

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 891**

51 Int. Cl.:

A61B 10/04	(2006.01)	G01N 1/28	(2006.01)	A61B 18/04	(2006.01)
G01N 33/487	(2006.01)	G01N 1/40	(2006.01)		
G01N 33/48	(2006.01)	G01N 1/44	(2006.01)		
A61B 10/02	(2006.01)	A61B 18/00	(2006.01)		
A61M 27/00	(2006.01)	A61B 18/20	(2006.01)		
A61N 7/02	(2006.01)	A61B 17/00	(2006.01)		
A61B 10/00	(2006.01)	A61B 17/32	(2006.01)		
A61N 7/00	(2006.01)	A61M 37/00	(2006.01)		
A61K 38/28	(2006.01)	C12M 1/00	(2006.01)		
A61K 31/522	(2006.01)	C12M 1/42	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010** **E 16154949 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 3073263**

54 Título: **Dispositivo, composición y método para el diagnóstico basado en tejidos**

30 Prioridad:

13.02.2009 US 152585 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2020

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**PALIWAL, SUMIT;
MITRAGOTRI, SAMIR y
OGURA, MAKOTO**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 799 891 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo, composición y método para el diagnóstico basado en tejidos

5 Antecedentes de la Invención

La composición biomolecular de los tejidos humanos, representada por una multitud de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas misceláneas, es un indicador sensible de patologías locales, tal como cáncer, alergias y eczema, así como también de varias enfermedades sistémicas, tal como enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer y diabetes. Además, la composición molecular de los tejidos contiene además información crítica sobre la exposición del cuerpo a entidades químicas y biológicas exógenas. Sin embargo, esta información no se usa actualmente en métodos de diagnóstico debido a la falta de métodos estandarizados y amigables para el paciente para la recolección de muestras de rutina de los tejidos. En cambio, el diagnóstico clínico se realiza invariablemente mediante observación visual y análisis histopatológico de biopsias de tejido, que son muy limitadas debido a su naturaleza cualitativa, lo que lleva a un mayor diagnóstico erróneo y uso inapropiado. Además de ser invasivos, los métodos actuales también fallan en explicar una génesis molecular completa de enfermedades, y no logran distinguir entre enfermedades.

Los enfoques anteriores que usan métodos físicos y químicos para evaluar el fluido tisular se han centrado principalmente en extraer algunas moléculas de bajo peso molecular que están presentes libremente en el fluido intersticial, tal como el calcio y la glucosa. Se ha reportado el uso de la extracción por cinta para recolectar físicamente los componentes de tejido que se encuentran superficialmente con una cinta adhesiva; sin embargo, se ha demostrado que esta técnica está limitada por la ineficacia, la falta de un protocolo estandarizado y la alta heterogeneidad en el muestreo de tejidos.

La patente de Estados Unidos US2006046261 describe reactivos de lisis y tampones de lisis que comprenden múltiples surfactantes y tampones. El documento menciona que la lisis mecánica requiere un equipo especializado que puede no estar fácilmente disponible y también es extremadamente laborioso.

30 Breve Resumen de la Invención

La presente invención describe un método y un dispositivo, así como también composiciones útiles en tales métodos y dispositivos, que implican la aplicación de energía a un tejido de interés para generar una muestra licuada que comprende constituyentes de tejido para proporcionar un muestreo de tejido rápido, así como también la calidad y/o detección cuantitativa de analitos que pueden ser parte de los componentes del tejido (por ejemplo, varios tipos de biomoléculas, fármacos y microbios). La determinación de la composición del tejido puede usarse en una variedad de aplicaciones, incluido el diagnóstico o el pronóstico de enfermedades, la evaluación de la biodisponibilidad de la terapéutica en diferentes tejidos después de la administración de fármacos, la detección forense de fármacos de abuso, la evaluación de los cambios en el microambiente del tejido después de la exposición a un agente nocivo, la descontaminación de tejido y varias otras aplicaciones.

La presente invención proporciona métodos y dispositivos para generar una muestra de tejido licuado a partir de un sujeto vivo o enfermo. El dispositivo y el método implican aplicar energía y un medio promotor de la licuefacción a un tejido de interés de un sujeto, la aplicación produce una muestra de tejido licuado y se recolecta la muestra de tejido licuado.

El dispositivo de la presente invención se define en la reivindicación 1, y el método de la presente invención se define en la reivindicación 15.

En algunas modalidades, se realiza un análisis de la presencia o ausencia de al menos un analito en la muestra de tejido licuado, en donde el análisis facilita el diagnóstico de una condición de interés. En ciertas modalidades, el análisis implica generar un perfil de analito a partir de la muestra de tejido licuado y comparar el perfil de analito con un perfil de analito de referencia, en donde la comparación facilita el diagnóstico de una condición de interés.

En algunas modalidades, el propósito de tal licuefacción de tejido es eliminar o descontaminar el tejido de sustancias no deseadas. Ejemplos no limitativos de tales sustancias no deseadas incluyen productos químicos, contaminantes ambientales, toxinas biológicas y, en general, sustancias que se consideran tóxicas o peligrosas para el cuerpo. En ciertas modalidades, tal método de descontaminación se realiza moviendo continuamente el dispositivo de licuefacción de tejido sobre el tejido de interés hasta que se logre la eliminación de sustancias no deseadas a un nivel preferido.

La composición promotora de licuefacción de la presente invención se define en la reivindicación 14.

En ciertas modalidades, la composición promotora de licuefacción comprende una suspensión de partículas abrasivas. En ciertas modalidades, las partículas abrasivas comprenden sílice u óxido de aluminio.

En algunas modalidades, la energía se aplica en forma de energía ultrasónica, mecánica, óptica, térmica o eléctrica. En ciertas modalidades, la energía mecánica se aplica mediante un material abrasivo. En ciertas modalidades, la energía térmica se aplica en forma de energía de radiofrecuencia. En ciertas modalidades, la energía óptica se aplica en forma de láser.

5

En algunas modalidades, la muestra de tejido licuado se genera para cada tejido sano de interés del sujeto y un tejido enfermo sospechoso de interés del sujeto, y el análisis comprende comparar resultados analíticos de la muestra de tejido sano con resultados analíticos de la muestra de tejido que se sospecha enfermo, en donde la comparación facilita el diagnóstico de una condición de interés. En algunas modalidades, la muestra de tejido

10

licuado se genera para múltiples sitios de tejido y el análisis comprende comparar resultados analíticos de los múltiples sitios de tejido, en donde tal comparación facilita el diagnóstico de una condición de interés. En algunas modalidades, la muestra de tejido licuado se recolecta de múltiples sitios de tejido, y las muestras se combinan para hacer un diagnóstico.

15

En algunas modalidades, la muestra de tejido licuado se recolecta por aspiración. En ciertas modalidades, la recolección se realiza mediante la retención del agente de licuefacción en una carcasa colocada en contacto con el tejido. En ciertas modalidades, la recolección se realiza mediante transferencia mecanizada de la muestra de tejido licuado en una carcasa ubicada en el dispositivo.

20

25

En algunas modalidades, la muestra de tejido licuado se mezcla con una sustancia que ayuda a la licuefacción adicional y a la estabilización de los analitos de interés para su almacenamiento o transporte. En ciertas modalidades, la muestra de tejido transferida desde ese contenedor de muestra se mezcla con las sustancias que se almacenan previamente en un contenedor. Los ejemplos incluyen un estabilizador de proteínas tal como un inhibidor de proteasas, un estabilizador de ácido nucleico tal como EDTA, fenol, proteinasa inespecífica, un inhibidor de RNasa y un inhibidor de DNasa, un agente antiespumante y surfactantes tal como Triton X-100, Dodecil Sulfato de Sodio y DMSO y las partículas abrasivas comprenden sílice u óxido de aluminio.

30

En ciertas modalidades, el dispositivo evalúa el tejido de interés antes, durante o después del proceso de licuefacción. En ciertas modalidades, la evaluación se realiza por medios electroquímicos, bioquímicos u ópticos. En algunas modalidades, la evaluación implica la medición de la conductividad eléctrica del tejido. En una modalidad ilustrativa, la conductividad eléctrica se mide por un medio que aplica una señal eléctrica de AC a través del tejido de interés. Tal señal eléctrica tiene una tensión entre 0,1 mV y 10 V y una frecuencia entre 1 Hz y 100 kHz.

35

En algunas modalidades, el dispositivo implica detectar ciertos constituyentes de tejido en la muestra de tejido licuado antes del análisis de un analito de interés, tal como un marcador de enfermedad. En ciertas modalidades, la detección es por medios electroquímicos, bioquímicos u ópticos. En algunas modalidades, el medio electroquímico de detección es un electrodo ion-selectivo. En algunas modalidades, el medio óptico de detección es medir el coeficiente de absorción o dispersión de una solución líquida.

40

45

En algunas modalidades, la energía se aplica a un tejido en forma de ultrasonido con un índice mecánico entre 0,1 y 50. En ciertas modalidades, la energía se aplica poniendo en contacto el tejido con una superficie abrasiva en movimiento. En ciertas modalidades, la energía se aplica al tejido poniendo en contacto el tejido con un dispositivo de cepillado móvil que comprende una pluralidad de cerdas. En ciertas modalidades, la energía se aplica al tejido mediante la inserción mecánica de un parche que porta una pluralidad de microagujas en el tejido; y la inyección

50

adicional de un medio de licuefacción a través de las microagujas en el tejido. En algunas modalidades, se aplica energía adicional moviendo tal parche de microagujas después de su inserción en el tejido. En ciertas modalidades, la energía se aplica al tejido mediante la agitación mecanizada del agente de licuefacción. En ciertas modalidades, la energía se aplica al tejido poniendo en contacto el tejido con un chorro de alta velocidad que comprende un medio promotor de la licuefacción, que también puede contener partículas abrasivas en diferentes modalidades.

55

En algunas modalidades, el tejido comprende mama, próstata, ojo, vagina, vejiga, uñas, cabello, colon, testículos o intestino. En ciertas modalidades, el tejido comprende piel o una membrana mucosa. En ciertas modalidades, el tejido comprende pulmón, cerebro, páncreas, hígado, corazón, hueso o pared de la aorta.

60

En algunas modalidades, el analito comprende una molécula pequeña, un fármaco o un metabolito del mismo, un polipéptido, un lípido, un ácido nucleico o un microbio. En ciertas modalidades, el analito comprende un anticuerpo, una citocina, un fármaco ilícito o un biomarcador de cáncer.

65

En algunas modalidades, la muestra de tejido licuado se mantiene en un contenedor, y el perfil de analito se genera integrando el contenedor de líquido con uno o más dispositivos analíticos. En ciertas modalidades, el dispositivo de licuefacción de tejidos contiene un medio para medir la concentración de un analito calibrador para proporcionar un medio para calibrar el análisis del analito.

CTACK/CCL27, IFN-g, TNFa, CD23, CD-40, Eotaxin-2 y TARC, en donde el análisis facilita el diagnóstico de enfermedades alérgicas en el sujeto.

- 5 En algunas modalidades, el dispositivo implica diagnosticar cáncer en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para analizar la muestra de tejido licuado en busca de la presencia o ausencia de uno o más marcadores de cáncer, en donde el análisis facilita el diagnóstico de cáncer en el sujeto. En ciertas modalidades, el tejido de interés es mama, colon, próstata, piel, testículo, intestino o boca.
- 10 En algunas modalidades, el dispositivo implica el diagnóstico de enfermedad cardíaca en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para analizar la muestra de tejido licuado en busca de la presencia o ausencia de uno o más de colesterol, triglicéridos, lipoproteínas, ácidos grasos libres y ceramidas, en donde el análisis facilita el diagnóstico de enfermedades del corazón en el sujeto.
- 15 En algunas modalidades, el dispositivo implica detectar la presencia de un fármaco ilícito, o un metabolito del mismo, en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para analizar la muestra de tejido licuado en busca de la presencia o ausencia de un fármaco ilícito, o metabolitos del mismo, en donde el análisis proporciona la detección de fármacos ilícitos en el sujeto.
- 20 En algunas modalidades, el dispositivo implica detectar un microorganismo en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para aplicar energía y un medio de licuefacción a un tejido de interés en un sujeto y analizar el medio de licuefacción en busca de la presencia o ausencia de un microorganismo, en donde el análisis proporciona la detección de la presencia o ausencia de un microorganismo.
- 25 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método y un dispositivo para el licuado de un tejido de un sujeto para facilitar el paso de un fármaco a través o dentro del tejido. El método y el dispositivo descritos anteriormente son aplicables no solo a la recolección de constituyentes del tejido sino también al suministro de fármacos. El dispositivo y el método implican aplicar energía y un medio de licuefacción a un tejido de interés de un sujeto, y suministrar un fármaco a través o dentro del sitio del tejido a licuar. La ventaja de usar la presente invención es 1) para proporcionar flujos más altos de fármacos en un tejido, y 2) para permitir un mayor control de los flujos en un tejido. Los fármacos que simplemente no pasarían a través de los tejidos tal como la piel son forzadas a través de los tejidos cuando se aplica el método.
- 30 En algunas modalidades, la presente invención ofrece un método para suministrar uno o más fármacos a través del tejido a licuar en el sistema circulatorio, lo que evita la degradación en el tracto gastrointestinal y el metabolismo rápido por el hígado desde el cual los fármacos se administrarán de forma oral o por inyección sufren. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un método y un dispositivo para administrar uno o más fármacos localmente al tejido de interés, limitando así los efectos secundarios a los tejidos sanos. El método y el dispositivo también pueden aplicarse para mejorar el transporte a las membranas celulares.
- 35 En particular, el dispositivo de la presente invención consta de los siguientes componentes principales: 1) un generador de energía; 2) un medio promotor de licuefacción; 3) un depósito para contener los fármacos que se suministrarán y/o recolectarán de la muestra de tejido licuado.
- 40 Puede agregarse un fármaco a administrar en el medio de licuefacción antes o durante el proceso de licuefacción de tejidos. En una modalidad alternativa, la aplicación de energía se combina con el medio de licuefacción que no contiene un fármaco que puede usarse para licuar un tejido, y subsecuentemente puede aplicarse un fármaco en un portador apropiado tal como un parche en un sitio del tejido para ser licuado.
- 45 El transporte del fármaco en el tejido puede mejorarse aún más mediante la aplicación simultánea o subsecuente de una fuerza impulsora secundaria, tal como la permeabilidad química o los potenciadores del transporte, convección, gradiente de presión osmótica, gradiente de concentración, iontoforesis, electroporación, campo magnético, ultrasonido o presión mecánica. La fuerza impulsora puede aplicarse continuamente durante un período de tiempo o a intervalos durante el período de licuefacción.
- 50 En algunas modalidades, el tejido a administrar comprende órganos así como también superficies biológicas. En cierta modalidad, las superficies biológicas comprenden una membrana biológica y una membrana celular. En cierta modalidad, la membrana biológica comprende piel o una membrana mucosa. En ciertas modalidades, la membrana biológica comprende una membrana bucal, ojo, vagina, colon o intestino. En alguna modalidad, el tejido comprende un tejido enfermo.
- 55 En una modalidad, se proporciona un dispositivo que puede usarse en un tejido para obtener una muestra licuada que comprende una fuente de energía acoplada operativamente al tejido, y una cámara, acoplada operativamente a tal tejido, capaz de suministrar un medio promotor de licuefacción y/o recoger tal muestra licuada de tal tejido.
- 60 En otra modalidad, el dispositivo puede usarse en un tejido que es parte de un organismo vivo; y el tejido puede extirparse del organismo antes del diagnóstico.
- 65

En otra modalidad, el dispositivo de la reivindicación 1 en donde la muestra de tejido licuado se transfiere a un ensayo para controlar la presencia o la ausencia de al menos un analito.

- 5 En otra modalidad más, la cámara del dispositivo puede ser un ensamble de esponja-fuelle donde la esponja es capaz de almacenar tal medio promotor de la licuefacción y/o muestra de tejido licuado.

10 En otra modalidad, se proporciona un dispositivo que comprende una fuente de energía acoplada operativamente al tejido, y una cámara, acoplada operativamente a tal tejido, capaz de suministrar un medio promotor de licuefacción y/o recolectar tal muestra licuada de tal tejido; comprende además un tubo/aguja, conectado a tal cámara, capaz de suministrar el medio promotor de licuefacción y/o aspirar una muestra de tejido licuado del tejido.

15 En aún otra modalidad, se proporciona un dispositivo que comprende una fuente de energía acoplada operativamente al tejido, y una cámara, acoplada operativamente a tal tejido, capaz de suministrar un medio promotor de licuefacción y/o recolectar tal muestra licuada de tal tejido; comprende además un contenedor de muestra, conectado operativamente a tal cámara, capaz de almacenar analitos que contienen muestras del tejido licuado aspirado o de transferir tal muestra de tejido licuado aspirado a una cámara auxiliar; en donde la cámara se usa solo para suministrar el medio promotor de licuefacción a la cámara.

20 En otra modalidad, un contenedor presurizado y/o contenedor al vacío es parte del dispositivo, lo que facilita la transferencia de tal medio promotor de licuefacción y/o muestra de tejido licuado.

25 En una modalidad, la energía emitida desde la fuente de energía en el dispositivo tiene forma de energía ultrasónica, mecánica, óptica, térmica o eléctrica. En una modalidad particular, la energía mecánica se aplica al tejido mediante un material abrasivo, vacío, presión o fuerza de cizallamiento. En otra modalidad, la energía térmica se aplica al tejido en forma de energía de radiofrecuencia. En otra modalidad, la energía óptica se aplica al tejido en forma de láser.

30 En otra modalidad más, se proporciona un dispositivo que comprende una fuente de energía acoplada operativamente al tejido, y una cámara, acoplada operativamente a tal tejido, capaz de suministrar un medio promotor de licuefacción y/o recolectar tal muestra licuada de tal tejido que comprende además un contenedor de muestra, conectado operativamente a tal cámara, capaz de almacenar analitos que contienen muestras del tejido licuado aspirado, o de transferir tal muestra de tejido licuado aspirado a una cámara auxiliar; en donde la cámara se usa solo para suministrar el medio promotor de licuefacción a la cámara.

35 En otra modalidad, se proporciona un dispositivo que comprende una fuente de energía acoplada operativamente al tejido, y una cámara, acoplada operativamente a tal tejido, capaz de suministrar un medio promotor de licuefacción y/o recolectar tal muestra licuada de tal tejido, en donde la fuente de energía se compone de una almohadilla conectada a un eje.

40 En una modalidad más particular, el eje tiene una unidad de detección de presión, que mantiene un perfil de presión predeterminado sobre el tejido al contacto.

45 En otra modalidad, la almohadilla se selecciona de un grupo que consiste de una superficie abrasiva y un parche que comprende una pluralidad de microagujas.

En otra modalidad más, el dispositivo comprende además un émbolo, conectado operativamente a la parte superior de la cámara.

50 En otra modalidad, el dispositivo se divide en una unidad superior e inferior, y en donde la unidad inferior es desmontable de tal unidad superior; en donde la unidad superior comprende la fuente de energía y la unidad inferior comprende la cámara.

55 En aún otra modalidad, el dispositivo comprende además una unidad analítica conectada operativamente a la cámara, y en donde la unidad analítica es capaz de realizar una monitorización temporal de la muestra de tejido por medios electroquímicos, bioquímicos u ópticos; o la unidad analítica es capaz de analizar los analitos dentro de tal muestra de tejido licuado.

60 En otra modalidad, el dispositivo está conectado a una sonda de diagnóstico o un catéter; en donde la sonda de diagnóstico se selecciona de un grupo que consiste de endoscopio, colonoscopia y laparoscopia.

En aún otra modalidad, el uso del dispositivo da como resultado la licuefacción in situ de la muestra de tejido.

65 En otra modalidad, el dispositivo contiene un medio promotor de licuefacción que puede preservar y mejorar la detección de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que comprende: 3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato (DPS) y polietilenglicol dodecil éter (Brij 30) disuelto en una solución tamponada; y donde la concentración de 3-(decil

dimetil amonio) propano sulfonato y polietilenglicol dodecil éter (B30) está entre 0,01 - 10 % (p/v); y donde el 3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato y el polietilenglicol dodecil éter están presentes en una relación de 50:50.

En otra modalidad más, el medio promotor de licuefacción dentro del dispositivo está tamponado en una solución que comprende solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, Tris-HCL o EDTA.

En otra modalidad, el medio promotor de licuefacción dentro del dispositivo comprende un surfactante no iónico seleccionado de un surfactante de la serie Brij, un surfactante Triton-X y un surfactante de Sorbitán; un surfactante aniónico o ion híbrido; y un solvente hidrófilo; en donde el medio tiene una concentración total de los surfactantes de aproximadamente 0,01 %-10 % (p/v).

Estas y otras características de la invención se harán evidentes para los expertos en la técnica después de leer los detalles del sistema, método y dispositivo para el diagnóstico basado en tejidos como se describe más detalladamente a continuación.

Breve Descripción de los Dibujos

La invención se entenderá mejor mediante la siguiente descripción detallada cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Se destaca que, de acuerdo con la práctica común, los diversos elementos de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de los diversos elementos se amplían o reducen arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras:

La Figura 1 (Paneles a-g) es una colección de dibujos en sección transversal que ilustran la estructura, los componentes y el funcionamiento de varios dispositivos de licuefacción de tejidos basados en energía abrasiva. Los Paneles a-c y los Paneles e-g muestran el funcionamiento secuencial de dos dispositivos de licuefacción separados. El Panel d es una representación esquemática de un eje motorizado sensible a la presión que lleva un cabezal abrasivo.

La Figura 2 (Paneles a-b) es una colección de dibujos en sección transversal de dispositivos de licuefacción de tejidos móviles para el muestreo continuo de una gran área de tejidos.

La Figura 3 (Paneles a-c) es una colección de dibujos en sección transversal que ilustran la estructura y los componentes de varios dispositivos de licuefacción de tejidos basados en el movimiento abrasivo lineal. El Panel c es una representación esquemática de un eje de soporte sensible a la presión que lleva un engranaje.

La Figura 4 (Panel a-g) es una colección de dibujos en sección transversal que ilustran varios tipos de cabezales abrasivos.

La Figura 5 (Paneles a-d) es una colección de dibujos y esquemas de dispositivos de sección transversal para medir la conductividad eléctrica del tejido.

La Figura 6 (Paneles a-g) es una colección de dibujos en sección transversal que ilustran la estructura, los componentes y el funcionamiento de varios dispositivos de licuefacción de tejidos basados en microagujas.

La Figura 7 (Paneles a-e) es una colección de dibujos en sección transversal de un dispositivo ilustrativo de licuefacción de tejidos basado en energía abrasiva. El Panel a muestra varios componentes del ensamble del dispositivo. Los Paneles b-d muestran etapas de trabajo secuenciales del dispositivo, incluida la transferencia del medio de licuefacción que se colocará en contacto con el tejido (Paneles b-c), la generación de muestra por licuefacción (Panel c) y la recolección de la muestra en un contenedor (Panel d). El Panel e muestra la recuperación posterior a la licuefacción del contenedor de muestreo del dispositivo.

La Figura 8 (Paneles a-d) es una colección de dibujos en sección transversal que ilustra los etapas de trabajo secuenciales de un dispositivo ilustrativo de licuefacción de tejidos basado en microagujas: transferencia del medio de licuefacción para ser puesto en contacto con el tejido (Paneles a-b); generación de muestra por licuefacción (Panel c); y recolección de la muestra en un contenedor (Panel d).

La Figura 9 (Paneles a-d) es una colección de dibujos que ilustran un contenedor de muestreo. Los Paneles a-d muestran las etapas de trabajo secuenciales para transportar y/o analizar las muestras generadas. El Panel a muestra sustratos que se unen selectivamente a analitos de interés que están recubiertos en la superficie interior del contenedor. Los sustratos recubiertos capturan selectivamente los analitos en las muestras del tejido licuado (Panel b). Tras una incubación suficiente de la muestra de tejido, la muestra se descarta mientras los analitos se mantienen en el contenedor (Panel c). Los analitos se eluyen mediante un tampón para su subsecuente análisis (Panel d).

La Figura 10 (Paneles a-c) es una colección de dibujos que ilustran la metodología de cribado para identificar formulaciones únicas de surfactantes de LPMS. El Panel a clasifica más de 150 formulaciones de surfactantes en su capacidad para preservar la bioactividad de las proteínas. El Panel b clasifica las mejores formulaciones del Panel a

en su potencial de solubilización de tejidos. El Panel c compara las mejores LPM de todo el cribado: 0,5 % (p/v) de DPS-Brij30 con otros surfactantes convencionales en su potencial para muestrear proteínas funcionales del tejido de la piel.

5 La Figura 11 (Paneles a-b) es una colección de dibujos que ilustran la preservación asistida por LPM de bioactividades de varias proteínas (IgE - Panel a; IgE, LDH y β -gal - Panel b) bajo esfuerzo mecánico de exposición al ultrasonido.

10 La Figura 12 (Paneles a-c) es una colección de dibujos que ilustran la capacidad de exposición ultrasónica en presencia de LPM (solución salina de 0,5 % (p/v) DPS-B30) para muestrear una variedad de biomarcadores de enfermedades funcionales (IgE - Panel a; Colesterol - Panel b; Bacterias - Panel c) del tejido de la piel.

La Figura 13 es un gráfico que ilustra el efecto de los tampones en LPMs sobre la compatibilidad con PCR cuantitativo.

15 La Figura 14 es un gráfico que ilustra la influencia de la mezcla de surfactantes en la compatibilidad con el PCR cuantitativo.

20 La Figura 15 es un gráfico que ilustra el efecto de la intensidad del ultrasonido y el tiempo de exposición en *E. Coli* viabilidad. Las muestras fueron expuestas a ultrasonido a intensidades de 1,7 W/cm² (●) y 2,4 W/cm² (■). Cada punto representa el valor medio de tres muestras independientes.

25 La Figura 16 es una fotografía de electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de células *E. Coli* sonicadas en diferentes condiciones en tris-HCl. Carril 1 estándar molecular; carril 2 Célula no tratada; carril 3 1,7 W/cm², 2 min; carril 4 1,7 W/cm² 3 min; carril 5 2,4 W/cm², 3 min.

La Figura 17 (Paneles a y b) es un gráfico que ilustra el número de bacterias muestreadas por acoplamiento de ultrasonido con tris-HCl, frotis y técnica de lavado con surfactante, medido por (a) ensayo de cultivo y (b) PCR cuantitativo. Cada punto representa el valor medio de cinco muestras independientes.

30 La Figura 18 es un gráfico que ilustra el efecto de agregar varios potenciadores de sensibilidad en el LPM para la detección mejorada de un analito modelo en él, anticuerpo IgE humano. Los potenciadores de la sensibilidad usados en el análisis son una mezcla de 10 % p/v de BSA y 0,5 % p/v de Tween 20 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (diamante abierto); y una mezcla de 10 % p/v de BSA y 0,5 % p/v de Tween 20 en solución salina tamponada con tris (círculo cerrado). Antes del análisis, cada uno de los potenciadores de la sensibilidad se diluyó a una relación de 1:10 con LPM que contenía analito modelo. Como control, se usaron analitos modelo que contienen LPM (cuadrado abierto) y un solvente analítico de uso común que comprende una mezcla de BSA al 1 % p/v y Tween 20 al 0,05 % p/v en solución salina tamponada con tris (cuadrado sólido). El LPM estaba compuesto de una solución de mezcla al 1 % p/v de NLS y Brij 30 en PBS. Las barras de error indican la desviación estándar.

40 La Figura 19 (Paneles a-b) es una colección de gráficos que ilustran la administración de Inulina a través y de Aciclovir en la piel de cerdo in vitro después de la aplicación de ultrasonido (a) o abrasión con una pluralidad de cerdas (b).

45 Descripción detallada de la invención

DEFINICIONES

50 "Energía", tal como se usa en la presente descripción, significa cualquier energía apropiada que pueda aplicarse al tejido para lograr el objetivo de los métodos descritos en la presente descripción (por ejemplo, tejido licuado). Los tipos de energía ilustrativos incluyen energía mecánica (por ejemplo, abrasión, cizallamiento, vacío, presión, succión), ultrasonido, energía óptica (por ejemplo, láser), magnética, térmica y eléctrica.

55 Un "analito" como se usa en la presente descripción significa cualquier biomolécula (por ejemplo, polipéptido, ácido nucleico, lípido y similares), fármaco (por ejemplo, fármacos terapéuticos, fármacos de abuso y similares), molécula pequeña (por ejemplo, factores de hidratación natural, nicotina y similares, con el entendimiento de que las moléculas pequeñas también pueden ser fármacos), agentes de guerra, contaminantes ambientales (por ejemplo, pesticidas, etc.), microbios (por ejemplo, bacterias, virus, hongos, levaduras y similares) y similares que están presentes en o sobre el tejido y pueden extraerse del tejido de interés (por ejemplo, piel, una membrana mucosa y similares) y detectarse, analizarse y/o cuantificarse.

60 El término "licuefacción" se usa para describir el proceso mediante el cual el tejido y/o los constituyentes del tejido se convierten en un estado suficientemente soluble mediante la exposición a suficiente energía y, opcionalmente, un medio promotor de licuefacción, y puede implicar la conversión de al menos una porción de una estructura de tejido de interés para una forma líquida. Una muestra de tejido que ha sido sometida a licuefacción, a la que a veces se hace referencia en la presente descripción como una muestra "licuada".

El término "medio promotor de licuefacción" (LPM) se usa para describir una sustancia que facilita la solubilización de uno o más constituyentes del tejido, facilita la conversión de al menos una porción de la estructura del tejido en un líquido cuando se expone a energía, y/o facilita la preservación de la bioactividad de uno o más constituyentes del tejido solubilizados.

