluorotioacetamida.

10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde:

(I) el primer componente es una sal haluro de colina; y en donde el segundo componente es un imidazol opcionalmente sustituido, en donde el o cada sustituyente es un grupo alquilo que tiene 1 a 3 átomos de carbono, y opcionalmente en donde:

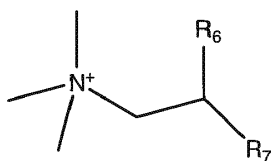
(a) la sal haluro de la colina es cloruro de colina; y/o

(b) el imidazol no está sustituido o en donde el imidazol es un metilimidazol, opcionalmente N-metilimidazol o 4-metilimidazol; y/o

(c) en donde la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente está en el intervalo de 2,8:1 a 2:1;

o

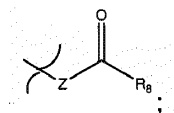
(II) en donde el primer componente comprende un compuesto de Fórmula III:



en donde:

R₆ es H u OH;

R₇ se selecciona entre H, CH₃, Cl, Br, un oxígeno carbonílico, y



Z se selecciona entre -CH₂-, O y S;

en donde R₈ se selecciona entre OH, un grupo alquilo que tiene de uno a tres átomos de carbono, un grupo monocloroalquilo que tiene de uno a tres átomos de carbono, y un grupo mono-, di- o trifluoroalquilo que tiene de uno a tres átomos de carbono; y

en donde el segundo componente es un azúcar o un alcohol de azúcar que tiene al menos 3 átomos de carbono, y opcionalmente en donde:

(a) el alcohol de azúcar se selecciona entre glicerol, xilitol y sorbitol, opcionalmente en donde el alcohol de azúcar es sorbitol; o

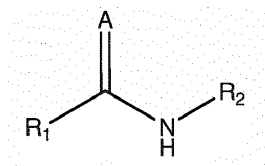
(b) el azúcar es trehalosa; y/o

(c) el primer componente comprende colina, en donde opcionalmente el primer componente es cloruro de colina; y/o

(d) la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente está en el intervalo de 1:2 a 2:1, opcionalmente, en donde la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente está en el intervalo de 1:0,8 a 1:1,2;

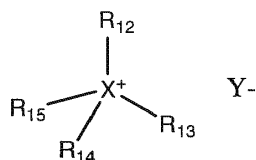
o

(III) en donde el primer componente es un haluro de cinc (II) o haluro de circonio (IV), y en donde el segundo componente es un compuesto de Fórmula IV:



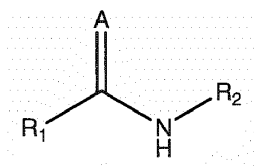
en donde:

- 5 A se selecciona entre O, S y NH;
- R₁ se selecciona entre H, un grupo alqueno que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, R₉, -NH₂, -NH-(CH₂)_nCH₃ y -C(R₃)(R₄)(R₅);
 en donde n es 0 o un número entero de 1 a 5;
- 10 R₂ se selecciona entre H y un grupo alquilo lineal que tiene 1 a 3 átomos de carbono;
 R₃ es un anillo aromático o alifático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es R₁₀;
 R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o F; y
- 15 en donde R₉ se selecciona entre grupos alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, grupos monocloroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, y grupos mono-, di- o tri-fluoroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, opcionalmente en donde
- 20 (a) el primer componente se selecciona entre urea, ZnCl₂, y ZrCl₄ y/o
 (b) la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente está en el intervalo de 1:3 a 1:4;
- o
- 25 (IV) en donde el primer componente comprende colina y en donde:
- (a) el segundo componente es un alcanodiol que tiene de 5 a 7 átomos de carbono, opcionalmente en donde el alcanodiol es hexanodiol; o
- 30 (b) el segundo componente comprende una N-alquilpirrolidona, en donde el grupo N-alquilo tiene de 1 a 5 átomos de carbono, opcionalmente en donde la N-alquilpirrolidona es N-metilpirrolidona; o
- (c) el segundo componente comprende beta-mercaptoetanol; o (d) el segundo componente comprende diotritol;
- o
- 35 (V) en donde el primer componente es cloruro de colina, opcionalmente
- (a) en donde el segundo componente es urea y/o en donde la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente está en el intervalo de 0,8:2 a 1,2:2.
- 40 11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el disolvente eutéctico profundo comprende un primer componente y un segundo componente, en donde el primer componente es un compuesto de Fórmula V:



en donde:

