

DESCRIPCIÓN

SISTEMAS Y MÉTODOS PARA LA INTEGRACIÓN DE LA RECOLECCIÓN DE MICROFLUIDO LAGRIMAL Y EL ANÁLISIS POR FLUJO LATERAL DE ANALITOS DE INTERÉS

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad bajo 35 U.S.C. 119(e) a la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos número de serie 62/053,923, titulada "Sistemas y Métodos para la Integración de Recolección de Lágrimas Microfluidas y Análisis de Flujo Lateral de Analitos de Interés" presentada el 23 de septiembre de 2014, cuya descripción completa se incorpora aquí como referencia.

Antecedentes

Las lágrimas cumplen un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de la superficie ocular, la protección contra los ataques microbianos y la preservación de la agudeza visual. Estas funciones, a su vez, dependen críticamente de la composición y estabilidad de la estructura de la película lagrimal, que incluye una base de mucina subyacente, un componente acuoso medio y una capa lipídica superpuesta. La interrupción, deficiencia o ausencia de la película lagrimal puede afectar gravemente el ojo. Estos desórdenes pueden causar desecación intratable del epitelio corneal, ulceración y perforación de la córnea, aumento de la incidencia de enfermedades infecciosas y, en última instancia, deterioro visual y ceguera.

La queratoconjuntivitis sicca (KCS), u "ojo seco", es una condición en la cual uno o más de los componentes de la estructura de la película lagrimal enumerados anteriormente está presente en un volumen insuficiente o está, de otra manera, fuera de equilibrio con los otros componentes. La tonicidad del líquido o la osmolaridad de las lágrimas aumentan en los pacientes con KCS. La KCS se asocia con condiciones que afectan la salud general del cuerpo, como el síndrome de Sjögren, el envejecimiento y la deficiencia de andrógenos.

Resumen

La osmolaridad de una película lagrimal es un indicador sensible y específico para el diagnóstico de KCS y otras condiciones. La osmolaridad de un fluido de muestra (como un ejemplo no limitante, una lágrima) se determina, a manera de ejemplo no limitativo, mediante una técnica *ex vivo* denominada "depresión del punto de congelación", en la que los solutos o iones en un disolvente (a manera de ejemplo no limitativo, agua), provocan una disminución del punto de congelación del fluido de lo que sería sin los iones. En el análisis de la depresión del punto de congelación se encuentra el punto de congelación del fluido de la muestra ionizada detectando la temperatura a la cual una cantidad de la muestra (típicamente del orden de aproximadamente varios mililitros) empieza a congelarse primero en un contenedor (como un ejemplo no limitante, un tubo). Para medir el punto de congelación, se recoge un volumen del fluido de muestra en un recipiente, tal como un tubo. A continuación, se sumerge una sonda de temperatura en el fluido de muestra y el recipiente se pone en contacto con un baño de congelación o dispositivo de refrigeración Peltier. La muestra se agita continuamente para conseguir un estado líquido superenfriado por debajo de su punto de congelación. Tras la inducción mecánica, la muestra se solidifica, alcanzando su punto de congelación debido al calor termodinámico de fusión. La desviación del punto de congelación de la muestra desde 0°C es proporcional al nivel de soluto en el fluido de la muestra. Este tipo de dispositivo de medición se denomina a veces osmómetro.

En la actualidad, las mediciones de la depresión del punto de congelación se hacen *ex vivo* mediante la extracción de las muestras de lágrimas del ojo usando una micropipeta o tubo capilar y midiendo la depresión del punto de congelación que resulta de la osmolaridad aumentada. Sin embargo, estas mediciones *ex vivo* a menudo están plagadas de muchas dificultades. Por ejemplo, para realizar el análisis de depresión del punto de congelación de la muestra de lágrimas, se debe recoger un volumen relativamente grande, típicamente del orden de 20 microlitros (μL) de una película lagrimal. Debido a que no se obtiene más de 10 a 100 nanolitros (nL) de muestra de lágrima en cualquier momento de un paciente de KCS, la recolección de cantidades suficientes de fluido para las técnicas *ex vivo* convencionales requiere que un médico induzca lacrimación refleja en el paciente. La lacrimación refleja es causada mediante una irritación aguda o prolongada de la superficie ocular, similar a cuando una gran pieza de suciedad se aloja en el ojo de alguien. Las lágrimas reflejas son más diluidas, en otras palabras, tienen menos iones soluto que las lágrimas que normalmente se encuentran en el ojo. Cualquier dilución de la película lagrimal invalida la capacidad diagnóstica de una prueba de osmolaridad para el ojo seco y, por lo tanto, hace que los métodos *ex vivo* actualmente disponibles sean prohibitivos en un entorno clínico.

Una técnica *ex vivo* similar es la osmometría por presión de vapor, en la que una pequeña pieza circular de papel de filtro se aloja debajo del párpado de un paciente hasta que se absorbe suficiente fluido. El disco de papel de filtro se coloca en una cámara sellada, tras lo cual un sensor de temperatura enfriado mide la condensación de vapor en su superficie. Eventualmente, el sensor de temperatura se eleva hasta el punto de rocío de la muestra. La reducción en el punto de rocío proporcional al agua se convierte entonces en osmolaridad. Debido a la inducción de la lacrimación refleja y los requerimientos de gran volumen para osmómetros de presión de vapor existentes, estas técnicas son actualmente poco prácticas para la determinación del ojo seco.

El Clifton Nanoliter Osmometer (disponible de Clifton Technical Physics de Hartford, N.Y., EE.UU.) se ha utilizado ampliamente en entornos de laboratorio para cuantificar las concentraciones de soluto de pacientes con KCS, pero la máquina requiere una cantidad significativa de entrenamiento para ser operada. El funcionamiento de este instrumento generalmente requiere calibraciones de una hora y un técnico calificado para generar datos aceptables. El Clifton Nanoliter Osmometer también es voluminoso y relativamente caro. Estas características perjudican seriamente su uso como osmómetro clínico.

Además, los cambios de parpadeo a parpadeo en la osmolaridad de la película lagrimal son una característica fundamental de la enfermedad ocular seca. Estos cambios de parpadeo a parpadeo, impulsados por la evaporación y la pérdida de agua de una película lagrimal inestable, aumentan en amplitud con el aumento de la gravedad de la enfermedad, dando lugar a un perfil de concentración caótico de los analitos de interés entre parpadeos. La medición simultánea o en serie de la osmolaridad lagrimal y los analitos de interés son útiles, ya que se puede compensar la variación biológica de la enfermedad ocular seca normalizando contra la presión osmótica de la muestra.