El término "agente promotor de la licuefacción" (LPA) se usa para describir un componente del medio promotor de licuefacción, particularmente un agente que promueve al menos la solubilización y/o la preservación de la bioactividad de uno o más constituyentes de los tejidos, y/o análisis de los subsecuentes ensayos de diagnóstico.

Un "analito de calibración" como se usa en la presente descripción significa cualquier molécula presente de forma natural en un tejido de interés a una concentración conocida, que puede servir como un analito de referencia (por ejemplo, como un control positivo para asegurar que se logre un grado deseado de licuefacción).

Una "biomolécula" como se usa en la presente descripción significa cualquier molécula o ion que tenga un origen o función biológica. Los ejemplos no limitantes de biomoléculas incluyen proteínas (por ejemplo, biomarcadores de enfermedades tales como biomarcadores de cáncer, anticuerpos: IgE, IgG, IgA, IgD o IgM, y similares), péptidos, lípidos (por ejemplo, colesterol, ceramidas o ácidos grasos), ácidos nucleicos (ARN y ADN), moléculas pequeñas (por ejemplo, glucosa, urea, creatina), fármacos de moléculas pequeñas o sus metabolitos, microbios, moléculas inorgánicas, elementos o iones (por ejemplo, hierro, Ca²⁺, K⁺, Na⁺, y similares). En algunas modalidades, la biomolécula es distinta de glucosa y/o es distinta de un marcador de cáncer.

El término "fármaco abusado" o "fármaco de abuso" o "fármaco ilícito" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a cualquier sustancia que esté regulada por un gobierno (por ejemplo, federal o estatal) cuya presencia en un tejido humano, y/o su presencia por encima de cierto nivel en un tejido humano, es ilegal o puede ser perjudicial para un ser humano. Los ejemplos de fármacos abusados incluyen: cocaína, heroína, metil anfetamina y fármacos recetados que se toman en exceso de la dosis o sin receta (por ejemplo, analgésicos tal como opioides).

El término "agente de guerra" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier molécula, compuesto o composición de origen biológico o químico que puede usarse como un arma. Los ejemplos de agentes de guerra incluyen gases nerviosos (por ejemplo, VX, Sarín), fosgeno, toxinas, esporas (por ejemplo, ántrax) y similares.

El término "contaminante ambiental" como se usa en la presente descripción incluye cualquier molécula, compuesto o composición que puede ser perjudicial para un individuo, por ejemplo, cuando están a concentraciones elevadas por encima de un umbral de riesgo. Los ejemplos incluyen contaminantes del agua (por ejemplo, fertilizantes, pesticidas, fungicidas, insecticidas, herbicidas, metales pesados, haluros), contaminantes del suelo (por ejemplo, fertilizantes, pesticidas, fungicidas, insecticidas, herbicidas, metales pesados, haluros), contaminantes del aire (por ejemplo, NO_x, SO_x, gases de efecto invernadero, contaminantes orgánicos persistentes (POPs), material particulado, humo).

El término "descontaminación" como se usa en la presente descripción incluye la eliminación en tejidos de cualquier molécula, compuesto o composición no deseada que puede ser perjudicial para un individuo. Los ejemplos incluyen contaminantes ambientales (como se definió anteriormente), químicos tóxicos y toxinas biológicas.

El término "factor de hidratación natural" (NMFs) como se usa en la presente descripción significa cualquiera de varios tipos de moléculas pequeñas, que incluyen pero no se limitan a aminoácidos libres, lactato y urea, que son derivados de fillagrina. Los NMFs pueden usarse como analitos para facilitar la evaluación de la salud general de la piel (por ejemplo, piel seca, piel escamosa, piel normal, etc.). El término "índice mecánico" como se usa en la presente descripción significa la relación de la amplitud de la presión negativa máxima en un campo ultrasónico y la raíz cuadrada de la frecuencia de ultrasonido ($\text{Índice Mecánico} = (\text{Presión (MPa)}) / (\text{Frecuencia (MHz)})^{0,5}$).

El término "suministro de fármacos", tal como se usa en la presente descripción, significa el suministro de uno o más fármacos en sangre, linfa, líquido intersticial, una célula o tejido.

El término "potenciador de la sensibilidad" como se usa en la presente descripción significa una sustancia o una mezcla de sustancias que se mezclan con LPM para estabilizar analitos de tejido licuado y facilitar su análisis en términos de mejorar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas analíticas de diagnóstico.

El término "reactivo de bloqueo" se usa para describir un componente que se usa para prevenir la unión no específica de analitos a sustratos usados en un ensayo de diagnóstico.

Antes de describir la presente invención y las modalidades ilustrativas específicas de la invención, debe entenderse que esta invención no se limita a las modalidades particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. Se deberá entender, además, que la terminología que se usa en la presente invención es para el propósito de describir

modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solamente por las reivindicaciones anexas.

Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor interviene hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera, entre los límites superior e inferior de ese intervalo que además se describe específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo indicado y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo donde hay alguno, ninguno o ambos límites se incluyen en los intervalos más pequeños y dentro de la invención se abarca además, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Donde el intervalo indicado incluya uno o los dos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos se incluyen también en la invención.

A menos que se especifique de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por aquellos expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o en las pruebas de la presente invención, algunos materiales y métodos preferidos y potenciales se describirán ahora.

Debe notarse que, tal como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En consecuencia, por ejemplo, la referencia a "un tejido" incluye una pluralidad de tales tejidos y la referencia a "el líquido" incluye una referencia a uno o más líquidos, etcétera. Debe notarse, además, que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración está destinada a servir como base de antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la narración de los elementos de la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

Las publicaciones analizadas en la presente descripción se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente descripción debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder tal publicación en virtud de una invención previa. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación presentes que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

La presente invención proporciona sistemas, métodos y dispositivos, así como también composiciones útiles en tales sistemas, métodos y dispositivos, que implican la aplicación de energía a un tejido de interés para generar una muestra licuada que comprende constituyentes del tejido para proporcionar un muestreo de tejido rápido, así como también la detección cualitativa y/o cuantitativa de analitos que pueden ser parte de los constituyentes del tejido (por ejemplo, varios tipos de biomoléculas, fármacos y microbios, es posible que desee un párrafo que defina formalmente lo que se quiere decir con los constituyentes del tejido). La determinación de la composición o los constituyentes del tejido puede usarse en una variedad de aplicaciones, incluido el diagnóstico o el pronóstico de enfermedades locales así como también sistémicas, la evaluación de la biodisponibilidad de la terapéutica en diferentes tejidos después de la administración de fármacos, la detección forense de fármacos de abuso, la evaluación de cambios en el microambiente del tejido después de la exposición a un agente nocivo, descontaminación y otras aplicaciones.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método y un dispositivo para el licuado de un tejido de un sujeto para facilitar el paso de un fármaco a través o dentro del tejido. El método y el dispositivo descritos anteriormente son aplicables no solo a la recolección de constituyentes del tejido sino también al suministro de fármacos. El dispositivo y el método implican aplicar energía y un medio de licuefacción a un tejido de interés de un sujeto, y suministrar un fármaco a través o dentro del sitio del tejido a licuar. La ventaja de usar la presente invención es 1) para proporcionar flujos más altos de fármacos en un tejido, y 2) para permitir un mayor control de los flujos en un tejido. Las fármacos que simplemente no pasarían a través de los tejidos tal como la piel y al sistema circulatorio son forzadas a través de los tejidos cuando se aplica el método.

Aunque la presente invención puede describirse junto con aplicaciones humanas, las aplicaciones veterinarias están dentro de la contemplación y el alcance de la presente invención.

DIAGNÓSTICO DEL TEJIDO

DISPOSITIVOS DE APLICACIÓN DE ENERGÍA

Los dispositivos de licuefacción de tejidos descritos en la presente descripción pueden describirse generalmente como que tienen una fuente/generador de energía acoplada operativamente a una unidad/carcasa de depósito, donde el depósito alberga un medio en el que se recolectan analitos y que, en la mayoría de las modalidades, facilita la transferencia de energía al tejido de interés y, por lo tanto, cuando se desee, puede facilitar la licuefacción de una muestra de tejido. En uso, la carcasa del depósito se coloca en contacto con el tejido del sujeto para hacer contacto

entre el medio y el tejido, y se activa la fuente de energía. El dispositivo puede acoplarse operativamente a fuentes de energía adicionales (por ejemplo, actuador abrasivo, transductor piezoeléctrico, succión o presión), que también pueden aplicarse al tejido para facilitar la transferencia de energía al tejido. A medida que se aplica energía al tejido, los constituyentes del tejido se solubilizan por la energía y se recolectan en el medio. El medio puede retenerse en la carcasa del depósito, o alternativamente puede transferirse a un contenedor separado. El depósito o la carcasa del contenedor puede acoplarse operativamente a un dispositivo de detección que puede medir cuantitativamente los constituyentes del tejido presentes en el medio.

La energía puede aplicarse al tejido desde una sola fuente de energía o desde una combinación de fuentes. Las fuentes de energía ilustrativas incluyen mecánica (por ejemplo, abrasión, cizallamiento, vacío, presión y similares), transductor piezoeléctrico, ultrasonido, energía óptica (por ejemplo, láser), térmica y eléctrica. La intensidad de la energía aplicada, así como también la duración de la aplicación de energía, pueden ajustarse apropiadamente para el tejido particular de interés y la aplicación particular del método. La intensidad de la energía y la duración de la aplicación también pueden ajustarse de manera apropiada según el medio promotor de licuefacción particular (LPM) usado en relación con la energía. En algunas modalidades, se proporciona un tiempo de exposición a la energía de más de 1 minuto, de más de 90 segundos o de más de 2 minutos para producir una muestra de tejido licuado adecuada. La magnitud de la energía depende del analito de interés y de la selección del LPM. Se requieren energías más altas para licuar los tejidos en ausencia de surfactantes o partículas en el LPM. El uso de altas energías está limitado por sus efectos adversos sobre el tejido o sus constituyentes. Un efecto adverso significativo es el daño al tejido perjudicial. Por lo tanto, en algunas modalidades, podría ser necesario incorporar ciertos componentes del dispositivo que proporcionan un monitoreo temporal (idealmente, en tiempo real) del cambio en las propiedades del tejido o el grado de licuefacción del tejido de manera que, una vez que se alcanza el límite seguro para la exposición a la energía, el dispositivo puede detenerse. La evaluación temporal puede realizarse antes, durante y después del proceso de licuefacción. En ciertas modalidades, la evaluación temporal se realiza mediante medios electroquímicos (por ejemplo, conductividad eléctrica del tejido, medición de ciertos iones mediante electrodos selectivos de iones, etc.), bioquímicos (por ejemplo, medición de ciertos componentes del tejido en el LPM mediante ensayos enzimáticos como ELISA y similares) u ópticos (por ejemplo, medición de turbidez del LPM por espectrofotómetro, etc.). En una modalidad ilustrativa, la conductividad eléctrica temporal del tejido se mide aplicando una tensión eléctrica de AC predefinida a través del tejido con un generador de señal, y analizando la corriente eléctrica resultante mediante un multímetro. Otro efecto adverso significativo de la exposición a alta energía se atribuye a la elevación de la temperatura en el tejido, también conocido como efectos térmicos. Por lo tanto, en algunas modalidades, podría ser necesario incorporar un elemento para detectar la temperatura (por ejemplo, un termopar) que permita monitorear la temperatura del tejido y/o del LPM, facilitando el juicio de una cantidad segura de exposición de energía al tejido.

El nivel de energía necesario se reduce significativamente mediante la selección adecuada del LPM. Por ejemplo, el uso de solo solución salina junto con ultrasonido resultó en la recuperación de menos de 0,1 mg de proteína por cm² de piel. Por otro lado, la incorporación de surfactantes tales como DPS, NLS y Brij-30 a una concentración del 1 % p/v en el LPM aumentó la recuperación de proteínas a más de 0,6 mg por cm² de piel.

En ciertas modalidades, el uso de energía para licuar el tejido puede conducir a la reducción de la actividad biológica de los constituyentes del tejido solubilizado, lo que requiere la selección del LPM que preserven adecuadamente la bioactividad de las moléculas del tejido, así como también que ayude a la solubilización del tejido. Por ejemplo, la incorporación de uno o más surfactantes como DPS, NLS y Brij-30 a una concentración del 1 % p/v en el LPM facilitó la preservación completa de la bioactividad de proteínas solubles y ácidos nucleicos bajo exposición a energía ultrasónica.

En ciertas modalidades, la energía puede aplicarse a un tejido mediante el uso de una cámara de suministro de energía que incluye un elemento productor de energía. La cámara, cuando se coloca sobre el tejido, expone el tejido al elemento productor de energía y permitirá que la energía se aplique al tejido con una mínima interferencia. Tal cámara puede contener el LPM y proporcionar el contacto del LPM con el tejido de manera que, tras la aplicación de energía, los constituyentes del tejido puedan recolectarse directamente en la solución.

En ciertas modalidades, la cámara de suministro de energía que contiene el LPM puede comprender además un dispositivo de diagnóstico, por ejemplo, un sensor de analito, para detectar y, opcionalmente, cuantificar analitos que pueden estar presentes en el LPM. Estos dispositivos de diagnóstico pueden servir como sensores químicos, biosensores o pueden proporcionar otras mediciones para formar un sistema completo de muestreo y medición. Un elemento que tiene un canal interno para la transferencia de fluido puede fabricarse junto con un sensor para formar una unidad desechable. El dispositivo puede adaptarse además para incluir o proporcionarse como una unidad desechable que proporciona la recolección de analitos en el LPM para su análisis.

Alternativamente, el elemento de diagnóstico puede ubicarse en otro lugar (por ejemplo, separado del dispositivo de energía) y los contenidos de la cámara de suministro de energía en contacto con el tejido pueden bombearse mediante el uso de fuerzas mecánicas, fuerzas capilares, ultrasonido, vacío o fuerzas electroosmóticas en una cámara de detección y análisis.

En ciertas modalidades, por ejemplo, cuando se evalúan formulaciones tópicas o se determinan parámetros farmacológicos, la unidad puede construirse para funcionar como una unidad de suministro de fármacos de lazo cerrado, que incluye medios de suministro de fármacos, medios de recuperación de analitos, medios de detección para medir el analito y medios de control para proporcionar una señal a los medios de suministro de fármacos.

Aquí se describe un ejemplo del funcionamiento general de un dispositivo de analito asistido por energía. Una unidad desechable portátil se inserta en un generador de energía portátil o de mesa. El generador de energía puede incluir además circuitos para mediciones de resistencia de tejidos, mediciones de concentración de analitos y visualización de mediciones de concentración de analitos. El sistema (por ejemplo, unidad desechable y aplicadora de energía) se coloca contra el tejido, y la energía se aplica durante un cierto período de tiempo, ya sea solo o en combinación con otras fuerzas físicas, mecánicas, eléctricas y químicas. El tejido de interés se licua, y los analitos del tejido licuado se recolectan en la unidad desechable y se miden mediante el uso de ensayos apropiados.

La modalidad preferida de la presente invención y sus ventajas se entienden mejor haciendo referencia a las FIGURAS de la 1 a la 19 de los dibujos, donde se usan números similares para partes similares y correspondientes de los diversos dibujos.

Con referencia a las FIGURAS de la 1a a la 1g, se muestran la estructura, los componentes y el funcionamiento de los dispositivos de licuefacción de tejidos basados en energía abrasiva. Los paneles del a al c de la FIGURA 1 muestra el funcionamiento secuencial de un dispositivo que usa un componente abrasivo giratorio 101 como medio para aplicar energía a los tejidos para su licuefacción. La licuefacción se logra colocando y configurando el componente abrasivo 101 en movimiento contra un tejido de interés 107. El componente abrasivo 101 se acopla a un eje 102, que está conectado además a un motor giratorio 103 en el dispositivo. En algunas modalidades, el eje 102 se diseña para detectar y controlar la presión aplicada por el componente abrasivo 101 sobre el tejido 107. En una modalidad ilustrativa, el eje 102 se construye del eje 1021 y el eje 1022 que están conectados entre sí por un resorte sensible a la presión 1023 (FIGURA 1d). En otra modalidad, el eje 1021 y el eje 1022 emparedan entre ellos un cristal piezoeléctrico sensible a la presión para monitorear y controlar la presión aplicada al tejido 107. Un paquete de batería 104 alimenta el motor 103, que subsecuentemente puede establecer el componente abrasivo 101 en movimiento giratorio cuando lo indique el operador del dispositivo. Antes de la licuefacción, el componente abrasivo 101 se diseña para mantenerse aislado contra el tejido 107 mediante el uso de una carcasa 105, y específicamente, una lámina delgada 106 ubicada en la base de la carcasa 105 (FIGURA 1a). Al iniciarse el proceso de licuefacción, los LPM almacenados en un cartucho 108 se transfieren a la carcasa 105 (FIGURA 1a), con lo cual los LPM contactan la superficie del material en lámina 106, seguido de poner el componente abrasivo 101 en movimiento contra la lámina 106. El material de la lámina 106 se elige de manera que pueda desgastarse rápidamente por el componente abrasivo 101, permitiendo que el LPM y el componente abrasivo 101 entren en contacto con el tejido 107 conduciendo a la licuefacción del tejido (FIGURA 1b). Los ejemplos no limitativos de la lámina 106 incluyen una lámina de papel, una lámina de caucho, una lámina de metal, una lámina de plástico o cualquier lámina soluble en agua. Al terminar el proceso de licuefacción, el motor 103 se detiene y los LPM que contienen los constituyentes del tejido se transfieren a un contenedor de muestra 110 (FIGURA 1c) [la muestra no licuada no se muestra claramente en 110, por lo que necesitaría una figura revisada]; o directamente en un contenedor preaspirado (evitando así la necesidad de la bomba de succión 109 y el contenedor 110). Cuando no hay un contenedor preaspirado, la recolección de la muestra se facilita mediante una bomba de succión 109.

En algunas modalidades, ciertos componentes del dispositivo se diseñan como unidades desechables de manera que, después de cada uso del dispositivo, estos componentes pueden reemplazarse para permitir el uso estéril. Tales componentes pueden incluir la carcasa 105, el componente abrasivo 101, el cartucho 108, el contenedor de muestra 110 y otros componentes del dispositivo de manejo de fluidos, según se considere necesario para mantener la esterilidad del dispositivo. Alternativamente, en algunas modalidades, todo el dispositivo puede hacerse desechable.

En ciertas modalidades, el cartucho de almacenamiento del LPM 108 puede reemplazarse con un ensamble de esponja-fuelle para almacenar y liberar el LPM. Los paneles del e al g de la FIGURA 1 muestra el funcionamiento secuencial de tal dispositivo. Una carcasa flexible en forma de fuelle 112 contiene una esponja 111 rellena con el LPM (FIGURA 1e). A medida que el dispositivo se empuja contra el tejido 107, la carcasa de esponja-fuelle se aprieta para liberar el LPM y el componente abrasivo 101 se pone en movimiento (FIGURA 1f). Al terminar el proceso de licuefacción, el motor 103 se detiene y el LPM que contiene los componentes del tejido se transfieren a un contenedor de muestra 110 (FIGURA 1g). La recolección de la muestra se facilita por una bomba de succión 109. Alternativamente, en algunas modalidades, la bomba de succión 109 y el contenedor 110 pueden evitarse recolectando la muestra en la esponja levantando el dispositivo nuevamente a su posición original.

Con referencia a las FIGURAS 2a y 2b, se muestran la estructura y los componentes de los dispositivos de licuefacción de tejido móviles diseñados para el muestreo continuo de una gran área de tejido. El panel a de la FIGURA 2 muestra un dispositivo que usa un componente abrasivo giratorio 201 como medio para aplicar energía a los tejidos para la licuefacción. La licuefacción se logra colocando y configurando el componente abrasivo 201 en movimiento contra un tejido de interés 207. El componente abrasivo 201 se acopla a un eje 202, que está conectado además a un motor giratorio 203 en el dispositivo. En algunas modalidades, el eje 202 se diseña para detectar y

controlar la presión aplicada por el componente abrasivo 201 sobre el tejido 207. En una modalidad ilustrativa, el eje 202 se construye de dos ejes distintos que están conectados entre sí mediante un resorte sensible a la presión o un cristal piezoeléctrico sensible a la presión para controlar y controlar la presión aplicada al tejido 207. Un paquete de batería 204 alimenta el motor 203, que subsecuentemente puede establecer el componente abrasivo 201 en movimiento giratorio cuando lo indique el operador del dispositivo. Una vez que el dispositivo se coloca contra el tejido 207, se inicia un procedimiento de licuefacción continua mediante la realización de tres procesos claves: el LPM almacenado en un cartucho 208 se suministra continuamente a la carcasa 212 en la interfaz dispositivo-tejido; el componente abrasivo 201 se pone en movimiento contra el tejido 207; y la muestra de tejido licuado se recolecta continuamente en un contenedor de muestra 210 mediante el uso de una bomba de succión 209. El dispositivo puede moverse de manera que superficies de tejido adicionales se expongan al dispositivo y se licúen. Cuando se desee, el proceso de licuefacción puede detenerse apagando el motor 103 y puede accederse a la muestra acumulativa de tejido desde el contenedor 210.

En algunas modalidades, pueden usarse componentes adicionales del dispositivo para evitar fugas del LPM desde la carcasa 212 debido al movimiento del dispositivo sobre la superficie del tejido. En una modalidad ilustrativa, la bomba de succión 209 puede usarse para crear un sello asistido por vacío entre el tejido 207 y la cámara 206 ubicada en una carcasa con bridas 205 alrededor del dispositivo.

El panel b de la FIGURA 2 muestran un dispositivo que usa un elemento piezoeléctrico 251 como medio para aplicar energía mecánica a los tejidos para la licuefacción. El elemento piezoeléctrico 251 se coloca en una carcasa 252 que interactúa con un tejido de interés 259, y la licuefacción se logra activando el elemento piezoeléctrico 251 con el LPM presente como fluido de acoplamiento entre el tejido 259 y el elemento piezoeléctrico 251. El elemento piezoeléctrico 251 es un transductor de energía eléctrica, que se le suministra por medio de un circuito colocado en un tubo flexible 253. Durante la licuefacción, se suministra el LPM a la carcasa 252 a través de un tubo flexible 254 mediante el uso de un sistema de inyección controlado por el operador 256. La muestra de tejido licuado puede recolectarse simultáneamente de la carcasa 252 a un contenedor de muestra 257 mediante el uso de un tubo flexible 255. La recolección de muestras es facilitada por una bomba de succión 258 que está conectada en serie al contenedor de muestras 257. En algunas modalidades, la presión de succión creada en la carcasa 252 por la bomba de succión 258 puede proporcionar un sellado efectivo entre la carcasa 252 y el tejido 259 para evitar fugas del LPM desde la carcasa 252 durante la licuefacción. En algunas modalidades, la presión de succión creada en la carcasa 252 por la bomba de succión 258 puede proporcionar una fuente adicional de energía para la licuefacción.

En algunas modalidades, la carcasa 252 puede moverse para licuar superficies de tejido adicionales y recolectar una muestra que representa los constituyentes del tejido acumulados de diversas superficies de tejido. En tal dispositivo, el LPM se suministra continuamente a la carcasa 252 por medio del tubo 254 y la muestra se recolecta continuamente por el tubo 255.

En ciertas modalidades, el dispositivo en la FIGURA 2b puede funcionar sin un elemento piezoeléctrico 251. En esta modalidad, el LPM que fluye desde un tubo 254 hacia la carcasa 252 hace contacto con el tejido y licua el tejido. El tejido licuado se recolecta de la carcasa mediante tubos 255. La carcasa puede moverse continua o intermitentemente para recolectar muestras de un área grande de tejido. El dispositivo puede tener medios adicionales que son prácticamente necesarios para permitir el movimiento del dispositivo sobre un tejido, la licuefacción del tejido y la recolección del tejido licuado. En ciertas modalidades, puede usarse presión o vacío, pero no ambos, para dirigir el LPM hacia el tejido y recolectar el tejido licuado.

En ciertas modalidades, los dispositivos de licuefacción pueden integrarse con una sonda de diagnóstico tal como endoscopio, colonoscopio, laparoscopio y similares.

Con referencia a las FIGURAS de la 3a a la 3c, se muestran la estructura y los componentes de los dispositivos de licuefacción que usan un componente abrasivo oscilante como medio para aplicar energía a los tejidos para la licuefacción. Con referencia a la FIGURA 3a, la licuefacción se logra colocando y configurando el componente abrasivo 301 en movimiento contra un tejido de interés 311. El movimiento lineal puede lograrse, por ejemplo, mediante un arreglo de piñón y cremallera (FIGURA 3a). Específicamente, el componente abrasivo 301 se acopla a una cremallera 302, que se desliza en un movimiento oscilatorio lineal mediante el uso de un engranaje circular 303 (piñón). El engranaje 303 se acciona en un movimiento circular oscilatorio por un motor 304. Un paquete de batería 305 alimenta el motor 304. En algunas modalidades, el motor 304 es un servomotor que puede requerir un controlador electrónico de microchip 306 para producir un movimiento circular oscilatorio. Antes de la licuefacción, el componente abrasivo 301 se diseña para mantenerse aislado contra el tejido 311 mediante el uso de una carcasa 307, y específicamente, una lámina delgada 308 ubicada en la base de la carcasa 307. El LPM puede almacenarse previamente en la carcasa 307, por ejemplo, para que esté en contacto con 308. En algunas modalidades, el LPM puede transferirse a la carcasa 307 desde un cartucho ubicado en otra parte en el dispositivo. El proceso de licuefacción se inicia al configurar el componente abrasivo 301 en un movimiento lineal contra la lámina 308. El material de la lámina 308 se elige de manera que pueda desgastarse rápidamente por el componente abrasivo 301, permitiendo que el LPM y el componente abrasivo 301 entren en contacto con el tejido 311, lo que conduce a la licuefacción del tejido. Los ejemplos no limitativos de la lámina 311 incluyen una lámina de papel, una lámina de caucho, una lámina de metal, una lámina de plástico o cualquier lámina soluble en agua. Al terminar el proceso de

licuefacción, el motor 304 se detiene y el LPM que contiene los constituyentes del tejido se transfieren a un contenedor de muestra 309. La recolección de la muestra se facilita por una bomba de succión 310. En ciertas modalidades, la muestra puede recolectarse directamente en un contenedor preaspirado, evitando la necesidad de la bomba de succión 310 y el contenedor 310.

En algunas modalidades, ciertos componentes del dispositivo se diseñan como unidades desechables de manera que, después de cada uso del dispositivo, estos componentes pueden reemplazarse para permitir el uso estéril. Tales componentes pueden incluir la carcasa 307, el componente abrasivo 301, el contenedor de muestra 309 y otros componentes del dispositivo de manejo de fluidos, según se considere necesario para mantener la esterilidad del dispositivo. Alternativamente, en algunas modalidades, todo el dispositivo puede hacerse desechable.

En algunas modalidades, el movimiento oscilatorio lineal del componente abrasivo 301 puede generarse por otro mecanismo tal como mediante el uso de motores lineales, actuadores de movimiento lineal, ensamble de tornillo de bolas, ensamble de tornillo de guía, ensamble de tornillo de elevación y otros dispositivos para traducir el movimiento de rotación a movimiento lineal.

En algunas modalidades, un sistema único de cremallera y piñón como se describió en la FIGURA 3a puede reemplazarse con un arreglo de múltiples engranajes y una correa como se ilustra en la FIGURA 3b. Específicamente, una correa 327 (no está claro dónde está la correa en la figura, necesita una figura revisada) se monta en los engranajes 321, 322, 323, 324, 325 y 326. Un componente abrasivo 328 se acopla a la correa 327 y se configura en un movimiento oscilatorio lineal cuando el engranaje 321 se acciona por el motor 304 en un movimiento de rotación oscilatorio. Mientras que los engranajes 321, 322 y 326 están fijados a la carcasa del dispositivo, los engranajes 323, 324 y 325 están montados en el eje 328. El eje 328 está fijado a la carcasa del dispositivo. En algunas modalidades, el eje 328 tiene una longitud flexible de manera que, cuando el componente abrasivo 328 se presiona contra una superficie de tejido no plana, los ejes 328 acoplados con los engranajes 323, 324 y 325 pueden ajustar sus longitudes para hacer que el componente abrasivo 328 contornee con la superficie del tejido no plano. Adicionalmente, el eje 328 puede diseñarse para detectar y controlar la presión aplicada por el componente abrasivo 328 sobre la superficie del tejido. En una modalidad ilustrativa, el eje 328 está construido por eje 3281 y el eje 3282 que están conectados entre sí por un resorte sensible a la presión 3283 (FIGURA 3c).