- Y⁻ es Cl⁻ o Br⁻, opcionalmente en donde Y⁻ es Cl⁻;
- X es N o P;
- 50 R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son cada uno independientemente un grupo alquilo lineal que tiene 1 a 16 átomos de carbono, un grupo alcohol lineal que tiene 1 a 16 átomos de carbono, un grupo bencilo o un grupo fenilo;
- en donde el segundo componente es un compuesto de Fórmula I o una sal del mismo:



en donde:

- 5 A se selecciona entre O, S y NH;
 R₁ se selecciona entre H, -CH=CH₂, R₉, -NH₂, -NHCH₃ y -C(R₃)(R₄)(R₅);
 R₂ se selecciona entre H y -CH₃;
 R₃ es un anillo aromático o alifático de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, en donde el sustituyente es R₁₀; y
 R₄ y R₅ son cada uno independientemente H o F;

10 en donde cada uno de R₉ y R₁₀ se selecciona independientemente entre grupos alquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, grupos monocloroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, y grupos mono-, di- o tri-fluoroalquilo que tienen de uno a tres átomos de carbono, opcionalmente

- 15 (i) en donde A es O o S y/o
 (ii) en donde R₁ se selecciona entre -NH₂ y -NHCH₃; y/o
 (iii) en donde la razón molar del primer componente con respecto al segundo componente es de 1:1,5 a 1:2,5, opcionalmente de 1:1,8 a 1:2,2.

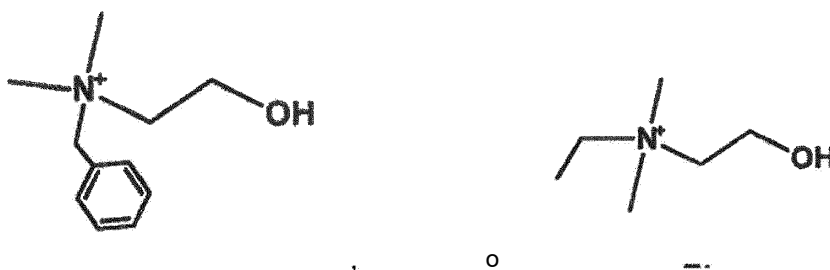
20 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde:

- 25 (a) el compuesto de Fórmula V es una sal de amonio cuaternario, opcionalmente en donde cada uno de R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ se selecciona independientemente entre grupos alquilo lineales que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, adicionalmente de manera opcional

- (i) en donde R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son cada uno grupos metilo o
 (ii) en donde R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son cada uno grupos etilo o
 (iii) en donde R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ son cada uno grupos butilo;

- 30 o
 (b) el primer componente se selecciona entre cloruro de tetrametilamonio, cloruro de tetraetilamonio, cloruro de tetrabutilamonio, bromuro de tetrabutilamonio, bromuro de metiltrifenilfosfonio, urea, trifluoroacetamida y trifluoroacetamida;

- 35 o
 (c) en donde el primer componente comprende:



- 40 o metiltrifenilfosfonio;
 o
 (d) en donde X es P, opcionalmente en donde al menos uno de R₁₂, R₁₃, R₁₄ y R₁₅ es un grupo fenilo.

13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en donde el disolvente eutéctico profundo comprende adicionalmente 1-bencilimidazol;
 45 y/o en donde el disolvente eutéctico profundo comprende adicionalmente tetrametilurea;
 y/o en donde el disolvente eutéctico profundo comprende agua en una cantidad de hasta 50% en peso del disolvente eutéctico profundo, opcionalmente en donde el disolvente eutéctico profundo comprende agua en una cantidad en el intervalo de 5% a 10% en peso del disolvente eutéctico profundo;
 50 y/o en donde el disolvente eutéctico profundo comprende adicionalmente al menos un aditivo seleccionado entre un colorante, un tinte, un detergente, una sal de amonio cuaternario, una saponina, un antimicrobiano, un desecante,

una sonda, un control interno, un antioxidante, un inhibidor de ribonucleasa, un tampón, un quelante, un gas disuelto, un alcohol y un precipitante de proteínas; opcionalmente

5 (a) en donde el al menos un aditivo se selecciona entre sulfato de cinc, cloruro de cinc, sal de cinc de EDTA, sulfato de amonio, tosilato de amonio y sorbitol, adicionalmente de manera opcional