Las técnicas existentes para la medición de analitos dentro de la película lagrimal requieren la recolección de grandes volúmenes de película lagrimal, utilizando toques repetidos de la superficie ocular con una esponja, colocando papel de filtro similar a una tira de Schirmer bajo el párpado de un paciente o por citología de impresión conjuntival donde el papel es presionado contra la conjuntiva para desprender posteriormente una capa superficial de células. En los entornos de investigación, se recogen microlitros de lágrimas utilizando muestreo repetido en un tubo capilar, pero esta técnica requiere un entrenamiento especial y, en algunos casos, requiere diez minutos o más en un paciente con ojo seco para obtener los volúmenes requeridos para ejecutar ensayos existentes. Todas estas técnicas

introducen el riesgo de lacrimación refleja, que produce un fluido hipoosmolar tendencioso hacia la salida lagrimal más que la lágrima basal que refleja más las contribuciones de toda la superficie ocular y de la glándula meibomiana.

De la discusión anterior debería quedar claro que las técnicas de recolección y medición integradas para los analitos de interés y la osmolaridad lagrimal generalmente no están disponibles en un entorno clínico y son incapaces de alcanzar los volúmenes pequeños disponibles de la mayoría de los pacientes. Por lo tanto, existe la necesidad de una técnica mejorada, clínicamente factible, para la medición de osmolaridad y analitos en la escala de nanolitros. La presente invención satisface esta necesidad con dispositivos que tienen una variedad de mejoras para análisis de pequeños volúmenes.

La presente divulgación proporciona sistemas, métodos y dispositivos para analizar muestras fluidas, tales como muestras de lágrima.

Los enfoques descritos en este documento permiten la detección de una o más propiedades de una muestra fluida de interés (como ejemplos no limitantes, osmolaridad, concentración de analito, o ambas) usando un solo dispositivo para microfluidos, produciendo de este modo una o más lecturas de muestra que, en algunas realizaciones, se cuantifican y se utilizan para diagnosticar diversas afecciones médicas. En ciertas realizaciones, la invención permite que se realice una pluralidad de análisis diferentes en un solo volumen de muestra, aumentando con ello la velocidad, versatilidad y conveniencia de las pruebas de diagnóstico. Además, los sistemas, métodos y dispositivos de la presente divulgación son adecuados para su uso con volúmenes de muestra pequeños (como ejemplos no limitantes, volúmenes de microlitros o nanolitros), lo cual es particularmente beneficioso para aplicaciones en las que solo están disponibles cantidades limitadas de muestra, a manera de ejemplo no limitativo, muestras de película lagrimal para el análisis de condiciones oculares.

En algunas realizaciones, se proporcionan dispositivos para analizar una muestra de fluido que comprende: una primera región de muestra configurada para recibir un volumen de la muestra de fluido y que comprende al menos un transductor configurado para detectar una propiedad de energía del volumen con el fin de generar una primera lectura de muestra; y una segunda región de muestra en comunicación fluida con la primera porción de recepción de muestra y configurada para recibir al menos una porción del volumen, en donde la segunda región de muestra comprende un sustrato de detección configurado para detectar uno o más analitos en al menos una porción del volumen con el fin de generar una segunda lectura de muestra.

En algunas realizaciones, los dispositivos comprenden además un mecanismo de medición que controla el flujo del volumen desde la primera región de muestra a la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, el mecanismo de medición comprende una válvula pasiva o una válvula activa. Las válvulas pasivas de ejemplo no limitativas incluyen una o más características geométricas que limitan el flujo de fluido a la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, la válvula pasiva está compuesta por una discontinuidad en la hidrofiliidad del sustrato receptor. En algunas realizaciones, una válvula pasiva es superada por un volumen de fluido presurizado. En algunas realizaciones, una válvula pasiva como la descrita aquí es accionada al menos por energía mecánica de un fluido. En algunas realizaciones, el fluido es uno o más líquidos, uno o más gases, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el fluido es el fluido de muestra, un fluido de lavado o un fluido de transferencia. En algunas realizaciones, una válvula pasiva como la descrita en la presente no requiere ninguna fuente de energía externa a los elementos del sistema como se describe en el presente documento para su correcto funcionamiento. En algunas realizaciones, una válvula pasiva no requiere energía adicional

aparte de la energía de fluido y/o energía de acción capilar, o energía transformada a partir de ella. Alternativamente o en combinación, el mecanismo de medición comprende una válvula activa, en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, la válvula activa comprende un electrodo que tiene un recubrimiento hidrófobo (a manera de ejemplo no limitativo, una monocapa de autoensamblaje de alcanotiol (SAM)). En algunas realizaciones, se aplica una tensión al electrodo con el fin de causar la disolución del revestimiento hidrófobo, permitiendo de este modo el flujo del volumen hacia la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, una válvula activa como se describe aquí requiere una fuente de energía eléctrica de elementos internos o externos al dispositivo o sistema como se describe en el presente documento para su correcto funcionamiento. En algunas realizaciones, una válvula activa requiere energía adicional además de la energía de fluido y/o energía de la acción capilar, o energía transformada a partir de la misma. En algunas realizaciones, la válvula como se describe en el presente documento es unidireccional. En otras realizaciones, la válvula está configurada para permitir el paso del volumen de fluido en ambas direcciones. En algunas realizaciones, la válvula pasiva o la válvula activa incluye uno o más seleccionados entre: una válvula equilibrada, una válvula de punta y una válvula de ventilación.

En algunas realizaciones, la primera región de muestra comprende un canal capilar. En algunas realizaciones, el al menos un transductor está situado sobre una pared del canal capilar. En algunas realizaciones, la al menos una pared del canal capilar comprende una capa de adhesivo sensible a la presión. En algunas realizaciones, la capa de adhesivo sensible a la presión interactúa con el volumen para retrasar el flujo del volumen a través del canal capilar.

En algunas realizaciones, la muestra fluida comprende fluido lagrimal.

En algunas realizaciones, la primera lectura de muestra es indicativa de osmolaridad de la muestra fluida. En algunas realizaciones, la segunda lectura de muestra es indicativa de la concentración del uno o más analitos en la muestra fluida. En algunas realizaciones, la primera lectura de muestra es indicativa de la osmolaridad de la muestra fluida, y la segunda lectura de muestra es indicativa de la concentración del uno o más analitos en la muestra fluida.