Con referencia a las FIGURAS de la 4a a la 4g, se describen varios diseños de componentes abrasivos usados en dispositivos, métodos y sistemas descritos en esta invención. La FIGURA 4a ilustra un componente abrasivo que comprende una lámina de material abrasivo con grosor uniforme. Ejemplos no limitativos de material abrasivo con grosor uniforme incluyen tela, cristales abrasivos (por ejemplo, cuarzo, metal, sílice, carburo de silicio, polvo y derivados de aluminio (tal como AlO_2), polvo de diamante, esponja polimérica y natural, y similares, etc. En algunas modalidades, puede ser ventajoso diseñar un componente abrasivo con abrasividad heterogénea, por ejemplo, aquellos que tienen variación espacial de la abrasividad. En una modalidad ilustrativa, el componente abrasivo es un disco con un gradiente de abrasividad que varía de alta abrasividad en el centro del disco a baja abrasión en la periferia del disco (FIGURA 4b). En algunas modalidades, la forma del componente abrasivo puede variarse a una geometría no plana. En modalidades ilustrativas, la FIGURA 4c muestra un componente abrasivo con una superficie lisa y redonda que mira hacia el tejido (la relación de aspecto, definida como la relación de altura y ancho, puede variar de 10 a 0,1), y la FIGURA 4d muestra un componente abrasivo circular en forma de anillo. Las FIGURAS de la 4e a la 4g muestran modalidades de componentes abrasivos que usan un cepillo como medio para la abrasión del tejido. La FIGURA 4e ilustra un componente abrasivo que comprende un cepillo con cerdas de altura y abrasividad uniformes. En algunas modalidades, el componente abrasivo comprende un cepillo con cerdas de altura y/o abrasividad diferentes. La FIGURA 4f muestra una modalidad ilustrativa de un cepillo circular en forma de disco con cerdas de alta abrasividad en el centro rodeadas de cerdas con baja abrasividad en la periferia del disco. La FIGURA 4g muestra una modalidad ilustrativa de un cepillo con cerdas de diferentes longitudes que forman una superficie lisa y redonda que mira hacia el tejido (la relación de aspecto, definida como la relación de altura y ancho del componente abrasivo, puede variar de 10 a 0,1).

Con referencia a las FIGURAS de la 5a a la 5d, se describen componentes del dispositivo para medir la conductividad eléctrica de un tejido. Mientras que la exposición a alta energía licua favorablemente los tejidos, su uso puede conducir a efectos adversos significativos, tal como daño perjudicial del tejido. Por lo tanto, en algunas modalidades, podría ser necesario incorporar ciertos componentes del dispositivo que proporcionan un monitoreo temporal (idealmente, en tiempo real) del cambio en las propiedades del tejido, por ejemplo, la conductividad eléctrica del tejido, de manera que, una vez que el límite seguro para la exposición a la energía sea alcanzado, el dispositivo puede detenerse. La medición y monitoreo temporal de la conductividad eléctrica del tejido durante el proceso de licuefacción puede realizarse aplicando una tensión eléctrica de AC predefinida a través del tejido de interés 503 mediante el uso de un electrodo de medición 501 colocado en el tejido 503 y un electrodo de referencia 502 colocado en los alrededores de la región en el tejido 503 que se está licuando. La corriente eléctrica resultante a través de los dos electrodos, medida por un amperímetro 504, puede tomarse como una medida de la conductividad eléctrica del tejido. En algunas modalidades, el electrodo de medición 501 se mantiene en contacto eléctrico con el LPM, o directamente con la región en el tejido 503 que se está licuando. En una modalidad, el electrodo de medición 501 está ubicado como un revestimiento de la superficie interna de la carcasa 509 del LPM (FIGURA 5a). En ciertas modalidades, el electrodo de medición es un contacto deslizante 506 que está sujeto a un eje motorizado 510

sumergido en LPM (FIGURA 5b). La corriente eléctrica se transmite mediante el contacto deslizante 506 a un espárrago aislado 505 asegurado en la carcasa del dispositivo. En algunas modalidades, el electrodo de referencia 502 es una extensión de la carcasa 509 del LPM y se coloca en la cercanía periférica de la región en el tejido 503 que se está licuando (FIGURA 5a y FIGURA 5b). En algunas modalidades, el electrodo de referencia es un electrodo cilíndrico de mano 507 que está conectado eléctricamente con los componentes de medición de conductividad eléctrica ubicados en el dispositivo de licuefacción (FIGURA 5c). En algunas modalidades, el electrodo de referencia es un electrodo de parche 508 que está conectado eléctricamente con los componentes de medición de conductividad eléctrica ubicados en el dispositivo de licuefacción (FIGURA 5d).

Con referencia a las FIGURAS de la 6a a la 6g, se describen la estructura, los componentes y el funcionamiento de los dispositivos que usan licuefacción de tejidos a base de microagujas. Los dispositivos basados en microagujas aplican energía a los tejidos a través de la ruptura mecánica de los componentes del tejido que se logra principalmente al empujar las microagujas dentro del tejido. La FIGURA 6a muestra el diseño básico de un parche de microagujas 601 que lleva una multitud de microagujas 602 que están precargadas con el LPM 613. El parche de microagujas 601 puede insertarse en el tejido de interés permitiendo la ruptura y disolución de los componentes del tejido en el LPM 613. El LPM 613 puede aspirarse más tarde del parche 601 para el análisis de diagnóstico.

Puede aplicarse energía adicional para la licuefacción mediante el movimiento subsecuente a la inserción de las microagujas dentro del tejido. La FIGURA 6b ilustra un componente vibratorio 603 que puede asegurarse en el parche de microagujas 601, que después de la inserción del parche 601 en el tejido puede activarse para sacudir vigorosamente las microagujas 602 dentro del tejido. El componente vibratorio 603 contiene una multitud de vibradores mecánicos 6031 y una placa de circuito electrónico que funciona con baterías 6032 para alimentar y controlar el movimiento de vibradores mecánicos en las direcciones deseadas. En una modalidad ilustrativa, los vibradores mecánicos 6031 pueden hacerse vibrar en direcciones paralelas y perpendiculares al eje de las microagujas 602.

En algunas modalidades, el movimiento de las microagujas después de la inserción puede producirse por el movimiento de cada microaguja 602 con respecto al parche 601. La FIGURA 6f describe un electroimán 612 colocado en la parte superior del parche 601. El electroimán 612 puede usarse para producir un movimiento oscilatorio de cada microaguja 602 a lo largo de su eje. Esto puede lograrse sujetando un imán 611 en la parte superior de cada microaguja 602, de manera que el imán 611 responda a un perfil de polaridad alterna del electroimán 612 que conduce al movimiento lineal oscilatorio de las microagujas 602. En ciertas modalidades, puede desearse el movimiento giratorio de las microagujas. Los electroimanes 6121, 6122, 6123 y 6124 se colocan simétricamente alrededor del parche 601 (FIGURA 6g). El imán 611 acoplado en la parte superior de cada microaguja 602 responde al perfil de polaridad alterna del electroimán 6121, 6122, 6123 y 6124 que conduce al movimiento giratorio de las microagujas 602.

En la FIGURA 6b-6e, la energía adicional para la licuefacción puede aplicarse además mediante el movimiento forzado del LPM en el tejido mediante el uso de una inyección activa y extracción del LPM a través de las microagujas. Una carcasa 604 colocada en el dispositivo puede contener un contenedor de aire comprimido 605 que puede usarse para forzar que el LPM contenido en el parche 601 fluya dentro del tejido. Puede usarse una bomba de succión 606 en la carcasa 604 para aplicar vacío para extraer el LPM del tejido. En algunas modalidades, el contenedor de aire comprimido 605 y la bomba de succión 606 pueden usarse alternativamente para una inyección repetida y una extracción del LPM del tejido para una licuefacción mejorada. Una placa de circuito electrónico que funciona por baterías 607 en la carcasa 604 se usa para alimentar y controlar el contenedor de aire comprimido 605 y la bomba de succión 606. En algunas modalidades, la bomba de succión 606 puede conectarse adicionalmente a un contenedor de muestra para aspirar y transferir la muestra de tejido licuado desde el parche 601 al contenedor de muestra. En ciertas modalidades, la carcasa 604 puede reemplazarse por una tapa elástica flexible 608 (véase la FIGURA 6d) montada en la parte superior del parche 601. La tapa flexible 608 puede repetirse empujándola hacia adentro y hacia afuera, por ejemplo, empujando con un dedo, de manera que se inyecta y retira repetidamente el LPM del tejido a través de las microagujas 602.

Las microagujas 602 pueden recubrirse con una sustancia 610 para mejorar la licuefacción del tejido (FIGURA 6e). En algunas modalidades, la sustancia 610 es un material abrasivo que puede ayudar a mejorar la ruptura de los constituyentes del tejido y su disolución más rápida en el LPM. En algunas modalidades, la sustancia 610 es una enzima que puede escindir componentes específicos del tejido tales como la matriz extracelular para una mejor licuefacción del tejido. En algunas modalidades, la sustancia 610 es una molécula que se une específicamente a analitos del tejido de interés que conduce a una recuperación mejorada del analito del tejido. En una modalidad ilustrativa, la sustancia 610 es un anticuerpo.

Con referencia a la FIGURA 6, en algunas modalidades, ciertos componentes del dispositivo pueden diseñarse como desechables de manera que, después de cada uso del dispositivo, estos componentes puedan reemplazarse para permitir el uso estéril. Tales componentes pueden incluir el parche de microagujas 601, las microagujas 602, el contenedor de aire comprimido 605, la bomba de succión 606 y otros componentes del dispositivo de manejo de fluidos, según se considere necesario para mantener la esterilidad del dispositivo. Alternativamente, en algunas modalidades, todo el dispositivo puede hacerse desechable.

MEDIO PROMOTOR DE LICUEFACCIÓN (LPM)

El LPM puede diseñarse para servir uno o más de los siguientes cuatro propósitos: a) facilita la dispersión de tejidos en sus constituyentes, b) actúa como un medio para recolectar constituyentes del tejido licuado, y c) inhibe la degradación de los constituyentes de la muestra de manera que su actividad química o biológica sea retenida (por ejemplo, preservando la conformación estructural de varias moléculas y preservando la capacidad de multiplicación de los microbios de la muestra), y d) garantiza la compatibilidad con las técnicas analíticas subsecuentes.

En general, el LPM comprende un solvente, tal como soluciones acuosas (por ejemplo, Tris-HCl, solución salina tamponada con fosfato, etc.) o líquidos orgánicos ("no acuosos") (por ejemplo, DMSO, etanol y similares), que adicionalmente pueden contener una variedad de agentes promotores de la licuefacción, que incluyen, entre otros, surfactantes (no iónicos, aniónicos o catiónicos), ácidos grasos, moléculas similares a las azonas, agentes quelantes (por ejemplo, EDTA, etc.), compuestos inorgánicos y sustancias abrasivas. El "agente promotor de la licuefacción", tal como se usa en la presente descripción, se refiere a un componente de un LPM que puede facilitar la licuefacción de una muestra de tejido y/o la solubilización de los constituyentes del tejido. En dependencia del tipo de tejido y los analitos de interés, los constituyentes del LPM pueden seleccionarse racionalmente en función de los criterios descritos anteriormente. Por ejemplo, un tejido delicado, tal como la membrana mucosa, puede licuarse con una solución salina con un mínimo o ningún surfactante, mientras que los tejidos queratinizados, tal como la piel, requerirán componentes adicionales, tal como los surfactantes.

Los agentes promotores de la licuefacción dentro del LPM pueden comprender una variedad de componentes adecuados, que incluyen, pero sin limitarse: agua, tris-HCl, solución salina (solución salina tamponada con fosfato (PBS) y solución salina tamponada con tris (TBS)), alcoholes (incluyendo etanol e isopropanol (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 10-100 % en solución acuosa)), sustancias abrasivas, tal como polvo o derivados de sílice, óxido de aluminio o carburo de silicio (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 0,01-99 % (p/v) en solución a base de agua), surfactantes, tal como Brij (varias longitudes de la cadena, por ejemplo, Brij-30), sulfato de propano 3-(decil dimetil amonio) (DPS), sulfato de propano 3-(dodecil dimetil amonio) (DDPS), N-lauroil sarcosina (NLS), Triton X-100, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) y Lauril Sulfato de Sodio (SLS), surfactante HCO-60, Hidroxipolietoxidodecano, Sarcosina lauroil, Nonoxinol, Octoxinonato, Fenileno, Polioleatos, Laurato de sodio, Oleato de sodio, Dilaurato de sorbitano, Dioleato de sorbitano, Monolaurato de sorbitano, Monooleatos de sorbitano, Trilaurato de sorbitano, Trioleato de sorbitano, Span 20, Span 40, Span 85, Sinperonic NP, Tweens, Alquilsulfatos de sodio y Haluros de alquilamonio, (por ejemplo, en concentraciones que oscilan entre el 0,01-20 % en solución a base de agua), DMSO (por ejemplo, en un intervalo de concentración entre el 0,01-20 % en solución a base de agua), ácidos grasos como el ácido linoleico (por ejemplo, en un intervalo de concentración entre el 0,1-2 % en etanol:agua (50:50), azona (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 0,1-10 % en etanol:agua (50:50), polietilenglicol (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 10-50 % en solución a base de agua), histamina (por ejemplo, en una concentración intervalo del 10-100 mg/ml en solución a base de agua), EDTA (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 1-100 mM) e hidróxido de sodio (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 1-100 mM). En algunas modalidades, el LPM puede contener surfactantes distintos de TWEEN, CTAB, SPAN o Alquilsulfatos de sodio. En algunas modalidades, el LPM puede contener surfactantes distintos de los surfactantes catiónicos. Cuando el LPM incluye un surfactante, la concentración total del surfactante (p/v) en el LPM puede variar de al menos del 0,5 % al 10 %, y puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 2,5 % o aproximadamente 3 %.

El LPM puede incluir agentes que faciliten la preservación de la bioactividad de un analito de interés. Por ejemplo, el LPM puede contener captadores de radicales libres (por ejemplo, antioxidantes (por ejemplo, polifenol, betacaroteno, luteína, licopeno, selenio, etc.), vitamina A, vitamina C, vitamina E, alfa-tocoferol, hidroxitolueno butilado, benzoato de sodio, formiato de sodio y similares); agentes antiespumantes (por ejemplo, agentes antiespumantes de silicona o no silicona tales como dimetilpolisiloxano, aceite de hidrocarburo, diglicérido con bajo contenido de ácidos grasos y similares); y protectores contra cizalladuras (por ejemplo, polietilenglicol, alcohol polivinílico, plurónico F68 y similares). La "bioactividad", tal como se usa en el contexto de un analito, se refiere a una conformación estructural que facilita la detección (por ejemplo, tal como un epítipo unido por un anticuerpo específico u otra característica estructural que es sensible a la desnaturalización), y puede incluir además una actividad biológica de un analito (por ejemplo, actividad enzimática).

Los LPM de interés particular son aquellos que contienen una combinación de surfactantes que, cuando se usan en relación con los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción, proporcionan un nivel deseado de constituyentes del tejido en el LPM mientras que proporcionan la preservación de la bioactividad de los analitos en el LPM, particularmente para proporcionar el mantenimiento de la conformación estructural de un analito (por ejemplo, evitar la desnaturalización de un analito de proteína).

El uso de diferentes combinaciones de surfactantes, incluida la combinación de surfactante no iónico, surfactante de ion híbrido y surfactante aniónico en el LPM, puede proporcionar niveles elevados de constituyentes del tejido en el LPM y una buena conservación de la bioactividad de un analito contenido en el LPM después del uso en dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción.

Los ejemplos no limitantes de surfactantes no iónicos de interés incluyen surfactantes de la serie Brij (por ejemplo, polietilenglicol dodecil éter (Brij 30), Polioxietileno 23-lauril éter (Brij 35), Polioxietileno 2-cetil éter (Brij 52), Polioxietileno 10- cetil éter (Brij 56), Polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58), Polioxietileno 2-estearil éter (Brij 72), Polioxietileno 10-estearil éter (Brij 76), Polioxietileno 20-estearil éter (Brij 78), Polioxietileno 2- oleil éter (Brij 92), Polioxietileno 10-oleil éter (Brij 96), Polioxietileno 100-estearil éter (Brij 700), Polioxietileno 21-estearil éter (Brij 721), y similares); Triton X (por ejemplo, Triton X-15, Triton X-45, Triton X-100, Triton X-114, Triton X-165, Triton X-200, Triton X-207, Triton X-305, Triton X-405, y similares); y sorbitano (por ejemplo, Span-20, Span-40, Span-60, Span-65, Span-80, Span-85 y similares).

Ejemplos no limitantes de surfactantes de ion híbrido de interés incluyen 3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato, 3-(dodecil dimetil amonio) propano sulfonato, sulfato de propano miristildimetil amonio, sulfato de propano hexadecildimetil amonio, ChemBetaine C, ChemBetaine Oleyl ACS, ChemBetaine Oleyl ACS, ChemBetaine Oleyl, ChemBetaine Oleyl, ChemBetaine Oleyl 3-(3-cholamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfonato.

Los ejemplos no limitantes de surfactantes aniónicos de interés incluyen sarcosina N-lauroil, Sarcosinato Cocoil de Sodio, Sarcosinato Miristoil de Sodio, Lauroilsarcosinato Isopropil, Sarcosinato Palmitoil de Sodio y Sarcosinato Lauroil Lauroanfodiacetato de Sodio.

En algunas modalidades, los surfactantes no iónicos se combinan con surfactantes de ion híbrido. En ciertas modalidades, los surfactantes no iónicos se combinan con surfactantes aniónicos. En estas modalidades, la relación entre el surfactante no iónico y el surfactante de ion híbrido o aniónico presente en el LPM puede ajustarse para lograr los resultados deseados. Las relaciones de interés no limitantes incluyen 25:75 no iónico:surfactante de ion híbrido, 50:50 no iónico:surfactante de ion híbrido, 75:25 no iónico:surfactante de ion híbrido, 25:75 no iónico:surfactante aniónico, 50:50 no iónico:surfactante aniónico y 75:25 no iónico:surfactante aniónico. Una mezcla de particular interés es una mezcla de surfactante 50:50 de un surfactante de la serie Brij (por ejemplo, Brij-30) y sarcosina N-lauroil (NLS). Otra mezcla de particular interés es una mezcla de surfactante 50:50 de un surfactante de la serie Brij (por ejemplo, Brij-30) y 3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato (DPS). Como se ilustra en los Ejemplos a continuación, estas combinaciones de surfactantes, cuando se incluyen en el LPM a una concentración de surfactante total del 0,5-1 % (p/v), proporcionaron la solubilización de un alto nivel de constituyentes del tejido según lo evaluado por la concentración de proteína total, y proporcionó la retención de bioactividad(según lo evaluado por la técnica ELISA).

En algunos casos específicos, por ejemplo, la colección de patógenos vivos, pueden usarse diferentes composiciones del LPM para lograr los resultados deseados. La solución salina y el tris-HCl se usaron como LPM para proporcionar la recolección de una amplia variedad de bacterias residentes en la piel y, adicionalmente, estos microbios se mantuvieron potentes para multiplicarse y crecer *ex vivo*. En algunas modalidades, un LPM puede contener un medio de caldo de enriquecimiento para soportar el crecimiento de microbios de muestra. Algunas de las bacterias anaerobias son sensibles a una atmósfera de oxígeno. En consecuencia, el LPM para recolectar bacterias anaerobias puede contener una atmósfera de nitrógeno e hidrógeno. Será evidente para el experto en la técnica al leer la presente descripción que las composiciones del LPM que varían en componentes pueden producirse fácilmente para su uso en aplicaciones específicas.

El LPM puede incluir además estabilizadores de analitos de interés, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de RNasa e inhibidores de DNasa, que pueden proporcionar la recolección y al menos el almacenamiento temporal de analitos con una degradación o pérdida mínima o nula de bioactividad. Otros ejemplos de agentes promotores de la licuefacción se describen en patente de Estados Unidos Núm. 5,947,921. Por ejemplo, el agente promotor de la licuefacción puede incluir surfactantes, partículas abrasivas y estabilizadores de biomoléculas.

En una modalidad ilustrativa, el LPM está compuesto de una solución de una mezcla al 1 % p/v de NLS y Brij-30 en PBS estéril. En otra modalidad ilustrativa, el LPM está compuesto de una solución de 0,5 % p/v de mezcla de DPS y Brij-30 en PBS estéril. En ciertas modalidades, específicamente donde los analitos son una o más proteínas, el LPM contiene un cóctel de inhibidor de proteasa del 1-10 % p/v (por ejemplo, número de catálogo: P8340, proporcionado por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En ciertas modalidades, el LPM es una solución salina. En ciertas modalidades, el LPM es una solución de tris-HCl.

El LPM puede incluir además agentes definidos como "potenciadores de la sensibilidad", que se usan para estabilizar analitos del tejido licuado y facilitar su análisis en términos de mejorar la sensibilidad y especificidad de las pruebas analíticas de diagnóstico. Según se considere necesario para lograr estos objetivos, los potenciadores de la sensibilidad pueden agregarse al LPM antes, durante o después del proceso de licuefacción de tejidos, o antes o durante el análisis de diagnóstico. Por ejemplo, el potenciador de la sensibilidad puede almacenarse previamente en un contenedor, y luego puede mezclarse la muestra de tejido licuado.

En modalidades típicas, los potenciadores de la sensibilidad están formulados de sustancias que actúan sinérgicamente con componentes específicos del LPM (como se describió anteriormente) para mejorar la sensibilidad de detección y la especificidad de los analitos de interés. En una modalidad ilustrativa, los potenciadores

de la sensibilidad están formulados de sustancias para prevenir la unión no específica de los analitos de proteínas presentes en la muestra de tejido a diversos sustratos de ensayo de diagnóstico, lo que da como resultado su detección sensible y específica. En algunas modalidades, los potenciadores de sensibilidad se formulan para estabilizar analitos de interés desactivando moléculas tales como proteasa, RNasa y DNasa. En algunos casos

específicos, los potenciadores de sensibilidad pueden formularse a partir de sustancias que activan las proteasas para evitar la unión no específica de ciertos analitos de interés con proteínas presentes en la muestra licuada. En algunas modalidades, los potenciadores de sensibilidad se usan para ajustar el estado fisiológico (por ejemplo, pH) de las muestras licuadas para facilitar el análisis aguas abajo de los analitos de interés.

En algunas modalidades, el potenciador de la sensibilidad puede comprender un solvente, tal como soluciones acuosas (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con tris, etc.) o líquidos orgánicos ("no acuosos") (por ejemplo, DMSO, etanol, fenol y similares), que pueden contener, adicionalmente, reactivos de bloqueo (por ejemplo, Tween 20, Triton X-100, albúmina de suero bovino, leche en polvo sin grasa, caseína, caseinato, gelatina de pescado, ácidos nucleicos de esperma sonicados y similares), estabilizadores tales como proteasa, inhibidores de proteasa, inhibidores de RNasa e inhibidores de DNasa, medios de caldo. En dependencia del tipo de tejido y analito de interés, los componentes del potenciador de sensibilidad pueden elegirse racionalmente. En una modalidad ilustrativa, para detectar ácidos nucleicos en un tejido queratinizado licuado tal como la piel, el potenciador de sensibilidad comprende 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris Cl (pH 8), 25 mM de EDTA (pH 8), SDS al 0,5 % y 0,1 mg/ml de proteasa K. En la presente descripción, la proteasa K puede no solo facilitar la licuefacción de la piel sino que también puede estabilizar los ácidos nucleicos al descomponer la DNasa y la RNasa, presentes en la muestra como un analito del tejido.

En algunas modalidades que implican la detección de analitos mediante un inmunoensayo, el potenciador de sensibilidad puede comprender una variedad de componentes adecuados que incluyen, pero no se limitan a: solvente (por ejemplo, agua, una solución tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, tris-HCl, solución salina tamponada con tris, etc.) y similares), un estabilizador tal como un inhibidor de proteasa y un reactivo de bloqueo tal como Tween 20, Triton X-100, albúmina de suero bovino (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 1-5 %), leche en polvo sin grasa (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 0,1-0,5 %), caseína o caseinato (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 1-5 %), gelatina de pescado (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 1-5 %). En una modalidad ilustrativa, el potenciador de sensibilidad para inmunoensayos se compone de una solución de BSA al 10 % y Tween 20 al 0,5 % en solución salina tamponada con Tris y se mezcla con la muestra del tejido en una relación de 1:10.

En algunas modalidades que implican la detección de ácidos nucleicos como analito de interés, el potenciador de sensibilidad puede comprender varios componentes adecuados que incluyen, pero no se limitan a: agua, una solución tampón (por ejemplo, TE, TAE, citrato de sodio, etc.), un agente quelante tal como EDTA, un estabilizador (por ejemplo, inhibidor de RNasa, inhibidor de DNasa, proteasa, fenol, sulfato de amonio, isotiocianato de guanidina, etc.), un surfactante tal como el dodecil sulfato de sodio y reactivos de bloqueo tal como los ácidos nucleicos de esperma sonicados, Tween 20, Triton X-100, albúmina de suero bovino (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 1-5 %), leche en polvo sin grasa (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 0,1-0,5 %), caseína o caseinato (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 1-5 %), gelatina de pescado (por ejemplo, en un intervalo de concentración del 1-5 %). En algunas modalidades, donde se desea la detección de ácidos nucleicos mediante el uso de tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debe elegirse el LPM para evitar la inclusión de inhibidores de PCR como LPA. En modalidades ilustrativas, el LPM compatible con PCR es tampón Tris-HCl, o tampón EDTA.

En algunas modalidades que implican microbios de detección como un analito de interés, el potenciador de sensibilidad puede comprender un medio de caldo de enriquecimiento para facilitar el crecimiento de microbios ex vivo. Algunas de las bacterias anaerobias son sensibles a una atmósfera de oxígeno. Por lo tanto, el potenciador de sensibilidad para recolectar bacterias anaerobias puede contener una atmósfera de nitrógeno e hidrógeno.

Otras formulaciones de potenciador de sensibilidad para un sistema de ensayo específico o un analito específico de interés serán evidentes para el experto en la técnica al leer la presente descripción.

En algunas modalidades, las propiedades térmicas (por ejemplo, temperatura, capacidad calorífica y similares) del LPM pueden manipularse antes o durante la licuefacción del tejido para reducir los efectos térmicos adversos de la exposición a la energía en el tejido y/o sus constituyentes. En una modalidad, la temperatura del LPM se mantiene lo suficientemente baja como para no inducir la fusión de los constituyentes del tejido. En otra modalidad ilustrativa, puede usarse un LPM preenfriado que tiene una temperatura inferior a la temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) para la licuefacción por ultrasonido. En otra modalidad ilustrativa, la temperatura del LPM puede reducirse continuamente durante la exposición a la energía transfiriendo su calor a un líquido preenfriado que fluye a través de una camisa de transferencia de calor acoplada al depósito que contiene el LPM.

ANALITOS

Puede detectarse una variedad de analitos (cualitativa o cuantitativamente) con los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción y, opcionalmente, caracterizados para proporcionar un perfil de analito del tejido en cuestión. Los ejemplos no limitantes incluyen: proteínas estructurales y de señalización (por ejemplo, queratinas (por ejemplo, queratinas básicas, queratinas ácidas), β -actina, interleucinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias, interferones, anticuerpos (IgE, IgG, IgA, IgD, IgM), biomarcadores de cáncer (por ejemplo, CEA y similares), proteínas de choque térmico (por ejemplo, Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90, etc.) y similares, lípidos (por ejemplo, colesterol), ceramidas (por ejemplo, ceramidas 1-6), ácidos grasos, triglicéridos, hidrocarburos de parafina, escualeno, ésteres de colesterol, diésteres de colesterol, ácidos grasos libres, lanosterol, colesterol, lípidos polares (por ejemplo, derivados de glucosilo y fosfolípidos), y similares, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y ADN), moléculas pequeñas (por ejemplo, aminoácidos libres, lactato, moléculas de fármacos liberados exógenamente, contaminantes ambientales, agentes de guerra y similares) y microorganismos (por ejemplo bacterias, hongos, virus y similares). Estos analitos se encuentran dentro del tejido en sí, y pueden no estar presentes únicamente en el fluido intersticial alrededor del tejido. El analito puede ser distinto de un marcador asociado con el fluido intersticial, tal como un marcador tumoral. En consecuencia, los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción pueden adaptarse para detectar marcadores tumorales que están presentes en las estructuras de los tejidos, pero que pueden o no estar presentes además en el fluido intersticial.

En una modalidad particular, los anticuerpos contra alérgenos y citocinas se licúan (se licúan o se licúa el tejido para producir estos analitos solubles) y se caracterizan para proporcionar un perfil de alergia para el tejido y el sujeto en cuestión. Los tipos específicos de anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos IgE e IgG. Los tipos específicos de citocinas incluyen, pero sin limitarse a, IL4, IL5, IL10, IL-12, IL13, IL-16, GM-CSF, RANTES, MCP-4, CTACK/CCL27, IFN- γ , TNF α , CD23, CD-40, Eotaxin-2 y TARC.

Los analitos pueden analizarse de muchas maneras, que pueden seleccionarse fácilmente por el experto en la técnica de acuerdo con el analito a evaluar. Puede aplicarse un depósito o contenedor colector al sitio para la recolección de la muestra, que luego se mide mediante el uso de técnicas analíticas. La aplicación de energía puede optimizarse para maximizar la recuperación de analitos. Puede ser conveniente para ciertas aplicaciones mantener los niveles relativos del analito a otros componentes de la muestra. Los métodos de ensayo ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, electroforesis en gel, placas de agar, pruebas enzimáticas, pruebas basadas en anticuerpos (por ejemplo, pruebas de western blot, Ensayo Inmuno Sorbente Ligado a Enzimas (ELISA), ensayos de flujo lateral y similares), cromatografía de capa delgada, HPLC, espectrometría de masas, pruebas basadas en radiación, electroforesis de ADN/ARN, espectrofotometría (UV/Vis), ensayos de flujo y similares.

Una medición cuantitativa de la presencia de constituyentes del tejido en la muestra del tejido licuado puede evaluar el grado de licuefacción del tejido. Tal calibración interna puede lograrse midiendo una o más propiedades ópticas de la muestra del tejido licuado, tal como absorbancia, transmitancia, dispersión o emisión de fluorescencia al ser irradiada por una fuente que emite ondas electromagnéticas. Pueden usarse parámetros de muestra adicionales tal como el peso gravimétrico, el contenido total de proteínas, el pH y la conductancia eléctrica para calibrar el grado de licuefacción. Además, puede usarse la medición de las propiedades del tejido, tal como el grosor, la velocidad de pérdida de agua y la conductividad eléctrica. La medición directa de la concentración de uno o más analitos de la muestra, tal como β -actina, β -tubulina, GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), LDH (lactato deshidrogenasa) o cualquier otra biomolécula abundantemente presente cuya concentración se espera que permanezca constante en el tejido, puede usarse para calibrar el grado de licuefacción del tejido. Los analitos pueden cuantificarse además mediante el uso de un ensayo inmunológico (es decir, radioinmuno; Eliza; FACs).