(i) en donde el al menos un aditivo es sulfato de cinc y/o

10 (ii) en donde el disolvente eutéctico profundo comprende adicionalmente sorbitol en una cantidad en el intervalo de 2,5% a 12,5% en peso del disolvente eutéctico profundo y/o

(iii) en donde el disolvente eutéctico profundo comprende adicionalmente gel de sílice en una cantidad en el intervalo de 40% a 60% en volumen; y/o

15 (b) en donde el al menos un aditivo está presente en el disolvente eutéctico profundo en una cantidad en el intervalo de 0,01% a 1% en peso del disolvente eutéctico profundo, opcionalmente en donde el al menos un aditivo está presente en una cantidad en el intervalo de 0,01% a 0,2% en peso del disolvente eutéctico profundo; o en donde el al menos un aditivo está presente en el disolvente eutéctico profundo en una cantidad en el intervalo de 0,5% a 1,5% en peso del disolvente eutéctico profundo, opcionalmente

20 (i) en donde el al menos un aditivo está presente en el disolvente eutéctico profundo en una cantidad en el intervalo de 0,8% a 1,2% en peso del disolvente eutéctico profundo; y/o

(ii) en donde el al menos un aditivo es cloruro de cinc.

25 14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, en donde el disolvente eutéctico profundo comprende adicionalmente una N-alquil pirrolidona, en donde el grupo N-alquilo tiene 1 a 5 átomos de carbono, opcionalmente

(a) en donde la N-alquilpirrolidona es:

30 (i) N-metilpirrolidona o

(ii) N-etilpirrolidona, opcionalmente en donde el segundo componente es trifluoroacetamida; y/o

(b) en donde la N-alquilpirrolidona está presente en el disolvente eutéctico profundo en una cantidad en el intervalo de 2% a 20% en peso del disolvente eutéctico profundo.

35 15. Un aparato adecuado para la fijación celular o tisular y/o para inhibir la degradación de una biomolécula, cuyo aparato comprende:

40 una primera capa de disolvente eutéctico profundo formada por un primer disolvente eutéctico profundo; y una cavidad en la primera capa de disolvente eutéctico profundo para recibir una muestra que comprende una biomolécula;

en donde el primer disolvente eutéctico profundo es un sólido o un gel; opcionalmente:

45 (a) que comprende adicionalmente una segunda capa de disolvente eutéctico profundo formada por un segundo disolvente eutéctico profundo,

en donde la segunda capa de disolvente eutéctico profundo encierra la cavidad; y

en donde el segundo disolvente eutéctico profundo es un sólido o un gel; y/o

50 (b) en donde el primer y/o segundo disolvente eutéctico profundo es un disolvente eutéctico profundo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, opcionalmente

(i) en donde el primer y/o segundo disolvente eutéctico profundo incluyen un componente seleccionado entre 3,3,3-trifluoropropanamida, 2,2-difluoro-2-fenilacetamida, urea y tiourea; y/o

55 (ii) en donde el primer y/o segundo disolvente eutéctico profundo incluyen un componente seleccionado entre cloruro de colina, yoduro de butirilcolina y N,N,N-trimetilglicina y/o

(c) en donde el aparato comprende adicionalmente un recuperador seleccionado entre un alambre, un alfiler, un cepillo, un testigo, una malla, una membrana permeable, un lecho polimérico y un soporte de plástico, cuyo recuperador se puede asociar de manera extraíble con la muestra; y/o

60 (d) en donde el primer y/o segundo disolvente eutéctico profundo comprenden una matriz de soporte seleccionada entre polietilenglicol, agarosa, poliacrilato y celulosa.

Figura 1.