En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango de aproximadamente 10 nL a aproximadamente 10 μ L, tal como dentro de un rango de aproximadamente 50 nL a aproximadamente 250 nL. En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango entre cualquiera dos de los siguientes: aproximadamente 10 nL, aproximadamente 20 nL, aproximadamente 30 nL, aproximadamente 40 nL, aproximadamente 50 nL, aproximadamente 60 nL, aproximadamente 70 nL, aproximadamente 80 nL, aproximadamente 90 nL, aproximadamente 100 nL, aproximadamente 150 nL, aproximadamente 200 nL, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 300 nL, aproximadamente 400 nL, aproximadamente 500 nL, aproximadamente 600 nL, aproximadamente 700 nL, aproximadamente 800 nL, aproximadamente 900 nL, aproximadamente 1 μ L, aproximadamente 2 μ L, aproximadamente 3 μ L, aproximadamente 4 μ L, aproximadamente 5 μ L, aproximadamente 6 μ L, aproximadamente 7 μ L, aproximadamente 8 μ L, aproximadamente 9 μ L, o aproximadamente 10 μ L. En algunas realizaciones, el volumen es no más que aproximadamente 20 μ L, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 200 nL, o aproximadamente 50 nL. En algunas realizaciones, el volumen es no más que aproximadamente 10 nL, aproximadamente 20 nL, aproximadamente 30 nL, aproximadamente 40 nL, aproximadamente 50 nL, aproximadamente 60 nL, aproximadamente 70 nL, aproximadamente 80 nL, aproximadamente 90 nL, aproximadamente 100 nL, Aproximadamente 150 nL, aproximadamente 200 nL, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 300 nL,

aproximadamente 400 nL, aproximadamente 500 nL, aproximadamente 600 nL, aproximadamente 700 nL, aproximadamente 800 nL, aproximadamente 900 nL, aproximadamente 1 µl, aproximadamente 2 µl, aproximadamente 3 µl, aproximadamente 4 µl, aproximadamente 5 µl, aproximadamente 6 µl, aproximadamente 7 µl, aproximadamente 8 µl, aproximadamente 9 µl, o aproximadamente 10 µl.

En algunas realizaciones, los dispositivos comprenden además un depósito de fluido de transferencia en comunicación fluida con la primera región de muestra. En algunas realizaciones, la introducción del fluido de transferencia desde el depósito en la primera región de muestra provoca que al menos una porción del volumen se desplace de la primera región de muestra a la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, se utiliza un flujo controlado para hacer coincidir la velocidad de absorción capilar del sustrato microporoso con la velocidad de bombeo de fluido desde el depósito. En otras realizaciones, un pulso de aire desplaza el fluido en la primera región de muestra a la segunda región de muestra.

En algunas realizaciones, el fluido de muestra se deja incubar con un reactivo (como ejemplos no limitantes, un anticuerpo o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, o un sitio de enlace de anticuerpo biosintético, tal como un scFv, un aptámero, un Avibody, un péptido, un PNA, un nanopartícula funcionalizada, etc.) dentro de la primera región de muestra, para facilitar la detección de un analito en la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, el reactivo está contenido dentro del sustrato microporoso u otra capa intermedia tal como una almohadilla de conjugado de vidrio, después de lo cual la ruptura de la válvula pasiva introduce el fluido de muestra en una región de incubación sobre el sustrato microporoso. En otras realizaciones, el fluido de muestra fluye primero a través del área de transducción de la primera o segunda región de muestra, seguido por la rehidratación y el transporte de una unidad estructural de detección corriente arriba usando fluido del depósito.

En algunas realizaciones, el sustrato de detección incluye un sustrato microporoso y un volumen de fluido fluye a través del sustrato microporoso. En algunas realizaciones, el sustrato de detección comprende un sustrato microporoso y, durante la operación, al menos una porción del volumen atraviesa el sustrato microporoso. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso tiene una geometría configurada para facilitar un frente de fluido sustancialmente uniforme cuando al menos una porción del volumen atraviesa el sustrato microporoso en la dirección del flujo. En algunas realizaciones, el volumen de fluido incluye uno o más líquidos, uno o más gases, o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el volumen de fluido incluye al menos el fluido de muestra. En algunas realizaciones, el volumen de fluido es mayor o igual que un volumen mínimo con el fin de generar al menos una lectura de muestra válida. En algunas realizaciones, el volumen de fluido es mayor o igual que un volumen mínimo con el fin de generar al menos una lectura de muestra válida de la primera región de muestra y al menos una lectura de muestra válida de la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso tiene una geometría configurada para generar o aumentar la homogeneización del flujo del volumen a medida que fluye a través del sustrato microporoso. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso tiene una geometría en forma de reloj de arena. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso tiene un canal serpentino central rodeado por canales de rehidratación de longitud de trayecto más lineales y más cortos. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso comprende una pluralidad de aberturas para aumentar la homogeneización del flujo. En otras realizaciones, el sustrato microporoso está conformado para efectuar una rehidratación preferencial de áreas de alta resistencia. En otras realizaciones, el sustrato microporoso está configurado para permitir que un flujo de rehidratación se mueva a través de áreas de baja resistencia o de baja longitud de trayectoria mientras que el fluido de muestra se retrasa a través de

regiones de mayor resistencia o de mayor longitud de trayectoria.