Células del Tejido y Microorganismos

Además de los analitos descritos anteriormente, pueden detectarse células enteras del tejido bajo análisis, así como también una variedad de microorganismos, en tejidos de interés mediante el uso de los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción. Las células del tejido y la mayoría de los microorganismos son mucho más grandes que los analitos descritos anteriormente, y su extracción de un tejido de interés puede lograrse mediante el uso de diversas modalidades de la presente invención. Las bacterias, virus, protozoos y hongos patógenos y no patógenos desempeñan papeles bien conocidos en diversas enfermedades infecciosas, y su detección puede facilitar el diagnóstico de una enfermedad causada por el microorganismo (por ejemplo, tuberculosis, herpes, malaria, tiña, etc.). El estado de la enfermedad exhibe la presencia de microorganismos nuevos o una alteración en la proporción de los microorganismos residentes. Cuando se sospecha que un sujeto tiene una infección con tal microorganismo, los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción pueden usarse para cuantificar o detectar la presencia o la ausencia de un microorganismo y facilitar el diagnóstico de la afección.

Los microorganismos no patógenos normalmente están presentes en los tejidos sanos ("flora normal") y pueden desempeñar un papel en muchas funciones corporales y en el mantenimiento de la salud de un sujeto. La detección de estos microorganismos normales de la flora (por ejemplo, bacterias) en un tejido de interés también puede lograrse con el presente método y dispositivo. El tejido de un sujeto puede muestrearse y analizarse mediante el uso de los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción para examinar los diversos microorganismos que están naturalmente presentes. Cuando se sospecha que un sujeto tiene una condición

anormal, puede tomarse una muestra del tejido del sujeto de acuerdo con los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción para detectar la presencia o la ausencia de un cambio en un perfil de microorganismos no patógenos con relación al de un sujeto normal y saludable. Un cambio en este perfil de microorganismos puede facilitar el diagnóstico de una condición de interés en el sujeto.

En algunas modalidades, los tejidos pueden licuarse para recuperar sus células o microorganismos que residen en ellos. La aplicación de los presentes dispositivos, métodos y sistemas mediante el uso de energía proporciona la recolección de bacterias de la piel de un sujeto en un medio de recolección que puede contener opcionalmente un LPA. Por ejemplo, la aplicación de energía de ultrasonido al tejido de interés mediante el uso de tris-HCl o PBS es suficiente para recolectar la microflora bacteriana. En general, el uso de un dispositivo que usa este método implica la aplicación de un nivel suficiente de energía de ultrasonido para desalojar los microorganismos del tejido e ingresar al medio de recolección, que luego se recolecta para su subsecuente análisis, que puede incluir el cultivo del medio para determinar si ciertos microorganismos están presentes, analizando directamente el medio (por ejemplo, mediante el uso de técnicas ELISA, por ejemplo, involucrando anticuerpos específicos de microorganismos, por ejemplo involucrando una prueba de aglutinación de látex, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de diagnóstico basado en ácido nucleico que incluye la hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa, método de secuenciación de ADN) o una combinación de estos enfoques. La detección de microorganismos en el medio facilita el diagnóstico de una condición de interés. Además, una recolección de microorganismos de alto rendimiento podría acortar o eliminar un proceso para amplificar el número de ácidos nucleicos para el diagnóstico.

La invención descrita en la presente descripción puede usarse además para recolectar células del tejido. La aplicación de energía con un LPM apropiado que licua los tejidos sin alterar las membranas celulares puede usarse para recolectar células enteras, incluidas las células enteras viables de los tejidos. En este caso el LPM puede comprender productos químicos que incluyen, entre otros, agentes quelantes de iones tal como EDTA o enzimas tal como la tripsina para desalojar las células. De manera similar, con los cambios en los parámetros de energía y/o LPM como se discutió anteriormente, los dispositivos, métodos y sistemas de la presente descripción pueden usarse para recolectar núcleos u otros orgánulos celulares.

TEJIDO DE INTERÉS

Una variedad de tejidos se adapta bien a los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción. Estos tejidos incluyen, pero sin limitarse a, piel, membranas mucosas (nasal, intestinal, colon, bucal, vagina, etc.) o moco, mama, próstata, ojos, intestino, vejiga, estómago, esófago, uñas, testículos, cabello, pulmón, cerebro, páncreas, hígado, corazón, hueso o pared de la aorta. En una modalidad, el tejido es la piel, que puede ser la piel de la cara, brazos, manos, piernas, espalda o cualquier otra ubicación. Si bien las superficies de la piel y las mucosas son altamente accesibles para realizar la licuefacción, los dispositivos, métodos y sistemas de licuefacción descritos en esta descripción pueden diseñarse para adaptarse fácilmente a varios tejidos internos de los enumerados anteriormente. Los dispositivos ilustrativos específicos para tejidos internos que pueden encontrar uso en los métodos descritos en la presente descripción incluyen los descritos en las patentes U.S. 5,704,361, U.S. 5,713,363 y U.S. 5,895,397.

En algunas modalidades, el tejido de interés es distinto de un tumor o un tejido sospechoso de ser un tumor. Cuando los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente descripción se aplican a la detección de un microorganismo, se sospecha que el tejido de interés contiene un microorganismo (por ejemplo, un tejido sospechoso de tener una infección, particularmente una infección de tejido profundo, por ejemplo, infección del capas dérmicas y/o subdérmicas de la piel, incluidas tales capas de membranas mucosas).

MÉTODO DE USO

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para una amplia gama de evaluaciones de tejidos, incluida la evaluación de la presencia o la ausencia de uno o varios analitos de interés para facilitar el diagnóstico de una condición de interés. En algunas modalidades, los métodos encuentran uso donde, por ejemplo, el paciente presenta signos y síntomas clínicos sugestivos de una o más afecciones, donde los métodos descritos en la presente descripción pueden facilitar un diagnóstico diferencial.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona métodos que implican comparar un perfil de analito de prueba generado a partir de una muestra del paciente con un perfil de analito de referencia. Un "perfil de analito de referencia" o "perfil de analito para un tejido de referencia" generalmente se refiere a niveles cualitativos o cuantitativos de un analito seleccionado o un conjunto de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más analitos, que son característicos de una condición de interés. Las condiciones ilustrativas de interés para las que puede proporcionarse un perfil de analito de referencia incluyen, pero no se limitan a, perfil de analito de referencia normal (por ejemplo, tejido sano (es decir, ausencia de enfermedad), salud general del tejido, niveles aceptables o tolerados de un analito (por ejemplo, un fármaco, contaminante ambiental, etc.), perfil de analito de referencia de la enfermedad (por ejemplo, un perfil de analito característico de la presencia de, por ejemplo, infección microbiana (por ejemplo, infección bacteriana, viral, fúngica u otra infección microbiana), enfermedades localizadas en tejidos (por ejemplo, dermatitis, psoriasis, cánceres (próstata, mama, pulmón, etc.), urticaria, etc.), enfermedades sistémicas

que se manifiestan en los tejidos (por ejemplo, alergias, diabetes, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares y similares), etc.), perfil de analito de referencia de contaminantes ambiental (por ejemplo, un perfil de analito característico de la presencia de niveles inaceptablemente altos de un contaminante ambiental (por ejemplo, agente de guerra, pólenes, partículas, pesticidas, etc.), perfil de analito de referencia de fármacos (por ejemplo un perfil de analito característico de los niveles terapéuticos de un fármaco, fármaco de abuso (por ejemplo, para facilitar la evaluación del fármaco de abuso), etc.) y similares. Los perfiles de analitos de referencia pueden incluir analitos que son miembros de una o más clases de analitos (por ejemplo, proteínas (por ejemplo, anticuerpos, biomarcadores de cáncer, citocinas, proteínas citoesqueléticas/citoplasmáticas/extracelulares y similares), ácidos nucleicos (ADN, ARN), lípidos (que incluyen ceramidas, colesterol, fosfolípidos, etc.), moléculas pequeñas derivadas biológicamente, fármacos (por ejemplo, fármacos terapéuticos, fármacos de abuso), contaminantes ambientales, agentes de guerra, etc.) o miembros de una subclase de analitos (por ejemplo, anticuerpos, fosfolípidos). Los perfiles de analito de referencia de una condición de interés dada pueden conocerse previamente en la técnica o pueden derivarse del tejido mediante el uso de los métodos descritos en esta invención. Los perfiles de analito de referencia pueden almacenarse en forma electrónica (por ejemplo, en una base de datos) para proporcionar una comparación rápida con un perfil de analito de prueba para facilitar el análisis y el diagnóstico.

Un "perfil de analito de prueba" o "perfil de analito para un tejido de interés" se refiere a niveles cualitativos o cuantitativos de un analito seleccionado o un conjunto de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más analitos, para facilitar el diagnóstico o pronóstico de una condición de interés. Un perfil de analito de prueba puede incluir analitos que son miembros de una o más clases de analitos (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, moléculas pequeñas derivadas biológicamente, fármacos (por ejemplo, proteínas (por ejemplo, anticuerpos, biomarcadores de cáncer, citocinas, citoesqueleto/proteínas citoplasmáticas/extracelulares y similares), ácidos nucleicos (ADN, ARN), lípidos (que incluyen ceramidas, colesterol, fosfolípidos, etc.), moléculas pequeñas derivadas biológicamente, fármacos (por ejemplo, fármacos terapéuticos, fármacos de abuso), contaminantes ambientales, agentes de guerra, etc.) o miembros de una subclase de analitos (por ejemplo, anticuerpos, fosfolípidos). En general, los analitos seleccionados para el análisis para generar un perfil de analito de prueba se seleccionan de acuerdo con los analitos de un perfil de analito de referencia deseado. La comparación de un perfil de analito de prueba con un perfil de analito de referencia apropiado facilita la determinación de la presencia o la ausencia de la condición o estado de interés, por ejemplo, al evaluar si existe una "coincidencia" sustancial entre un perfil de analito de prueba y un perfil de analito de referencia.

Los métodos para generar perfiles de analito de referencia y de prueba de un analito o conjunto de analitos seleccionados pueden lograrse mediante el uso de los métodos disponibles en la técnica, y se seleccionarán de acuerdo con los analitos a evaluar.

Los presentes métodos pueden usarse para una amplia gama de evaluaciones de tejidos. La licuefacción de tejidos asistida por energía puede proporcionar una evaluación cuantitativa y un perfil del tejido normal. La comparación del perfil del tejido normal con un perfil del tejido bajo investigación puede facilitar el diagnóstico de cambios en el microambiente del tejido (por ejemplo, regulación ascendente/descendente de varias proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, fármacos, etc.) que pueden indicar diversas enfermedades tales como alergias, enfermedades cardiovasculares, dermatitis, etc. Los métodos pueden usarse además como una herramienta para monitorear la recuperación de tejidos y evaluar la eficacia terapéutica de varios tratamientos (como en el monitoreo de la terapia, que puede combinarse con la modificación de la terapia según se desee o se necesite). Los métodos de creación de perfiles de analitos pueden proporcionar además herramientas para la industria del cuidado personal para la evaluación de formulaciones tópicas (por ejemplo, como en cosméticos). Esta metodología puede usarse para determinar los parámetros farmacológicos de tejidos licuados y detectar las moléculas del fármaco en ellos. De manera similar, las pruebas rápidas y rutinarias de productos químicos, contaminantes biopeligrosos y fármacos de abuso también pueden lograrse cuantitativamente. Los métodos pueden usarse además para la detección sensible y el diagnóstico de la microflora patógena.

En ciertas modalidades, los presentes métodos proporcionan un perfil del tejido normal, en donde el tejido normal se define por la ausencia de la condición del tejido anormal de interés. La energía se aplica al tejido normal, por ejemplo, por exposición al ultrasonido o abrasión, en presencia de un agente promotor de la licuefacción. Se realizan varias pruebas sobre la muestra de tejido licuado para aislar e identificar los analitos presentes en el tejido.

En ciertas modalidades, los métodos pueden aplicarse para facilitar el diagnóstico de diversas enfermedades del tejido que se caracterizan por una evaluación cuantitativa de un cambio en el microambiente del tejido. Esta evaluación se realiza comparando un perfil de analito de un tejido de referencia (por ejemplo, un perfil de analito de referencia, que puede almacenarse en una base de datos) con el perfil de analito del tejido de interés (es decir, el perfil de analito de prueba). La presencia o la ausencia cuantitativa de cierto analito o conjunto de analitos presentes en un tejido bajo investigación, en comparación con la presencia o la ausencia cuantitativa de los mismos analitos en un tejido de referencia indicará la presencia o la ausencia de una enfermedad en particular, y por lo tanto facilitará el diagnóstico de la condición. El perfil de analito de referencia puede ser una característica del tejido que se sabe que no está afectada con la enfermedad en cuestión, o puede ser un perfil de analito de referencia característico de la enfermedad en cuestión para el tejido en cuestión.

En una modalidad, el tejido bajo investigación es la piel y/o membranas mucosas, y el perfil de analito de prueba cuantitativa se compara con un perfil de analito de referencia para determinar la presencia o la ausencia de una enfermedad tal como alergia, urticaria, infección microbiana, enfermedad autoinmune, enfermedad cardiovascular o cáncer.

En ciertas modalidades, este método puede usarse para monitorear la recuperación de tejido. Este monitoreo se realiza comparando un perfil de analito del tejido de referencia con el perfil de analito del tejido bajo investigación. La presencia o la ausencia cuantitativa de cierto analito o composición de analitos presentes en un tejido bajo investigación, en comparación con la presencia o la ausencia cuantitativa de los mismos analitos en un tejido de referencia, puede indicar si el tejido está volviendo a su estado saludable. El tejido de referencia generalmente es un tejido que se encuentra en un estado saludable.

En ciertas modalidades, los presentes métodos pueden usarse para evaluar el efecto terapéutico de diversos tratamientos, incluida la biodisponibilidad de productos terapéuticos en tejidos de interés. El analito en la muestra del tejido licuado puede cuantificarse para indicar la cantidad de analito presente en el tejido. La presencia o la ausencia cuantitativa de cierto analito o composición de analitos presentes en un tejido bajo investigación, en comparación con la presencia o la ausencia cuantitativa de los mismos analitos en un tejido de referencia, puede indicar si el agente terapéutico dosificado permanece o no en el tejido o el cuerpo específico, el tiempo suficiente para lograr el efecto deseado. El tejido de referencia generalmente es un tejido que se encuentra en un estado saludable.

En ciertas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para evaluar formulaciones terapéuticas en un tejido tal como la piel, específicamente, si los componentes de una formulación (por ejemplo, lociones, cremas, ungüentos y similares) están siendo absorbidos por el tejido, y si la cantidad entregada es terapéuticamente efectiva. En ciertas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción pueden incluir un sistema de lazo cerrado, en el que el mismo sistema puede aplicar la formulación terapéutica, licuar los analitos, analizar el perfil del analito y ajustar la administración de la formulación en consecuencia. El tejido de referencia en este caso sería un tejido sano, o un tejido en varios niveles de recuperación de la condición que estaba tratando la formulación terapéutica.

En ciertas modalidades, los presentes métodos pueden usarse para determinar el perfil de analito para usar en la determinación de parámetros farmacológicos o en la eficacia de agentes farmacéuticos. La presencia o la ausencia de ciertos analitos (por ejemplo, respondedores del sistema inmunitario, citocinas) puede usarse para correlacionar ciertas dosis de agentes farmacéuticos con parámetros biológicos, que incluyen, pero sin limitarse a, biodisponibilidad, AUC, aclaramiento y vida media.

En ciertas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para detectar la presencia o la ausencia de ciertos productos químicos, que incluyen, pero no se limitan a, contaminantes biopeligrosos, agentes de guerra, fármacos ilícitos, agentes farmacéuticos conocidos y similares. Tales métodos se usan, por ejemplo, en la aplicación de la ley, la regulación del dopaje en deportes competitivos, la evaluación de la exposición y/o el riesgo de enfermedades como resultado de la exposición a toxinas o contaminantes, y similares.

En ciertas modalidades, los presentes métodos pueden usarse para detectar o diagnosticar microbios patógenos (por ejemplo, bacterias, hongos, virus y similares). Las metodologías actuales para el diagnóstico microbiano en los tejidos, tal como el recubrimiento de las réplicas, el frotis y el lavado, no son atractivas debido a la gran variabilidad y la baja dispersión de los extractos, lo que conduce a una menor sensibilidad y una alta dependencia del protocolo. Pueden realizarse varias pruebas sobre la muestra del tejido licuado para aislar e identificar los analitos microbianos presentes en el tejido. En ciertas modalidades, estas pruebas incluyen el recubrimiento en placas de agar.

SUMINISTRO DE FÁRMACOS

La presente invención proporciona un método y un dispositivo que implica la licuefacción de un tejido para controlar y mejorar el flujo de fármacos hacia o a través del tejido. El método incluye las etapas de 1) aplicar energía y un medio promotor de licuefacción a un tejido donde se desea el transporte en cuestión; y 2) suministrar uno o más fármacos en o a través del tejido para licuar continua o repetidamente. El método puede incluir además volver a licuar el tejido durante el período de tiempo durante el cual se produce el transporte. El método que comprende licuar un tejido puede perturbar las propiedades de barrera de un tejido o de una superficie biológica, lo que lleva a reducir la resistencia al paso del fármaco. La ventaja de la presente invención es que la velocidad y la eficiencia de la transferencia se mejoran y se controlan. Los fármacos que simplemente no pasarían a través de las superficies biológicas, o pasarían a una velocidad inadecuada o variable con el tiempo, son forzadas a las superficies biológicas cuando se aplica energía en combinación con un LPM. Al controlar el modo, la intensidad y el tiempo de aplicación de energía y la formulación de un LPM, se controla la velocidad de transferencia.

El transporte de fármacos puede modularse o mejorarse mediante la aplicación simultánea o subsecuente de una fuerza impulsora secundaria, tal como la permeabilidad química o los potenciadores del transporte, convección, gradiente de presión osmótica, gradiente de concentración, iontoforesis, electroporación, campo magnético, ultrasonido o presión mecánica.

La mejora del método descrito se demostró mediante el siguiente ejemplo no limitativo que emplea ³Aciclovir e Inulina marcados con H. El tipo requerido, el período de tiempo y la intensidad de la energía y la formulación de un LPM dependen de una serie de factores, incluido el tipo de tejidos y la propiedad de los fármacos, que varía de una especie a otra, con la edad, la lesión o la enfermedad, y por la ubicación en el cuerpo.

Fármaco a Administrar

Las fármacos a administrar incluyen una variedad de agentes bioactivos, pero son preferentemente proteínas o péptidos. Ejemplos específicos incluyen insulina, eritropoyetina e interferón. También pueden administrarse otras sustancias, incluidas las moléculas de ácido nucleico tal como antisentido, siARN y genes que codifican proteínas terapéuticas, moléculas orgánicas e inorgánicas sintéticas que incluyen antiinflamatorios, antivirales, antifúngicos, antibióticos, anestésicos locales y sacáridos. El fármaco se administrará típicamente en un portador farmacéuticamente aceptable apropiado que tenga un coeficiente de absorción similar al agua, tal como un gel acuoso. Alternativamente, puede usarse un parche como portador. El fármaco puede administrarse en gel, pomada, loción o suspensión.

En una modalidad, el fármaco tiene forma de o está encapsulado en un dispositivo de administración tal como liposoma, vesícula lipídica, emulsión o nanopartículas poliméricas, micropartícula, microcápsula o microesfera (denominadas colectivamente micropartículas a menos que se indique de cualquier otra manera). Estos pueden estar formados por polímeros tal como polihidroxiácidos, poliortoésteres, polianhídridos y polifosfacenos, o polímeros naturales tal como colágeno, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos, y sus combinaciones. Las micropartículas pueden recubrirse o formarse con materiales que mejoran la penetración, tal como materiales lipofílicos o moléculas hidrofílicas, por ejemplo, polímeros de óxido de polialquilenos y conjugados, tal como polietilenglicol.

Administración de Fármacos

Los fármacos se administran preferentemente mediante el uso de los dispositivos de licuefacción mencionados, a los tejidos en un sitio seleccionado según la conveniencia del paciente, así como también para lograr los resultados del tratamiento deseado. Una variedad de tejidos que incluyen superficies biológicas se adaptan bien al presente método. Estos tejidos incluyen, pero sin limitarse a, piel, membranas mucosas (nasal, tripa, colon, bucal, intestinal, vagina, etc.). En una modalidad, el método de la presente invención se administra preferentemente a la piel de la cara, brazos, manos, piernas, espalda o cualquier otra ubicación. Si bien la piel es altamente accesible para realizar la licuefacción, los dispositivos descritos en esta descripción pueden diseñarse para adaptarse fácilmente a varias membranas internas de las enumeradas anteriormente.

En alguna modalidad, el tejido a administrar es un tejido enfermo tal como órganos infecciosos, tejidos inflamados y tumores sólidos. En una determinada modalidad, la presente invención comprende usar los dispositivos de licuado en los tejidos sanos en los alrededores de y/o el tejido enfermo, y administrar los fármacos a través de los tejidos sanos y/o en el sitio de las enfermedades. Los esteroides, tal como los corticosteroides y muchos de los agentes quimioterapéuticos, incluidos el fosfato de estramustina, el paclitaxel y la vinblastina, tienen efectos secundarios potencialmente graves. Por lo tanto, si se administra por vía sistémica, es probable que causen efectos secundarios indeseables. Este problema se supera mediante la entrega local de estos fármacos a los tejidos de la enfermedad. Otras indicaciones incluyen el suministro de fármacos a la piel anormal, tal como la psoriasis, la dermatitis atópica y las cicatrices.

En algunas modalidades, la presente invención se usa para mejorar el paso de un compuesto tal como un gran peso molecular o molécula polar a través del tejido tal como piel, membranas mucosas (nasal, tripa, colon, intestinal, bucal, vagina, etc.). Se logra un mayor control y utilización del fármaco al aumentar la velocidad y el control direccional del fármaco aplicado. El porcentaje de fármaco que ingresa rápidamente al torrente sanguíneo aumenta en consecuencia y se evitan los efectos secundarios indeseables. Los fármacos a través de los tejidos indicados anteriormente se infunden en el torrente sanguíneo a una velocidad óptima.

Medio de Promoción de la Licuefacción (LPM) para el Suministro de Fármacos

Un LPM también es un componente importante para el suministro de fármacos. El diseño del LPM para el suministro de fármacos se solapa en cierta medida al del LPM para la recolección de muestras. El LPM puede diseñarse para servir a uno o más de los siguientes cinco propósitos: a) acoplar energía a un tejido, b) facilitar la licuefacción del tejido, c) almacenar los fármacos que se suministrarán en el tejido, d) aumentar la solubilidad de los fármacos, y e) inhibir la degradación de los fármacos de manera que se retiene su actividad biológica o química.

El LPM puede contener además un fármaco antes o durante el proceso de licuefacción de tejidos. En una modalidad alternativa, la aplicación de energía y el LPM que excluye un fármaco puede usarse para licuar un tejido, y subsecuentemente puede aplicarse un fármaco en un portador apropiado tal como un parche en un sitio del tejido a licuar.

KITS

La presente descripción abarca además kits para practicar los presentes métodos. Los kits en cuestión pueden incluir, por ejemplo, todo el dispositivo de aplicación de energía y un agente promotor de la licuefacción para licuar tejidos de interés, reactivos para realizar ensayos para detectar y analizar (cualitativa o cuantitativamente) la presencia o la ausencia de analitos de tejido en la muestra del tejido licuado generada a través de los métodos descritos en la presente descripción. Los diversos componentes del kit pueden estar presentes en contenedores separados, o ciertos componentes compatibles pueden combinarse previamente en un solo contenedor, según se desee.

Además de los componentes mencionados anteriormente, además los kits típicamente incluyen instrucciones para usar los componentes del kit para practicar los métodos. Las instrucciones los métodos en cuestión se registran generalmente en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden imprimirse sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Como tal, las instrucciones pueden estar presentes en los kits tal como un prospecto del empaque, en el etiquetado del contenedor del kit o en los componentes del mismo (es decir, pueden estar asociadas con el empaque o el subempaque), etc. En otras modalidades, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por computadora adecuado, por ejemplo, CD-ROM, disquete, etc. En aún otras modalidades, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, a través de internet. Un ejemplo de esta modalidad es un kit que incluye una dirección en la web donde pueden verse las instrucciones y/o de la cual pueden descargarse las instrucciones. A igual que con las instrucciones, este medio para obtener las instrucciones se registra en un sustrato adecuado.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa y una descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni pretenden representar que los siguientes experimentos son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tomarse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son las partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es la atmosférica o cercana.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a sus modalidades específicas, se entenderá por los expertos en la técnica que pueden hacerse varios cambios y pueden sustituirse los equivalentes sin apartarse del alcance de la invención.

EJEMPLO 1**Muestreo de piel mediante un dispositivo a base de energía abrasiva**

Con referencia a las FIGURAS de la 7a a la 7e, se describe un dispositivo de licuefacción de tejidos a base de energía abrasiva para el muestreo del tejido de la piel. El dispositivo se ensambla a partir de tres componentes: 751 (ensamble de la carcasa del dispositivo 701 que contiene el motor 704 y los componentes de conductividad eléctrica 705 y 706); 752 (ensamble desechable del cartucho del LPM 708, contenedor de recolección 707 y aguja 709); y 753 (ensamble desechable de la carcasa del LPM 712, almohadilla abrasiva 711 y eje 710) (FIGURA 7a). El dispositivo ensamblado se coloca contra una región de interés previamente identificada en la piel 713, de manera que la almohadilla abrasiva 711 está orientada hacia la piel 713 (FIGURA 7b). El émbolo deslizante 702 ubicado en la parte superior del dispositivo se empuja hacia la piel, lo que empuja la aguja 709 dentro del cartucho LPM 708, rompiendo su sello estéril y transfiere el LPM a la carcasa 712. El émbolo deslizante 702 también energiza el motor 704 a través del paquete de baterías 703, configurando el eje 710 y la almohadilla abrasiva 711 en movimiento giratorio contra el tejido de la piel 713. A medida que el tejido de la piel se licua, los componentes del tejido se disuelven en el LPM contenido en la carcasa 712. La conductividad eléctrica del tejido de la piel 713 también se mide simultáneamente mediante el uso del contacto deslizante 705 sujeto al eje 710 como un electrodo de medición y un electrodo de referencia 706. Una vez que se alcanza el límite de exposición de energía segura según lo determinado por el umbral de conductividad eléctrica, el motor 704 se detiene. El émbolo deslizante 702 se empuja aún más hacia la piel de manera que la aguja 709 perfora un contenedor de muestra previamente aspirado 707, que aspira en él la muestra de la carcasa 712 (FIGURA 7d). El dispositivo se retira de la piel y se desmonta. El componente del dispositivo 752 se desmonta adicionalmente y el contenedor de muestra 707 se procesa para la detección de analitos.

EJEMPLO 2**Muestreo de piel por un dispositivo basado en microagujas**

Con referencia a las FIGURAS de la 8a a la 8d, se describe un dispositivo de licuefacción de tejido basado en microagujas para tomar muestras del tejido de la piel. El dispositivo se coloca contra una región de interés previamente identificada en la piel 807, de manera que el parche que lleva las microagujas 805 está orientado hacia la piel 807 (FIGURA 8a). El émbolo deslizante 801 ubicado en la parte superior del dispositivo se empuja hacia la piel 807 de manera que la esponja empapada del LPM 804 se aprieta y libera el LPM en la carcasa 803 (FIGURA 8b). En consecuencia, las microagujas en el parche 805 y la carcasa 803 en la interfaz de la piel se llenan con el LPM. Para iniciar el proceso de licuefacción, el émbolo deslizante 801 se empuja aún más dentro del tejido de la piel 807, lo que conduce a la inserción de las microagujas 805 en el tejido de la piel 807 (FIGURA 8c). A medida que el tejido de la piel se licua, los componentes del tejido se disuelven en el LPM contenido en la carcasa 803. Una vez terminada la licuefacción de la piel, el contenedor de muestra preaspirado 802 se empuja hacia el tejido de la piel 807 de manera que la aguja 806 perfora el contenedor de muestra 802 dando como resultado la aspiración de la muestra desde la carcasa 803 (FIGURA 8d). El dispositivo se retira de la piel y se desmonta. El contenedor de muestra 802 se recupera para el análisis de analitos y el resto de los componentes del dispositivo se desechan.

EJEMPLO 3

Carcasa del depósito para capturar analitos del tejido

Con referencia a la FIGURA 9 (Paneles a - d) se describe un diseño para una carcasa del depósito para capturar analitos del tejido de las muestras del tejido licuado. La carcasa del depósito (901) está destinada a ser usada con los dispositivos de aplicación de energía descritos en la presente descripción, tal como un contenedor para recolectar la muestra del tejido licuado. La carcasa está recubierta con sustratos de captura (902) que se unen selectivamente a los analitos del tejido (903) presentes en la muestra. Tras una incubación suficiente de la muestra del tejido, la muestra se desecha mientras que los analitos (903) se mantienen en la carcasa. Los analitos se eluyen mediante un tampón de elución en la carcasa para la subsecuente captura de los analitos como una muestra separada (904). Alternativamente, la carcasa puede integrarse en una herramienta analítica para analizar los analitos unidos (903).