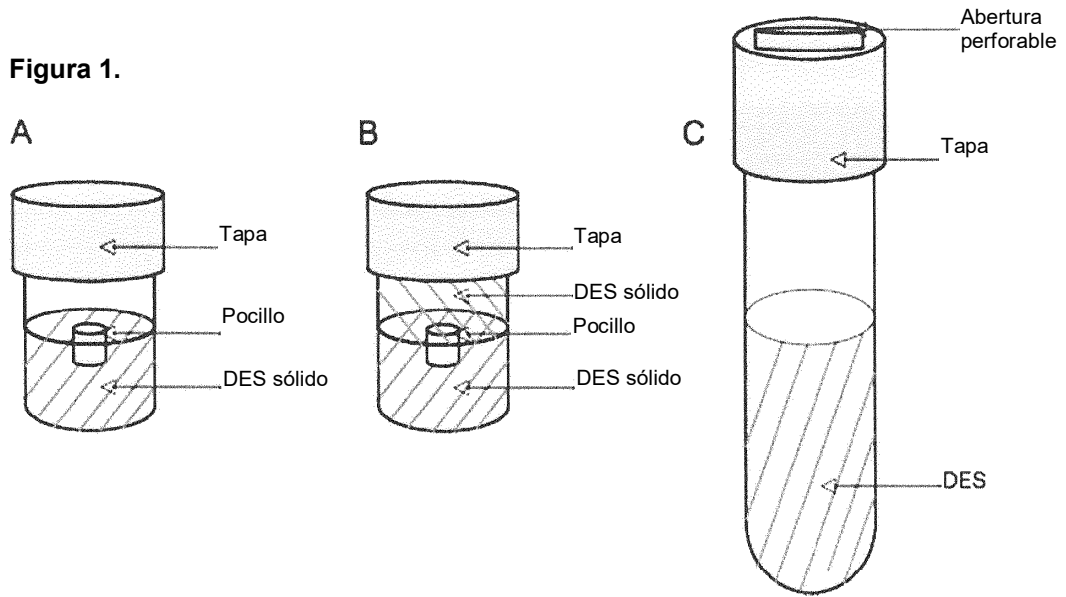
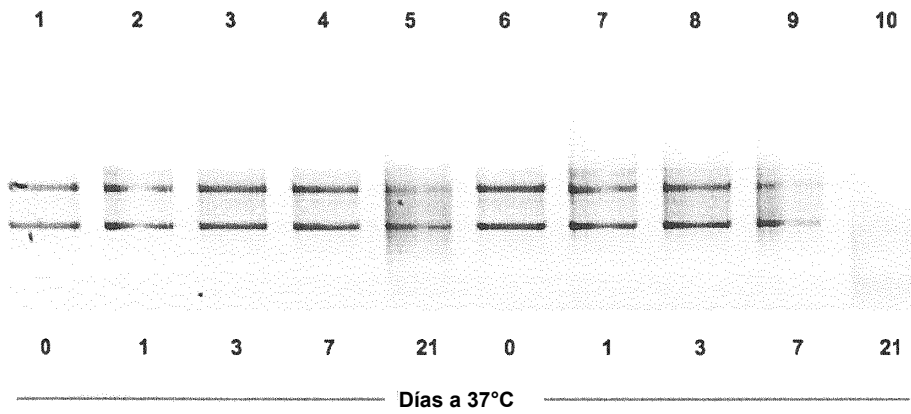


Figura 2. Estabilización a largo plazo de ARN en hígado de rata



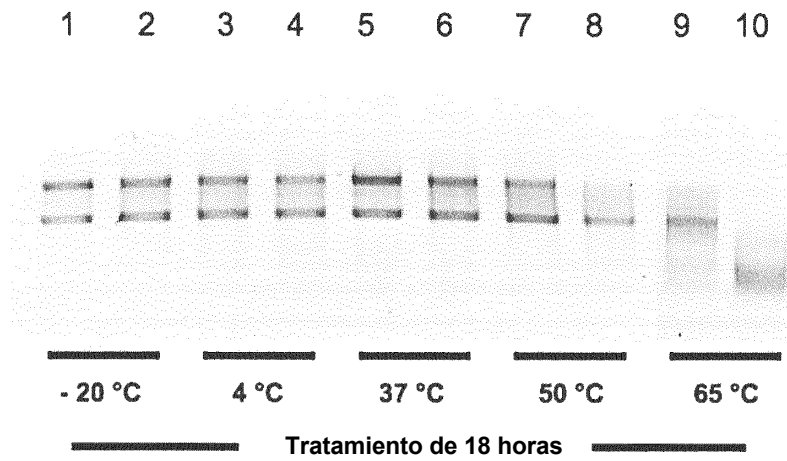


Figura 3. Estabilización de ARN en Cloruro de colina:Urea a un intervalo de temperaturas

Figura 4. Conservación a largo plazo de ARN en tejido utilizando Cloruro de colina:Urea (1:2)