- 5 En algunas realizaciones se describen procedimientos para analizar una muestra de fluido que comprende: introducir un volumen de la muestra fluida en una primera región de muestra; detectar una propiedad energética del volumen dentro de la primera región de muestra utilizando al menos un transductor, generando de este modo una primera lectura de muestra; hacer fluir al menos una porción del volumen hacia una segunda región de muestra; y detectar uno o más analitos en al menos una porción del volumen dentro de la segunda región de muestra usando un sustrato de detección, generando de este modo una segunda lectura de muestra.
- 10 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además controlar el flujo de fluido desde la primera región de muestra hasta la segunda región de muestra usando un mecanismo de medición. En algunas realizaciones, el mecanismo de medición comprende una válvula pasiva. En algunas realizaciones, el mecanismo de medición comprende una o más características geométricas que limitan el flujo de fluido a la segunda región de muestra.
- 15 En otras realizaciones, el método detiene además el flujo de fluido utilizando una discontinuidad en la hidrofiliidad del sustrato receptor. Alternativamente o en combinación, en algunas realizaciones, el mecanismo de medición comprende una válvula activa. En algunas realizaciones, la válvula activa comprende un electrodo que tiene un recubrimiento hidrófobo (a manera de ejemplo no limitativo, una monocapa de autoensamblaje de alcanotiol (SAM)). En algunas realizaciones, se aplica una tensión al electrodo con el fin de causar la disolución del revestimiento hidrófobo, permitiendo de este modo el flujo de fluido a la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, se utiliza un fluido de lavado presurizado para superar una válvula pasiva y transportar el fluido de muestra a la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, la primera región de muestra comprende un canal capilar. En algunas realizaciones, el al menos un transductor está situado en una pared del canal capilar. En algunas realizaciones, la al menos una pared del canal capilar comprende una capa de adhesivo sensible a la presión. En algunas realizaciones, la capa de adhesivo sensible a la presión interactúa con el volumen para retrasar el flujo del volumen a través del canal capilar.
- 20 En algunas realizaciones, la muestra fluida comprende fluido lagrimal.
- 25 En algunas realizaciones, la primera lectura de muestra es indicativa de osmolaridad de la muestra fluida. En algunas realizaciones, la segunda lectura de muestra es indicativa de la concentración del uno o más analitos en la muestra fluida. En algunas realizaciones, la primera lectura de muestra es indicativa de la osmolaridad de la muestra fluida, y la segunda lectura de muestra es indicativa de la concentración de uno o más analitos en la muestra fluida.
- 30 En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango de aproximadamente 10 nL a aproximadamente 10 µl, tal como dentro de un rango de aproximadamente 50 nL a aproximadamente 250 nL. En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango entre cualquiera dos de los siguientes: aproximadamente 10 nL, aproximadamente 20 nL, aproximadamente 30 nL, aproximadamente 40 nL, aproximadamente 50 nL, aproximadamente 60 nL, aproximadamente 70 nL, aproximadamente 80 nL, aproximadamente 90 nL, aproximadamente 100 nL, aproximadamente 150 nL, aproximadamente 200 nL, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 300 nL, aproximadamente 400 nL, aproximadamente 500 nL, aproximadamente 600 nL, aproximadamente 700 nL, aproximadamente 800 nL, aproximadamente 900 nL, aproximadamente 1 µl, aproximadamente 2 µl, aproximadamente 3 µl, aproximadamente 4 µl, aproximadamente 5 µl, aproximadamente 6 µl, aproximadamente 7 µl, aproximadamente 8 µl, aproximadamente 9 µl, o aproximadamente 10 µl. En algunas

realizaciones, el volumen es no más que aproximadamente 20 μ l, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 200 nL, o aproximadamente 50 nL. En algunas realizaciones, el volumen es no más que aproximadamente 10 nL, aproximadamente 20 nL, aproximadamente 30 nL, aproximadamente 40 nL, aproximadamente 50 nL, aproximadamente 60 nL, aproximadamente 70 nL, aproximadamente 80 nL, aproximadamente 90 nL, aproximadamente 100 nL, aproximadamente 150 nL, aproximadamente 200 nL, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 300 nL, aproximadamente 400 nL, aproximadamente 500 nL, aproximadamente 600 nL, aproximadamente 700 nL, aproximadamente 800 nL, aproximadamente 900 nL, aproximadamente 1 μ l, aproximadamente 2 μ l, aproximadamente 3 μ l, aproximadamente 4 μ l, aproximadamente 5 μ l, aproximadamente 6 μ l, aproximadamente 7 μ l, aproximadamente 8 μ l, aproximadamente 9 μ l, o aproximadamente 10 μ l.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la introducción de un fluido de transferencia en la primera región de muestra con el fin de desplazar al menos una porción del volumen de la primera región de muestra a la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, el fluido de transferencia se introduce desde un depósito en comunicación fluida con la primera región de muestra. En algunas realizaciones, se utiliza un mecanismo de bombeo que empuja el flujo desde el depósito a una velocidad que coincide sustancialmente con la velocidad de absorción capilar del sustrato microporoso. En otras realizaciones, un pulso de aire desplaza el fluido en la primera región de muestra a la segunda región de muestra.

En algunas realizaciones, el fluido de muestra se deja incubar con una unidad estructural de detección o reactivo de ensayo (como ejemplos no limitativos, un anticuerpo o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, un sitio de enlace de anticuerpo biosintético que incluye un sFv, un aptámero, un Avibody, un péptido, un PNA, nanopartículas funcionalizadas o similares.) dentro de la primera región de muestra. En otras realizaciones, la unidad estructural de detección está contenida dentro del sustrato microporoso u otra capa intermedia tal como una almohadilla de conjugado de vidrio, tras lo cual la ruptura de la válvula pasiva introduce el fluido de muestra en una región de incubación sobre el sustrato microporoso. En otras realizaciones, el fluido de muestra fluye primero sobre el área de transducción de la primera o segunda región de muestra, seguido de rehidratación y transporte de una unidad estructural de detección corriente arriba usando fluido del depósito.

En algunas realizaciones, el sustrato de detección comprende un sustrato microporoso y el fluido fluye a través del sustrato microporoso. En algunas realizaciones, el sustrato de detección comprende un sustrato microporoso y al menos una porción del volumen atraviesa el sustrato microporoso. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso tiene una geometría configurada para facilitar un frente de fluido sustancialmente uniforme cuando al menos una porción del volumen atraviesa el sustrato microporoso en la dirección del flujo. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso tiene una geometría en forma de reloj de arena. En algunas realizaciones, la geometría de sustrato microporosa tiene un canal serpentino central rodeado por canales de hidratación de trayectoria más lineales y más cortos. En algunas realizaciones, la geometría de sustrato microporosa comprende una pluralidad de aberturas para incrementar la homogeneización del flujo. En otras realizaciones, el sustrato microporoso está conformado para efectuar una rehidratación preferencial de áreas de alta resistencia. En otras realizaciones, el sustrato microporoso está configurado para permitir que un flujo de hidratación se mueva a través de áreas de baja resistencia o de longitud de baja trayectoria mientras que el fluido de muestra se retrasa a través de regiones de mayor resistencia o áreas de mayor longitud de trayectoria.

En algunas realizaciones, se describen aquí procedimientos para tratar o monitorizar una