EJEMPLO 4

Formulaciones de surfactantes para una mayor solubilización de tejidos y retención de funcionalidad de proteínas.

Se identificaron formulaciones de surfactantes únicas que forman el medio promotor de la licuefacción (LPM) de acuerdo con la definición descrita en este texto. Se creó una biblioteca de 153 formulaciones de surfactantes binarios mediante el uso de 19 surfactantes que pertenecen a cuatro categorías distintas: (i) surfactantes aniónicos (laurilsulfato de sodio (SLS), laurelsulfato de sodio (SLA), tridecilsulfato de sodio (TDP), desoxicolato de sodio (SDC), decanoil sarcosinato de sodio (NDS), lauroil sarcosinato de sodio (NLS), palmitoil sarcosinato de sodio (NPS)); (ii) surfactantes catiónicos (cloruro de octiltrimetilamonio (OTAB), cloruro de dodecil trimetil amonio (DDTAB), cloruro de tetradecil trimetil amonio (TTAB)); (iii) surfactantes de ion híbrido (dimetil amonio 3-[(3-Colamidopropil)] 1-sulfato de propano (CHAPS), 3-(decil dimetil amonio) sulfato de propano (DPS), 3-(decil dimetil amonio) sulfato de propano (DDPS)); (iv) surfactantes no iónicos (polietilenglicol dodecil éter (B30), polioxietileno 23-lauril éter (B35), polioxietileno 10-cetil éter (B56), polioxietileno 2-estearil éter (B72), polietilenglicol oleil éter (B93), nonilfenol polietilenglicol éter (NP9)). Solo un puñado de surfactantes de estas categorías (por ejemplo, surfactantes no iónicos) se han usado tradicionalmente para extraer proteoma del tejido funcional. Adicionalmente, estos surfactantes tienen una capacidad muy limitada para solubilizar eficientemente los constituyentes del tejido. Como tal, en todos los tipos de surfactantes, el potencial de extracción y la conservación de la bioactividad de los componentes del tejido se consideran en gran medida como propiedades mutuamente conflictivas. Al combinar los surfactantes no iónicos con otros tipos de surfactantes que se han descrito previamente por su alta capacidad de solubilización (surfactantes aniónicos, catiónicos y de ion híbrido), mostramos el descubrimiento de nuevas familias de formulaciones de surfactantes que poseen simultáneamente una solubilización superior, así como también capacidades no desnaturizantes.

La biblioteca de surfactantes se examinó primero para identificar formulaciones de surfactantes no desnaturizantes que retienen la bioactividad de las proteínas en los extractos, y subsecuentemente se clasificó según la capacidad de las formulaciones para solubilizar las proteínas de los tejidos. La FIGURA 10a muestra la potencia de 153 formulaciones de surfactantes para preservar la funcionalidad específica de una proteína modelo, anticuerpo IgE. Específicamente, se probó la capacidad de unión del anticuerpo IgE con ovoalbúmina. El eje x en esta figura representa el índice de formulación único para cada formulación binaria. El eje y representa el % de retención de bioactividad del IgE, definida como la actividad de unión del IgE fraccional en la formulación de surfactante en comparación con la actividad de unión del IgE cuando los surfactantes están en solvente puro (solución salina tamponada con fosfato, PBS). Las formulaciones abarcaron un amplio intervalo de potenciales desnaturizantes. Sorprendentemente, un número creciente de surfactantes desnaturizantes tras la combinación con un surfactante no iónico más suave produjo una alta ganancia sinérgica en la retención de la funcionalidad IgE. Se descubrió que el potencial no desnaturizante, promediado sobre todas las formulaciones de surfactantes binarios, era

significativamente mayor que sus formulaciones de surfactantes individuales constituyentes ($p < 0,006$; prueba t-student heteroescedástica de dos colas); demostrando además más interacciones sinérgicas únicas.

Las formulaciones de surfactantes que exhiben una alta retención de bioactividad ($\geq 90\%$) se examinaron además por su capacidad para extraer proteínas de tejido junto con un breve tratamiento con sonicación. La piel porcina se usó como tejido modelo para estos estudios. Mientras que la mayoría de las formulaciones revelaron un potencial de extracción cercano a $0,1\text{ mg de proteína por cm}^2$ del tejido de la piel, solo un par de formulaciones lograron una extracción de proteínas superior a $0,3\text{ mg/cm}^2$ (Figura 10b).

Los principales candidatos seleccionados de la biblioteca de surfactantes generalmente dieron como resultado formulaciones que eran excepcionalmente no desnaturizantes, pero más efectivas en la solubilización de tejidos que algunos de los surfactantes de extracción más usados reportados en la literatura. La FIGURA 10c compara la formulación de surfactante líder: $0,5\%$ (p/v) de DPS-B30, con SDS al 1% (p/v) para el muestreo de la piel. A pesar de una capacidad de extracción moderada ($0,16 \pm 0,07\text{ mg/cm}^2$), el SDS es altamente desnaturizante, lo que da como resultado un bajo rendimiento de recuperación funcional de proteínas (producto de bioactividad fraccionada retenida y proteína extraída total). Por el contrario, la formulación de DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v) no solo extrae más proteínas de la piel ($0,48 \pm 0,12\text{ mg/cm}^2$), sino que preserva además la actividad de la proteína, lo que equivale a un aumento de 100 veces en la recuperación de proteína funcional esperada sobre el SDS. De manera similar, se lograron más de 10 veces la recuperación de proteínas sobre el surfactante no desnaturizante comúnmente usado al 1% (p/v) Triton X-100 y PBS.

EJEMPLO 5:

Retención de bioactividad bajo estrés

Mostramos que las formulaciones de surfactante únicas, o LPMs (como se identifica por el método descrito en el Ejemplo 1) protegen adicionalmente una variedad de analitos bajo estrés. Mostramos específicamente los efectos desnaturizantes de la energía mecánica, tal como la exposición al ultrasonido (un desnaturizante comúnmente conocido para las biomoléculas), que pueden neutralizarse con el uso de formulaciones de surfactantes únicas.

En experimentos separados, se disolvieron una proteína globular (IgE) y dos enzimas representativas, lactato deshidrogenasa (LDH) y beta-galactosidasa (β -Gal), en una formulación de surfactante DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v) y se sonicaron para determinar la retención de bioactividad de proteínas a lo largo del tiempo. Las proteínas disueltas en solución salina (PBS) se prepararon como controles comparativos. Se observó una disminución progresivamente aguda en la funcionalidad para la IgE disuelta en PBS; sin embargo, la formulación de DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v), sorprendentemente, extendió la protección a las proteínas IgE contra el estrés desnaturizante ultrasónico (Figura 11a). Independientemente del tratamiento con ultrasonido, la IgE disuelta en SDS mostró un estado completo de desnaturización. Se observaron tendencias similares en la conservación prolongada de las actividades enzimáticas para LDH y β -Gal preparadas en la formulación de DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v) (Figura 11b). La preparación de proteínas en PBS resultó en una pérdida significativa de la bioactividad ($p < 0,006$; prueba t-student heteroescedástica de dos colas), lo que equivale a una bioactividad fraccional de $16,7\%$ (IgE), $70,8\%$ (LDH) y $68,7\%$ (β -Gal) después de 3 minutos de sonicación.

EJEMPLO 6

Muestreo de tejidos y diagnóstico molecular

Se demostró la capacidad de la exposición ultrasónica en presencia del LPM (solución salina del $0,5\%$ (p/v) DPS-B30) para muestrear una variedad de biomarcadores de enfermedades funcionales de los tejidos.

Se demostró el muestreo de anticuerpos IgE específicos de alergia de la piel de ratones alérgicos al huevo. Se compraron ratones BALB/CJ hembras de seis a ocho semanas de edad de Charles River Labs (Wilmington, MA) y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos. La reacción alérgica fue inducida en ratones por un protocolo de exposición epicutáneo. Después de la anestesia con $1,25\text{--}4\%$ de isoflurano en oxígeno, se rasuró la piel de la parte subsecuente de los ratones y luego se les quitó la cinta 10 veces (cinta Scotch Magic, 3M Health ACRe, St Paul, MN) para introducir una lesión cutánea estandarizada. Se colocó un parche de gasa ($1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$) empapado con $100\text{ }\mu\text{l}$ de OVA al $0,1\%$ en la piel de la espalda y se aseguró con una cinta adhesiva elástica transpirable a base de tela. Los parches se mantuvieron fijados durante 1 semana. Todo el experimento comprendió un total de tres exposiciones de 1 semana con un intervalo de 2 semanas entre cada semana de exposición. El muestreo se realizó pegando una cámara con bridas a medida (área de exposición de la piel de $1,33\text{ cm}^2$) al área de la piel afeitada con una cantidad mínima de adhesivo a base de cianoacrilato. La cámara se llenó con $1,8\text{ ml}$ de formulación de surfactante DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v) y se aplicó ultrasonido de 20 kHz a un ciclo de trabajo del 50% , $2,4\text{ W/cm}^2$ durante 5 minutos. Se obtuvieron biopsias de piel de eccemas tratados con ultrasonido o sin tratar, y se prepararon muestras de homogeneizado de piel como controles positivos. La FIGURA 12a muestra que el muestreo asistido por ultrasonido muestreó con éxito una cantidad significativamente mayor de anticuerpos IgE específicos de alergia de la

piel de ratones alérgicos en comparación con los ratones sanos. Como era de esperar, no se observaron diferencias en la cantidad de anticuerpos IgG en las muestras de pieles de ratones alérgicos y sanos.

También se demostró la toma de muestras de colesterol de la piel del ratón. Con procedimientos similares a los que se describieron en el párrafo anterior, se recolectaron muestras de piel con el procedimiento de ultrasonido. Los homogeneizados de la piel se prepararon como controles positivos de biopsias recolectadas de la piel no tratada. El colesterol cutáneo es un biomarcador importante para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares [1]. La FIGURA 12b muestra que el muestreo asistido por ultrasonido toma muestras exitosamente de colesterol de la piel y la cantidad muestreada es comparable al colesterol presente en el homogeneizado de la piel.

Por último, se demostró el muestreo del genoma bacteriano de la piel porcina. Los tejidos, particularmente la piel y las membranas mucosas, están colonizados por un conjunto diverso de microorganismos que incluyen bacterias, hongos y virus [2-5]. El diagnóstico preciso de la infección bacteriana conduce a un manejo adecuado del paciente, proporcionando información sobre el pronóstico y permitiendo el uso de antibióticos de espectro estrecho [6-8]. En consecuencia, la detección definitiva de microorganismos es esencial para el diagnóstico para el tratamiento de infecciones y el rastreo de brotes de enfermedades asociadas con infecciones microbianas. Sin embargo, la obtención precisa de muestras que representan microorganismos en la piel es un desafío importante [2]. El método más práctico de recolección sería frotar, ya que es simple, rápido y no invasivo [3, 9]. Sin embargo, frotar tiene varias limitaciones, incluida la recuperación deficiente de los microorganismos y la falta de un protocolo estandarizado, lo que sugiere que no representa con precisión los microorganismos en la piel ni proporciona datos cuantitativos. El muestreo asistido por ultrasonido puede abordar efectivamente estas limitaciones. En particular, la piel porcina extirpada se muestreó con un hisopo con una bola de algodón empapada en solución salina (PBS) y mediante muestreo asistido por ultrasonido con DPM-Brij30 al 0,5 % (p/v) como LPM en experimentos separados. El genoma bacteriano se purificó de cada muestra por el método estándar de extracción con fenolcloroformo. Brevemente, las muestras se incubaron primero en una solución que consistía de 20 mM de Tris a pH 8,0 (BP154-1, Fisher Scientific), 2 mM de EDTA (BP120-500, Fisher Scientific), 1,2 % de Triton X-100 (BP151-100, Fisher Scientific), y 20 mg/ml de lisozima (62970-1G-F, Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37 °C [9]. Subsecuentemente, las muestras se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una solución que consistía de 0,1 mg/ml de Proteinasa K (P2308-25MG, Sigma-Aldrich), 0,5 % (p/v) de laurilsulfato de sodio (S529, Fisher Scientific), y 100 mM de cloruro de sodio (BP358-1, Fisher Scientific). Luego se extrajo el ADN genómico con un volumen igual de fenol (P4557, Sigma-Aldrich), seguido de la extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, 25:24:1 (P2069, Sigma-Aldrich). El ADN se precipitó por incubación con etanol y centrifugación durante 20 min. Los precipitados de ADN se lavaron dos veces con etanol al 70 %, se dejaron secar y se resuspendieron en 80 µl de tampón tris. La cantidad de bacterias muestreadas por cada metodología se evaluó determinando la presencia del gen bacteriano 16S conservado en cada muestra mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). La FIGURA 12c muestra que el muestreo asistido por ultrasonido muestreó al menos una cantidad 7 veces mayor de genoma bacteriano de la piel que el procedimiento convencional de hisopo de algodón.

EJEMPLO 7

Diseño del tampón del LPM compatible con pruebas basadas en ácido nucleico

Para garantizar la compatibilidad de las muestras del tejido licuado con el análisis subsecuente, los componentes del LPM deben elegirse cuidadosamente. Se probó la compatibilidad de varios componentes del LPM con la técnica analítica basada en ácido nucleico. Específicamente, la compatibilidad de los componentes del LPM con qPCR, la prueba basada en genes más común, se evaluó midiendo la capacidad de la prueba para amplificar el ADN plasmídico agregado en diferentes LPMs.

Se añadieron diez millones de copias del plásmido Luciferase (E1741, Promega Corp.) en 10 µl de diferentes soluciones: (i) agua, (ii) 0,91 % (p/v) de cloruro de sodio (BP358-1, Fisher Scientific) en agua, (iii) PBS (P4417, Sigma-Aldrich), (iv) 10 mM de Tris-HCl, pH 7,9 (BP154-1, Fisher Scientific), (v) 0,075 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 7,9, derivado de fosfato de sodio monobásico monohidrato y fosfato de sodio dibásico (S9638-25G, S7907-100G, Sigma-Aldrich), y (vi) 0,5 mM de EDTA (BP120-500, Fisher Scientific) en agua. Las soluciones se combinaron con 10 µl de tampón de reacción de PCR. Los cebadores de amplificación de luciferasa fueron 5'-GCC TGA AGT CTC TGA TTA AGT-3' para el cebador directo y 5'-ACA CCT GCG TCG AAG-3' para el cebador inverso, creando un amplicón de 96 bp [10]. Las reacciones de amplificación se realizaron en una solución de 20 µl que contenía MgCl₂ a 1,5 mM, cebadores a 0,2 µM (cada uno) y 0,2 mM de dNTP en tampón de PCR y 0,025 unidades/µl de Taq polimerasa (10966-034, Invitrogen) y SYBR-green (S-7563, Invitrogen) a 1:45,000. Alícuotas de ADN plasmídico se diluyeron en agua para generar una curva estándar. El análisis se realizó en una máquina de PCR iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mediante el uso de placas de 96 pozos de grado óptico. El ciclo térmico de la reacción se ajustó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, recocido de 30 segundos a 60 °C y alargamiento de 30 segundos a 72 °C, todo seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C. Para cada muestra, se realizaron tres réplicas. Para cada tampón, la compatibilidad se calculó comparándola con el control (ADN plasmídico en agua).

La FIGURA 13 muestra que el tampón de cloruro de sodio, el PBS y fosfato de sodio era incompatible como tampón de detección para el ensayo de PCR cuantitativo en comparación con el control. Sin embargo, el uso de tris-HCl o EDTA como tampón aumentó la capacidad de detección del ensayo analítico.

5 **EJEMPLO 8**

Compatibilidad de los LPMs con pruebas basadas en ácidos nucleicos

Se probó la compatibilidad de varios LPMs (descritos en el EJEMPLO 1) con las pruebas existentes basadas en ácidos nucleicos. Específicamente, el ADN plasmídico se mezcló con diferentes LPMs y se evaluó la capacidad de qPCR para amplificar el ADN. Se prepararon LPMs añadiendo surfactantes a diversas concentraciones en 10 mM de tampón Tris-HCl. Para imitar el proceso de licuefacción de tejidos como se describió en este texto, cada LPM se mezcló con 0,2 mg/ml de homogeneizado de piel de cerdo y se añadieron diez millones de copias del plásmido Luciferasa (E1741, Promega Corp.) por cada 10 µl del LPM. Esta solución se combinó con 10 µl de tampón de reacción de PCR. El qPCR se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 4. El ADN plasmídico purificado se diluyó en una solución de tris-HCl para generar una curva estándar. La compatibilidad de cada LPM se calculó determinando la cantidad de plásmido amplificado por el qPCR y se comparó con el tampón de control (ADN plasmídico en tris-HCl sin surfactante).

La FIGURA 14 muestra que Triton X-100, Brij 30, DMSO, OTAB, OTAB-Brij 30 y DPS-Brij 30 eran altamente compatibles con el PCR cuantitativo; sin embargo, los LPMs que consisten en NLS o NLS-Brij30 no pudieron amplificar el ADN. En particular, DPS-Brij 30 como LPM efectivamente toma muestras de biomoléculas de los tejidos, retiene la actividad proteica y es compatible con métodos analíticos que incluyen ELISA, cromatografía y qPCR. Por lo tanto, DPS-Brij 30 es más conveniente como medio promotor de licuefacción para analizar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Triton X-100 y DMSO, que han sido conocidos como facilitadores del PCR [11], mostraron consistentemente que producen reacciones en cadena de la polimerasa de manera efectiva; sin embargo, no producen una extracción de tejido satisfactoria.

EJEMPLO 9

Identificación de parámetros ultrasónicos para el muestreo de microorganismos viables y genéticamente intactos de tejidos

Este ejemplo describe una condición no letal del ultrasonido para recolectar de manera eficiente microorganismos vivos de los tejidos. Los microorganismos pueden recolectarse del tejido aplicando varias formas de energía a los tejidos; sin embargo, el uso de altas energías es altamente perjudicial para la viabilidad de los microorganismos. Por lo tanto, es esencial descubrir las condiciones no letales de la aplicación de energía para el muestreo de microorganismos vivos. Describimos las condiciones de exposición al ultrasonido para el muestreo de bacterias viables y genéticamente intactas de la piel.

El cultivo bacteriano de *E. Coli* cepa DH10α (18290-015, Invitrogen) se cultivó en Luria-Bertani (BP1426, Fisher Scientific) a 37 °C, 250 rpm o como cultivo sólido en placas de Agar (37 °C). El cultivo se cosechó por centrifugación y el precipitado resultante se suspendió en el LPM que comprende 10 mM de Tris-HCl, pH 7,9 a una concentración de 10^9 células/ml. Las células *E. Coli* se cuantificaron con un espectrofotómetro (biofotómetro, Eppendorf) y se consideró que un cultivo bacteriano de $0,25 \times 10^9$ células/ml correspondía a un valor de absorbancia de densidad óptica de 0,25 a una longitud de onda de 600 nm. Se colocó un ml de las células resuspendidas en un contenedor cilíndrico esterilizado (diámetro interno 20 mm, base plana, grosor de pared 1,3 mm, altura 31 mm). Todos los experimentos se realizaron con un sonicador de 600 Watt (Sonics & Materials, Newtown, CT) que funciona a una frecuencia de 20 kHz con un ciclo de trabajo del 50 %. La configuración de potencia y el tiempo de exposición al ultrasonido variaron en este experimento. El transductor se bajó al contenedor hasta que la sonda se sumergió en el fluido a una distancia de 5 mm de la parte inferior. El transductor se esterilizó con etanol al 70 % entre los procedimientos de sonicación en diferentes muestras. Después de la sonicación, se prepararon 10 veces diluciones en serie de cada muestra en 10 mM de Tris-HCl (pH 7,9). Se colocaron 100 µl de muestra de cada etapa de dilución en agar Luria-Bertani y se extendieron con un esparcidor estéril. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se realizaron recuentos de colonias bacterianas viables en la superficie de las placas de agar. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción en la viabilidad con relación a los controles no sonicados. Para evaluar la integridad del genoma bacteriano en muestras expuestas a ultrasonido, se realizó electroforesis. Todas las muestras se incubaron a 56 °C en Proteinasa K (19131, Qiagen) y lauril sulfato de sodio al 0,5 % (p/v) (S529, Fisher Scientific). Después de 1 h de incubación, se extrajo el ADN genómico total mediante el uso del Kit de Extracción de ADN DNeasy (69504, Qiagen). Se siguió el protocolo estándar para el kit para todas las etapas subsecuentes. El ADN genómico purificado se resuspendió en 400 µl de Tampón AE y se almacenó a -20 °C hasta el análisis. El ADN purificado se sometió a electroforesis durante 90 minutos a 100 V en un gel de Tris-acetato-EDTA-agarosa al 2 % (p/v). Los geles se tiñeron con SYBR Gold (S11494, Invitrogen) y se visualizaron bajo luz UV.

La FIGURA 15 muestra que la viabilidad del *E. Coli* expuesto a ultrasonido a una intensidad de $1,7 \text{ W/cm}^2$ hasta 2 minutos fue estadísticamente insignificante para la viabilidad de las muestras de *E. Coli* no tratadas. Esto sugiere

que estas condiciones de licuefacción ultrasónica pueden usarse para tomar muestras de bacterias sin una gran pérdida de viabilidad. Sin embargo, las muestras sonicadas a una potencia de salida más alta exhibieron una disminución más rápida con el tiempo de aplicación, y las viabilidades celulares fueron significativamente diferentes en comparación con las células no tratadas. Incluso después de 1 minuto de exposición a una intensidad más alta, la viabilidad se redujo un 3,6 % ($p < 0,05$). Esta observación está de acuerdo con la integridad del genoma bacteriano según lo evaluado por electroforesis (FIGURA 16). No se observó daño al genoma bacteriano tras la sonicación durante 2 minutos a $1,7 \text{ W/cm}^2$ (condiciones que demuestran mantener la viabilidad celular); sin embargo, por el contrario, el ADN genómico de células *E. Coli* sonicadas a intensidades de $1,7 \text{ W/cm}^2$ (32 % de viabilidad) y $2,4 \text{ W/cm}^2$ (8 % de viabilidad) durante 3 minutos estaban altamente fragmentados como puede verse por su migración a la parte del gel de menor peso molecular. Estos resultados sugieren que la recolección de bacterias vivas debe realizarse a una intensidad de ultrasonido de $1,7 \text{ W/cm}^2$ por hasta 2 min.

EJEMPLO 10

Detección de microorganismos vivos de tejidos

Una breve exposición de energía ultrasónica junto con el LPM (tampón tris-HCl) puede tomar muestras de bacterias viables de la piel. Las bacterias de la piel muestreadas por ultrasonido se cuantificaron mediante el ensayo de recuento de colonias convencional, así como también por PCR cuantitativo en tiempo real, y se evaluaron mediante la comparación con métodos de muestreo estándar, tal como el frotis y la técnica de lavado con surfactante.

Se realizaron experimentos *in vitro* en piel porcina para evaluar el muestreo de bacterias residentes en la piel. La piel de porcino congelada de grosor completo precortada cosechada de la región abdominal lateral de los cerdos Yorkshire se obtuvo en tiras de 10 cm x 25 cm de Lampire Biological Laboratories Inc., PA. La piel se almacenó a -70°C hasta el experimento. Las piezas de piel sin imperfecciones visibles, tal como rasguños y abrasiones, se descongelaron a temperatura ambiente y se cortaron en piezas pequeñas ($2,5 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm}$) y se montaron en una celda de difusión Franz (PermeGear, Hellertown, PA, Estados Unidos). La cámara receptora de las células de difusión se llenó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (P4417, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la cámara donante (área de exposición de la piel de $1,77 \text{ cm}^2$) se llenó con un 1 ml de tampón 10 mM de Tris-HCl (pH 7,9), que también actuó como fluido de acoplamiento entre el transductor de ultrasonido y la piel. El transductor de ultrasonido se colocó a una distancia de 5 mm de la superficie de la piel y una intensidad ultrasónica de $1,7 \text{ W/cm}^2$ se aplicó durante 2 minutos. La sonda se desinfectó con etanol al 70 % entre experimentos en diferentes muestras. Como controles comparativos, se obtuvieron muestras frotando la piel. Se empaparon hisopos de algodón (B4320115, BD Diagnostics) en solución salina tamponada con fosfato esterilizada antes de su uso. El área del sitio de la muestra se estandarizó sosteniendo un anillo de metal esterilizado que encierra un área de $3,3 \text{ cm}^2$ sobre la superficie de la piel. La superficie de la piel se frotó suavemente y repetidamente durante aproximadamente 20 segundos. Cada torunda se extrajo con 1 ml de PBS. Las bacterias de la piel también se muestrearon mediante la técnica de lavado con surfactante de Williamson y Kligman [2, 12]. Se sostuvo firmemente un anillo de metal estéril contra la superficie de la piel y se pipeteó 1 ml de Triton X-100 al 0,1 % en tampón fosfato 0,075 M, pH 7,9. La superficie de la piel dentro del anillo se frotó firmemente durante 1 minuto con un raspador de células de teflón y la muestra resultante se recolectó en un tubo de centrifuga estéril. El procedimiento se repitió en el mismo sitio de la piel durante dos veces más y las muestras se agruparon. Se prepararon de 10 veces diluciones en serie de cada muestra y se colocaron alícuotas de 100 μl de cada muestra diluida en placas de agar Tryptic Soy (90002, BD Diagnostics) [12]. Las placas se incubaron subsecuentemente en condiciones aeróbicas a 37°C durante 24 horas y se contaron las colonias para obtener una estimación de la eficiencia de extracción calculando la unidad formadora de colonias por unidad de área de la piel muestreada (UFC/cm^2). Para cuantificar el total de bacterias, se realizó un PCR cuantitativo en tiempo real basada en un amplicón del gen 16S ARNr. Todas las muestras biológicas se incubaron primero en una preparación de tampón de lisis enzimática (20 mM de Tris a pH 8,0, 2 mM de EDTA, Triton X-100 al 1,2 %) y lisozima (20 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C [9]. Subsecuentemente, las muestras se incubaron durante 1 hora a 56°C en el tampón AL y la proteinasa K del Kit de Extracción de ADN DNeasy (Qiagen). Se siguió el protocolo estándar para el kit para todos las etapas subsecuentes. El ADN eluido por el Tampón AE se precipitó por incubación con volúmenes iguales de isopropanol absoluto y luego se centrifugó durante 20 minutos. Los precipitados de ADN se lavaron una vez con etanol al 70 %, se dejaron secar y se resuspendieron en 80 μl de Tampón AE. Los controles negativos también se prepararon mediante el uso de hisopos de algodón estériles no tratados en PBS. El análisis de los genes 16S se realizó en la máquina de PCR iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) mediante el uso de placas de 96 pozos de grado óptico. Una porción del gen bacteriano 16S se amplificó mediante el uso del cebador directo 63F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el cebador inverso 355R (5'-GACGGGCGGTGTGTRCA-3') [9, 13]. Se construyó una curva estándar amplificando diluciones en serie de ADN genómico a partir de cantidades conocidas de células *E. Coli* en 10 μl de Tampón AE. Se mezclaron 10 μl de ADN purificado con 2 pmol de cada cebador y Platinum PCR Supermix (11784, Invitrogen) hasta un volumen de reacción final de 20 μl . El ciclo térmico se ajustó de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 32 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 94°C , recocido de 30 segundos a 66°C y alargamiento de 30 segundos a 72°C , todos seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C . Para cada muestra, se realizaron tres réplicas.

La FIGURA 17 muestra la comparación de las eficacias de muestreo de diferentes técnicas. La FIGURA 17a muestra que el muestreo ultrasónico recuperó aproximadamente 17 veces más cantidad de bacterias de la piel que los hisopos de algodón ($p < 0,05$). Notablemente, los recuentos del número total de bacterias recolectadas por ultrasonido no difirieron significativamente del control positivo (método de raspado de surfactante). La efectividad del muestreo ultrasónico se probó adicionalmente mediante el uso del PCR cuantitativo en tiempo real basada en la amplificación del gen bacteriano 16S ADNr (FIGURA 17b). Consistentemente, el ultrasonido recolectado $1,7 \times 10^4$ bacterias/cm² que es significativamente más alto que frotar ($4,5 \times 10^3$ bacterias/cm²), y equivalente a la técnica de fregado ($1,6 \times 10^4$ bacterias/cm²).

EJEMPLO 11

Uso de potenciadores de sensibilidad para facilitar la detección de IgE humana en el LPM

Se probó la capacidad de los potenciadores de sensibilidad para facilitar la detección de un analito modelo, anticuerpo IgE humano, que se disolvió en un modelo LPM, 1 % p/v NLS-Brij 30 en una PBS. El ensayo ELISA se usó para evaluar la detección de anticuerpos IgE humanos en presencia o ausencia de potenciadores de sensibilidad en el LPM. Específicamente, se recubrió 1 microgramo de anticuerpos (A80-108A, Bethyl Laboratory, TX) con unión específica a anticuerpos IgE humanos por pocillo de una placa ELISA de 96 pozos. La IgE humana (RC80-108, Bethyl Laboratory, TX) se disolvió en el LPM con o sin nuestro potenciador de sensibilidad a una concentración de 0-100 ng/ml. Como control positivo, se prepararon muestras de IgE humana disolviéndolas en un diluyente estándar que contenía BSA al 1 % p/v y Tween 20 al 0,05 % p/v (P7949, Sigma-aldrich, MO) en solución salina tamponada con 50 mM de Tris (T6664, Sigma-aldrich, MO), que se usa comúnmente en inmunoensayos. Se formularon dos tipos de potenciadores de sensibilidad: BSA al 10 % y Tween 20 al 0,5 % en PBS y BSA al 10 % y Tween 20 al 0,5 % en solución salina tamponada con 50 mM de Tris. Cada uno de estos potenciadores de sensibilidad se añadió por separado al LPM que contenía IgE en una relación de 1:10. Después de 30 minutos de incubación de las placas ELISA con un tampón de bloqueo estándar, estas muestras se incubaron en pozos individuales durante 1 hora. Después de lavar los pozos, se incubaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP a una concentración de 1 microgramo/ml en cada pocillo durante 1 hora. Después del lavado, se midió una señal de quimioluminiscencia basada en HRP (inducida por sustratos 54-61-00, KPL, MD), que significa la capacidad de detección de anticuerpos IgE por ELISA, para cada caso de prueba mediante el uso de un espectrofotómetro.