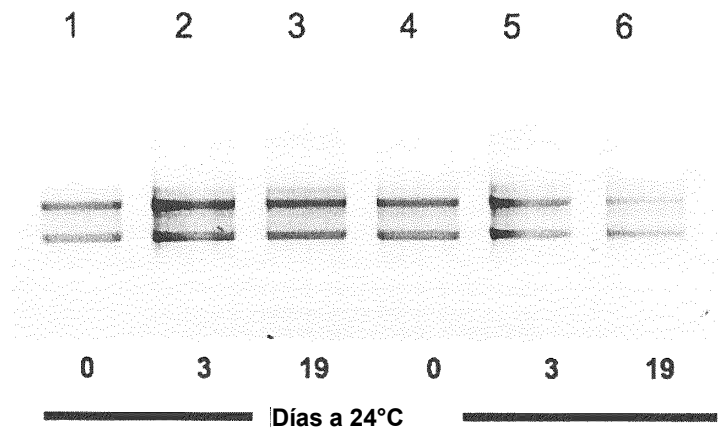


Figura 5A. Estabilización de ARN en muestras de riñón y cerebro de ratón a 37°C.

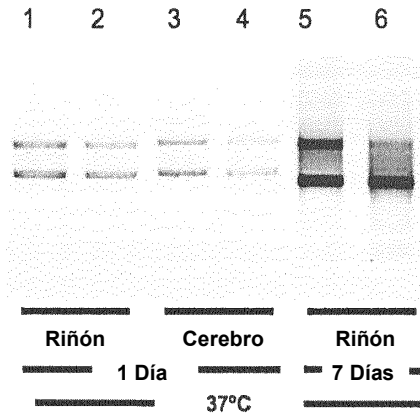


Figura 5B. Estabilización de ARN en muestras de tejido de ratón

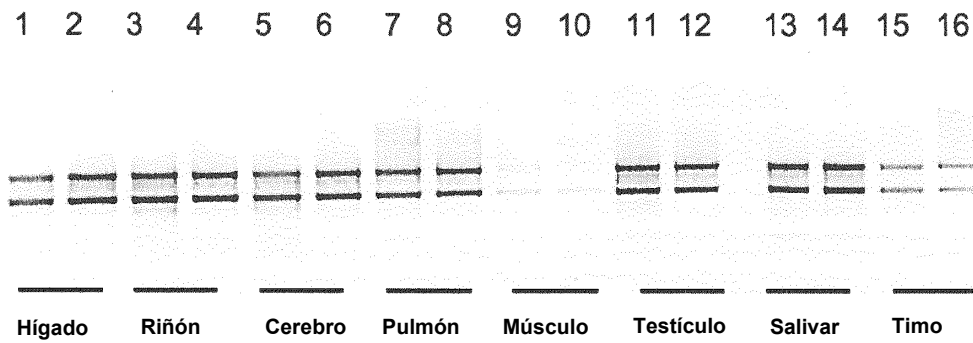


Figura 6. Conservación de ARN en cantidades variables de tejido

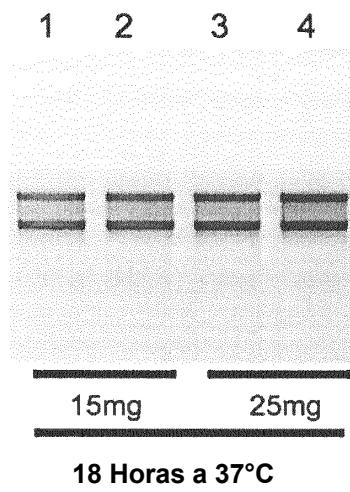


Figura 7. Purificación de ARN en muestras de sangre completa.

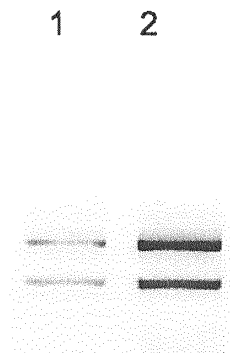


Figura 8. Gel que muestra la calidad del ARN de muestras de ARN estabilizadas

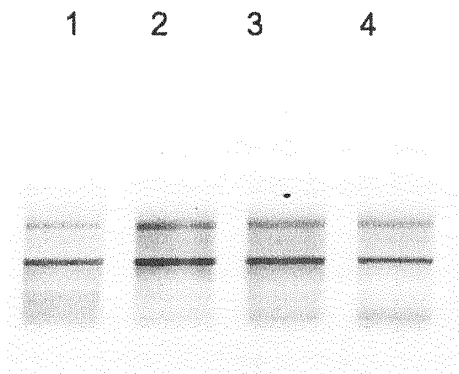


Figura 9. Estabilización de ARN en sangre completa con Guanidina o con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida

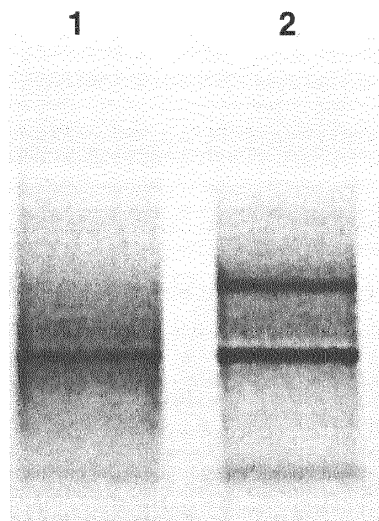


Figura 10. Imágenes de microscopio óptico de células HeLa fijadas con Cloruro de colina:Trifluoroacetamida

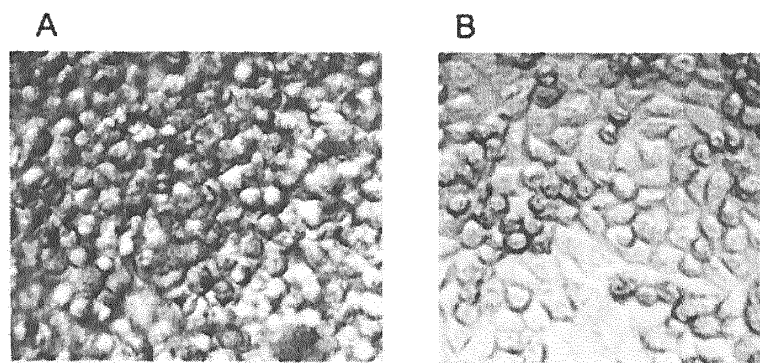


Figura 11. Degradación de ARN en tejidos en ausencia de estabilizador

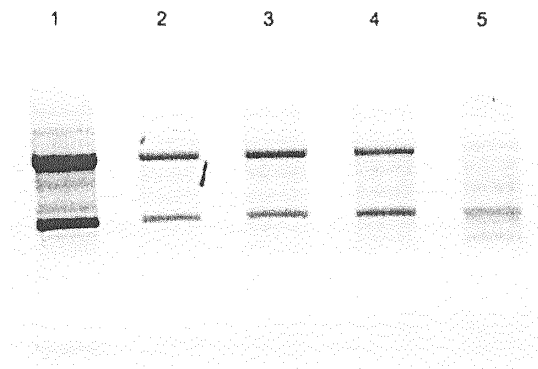


Figura 12. Estabilización de ADN genómico.

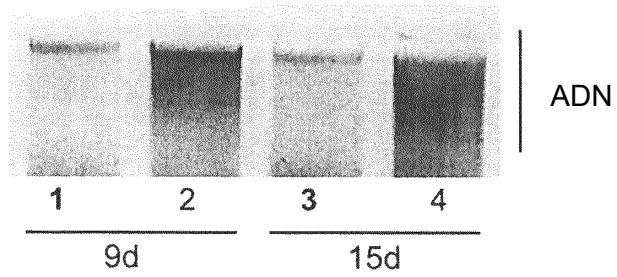


Figura 13. Estabilización de proteínas.

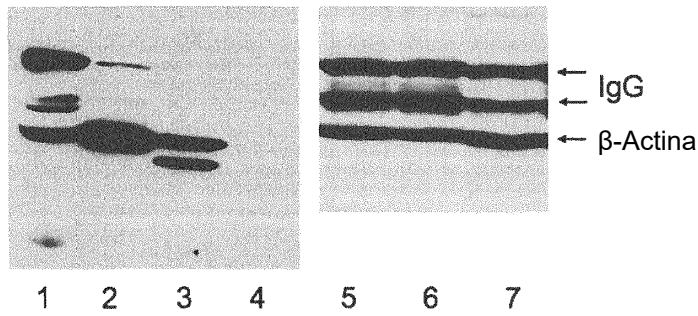


Figura 14. Integridad de ARN y ADN de células HeLa después de la fijación y la inclusión en parafina. Un signo más (+) indica que la etapa de procesamiento se llevó a cabo antes de la purificación del ácido nucleico.