condición del ojo en un individuo que lo necesite, que comprende: introducir un volumen de una muestra de película lagrimal desde el individuo en una primera región de muestra de un dispositivo de análisis; detectar una propiedad energética del volumen dentro de la primera región de muestra utilizando al menos un transductor, generando de este modo una primera lectura de muestra; hacer fluir al menos una porción del volumen a una segunda región de muestra del dispositivo de análisis; detectar uno o más analitos en al menos una porción del volumen dentro de la segunda región de muestra usando un sustrato de detección, generando de este modo una segunda lectura de muestra; y ajustar un plan de tratamiento para tratar la afección del ojo en el individuo, basándose en la primera y segunda lecturas de la muestra. En algunas realizaciones, el método comprende además recoger el volumen de la muestra de película lagrimal. En algunas realizaciones, la condición del ojo es queratoconjuntivitis sicca. En algunas realizaciones, la condición del ojo es alergia. En algunas realizaciones, la condición del ojo es diabetes. En algunas realizaciones, la condición del ojo es la retinopatía diabética. En algunas realizaciones, la condición del ojo es la degeneración macular relacionada con la edad. En algunas realizaciones, la condición del ojo es glaucoma. En algunas realizaciones, la condición del ojo es una o más de degeneración macular relacionada con la edad, alergia, blefaritis, cataratas, conjuntivitis, celulitis, retinopatía serosa central, chalazión, daño relacionado con lentes de contacto, abrasiones corneales/conjuntivales, distrofias, erosiones, úlceras, rechazo de trasplante de córnea, retinitis por citomegalovirus, retinopatía diabética, cáncer de ojo, distrofia de Fuch, enfermedad de Grave, histoplasmosis, glaucoma, infección, queratitis, queratocono, enfermedad macular, neovascularización, hipertensión ocular, neuritis óptica, pinguécula, pterigión, retinitis pigmentosa, retinoblastoma, escleritis, tracoma, triquiasis, o uveítis.

A medida que el fluido de muestra interactúa con el sustrato microporoso, existe una cierta velocidad de enlace no específica que elimina progresivamente la señal a lo largo de la longitud de la trayectoria a través de la membrana microporosa. Por lo tanto, ciertas realizaciones minimizan la interacción del fluido de muestra con el sustrato microporoso desnudo antes del flujo sobre el transductor, con el fin de eliminar las pérdidas no específicas y la reducción en la precisión. En algunas realizaciones, la geometría del sustrato microporoso utiliza una protrusión en forma de cuña corta o triángulo para servir como interfaz inicial entre regiones de muestra, minimizando así la cantidad de membrana desnuda con la que interactúa el fluido de muestra. En algunas realizaciones, las unidades estructurales de detección se colocan dentro y se dejan incuban con el fluido de muestra dentro del canal de recolección para evitar que el fluido de muestra interactúe con la membrana desnuda por completo.

En algunas realizaciones, se describen dispositivos para analizar una muestra fluida, comprendiendo el dispositivo: (a) una entrada de fluido; (b) una región de muestra dispuesta dentro del dispositivo en comunicación fluida con la entrada de fluido y configurada para recibir un volumen de la muestra fluida, comprendiendo la región de muestra un sustrato de detección configurado para permitir la detección de uno o más analitos en el volumen para generar una primera lectura de muestras; y (c) un depósito de fluido dispuesto dentro del dispositivo y en comunicación fluida con la región de muestra, conteniendo el depósito de fluido un fluido de transferencia, que cuando se transfiere a la región de muestra es capaz de hidratar un reactivo dispuesto dentro de la región de muestra, lavando el sustrato de detección durante la operación del dispositivo, o ambos. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende además un mecanismo de medición que controla el flujo de fluido entre la entrada de fluido y la región de muestra. En algunas realizaciones, el mecanismo de medición comprende una válvula pasiva, o una válvula activa, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la válvula pasiva comprende una o más características geométricas que limitan el flujo del volumen en la región de muestra. En algunas realizaciones, la válvula activa comprende un electrodo que

tiene un revestimiento hidrófobo y la aplicación de una tensión al electrodo provoca la disolución del revestimiento hidrófobo, permitiendo de este modo el flujo de al menos una porción del volumen a la región de muestra. En algunas realizaciones, el recubrimiento hidrófobo comprende una monocapa autoensamblada de alcanotiol. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende además una segunda región de muestra dispuesta entre, y en comunicación fluida con, la entrada y la primera región de muestra, en donde la segunda región de muestra comprende al menos un transductor configurado para detectar una propiedad energética de la muestra fluida. En algunas realizaciones, la segunda región de muestra comprende un canal capilar. En algunas realizaciones, el al menos un transductor está situado en una pared del canal capilar. En algunas realizaciones, la muestra fluida comprende fluido lagrimal. En algunas realizaciones, la primera lectura de muestra es indicativa de la presencia o concentración de uno o más analitos en la muestra fluida. En algunas realizaciones, la segunda lectura de muestra es indicativa de la osmolaridad de la muestra fluida. En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango de aproximadamente 10 nL a aproximadamente 10 μ L. En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango de aproximadamente 50 nL a aproximadamente 250 nL. En algunas realizaciones, el volumen es no más que 10 nL, 20 nL, 30 nL, 40 nL, 50 nL, 60 nL, 70 nL, 80 nL, 90 nL, 100 nL, 150 nL, 200 nL, 250 nL, 300 nL, 400 nL, 500 nL, 600 nL, 700 nL, 800 nL, 900 nL, 1 μ L, 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L, 5 μ L, 6 μ L, 7 μ L, 8 μ L, 9 μ L o 10 μ L. En algunas realizaciones, el sustrato de detección comprende un sustrato microporoso y, durante la operación, al menos una porción del volumen atraviesa el sustrato microporoso. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso tiene una geometría configurada para facilitar un frente de fluido sustancialmente uniforme cuando al menos una porción del volumen atraviesa el sustrato microporoso en la dirección del flujo. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso tiene una geometría en forma de reloj de arena. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso comprende una pluralidad de aberturas para facilitar el frente de fluido sustancialmente uniforme. En algunas realizaciones, el sustrato de detección comprende además un primer enlazante inmovilizado capaz de enlazar, directa o indirectamente, uno o más analitos si están presentes en el volumen. En algunas realizaciones, el primer enlazante se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, un miembro de un par de enlace a avidina-biotina y un miembro de un par de enlace a estreptavidina-biotina. En algunas realizaciones, el sustrato de detección comprende además un segundo enlazante capaz de enlazarse a uno o más analitos si están presentes en el volumen, en el que el segundo enlazante está opcionalmente conjugado con una unidad estructural detectable. En algunas realizaciones, la unidad estructural detectable es una nanopartícula, un marcador detectable visualmente, un marcador fluorescente o un marcador bioluminiscente.

En algunas realizaciones se describen procedimientos para analizar una muestra fluida, comprendiendo el método: (a) introducir un volumen de la muestra fluida en la región de muestra del dispositivo de un dispositivo proporcionado en el presente documento; y (b) detectar la presencia y/o concentración del uno o más analitos en el volumen, si está presente en la muestra fluida. En algunas realizaciones, la muestra fluida comprende fluido lagrimal. En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango de aproximadamente 10 nL a aproximadamente 10 μ L. En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango de aproximadamente 50 nL a aproximadamente 250 nL. En algunas realizaciones, el volumen es no más que 10 nL, 20 nL, 30 nL, 40 nL, 50 nL, 60 nL, 70 nL, 80 nL, 90 nL, 100 nL, 150 nL, 200 nL, 250 nL, 300 nL, 400 nL, 500 nL, 600 nL, 700 nL, 800 nL, 900 nL, 1 μ L, 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L, 5 μ L, 6 μ L, 7 μ L, 8 μ L, 9 μ L o 10 μ L .