La FIGURA 18 grafica la intensidad de la señal de quimioluminiscencia de varios casos de prueba en función de la concentración del analito. Los resultados muestran que el LPM por sí solo no era un reactivo de detección adecuado para el ensayo ELISA en comparación con el control positivo. Sin embargo, agregar potenciadores de sensibilidad al LPM aumentó la capacidad de detección del ensayo analítico. Adicionalmente, se demostró que la solución salina tamponada con tris eleva la intensidad de la señal en comparación con la solución salina tamponada con fosfato, cuando se usan como solventes para preparar potenciadores de sensibilidad. Estos resultados demostraron que el LPM en sí no es eficiente para facilitar la detección de analitos por ELISA; sin embargo, la adición de potenciadores de sensibilidad puede mejorar significativamente la capacidad de detección de analitos por ELISA.

Lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende limitarse a las modalidades ilustrativas mostradas y descritas en la presente descripción.

EJEMPLO 12

Suministro de Inulina y Aciclovir en piel de cerdo

Se realizaron experimentos de suministro de fármacos en piel de cerdo *in vitro*. La piel porcina congelada de grosor completo precortada, cosechada de la región abdominal lateral de los cerdos Yorkshire, se obtuvo de Lampire Biological Laboratory, Inc., PA. La piel se almacenó a -80 °C en el congelador antes del experimento. La piel se descongeló a temperatura ambiente, y la piel sin imperfecciones visibles tales como arañazos y abrasiones se cortó en trozos pequeños (2,5 x 2,5 cm). Las piezas de piel se montaron en una celda de difusión Franz (PermeGear, Inc., PA). Antes de cada experimento, el compartimento receptor se llenó con una solución salina tamponada con fosfato (LPM) o fosfato (PBS). Se eligió una mezcla al 1 % p/v de NLS y Brij 30 en PBS como una formulación modelo de un LPM. Antes de cada experimento, se midió la conductividad eléctrica de la piel para garantizar su integridad. La piel se consideró dañada si la conductividad inicial era superior a 2,2 microA/cm². La ecografía se aplicó mediante el uso de un sonicator (VCX 400, Sonics and Materials) que funciona a una frecuencia de 20 kHz a una intensidad de 2,4 W/cm² durante 5 minutos. Después de eliminar el LPM o PBS, el compartimento del donante se llenó con 10 microCi/ml de solución de Inulina (NET086L001MC, PerkinElmer Life y Analytical Sciences, Inc., MA) en PBS. Se tomaron muestras de los compartimientos del receptor 24 horas después de la aplicación del ultrasonido. En un experimento separado, se introdujo una superficie abrasiva giratoria (un cepillo circular con cerdas de plástico) en la cámara del donante de manera que contactara directamente con la muestra de piel. Se colocaron 10 microCi/ml de solución de Aciclovir sobre la piel durante 24 horas. La piel se lavó con una solución salina y se disolvió en Solvable (PerkinElmer, MA). Las concentraciones de esas muestras se midieron mediante un contador de centelleo (Tri-Carb 2100 TR, Packard, CT). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, 22 °C. No se aplicó ultrasonido ni dispositivo abrasivo en los controles. Las barras de error indican la desviación estándar.

5 minutos de irradiación con ultrasonido en combinación con el LPM aumentaron el transporte del fármaco, en comparación con el ultrasonido solo y la difusión pasiva en la piel intacta, tal como se muestra en la FIGURA 19(a). Se observó el mismo efecto cuando la piel se raspó con un dispositivo de cepillado en movimiento que comprendía una pluralidad de cerdas (FIGURA 19 (b)). En resumen, los ejemplos que usan piel de cerdo *in vitro* demostraron que aplicar energía con un LPM es efectivo para mejorar el paso de moléculas a través o hacia los tejidos. Parámetros tal como la potencia, el tiempo de aplicación y la formulación de un LPM pueden optimizarse para adaptarse a la situación individual, tanto con respecto al tipo de tejido como a las sustancias a transportar.

10

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para licuar al menos parcialmente un tejido de un sujeto vivo, que comprende:
5 un depósito que se configura para acoplar operativamente una fuente de energía al tejido del sujeto vivo;
un medio promotor de licuefacción comprendido por el depósito, el medio promotor de licuefacción que
comprende un surfactante no iónico y un surfactante de ion híbrido; y
un material abrasivo,
10 el depósito, el material abrasivo y el medio promotor de licuefacción se configuran para aplicar energía al
tejido del sujeto vivo efectiva para licuar al menos parcialmente el tejido del sujeto vivo.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, el medio promotor de licuefacción que comprende 3-(decil dimetil amonio)
propano sulfonato y polietilenglicol dodecil éter en una solución tamponada.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, una concentración total del surfactante no iónico y el surfactante de ion
15 híbrido (p/v) en el medio promotor de licuefacción está entre aproximadamente 0,01 % a aproximadamente
20 %.
4. El dispositivo de la reivindicación 1, una concentración total del surfactante no iónico y el surfactante de ion
20 híbrido (p/v) en el medio promotor de licuefacción está entre aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10
%.
5. El dispositivo de la reivindicación 1, el surfactante no iónico y el surfactante de ion híbrido están en una
relación de entre aproximadamente 25:75 y aproximadamente 75:25.
- 25 6. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde uno o más de:
el surfactante no iónico comprende uno o más de: polietilenglicol dodecil éter, polioxietileno 23-lauril éter,
polioxietileno 2-cetil éter, polioxietileno 10-cetil éter, polioxietileno 20-cetil éter, polioxietileno 2-estearil éter,
polioxietileno 10-estearil éter, polioxietileno 20-estearil éter, polioxietileno 2-oleil éter, polioxietileno 10-oleil
30 éter, polioxietileno 100-estearil éter, y polioxietileno 21-estearil éter; y
el surfactante de ion híbrido comprende uno o más de: 3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato, 3-(dodecil
dimetil amonio) propano sulfonato, miristildimetil amonio propano sulfonato, hexadecildimetil amonio propano
sulfonato, cocamidopropil betaína, oleil betaína, cocamidopropil hidroxisultaina y 3-(3-colamidopril)-
dimetilamonio-1-propanosulfonato.
- 35 7. El dispositivo de la reivindicación 1, el depósito se configura para aplicar la energía al tejido del sujeto vivo en
forma de uno o más de: energía de ultrasonido, energía mecánica, energía óptica, energía térmica y energía
eléctrica.
- 40 8. El dispositivo de la reivindicación 1, el material abrasivo está:
compuesto por el medio promotor de licuefacción como una suspensión de partículas abrasivas; o acoplado
operativamente al depósito, el depósito se configura para transmitir energía mecánica a través del material
abrasivo al tejido del sujeto vivo en forma de uno o más de: agitación, abrasión, presión y fuerza de
cizallamiento.
- 45 9. El dispositivo de la reivindicación 8, el material abrasivo comprende al menos uno de: una tela, cristales
abrasivos, polvo de diamante, una esponja polimérica, una esponja natural, un disco abrasivo y un cepillo.
10. El dispositivo de la reivindicación 8, el material abrasivo incluye una esponja, la esponja se configura para
50 almacenar el medio promotor de la licuefacción.
11. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además un émbolo conectado operativamente al
depósito y que se configura para aplicar el medio promotor de licuefacción desde el depósito al tejido del
sujeto vivo.
- 55 12. El dispositivo de la reivindicación 1, al menos una porción del dispositivo es estéril o desechable.
13. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además uno o más de una composición terapéutica y
una composición cosmética,
60 la composición terapéutica que comprende al menos uno de un fármaco basado en proteínas, un fármaco
basado en péptidos, insulina, eritropoyetina, interferón, moléculas de ácido nucleico, antiinflamatorios,
antivirales, antifúngicos, antibióticos, anestésicos locales, sacáridos, un fármaco basado en lípidos, un
fármaco basado en carbohidratos, un fármaco de molécula pequeña, un fármaco basado en nanopartículas y
un fármaco encapsulado en liposomas, y
65 el depósito se configura para conectarse operativamente al tejido del sujeto vivo para aplicar una o más de la
composición terapéutica y la composición cosmética al tejido del sujeto vivo.

14. Una composición, que comprende:
3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato; y
un polietilenglicol dodecil éter,
5 en donde el 3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato y el polietilenglicol dodecil éter están presentes en una concentración total del 0,01 % al 20 % (p/v) en una solución tampón.
15. Un método para solubilizar una región de interés en la piel, que comprende:
aplicar energía a la región de interés; y
poner en contacto la región de interés con una composición, en donde la composición comprende:
10 3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato; y
un polietilenglicol dodecil éter,
en donde el 3-(decil dimetil amonio) propano sulfonato y el polietilenglicol dodecil éter están presentes en una concentración total del 0,01 % al 20 % (p/v) en una solución tampón.