	1	2	3	4	5	6
Cloruro de colina: Trifluoroacetamida 60 min	-	+	+	+	+	+
Etanol 30 min	-	-	+	+	+	+
Tolueno 15 min	-	-	-	+	+	+
Parafina 15 min x 55°C	-	-	-	-	+	-
Parafina 60 min x 55°C	-	-	-	-	-	+

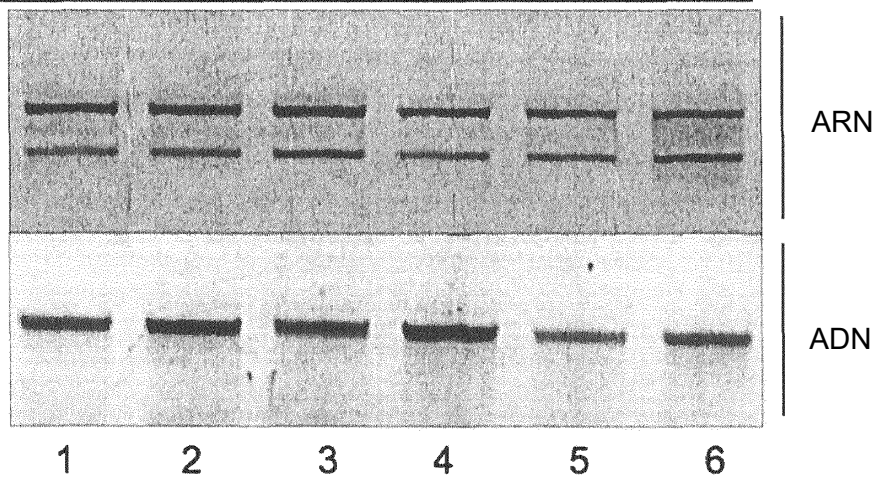


Figura 15. Integridad de ARN y ADN de células HeLa después de la fijación en Cloruro de colina:Trifluoroacetamida o la incubación en PBS seguido de inclusión en parafina, después extracción del ácido nucleico.

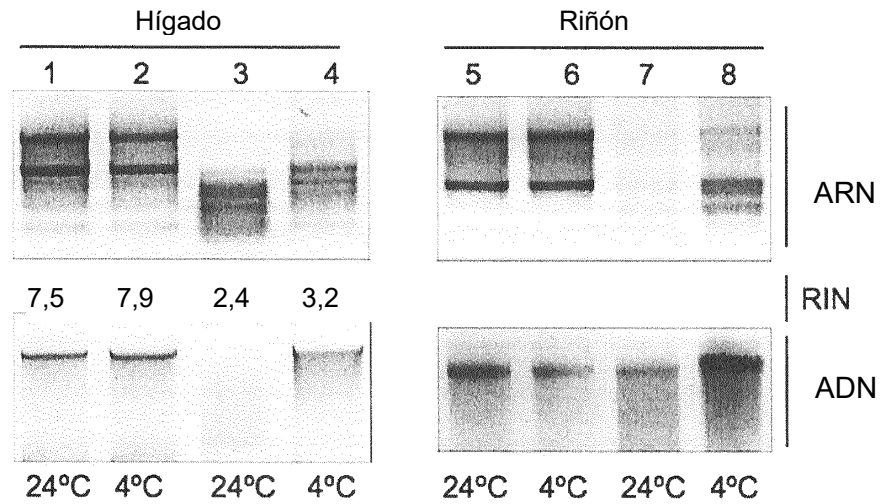


Figura 16. Estabilización de ARN en embriones de Drosophila

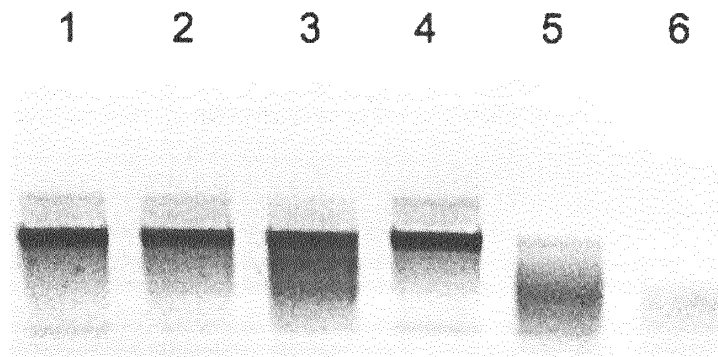


Figura 17. Estabilización de ARN en brotes de hoja de A. cepa.