En algunas realizaciones, se describen procedimientos para tratar o monitorizar una condición del ojo en un individuo, comprendiendo el método: (a) introducir un volumen de una muestra de película lagrimal desde el individuo en la región de muestra de un dispositivo proporcionado en el presente documento; (b) detectar la presencia y/o

concentración de uno o más analitos en el volumen; y (c) ajustar un plan de tratamiento para tratar la afección del ojo en el individuo, con base en la presencia y/o concentración del uno o más analitos en el volumen. En algunas realizaciones, la condición del ojo es queratoconjuntivitis sicca. En algunas realizaciones, la condición del ojo es alergia. En algunas realizaciones, la condición del ojo es diabetes. En algunas realizaciones, la condición ocular es la retinopatía diabética. En algunas realizaciones, la condición ocular es glaucoma. En algunas realizaciones, la condición ocular es una o más de la degeneración macular relacionada con la edad, alergia, blefaritis, cataratas, conjuntivitis, celulitis, retinopatía serosa central, chalazión, daño relacionado con los lentes de contacto, abrasiones corneales/conjuntivales, distrofias, erosiones, úlceras, rechazo de trasplante de córnea, retinitis de citomegalovirus, retinopatía diabética, cáncer de ojo, distrofia de Fuch, enfermedad de Grave, histoplasmosis, glaucoma, infección, queratitis, queratocono, enfermedad macular, neovascularización, hipertensión ocular, neuritis óptica, pinguécula, pterigión, retinitis pigmentosa, retinoblastoma, escleritis, tracoma, triquiasis y uveítis.

Otros objetos y características de la presente invención se harán evidentes mediante una revisión de la especificación, reivindicaciones y figuras anexas.

Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que presenta realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos, de los cuales:

La figura 1 ilustra una vista en sección transversal de un dispositivo para microfluidos de ejemplo no limitativo con una válvula pasiva para medir el flujo de fluido, de acuerdo con algunas realizaciones;

La figura 2 ilustra una vista en sección transversal de un dispositivo para microfluidos de ejemplo no limitativo con una válvula activa para medir el flujo de fluido, de acuerdo con algunas realizaciones;

La figura 3A ilustra una vista en sección transversal de un dispositivo para microfluidos de ejemplo no limitativo para la detección integrada de osmolaridad y uno o más analitos de interés que utiliza interacciones de energía superficial para retrasar el flujo de fluido, de acuerdo con algunas realizaciones;

Las figuras 3B y 3C ilustran resultados de flujo de ejemplo no limitativo obtenidos utilizando un dispositivo para microfluidos que implementa un mecanismo de retardo de flujo basado en energía superficial, de acuerdo con algunas realizaciones;

La figura 4A ilustra una vista en despiece de un dispositivo para microfluidos de ejemplo no limitativo para la detección integrada de osmolaridad y la detección de uno o más analitos que tienen una válvula pasiva, de acuerdo con algunas realizaciones;

La figura 4B ilustra una vista en sección transversal del dispositivo para microfluidos ensamblado de la figura 4A;

La figura 5A y la figura 5B ilustran vistas de arriba y de abajo de unos dispositivos para microfluidos de ejemplo no limitativos ensamblados para la detección integrada de osmolaridad y uno o más analitos de interés, de acuerdo con algunas realizaciones;

Las figuras 6A a 6G ilustran sustratos de detección no limitativos de ejemplo con geometrías para lograr homogeneización de flujo, de acuerdo con algunas realizaciones; y

La figura 7 ilustra sustratos de detección de ejemplo no limitativos configurados para efectuar retardos de temporización de fluidos de precisión, de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 8 muestra una ilustración no limitativa de una osmolaridad medida en serie y 250 ng/ml de IgE utilizando aproximadamente 100 nL de fluido lacrimal humano.

La figura 9 muestra una ilustración no limitativa de un ensayo multiplexado dentro de una estructura de rehidratación que contiene canales de rehidratación segregados.

10 Descripción detallada

La presente divulgación proporciona, en ciertas realizaciones, sistemas, métodos y dispositivos para recoger y analizar pequeños volúmenes (a manera de ejemplo no limitativo, menos de aproximadamente 20 microlitros) de muestras fluidas. Los sistemas, métodos y dispositivos descritos aquí se usan, en algunas realizaciones, para detectar y/o medir una o más características de la muestra de fluido de interés. A modo de ejemplo no limitativo, se utilizan sistemas, métodos y dispositivos para medir una primera característica (a manera de ejemplo no limitativo, la osmolalidad de un fluido de interés) y una segunda característica de interés (a manera de ejemplo no limitativo, la presencia y/o concentración de uno o más analitos en el fluido de interés). En algunas realizaciones, los sistemas, métodos y dispositivos se usan para medir la presencia y/o concentración de uno o más analitos en un fluido de interés. En algunas realizaciones, los sistemas, métodos y dispositivos se usan para medir una primera característica (a manera de ejemplo no limitativo, la osmolalidad de un fluido de interés) o una segunda característica de interés (a manera de ejemplo no limitativo, la presencia y/o concentración de uno o más analitos en el fluido de interés).

La presente invención aborda problemas que pueden surgir cuando se intenta recoger y analizar muestras de nanolitro (nL) de fluido en un dispositivo integrado para su uso en el punto de atención. Pequeños volúmenes de muestra tienen menos moléculas para detectar que volúmenes mayores a la misma concentración, requiriendo una sensibilidad muy alta. Normalmente, los ensayos intentan resolver este problema mediante largos tiempos de incubación de más de una hora hasta una noche para permitir la difusión para ayudar a acumular analitos de interés en la superficie del detector, acompañados de lavado repetido y riguroso para eliminar la señal fondo no específica. Ninguna de estas técnicas está disponible en el punto de atención, lo que requiere pruebas rápidas (a manera de ejemplo no limitativo, menos de unos pocos minutos) con sistemas sencillos operables por usuarios totalmente desentrenados. Además, cuando se implementa un análisis en serie tanto de una osmolaridad lacrimal basada en impedancia como de un ensayo en sándwich de tipo cromatográfico (o de flujo lateral), pueden surgir cualquiera de una variedad de problemas, tales como: medir con precisión el fluido recogido, rehidratación del anticuerpo de detección (o como ejemplos no limitantes incluyendo el complejo de nanopartículas, aptámero, scFv, o similares), eficiencia de transferencia de muestra, logrando la rehidratación del anticuerpo de captura antes de que la muestra de lágrimas haya pasado completamente sobre la región de muestra, evitando el desbordamiento del regulador de funcionamiento sobre la membrana microporosa de flujo lateral, homogeneizando el flujo (creando un patrón uniforme de flujo sustancialmente isotrópico en el borde delantero del anticuerpo de detección, o alternativamente, en el que la mayor parte de la muestra de lágrima que ha reaccionado y el frente del complejo de detección fluyen a través de la región de captura en lugar de alrededor de ella), y evitando las inestabilidades de flujo que desplazan

aleatoriamente el flujo hacia un lado u otro del sistema cromatográfico.