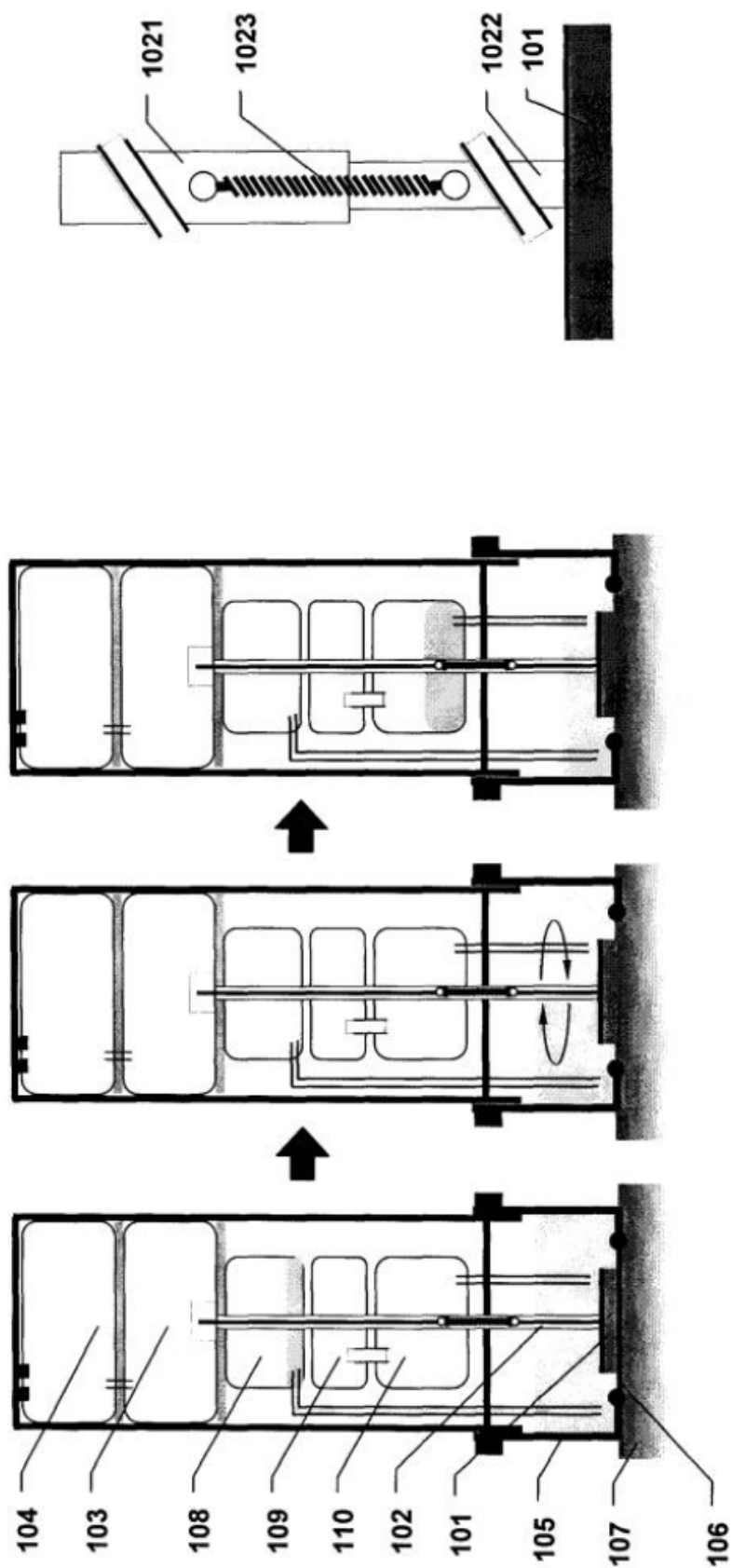


Figura 1d

Figura 1c

Figura 1b

Figura 1a

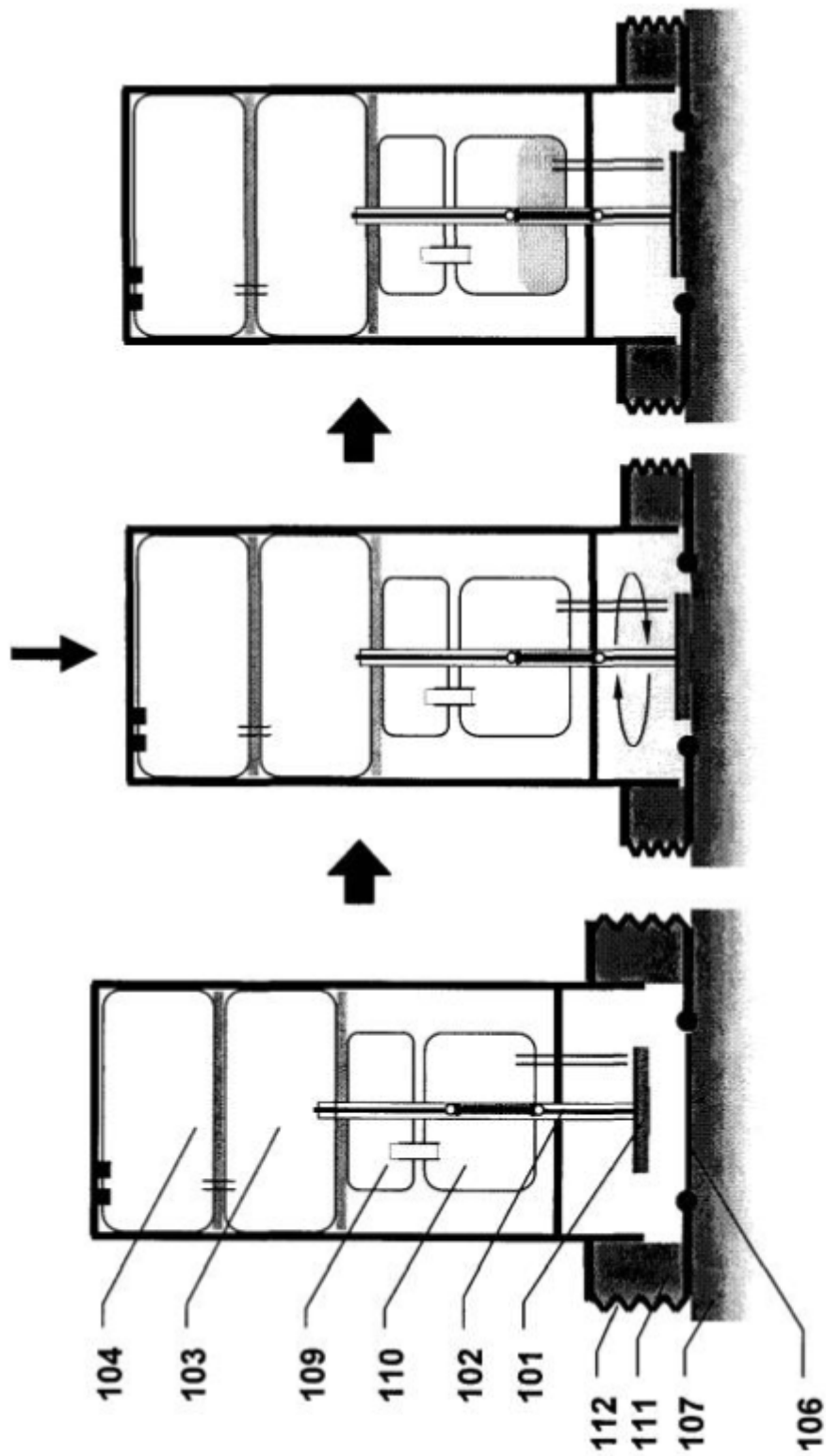


Figura 1e

Figura 1f

Figura 1g

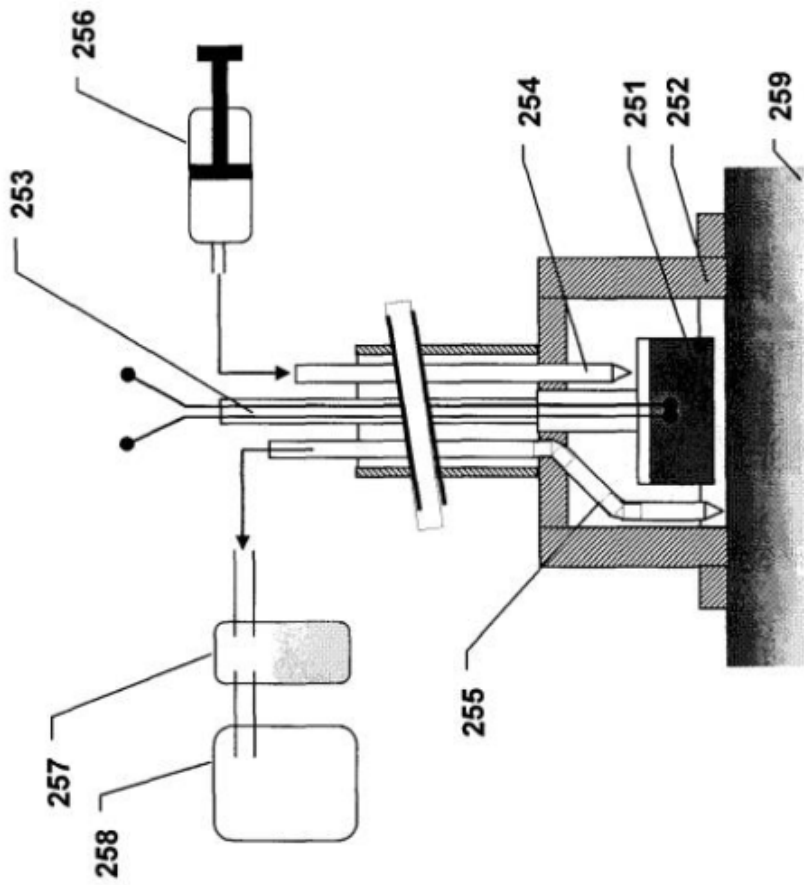


Figura 2b

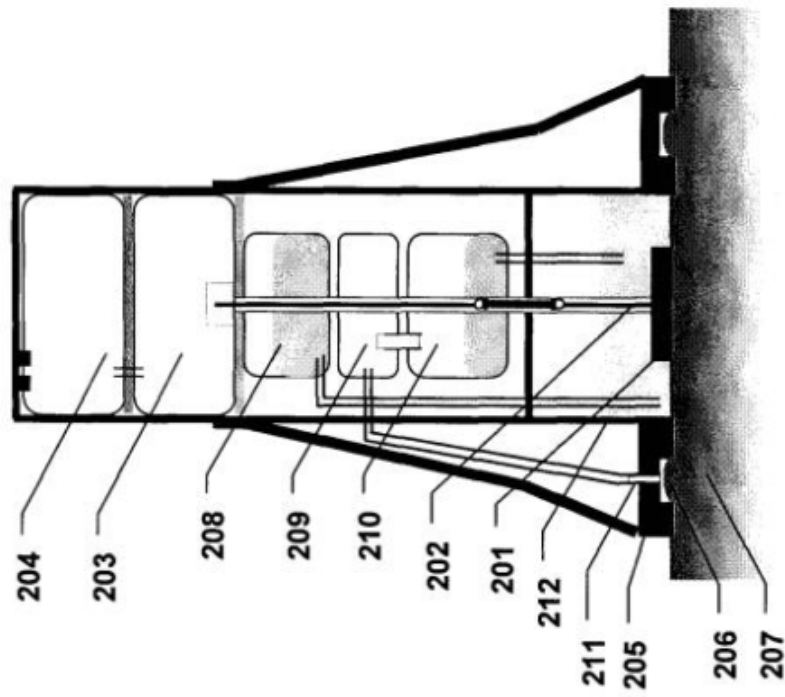


Figura 2a

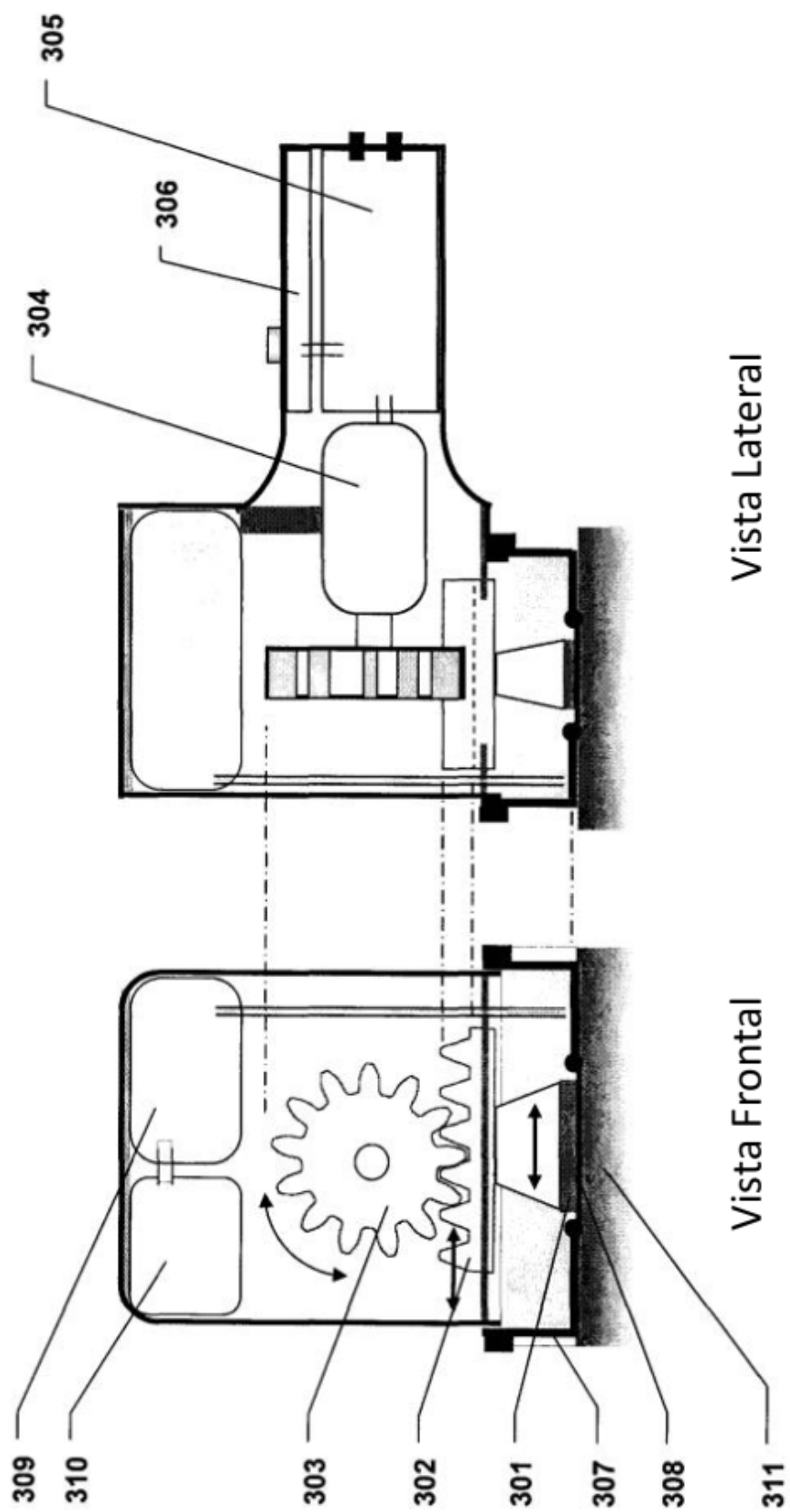


Figura 3a

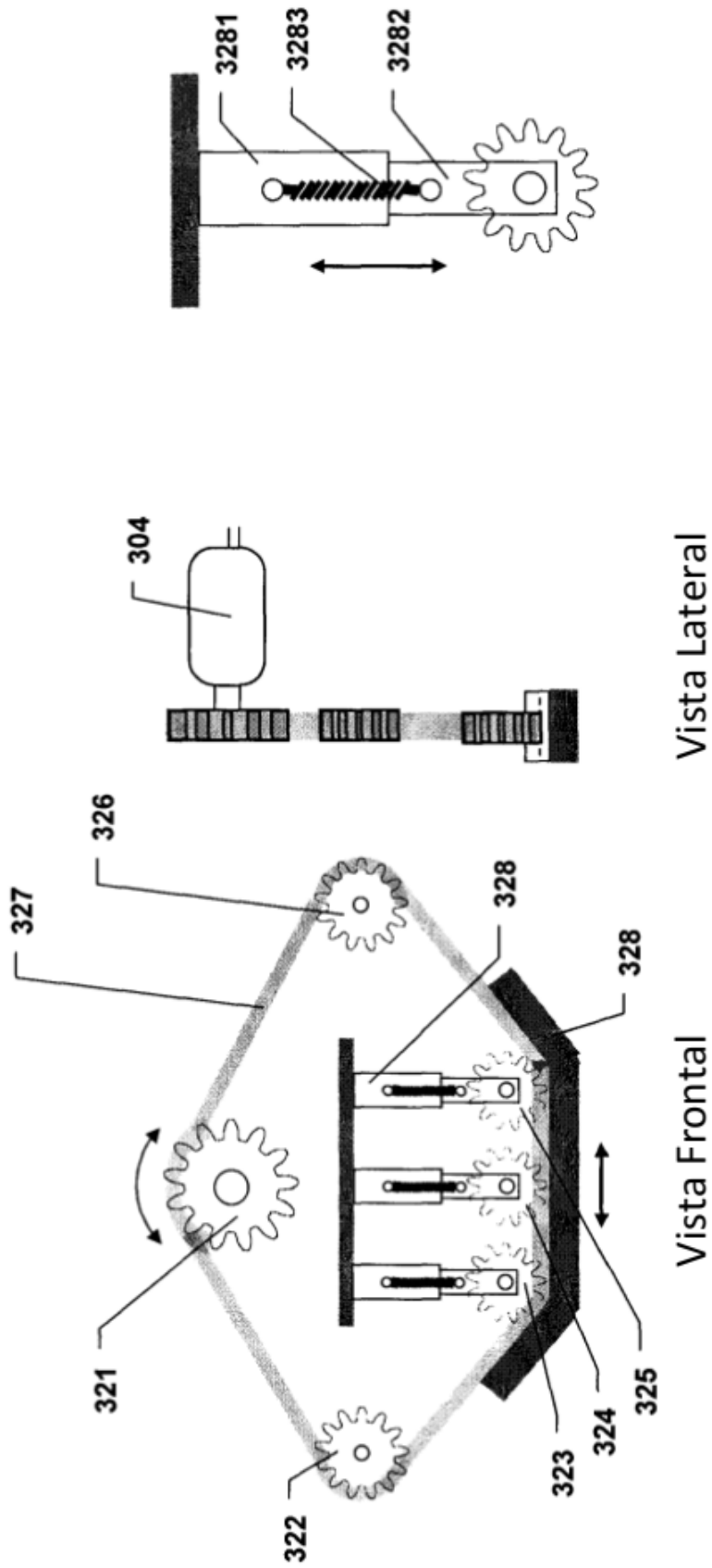


Figura 3c

Figura 3b

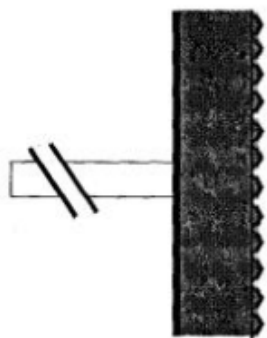


Figura 4a

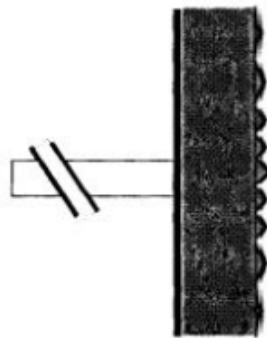


Figura 4b

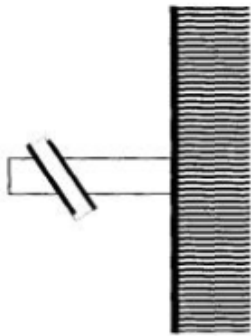


Figura 4e

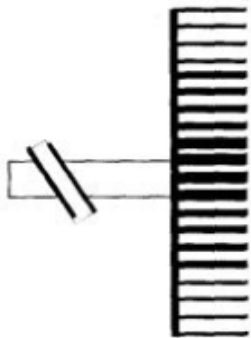


Figura 4f

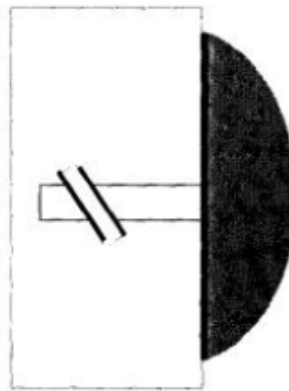


Figura 4c

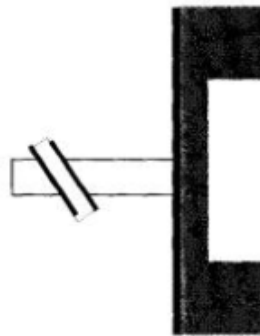


Figura 4d

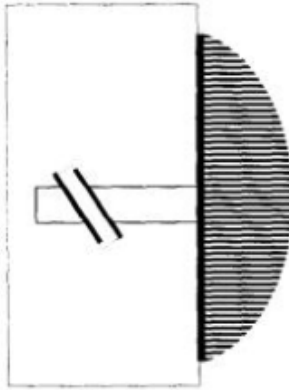


Figura 4g

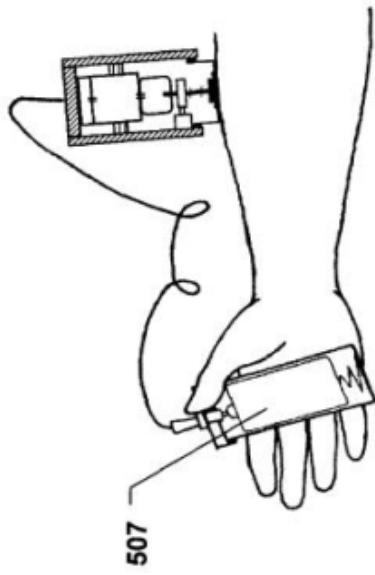


Figura 5c

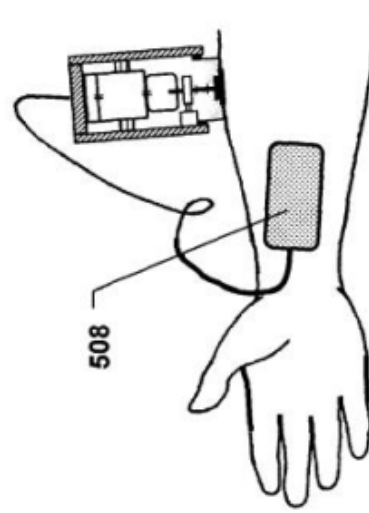


Figura 5d

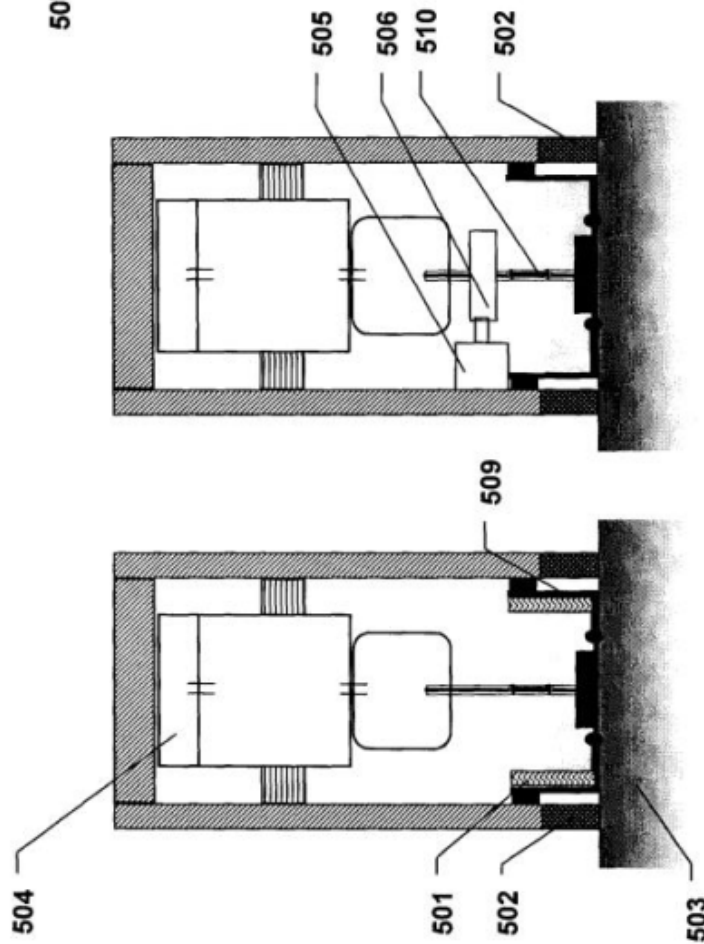
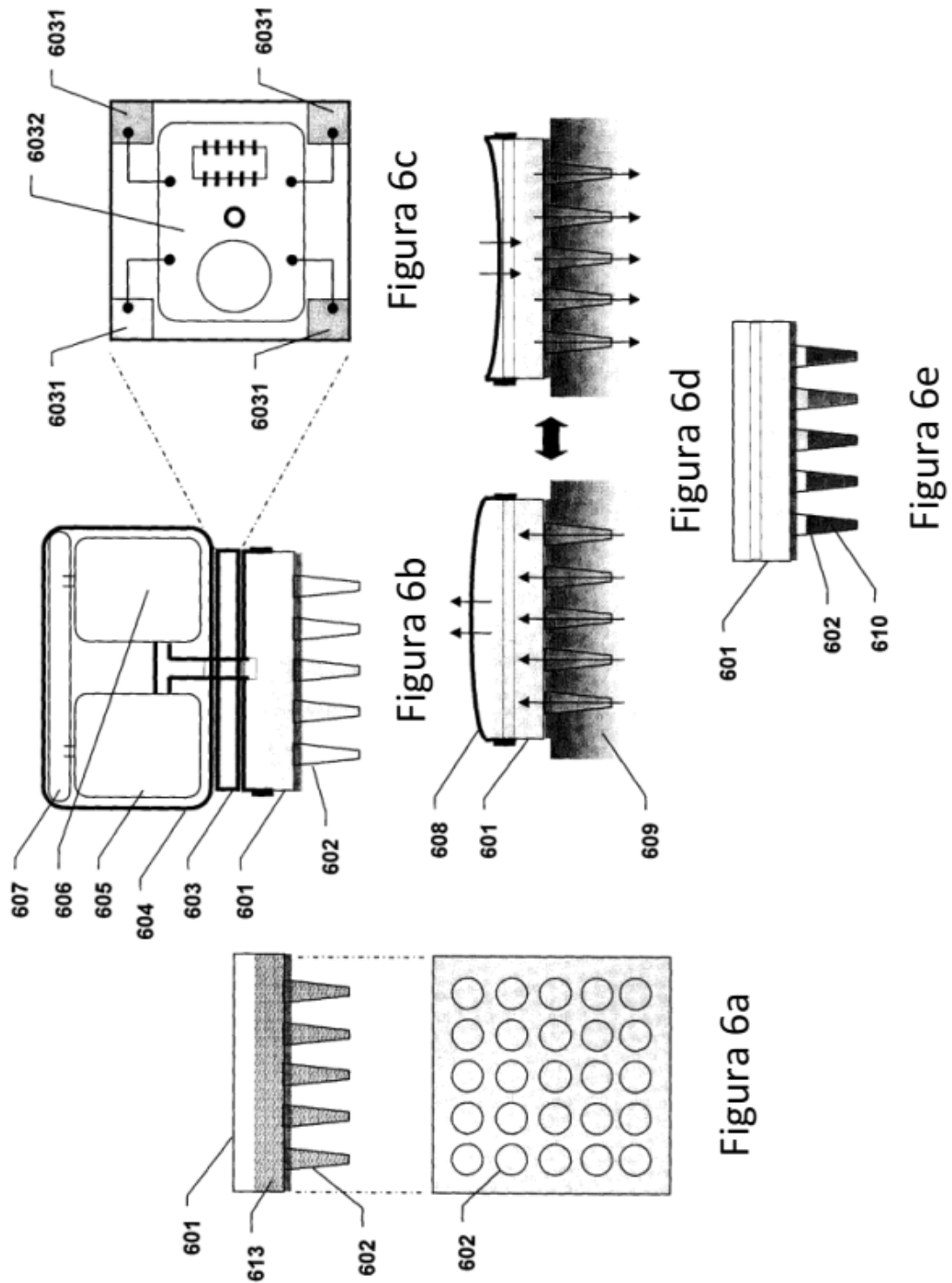