Para resolver estos problemas, la presente descripción proporciona, en algunas realizaciones, dispositivos integrados de recolección de microfluidos que comprenden (a) un sustrato que recibe un volumen alícuota de un fluido de muestra, en el que el sustrato está configurado operativamente para recibir el volumen alícuota del fluido de muestra a través de acción capilar; y al menos una de (b) una región de fluido de muestra del sustrato, dimensionada de tal manera que el volumen del fluido de muestra sea suficiente para cubrir operativamente una porción de la región de muestra, tras lo cual las propiedades energéticas del fluido de muestra se transducen para producir un fluido de muestra que indica la osmolaridad de la muestra, y (c) una segunda región de muestra que analiza una porción del fluido de muestra para los analitos de interés. En ciertas realizaciones, el dispositivo y el sistema como se describen aquí también contienen una serie de una o más válvulas pasivas balanceadas para medir el fluido de la muestra, en donde la presión del fluido a través del sistema recorrerá las válvulas en una secuencia predeterminada. En ciertas realizaciones, el dispositivo y sistema como se describe en el presente documento contiene también al menos un depósito integrado. En algunas realizaciones, el depósito contiene un regulador, fluido de lavado, fluido de transferencia, fluido de muestra, gas, aire o cualquier otro volumen de fluido en su interior. En algunas realizaciones, el depósito se divide para contener más de uno de un regulador de transferencia, fluido de lavado, fluido de transferencia, fluido de muestra, gas, aire o cualquier otro volumen de fluido dentro de él. Algunas realizaciones presentan una segunda región de muestra que comprende un sustrato microporoso, configurado operativamente para optimizar la eficiencia de transferencia de muestras, la dinámica de rehidratación, la protección contra el desbordamiento y el equilibrio de resistencia de fluido para evitar inestabilidades de flujo. En ciertas realizaciones, la eficiencia de transferencia de muestra se optimiza colocando una pequeña protrusión del sustrato microporoso en la interfaz entre las dos regiones de muestra. En otras realizaciones, la dinámica de rehidratación del complejo de detección se consigue colocando el complejo de detección del inmunoensayo en el lado medido de una válvula pasiva, o dentro del canal de recolección, o ambos. En otras realizaciones, la rehidratación del complejo de detección se consigue dentro del sustrato microporoso después de la transferencia de la muestra. En otras realizaciones, la dinámica de rehidratación de la región de captura se consigue colocando constricciones fluidas corriente abajo de tal manera que la trayectoria fluida de menor resistencia pase a través de la región de captura en lugar de a su alrededor. En otras realizaciones, la rehidratación de la región de captura se consigue corriente abajo de una rápida expansión en la trayectoria de la sección transversal fluida. En otra realización, la rehidratación de la región de captura se consigue mediante el patrón de uno o más canales serpentinados dentro del sustrato microporoso que actúa como un retraso de fluido y un camino preferencial para la transferencia de muestras mientras que los canales de rehidratación de longitud de trayecto más pequeños y más cortos antes de la llegada de la muestra retardada, momento en el que se reúnen los trayectos de rehidratación y de muestra. En otras realizaciones, canales de rehidratación de longitud de trayectoria más cortos que rodean una trayectoria central de la muestra enfocan el flujo desarrollado del detector en un área más predecible después de que los canales de rehidratación y canales de muestra se fusionen en una única trayectoria. En otras realizaciones, se añaden uno o más canales para fluido para ayudar a mitigar la posibilidad de un desbordamiento impulsado por presión desde el depósito. En otras realizaciones, los canales de rehidratación y de protección contra el desbordamiento se combinan en una estructura. En una realización adicional, las resistencias de flujo de muestra corriente abajo están equilibradas para evitar que el flujo escoja aleatoriamente una trayectoria asimétrica a través del sustrato microporoso que crea una inestabilidad del flujo e impredecibilidad dentro del sistema. En otras realizaciones, se permiten inestabilidades de flujo asimétrico en el sistema y se compensan colocando regiones de captura redundantes a cada lado de una trayectoria simétrica y sus intensidades

promediadas en software. Colectivamente, estas características abordan los problemas de análisis paralelo de uno o más analitos de interés en muestras de tamaño de nanolitros.

En algunas realizaciones, un volumen de una muestra fluida de interés es fluido secuencial y controladamente a través de una pluralidad de regiones de muestra en un solo dispositivo para microfluidos. En algunas realizaciones, cada región de muestra incluye diversos componentes de detección para analizar y detectar diversas propiedades del volumen de muestra, tales como presión osmótica, concentración total, osmolalidad y/o osmolaridad, así como detección de uno o más analitos de interés. Algunas realizaciones de la presente descripción están configuradas para ser relativamente rápidas, no invasivas, baratas y/o fáciles de usar, con un riesgo mínimo de lesión para el paciente. Se proporcionan mediciones precisas con volúmenes tan pequeños como microlitros de un fluido de muestra, en algunas realizaciones. A manera de ejemplo no limitativo, un dispositivo de medición configurado de acuerdo con algunas realizaciones descritas en el presente documento permite la medición de la osmolaridad con no más que 20 microlitros de fluido de muestra. En algunas realizaciones, se miden con éxito volúmenes más pequeños, como ejemplos no limitantes, volúmenes de nanolitros, a veces tan pequeños como 20 nanolitros. En algunas realizaciones, el rendimiento de medición no se ve comprometido por variaciones en el volumen de fluido de muestra recogido, de modo que las mediciones de osmolaridad y uno o más analitos de interés son sustancialmente independientes del volumen recogido. En una realización, esto se consigue mediante la búsqueda de un subconjunto bien definido del volumen de alícuota del fluido de muestra. En algunas realizaciones, los enfoques descritos en este documento permiten el análisis rápido de volúmenes de muestra pequeños dentro de un único dispositivo integrado, mejorando con ello la velocidad, flexibilidad, comodidad del usuario y rentabilidad de las pruebas de diagnóstico de muestras fluidas.