Figura 5b

Figura 5a



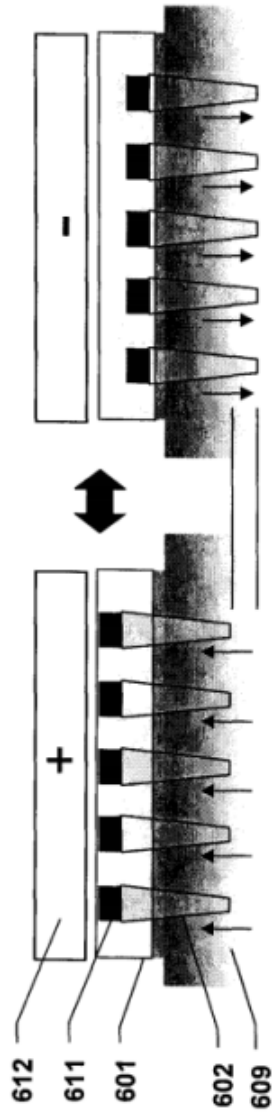


Figura 6f

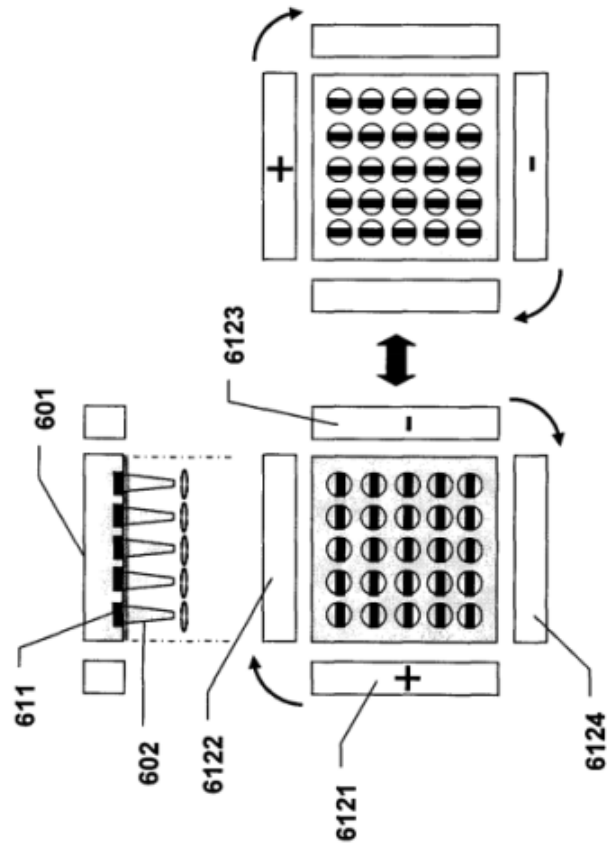


Figura 6g

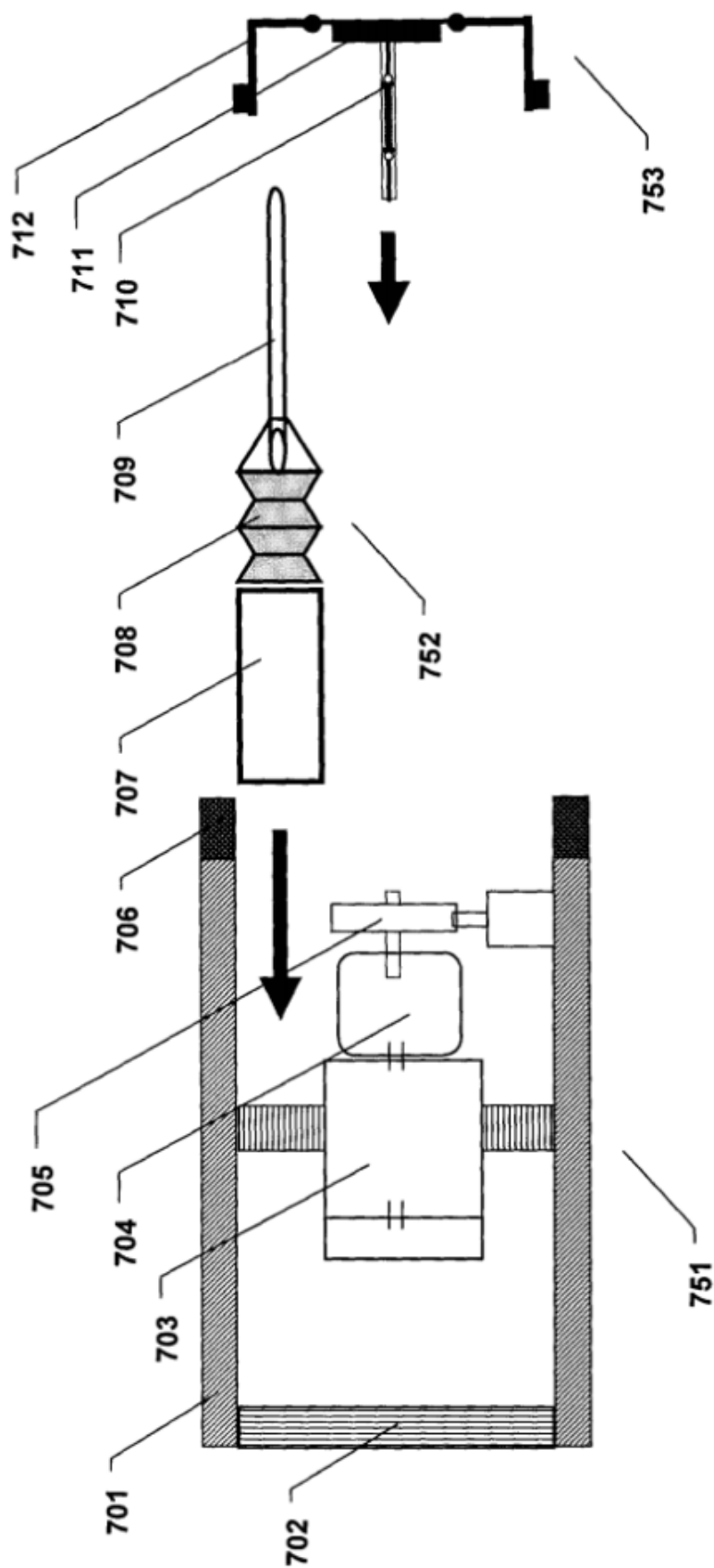


Figura 7a

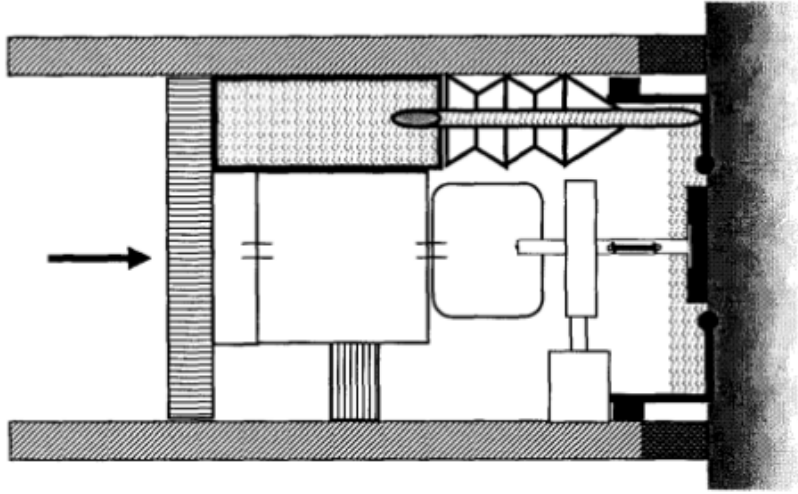


Figura 7d

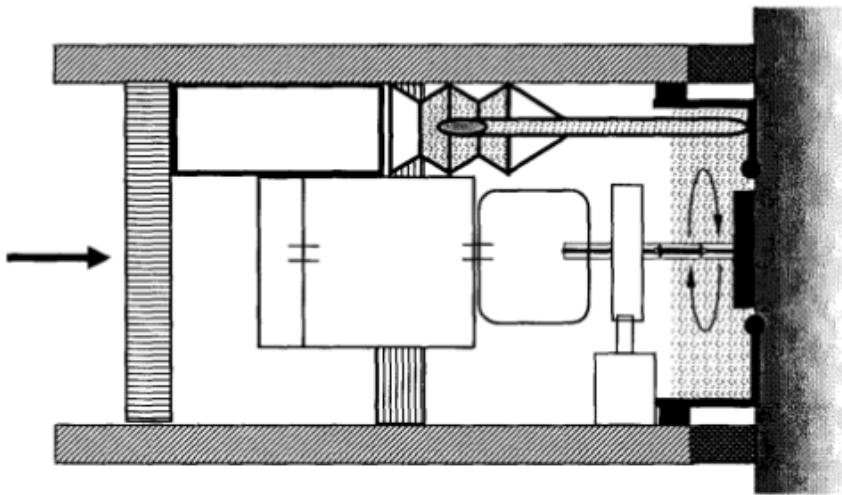


Figura 7c

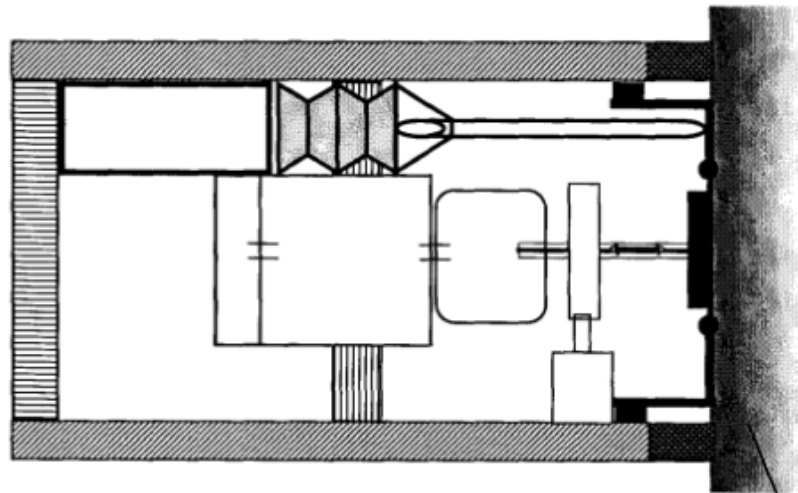


Figura 7b

713

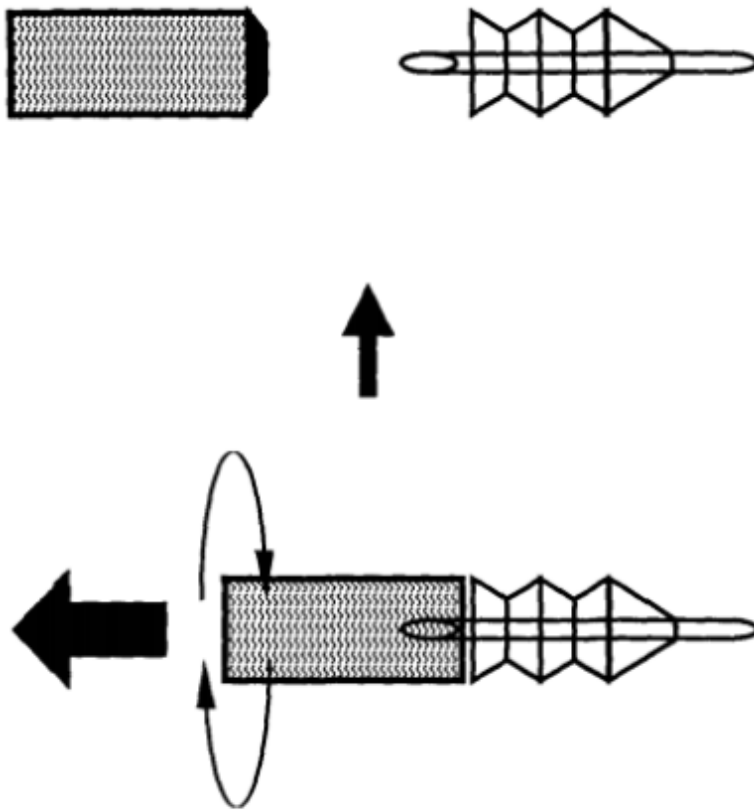


Figura 7e

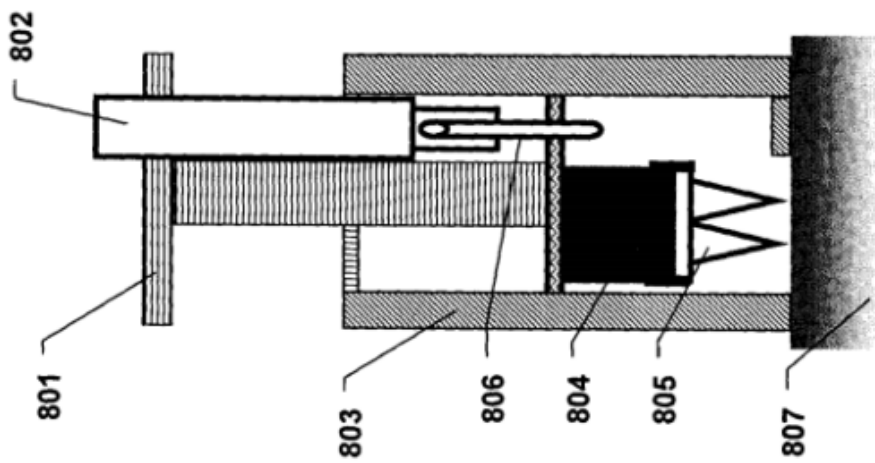


Figura 8a

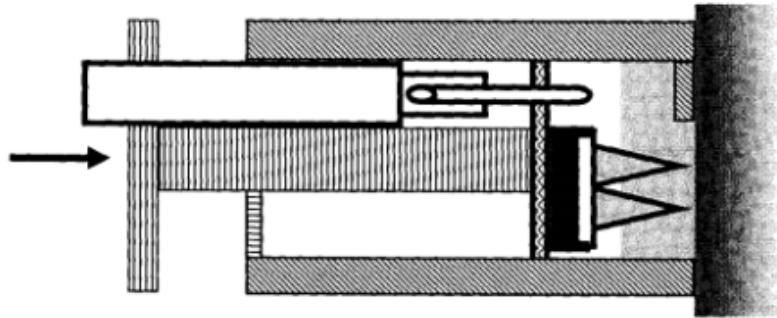


Figura 8b

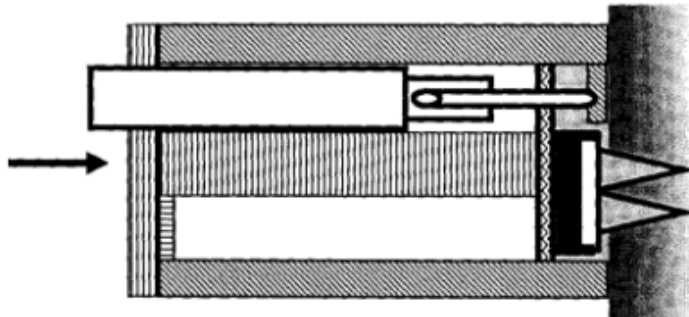


Figura 8c

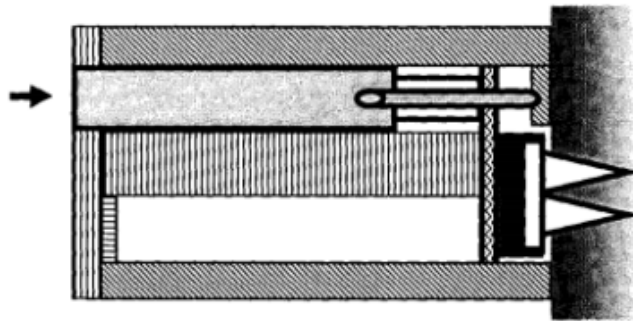


Figura 8d

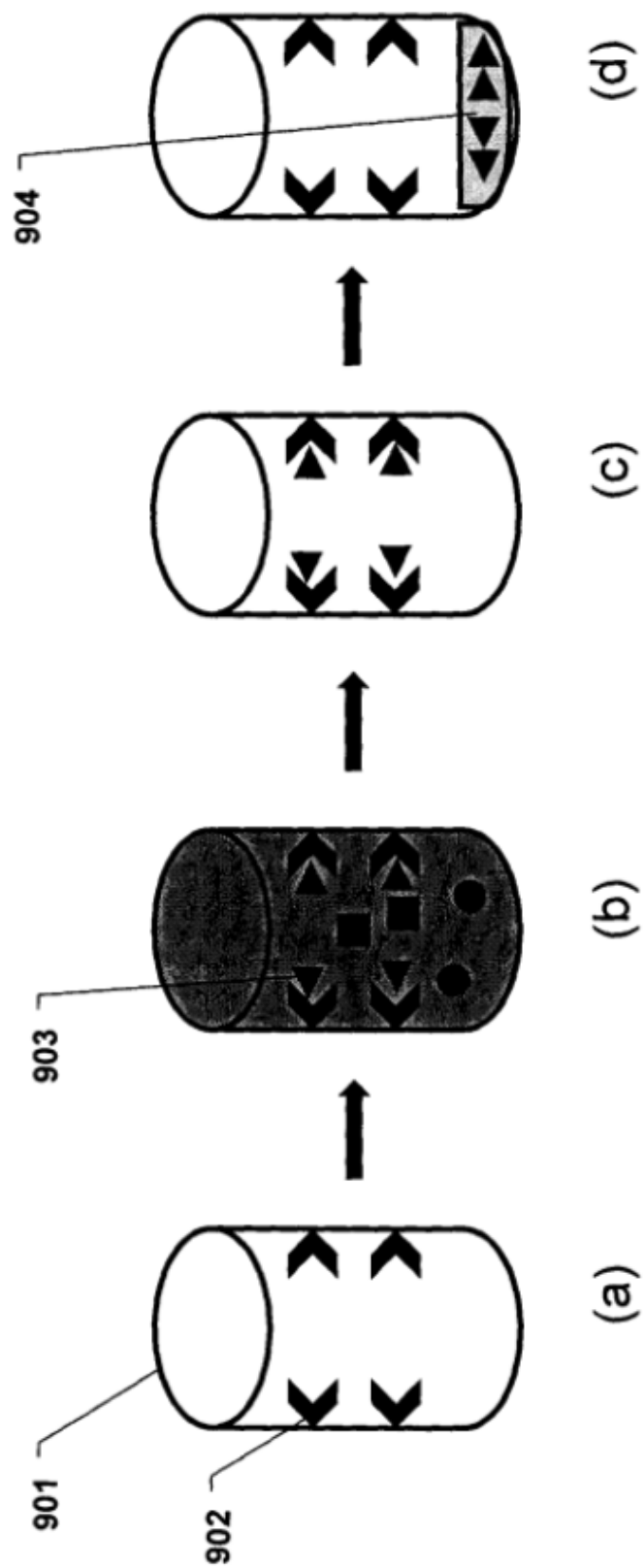


Figura 9

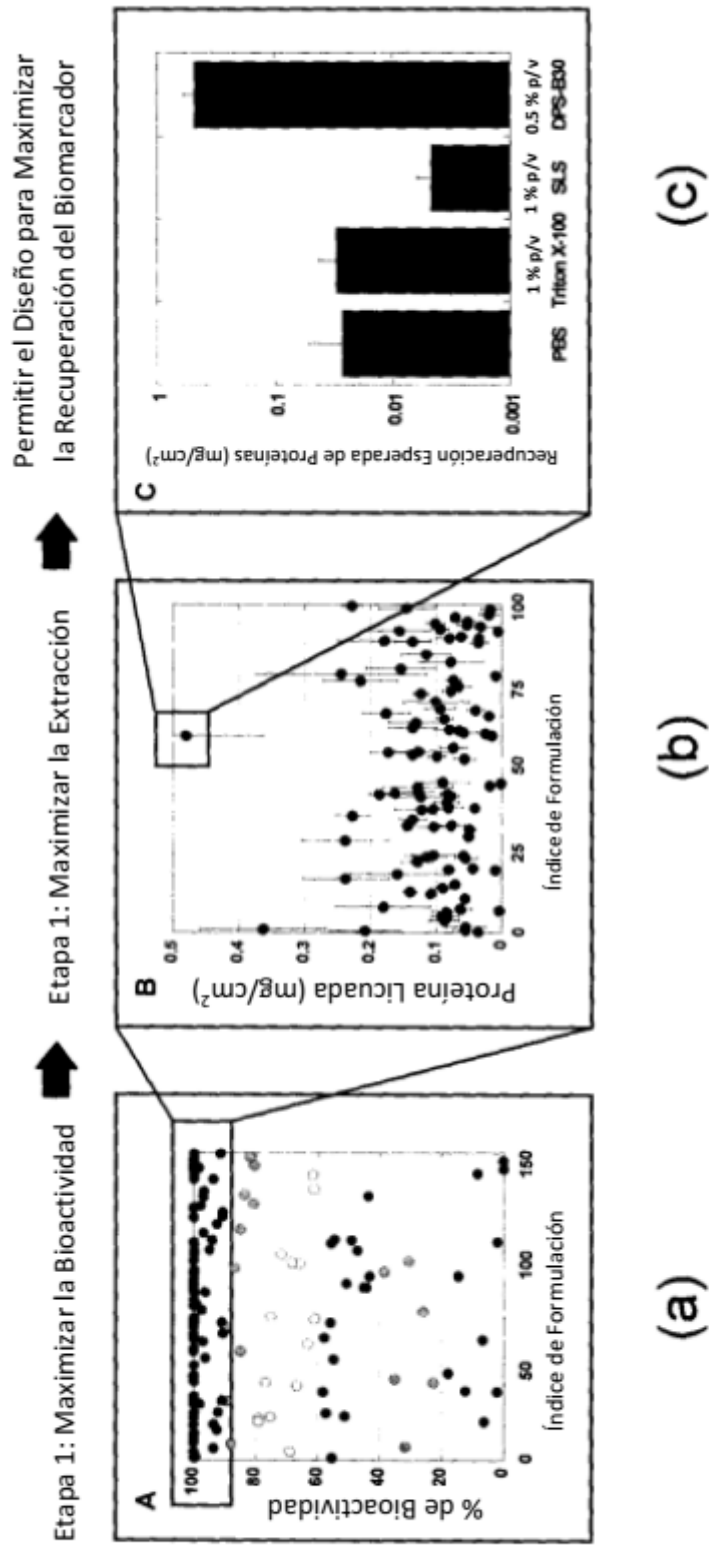


Figura 10

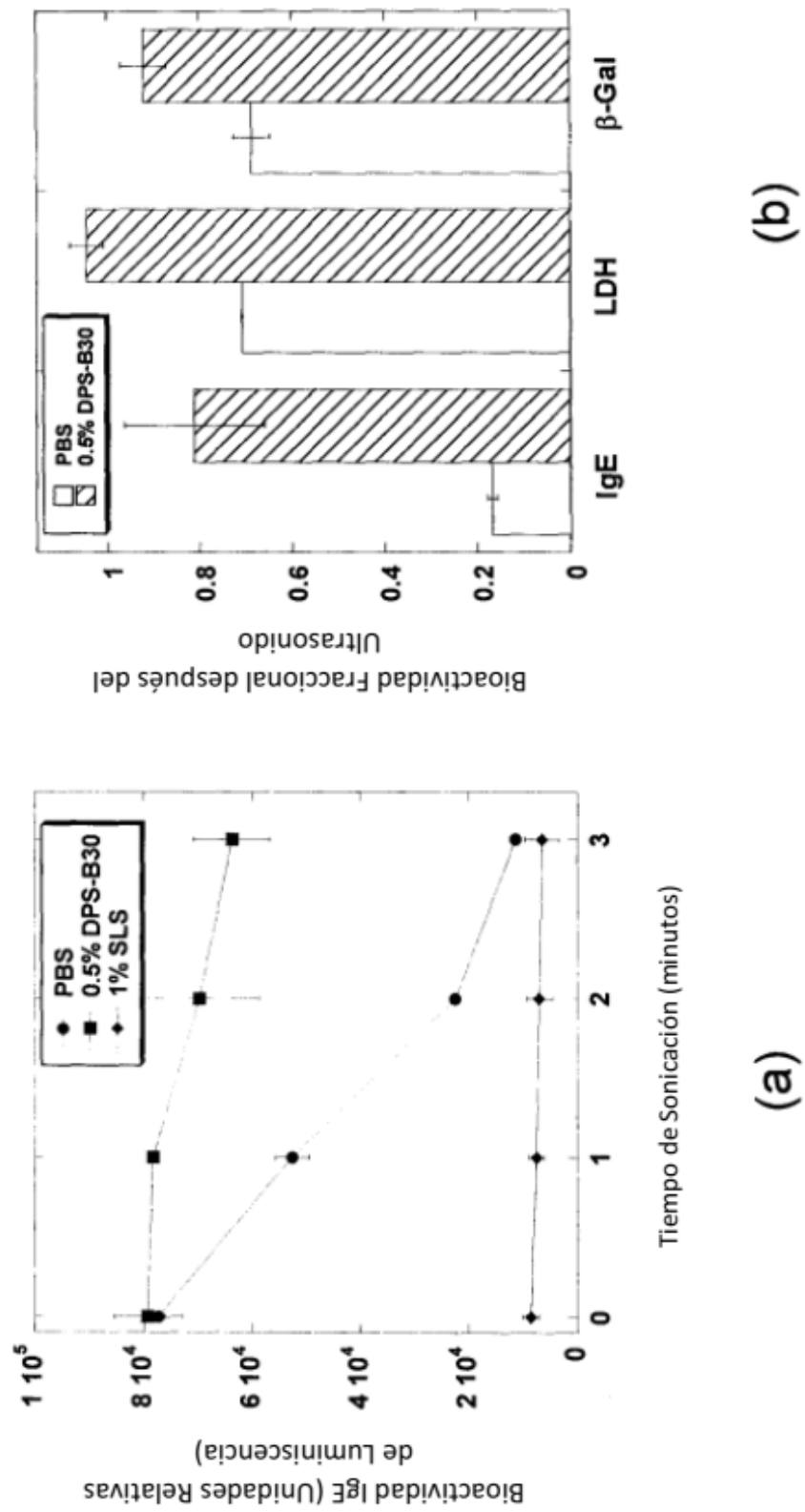


Figura 11

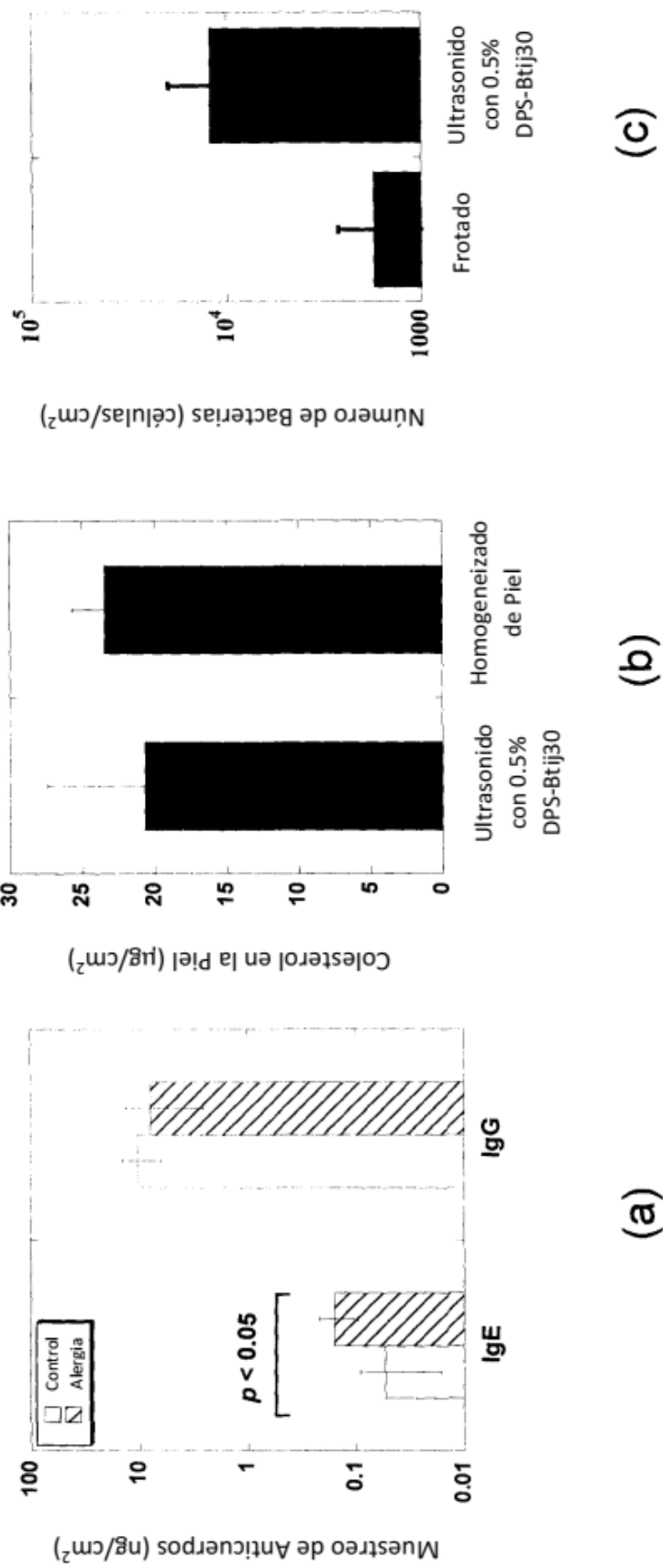


Figura 12

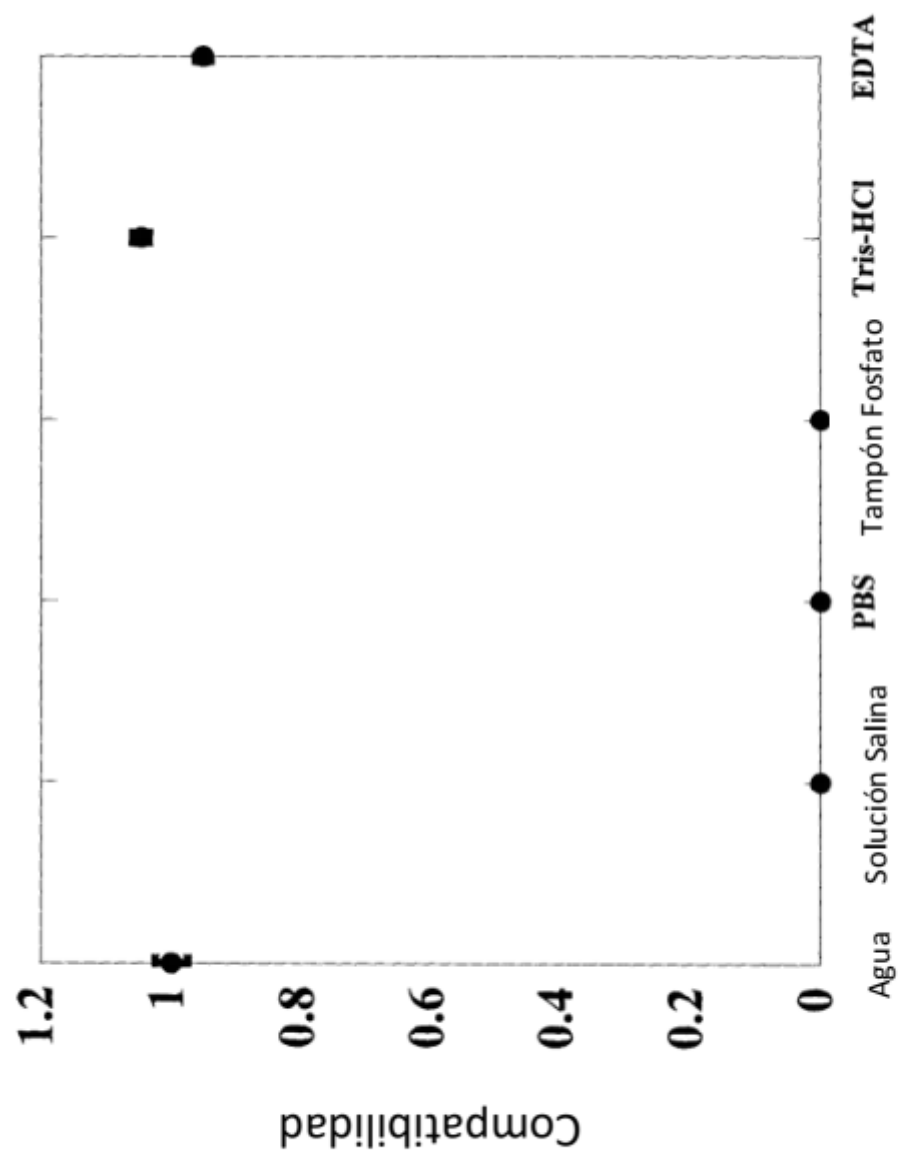


Figura 13

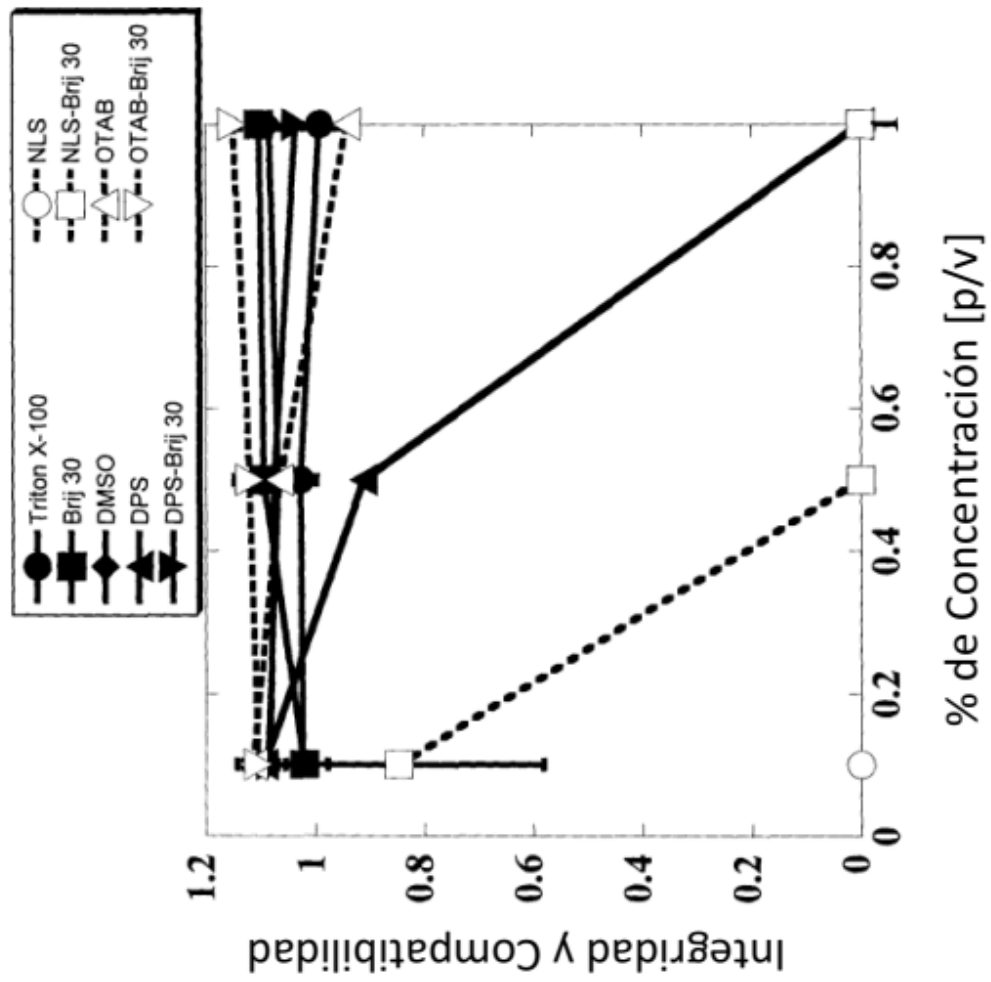


Figura 14

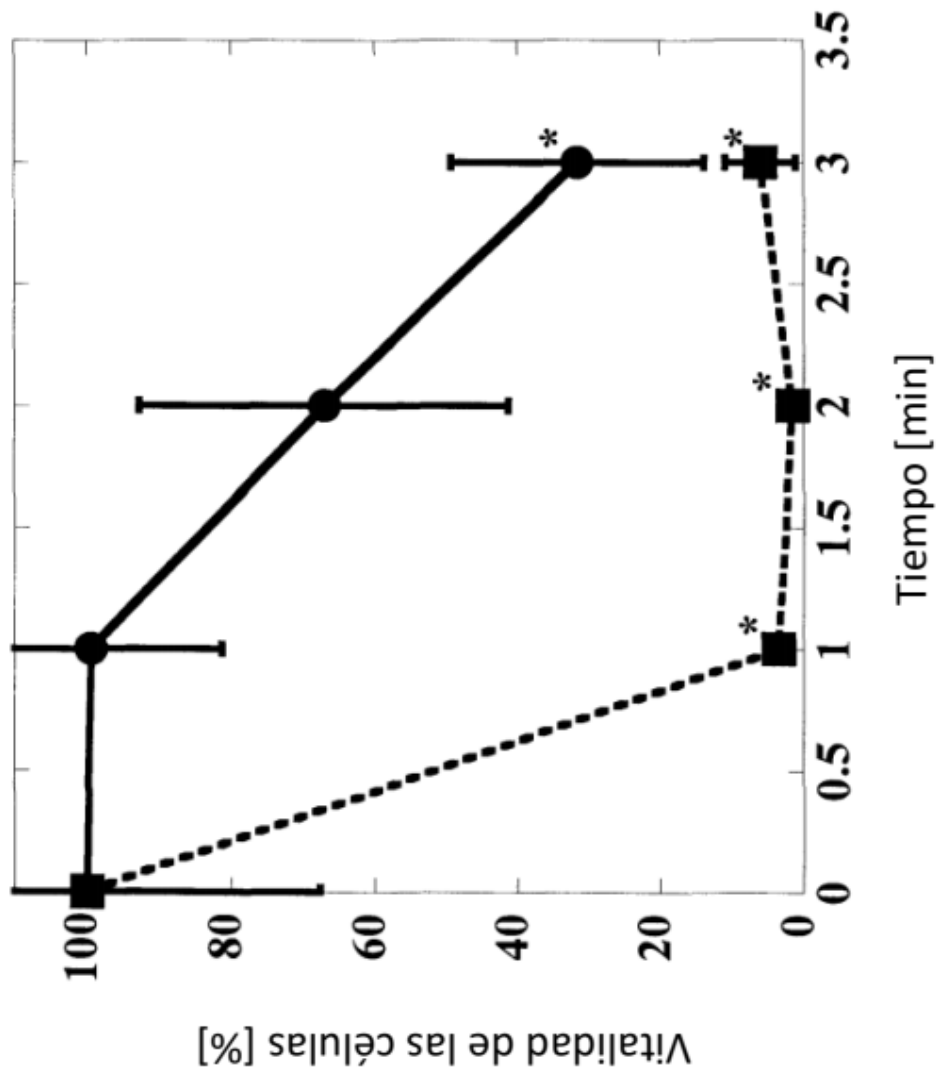


Figura 15

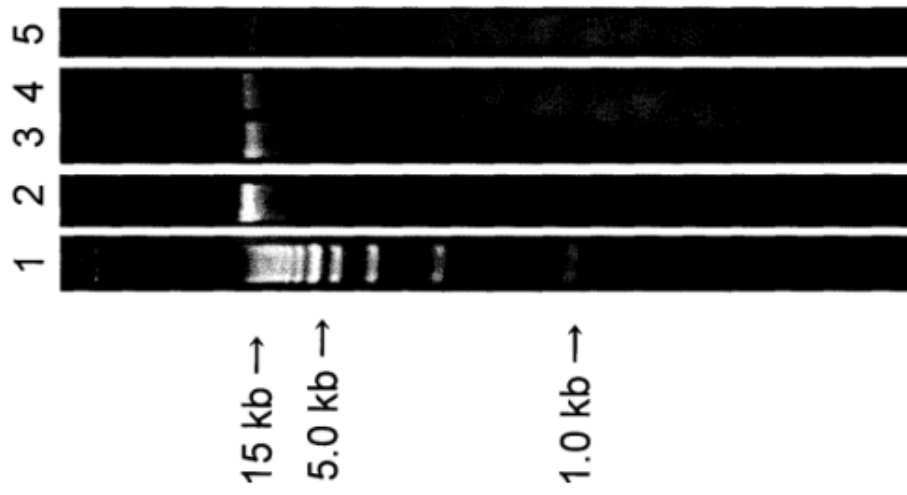


Figura 16

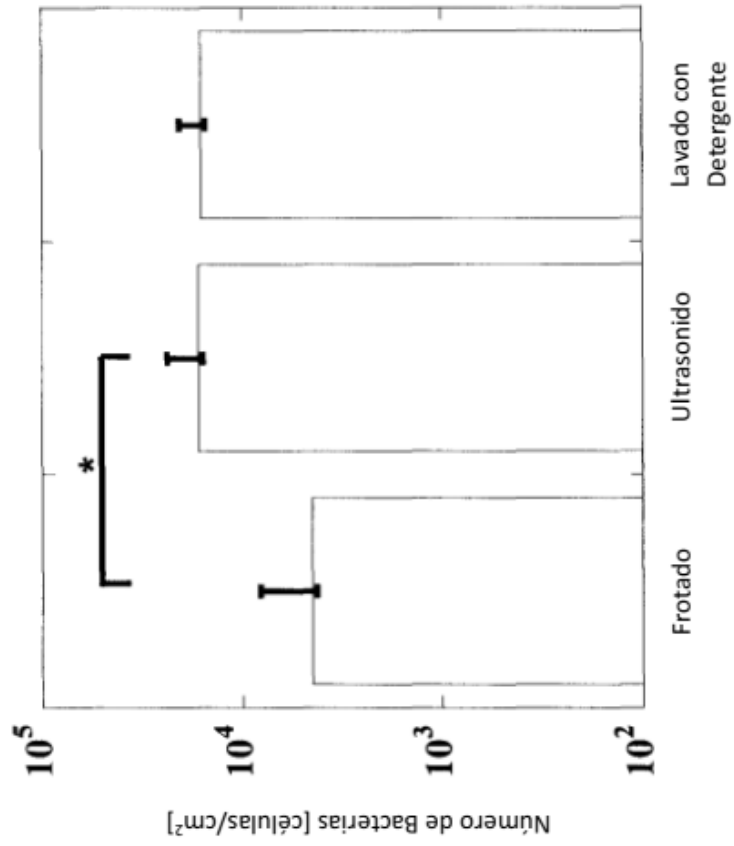


Figura 17b

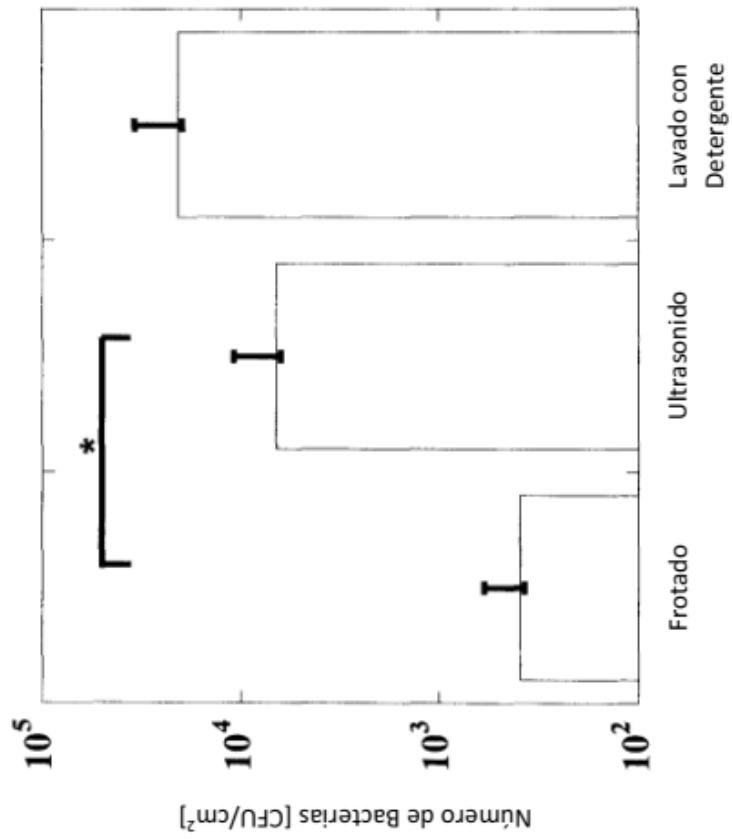


Figura 17a

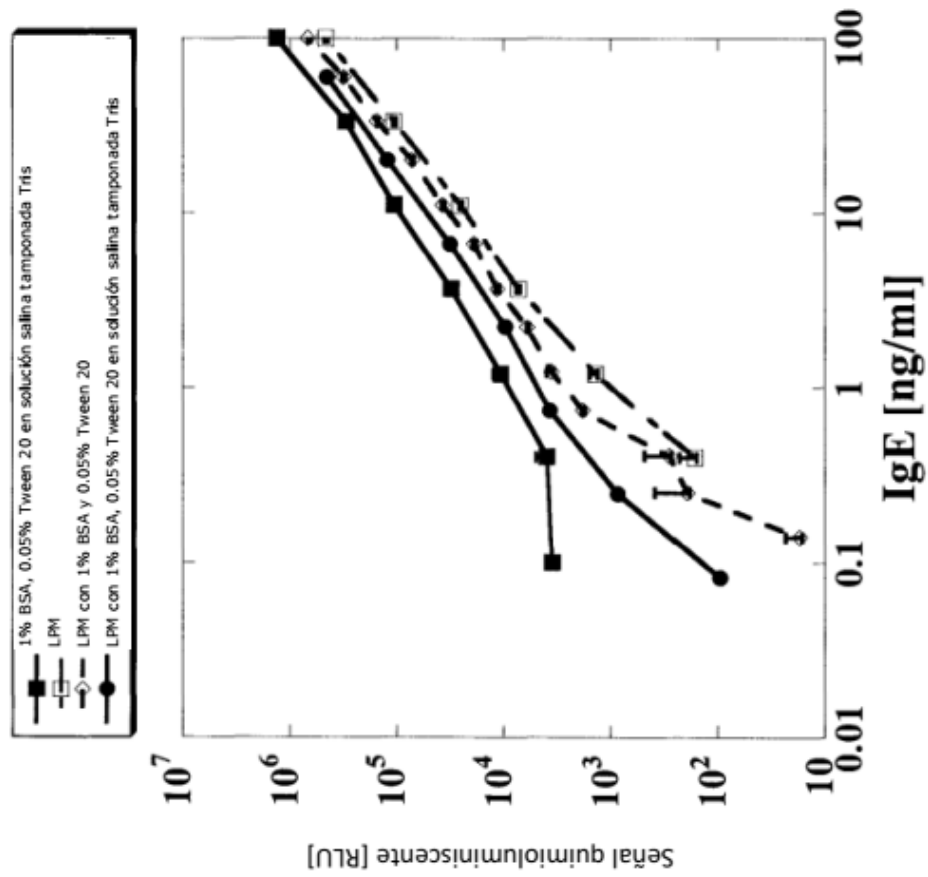


Figura 18

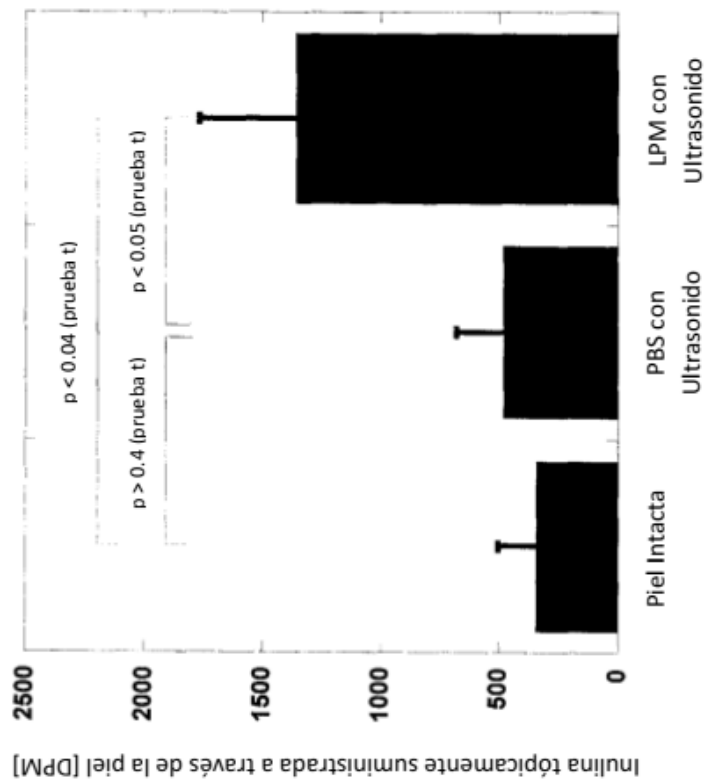


Figura 19a

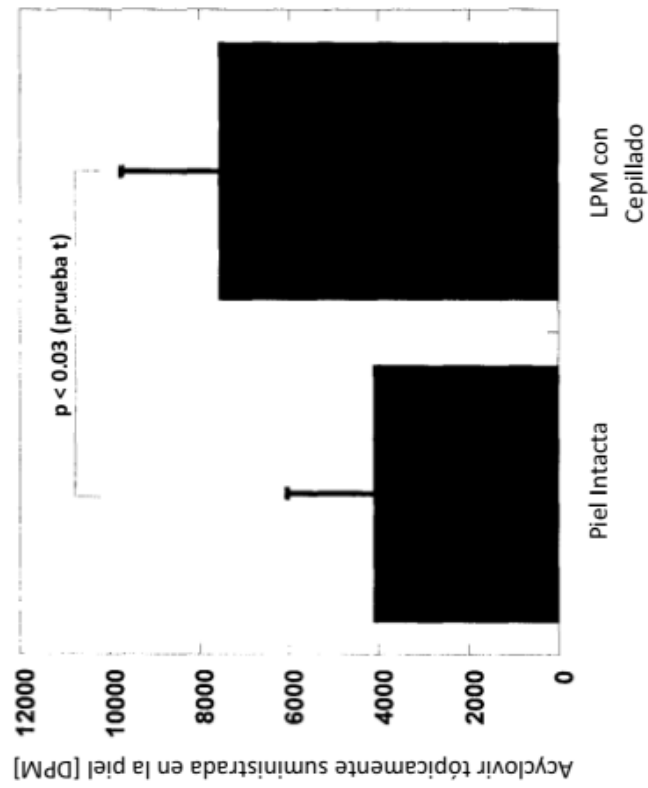


Figura 19b