En algunas realizaciones, los dispositivos descritos aquí se usan para analizar una variedad de diferentes tipos de fluidos, incluyendo película lagrimal, sudor, sangre, orina, saliva u otros fluidos corporales, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los dispositivos descritos aquí se usan para analizar otros fluidos de muestra, tales como leche u otras bebidas, así como diversos tampones, soluciones, reactivos o productos químicos, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los dispositivos descritos aquí se usan para analizar fluido lagrimal de un paciente. En algunas realizaciones, el análisis del líquido lagrimal es beneficioso para diagnosticar, monitorizar y/o tratar diversas condiciones oculares en las que se manifiestan anomalías en la película lagrimal del paciente. Por ejemplo, la queratoconjuntivitis sicca (KCS), u "ojo seco", es una condición en la cual uno o más de los componentes de la estructura de la película lagrimal (como un ejemplo no limitante, la base de mucina subyacente, el componente acuoso central, capa lipídica superpuesta) está presente en un volumen insuficiente o de otra manera fuera de equilibrio con los otros componentes. Se sabe que la tonicidad del fluido o la osmolaridad de las lágrimas aumentan en los pacientes con KCS. La KCS se asocia con condiciones que afectan la salud general del cuerpo, como el síndrome de Sjögren, el envejecimiento y la deficiencia de andrógenos. Por lo tanto, la osmolaridad de una película lagrimal es un indicador sensible y específico para el diagnóstico de KCS y otras condiciones.

Además, la evidencia reciente ha demostrado que la hiperosmolaridad lagrimal está directamente relacionada con la inestabilidad de la película lagrimal, la condición en la que la película lagrimal pasa de un sistema homeostático en equilibrio con la osmolaridad sanguínea, a una forma progresivamente más caótica e impredecible. En las primeras etapas de la enfermedad de los ojos secos, la película lagrimal puede ser metaestable, donde las variaciones de parpadeo a parpadeo de la resistencia, el contacto de la tapa,

etc., hacen retroceder una película delgada variable según las variables antes mencionadas. En la enfermedad avanzada del ojo seco, o en cualquier otra condición de la superficie ocular que promueve la inestabilidad, la película lagrimal se ve comprometida hasta el punto en que las fuerzas cohesivas son insuficientes para mantener cualquier

5 apariencia de una película, y da como resultado la evaporación rápida sobre la córnea y la conjuntiva. Tal inestabilidad es relevante cuando se intentan medir analitos tales como biomarcadores de proteínas dentro de una muestra de película lagrimal. Por ejemplo, las muestras puntuales de biomarcadores de lágrimas (a manera de ejemplo no limitativo, para un solo uso pruebas desechables para diagnóstico *in vitro* que dan datos sobre la

10 concentración de un biomarcador en el punto temporal único de recolección de muestras) son susceptibles a variaciones inaceptables cuando se toman decisiones clínicas a menos que la osmolaridad de la muestra se contabilice debido a la variación de primer orden en la concentración debido a la inestabilidad de la lágrima y la hiperosmolaridad resultante debido a la pérdida de agua por evaporación.

15 En algunas realizaciones, se ensaya una pluralidad de analitos de interés y se utiliza para ayudar en el diagnóstico y manejo de una o más enfermedades oculares. Ejemplos no limitativos de enfermedades oculares incluyen: degeneración macular relacionada con la edad, alergia, blefaritis, cataratas, conjuntivitis, celulitis, retinopatía serosa central, chalazión, daño relacionado con I de contacto, abrasiones corneales/conjuntivales,

20 distrofias, erosiones, laceraciones, úlceras, rechazo de trasplante de córnea, retinitis de citomegalovirus, retinopatía diabética, cáncer de ojo, distrofia de Fuch, enfermedad de Grave, histoplasmosis, glaucoma, infección, queratitis, queratocono, enfermedad macular, neovascularización, hipertensión ocular, neuritis óptica, pinguécula, pterigión, retinitis pigmentosa, retinoblastoma, escleritis, tracoma, triquiasis y uveítis. En algunas realizaciones, se utiliza una interpretación paralela (a manera de ejemplo no limitativo, un OR lógico, donde si cualquiera de la pluralidad de analitos es positivo, devuelve un diagnóstico positivo) de analitos específicos (y/o propiedades de fluidos tales como osmolaridad) para aumentar la sensibilidad general de una prueba de enfermedad ocular sin sacrificar mucha especificidad. A manera de ejemplo no limitativo, en una realización,

30 se utiliza la interpretación paralela de osmolaridad, lactoferrina, albúmina y lipocalina para diagnosticar la enfermedad ocular seca. En otra realización, se utiliza la interpretación paralela de osmolaridad, lipocalina, proteína 4 rica en prolina (PRR4) y zinc-alfa-2-glicoproteína 2 (ZAG2) (u otras proteínas principales de la lágrima) para diagnosticar la enfermedad ocular seca cuando los niveles de proteína son inferiores a su rango normal.

35 En otra realización más, se utiliza la interpretación paralela de osmolaridad, lipocalina, PRR4 y ZAG2 (u otras proteínas principales de la lágrima) para diagnosticar glaucoma no tratado sin tratar si los niveles son más altos que el rango normal. En otra realización más, se utiliza la interpretación paralela de osmolaridad, lipocalina, PRR4 y ZAG2 (u otras proteínas importantes de la lágrima) para diagnosticar tanto el ojo seco como el glaucoma

40 en el mismo dispositivo. En algunas realizaciones, la interpretación paralela de la osmolaridad y de la albúmina glucosilada permite una mayor precisión en la diferenciación entre pacientes sanos, pacientes diabéticos y pacientes diabéticos con retinopatía, compensando la variación de parpadeo a parpadeo en la concentración de lágrimas normalizando la concentración de albúmina glicada contra la osmolaridad medida. En otras realizaciones, la interpretación paralela de la osmolaridad y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) permite una precisión mejorada en la determinación del glaucoma de baja tensión normalizando el nivel de BDNF frente a la osmolaridad lacrimal medida. En otra realización, la interpretación paralela de la osmolaridad, IL-1Ra, MMP-9 y S100A8 ayuda a diagnosticar tanto la enfermedad del ojo seco como los subconjuntos causales del

50 trastorno, ya sea deficiencia inflamatoria o acuosa. En otras realizaciones, se mide en paralelos múltiples analitos de interés de diferentes enfermedades con síntomas de superposición y presentación clínica. A manera de ejemplo no limitativo, en una realización, se miden la osmolaridad más una pluralidad de marcadores alérgicos tales como IgE, ECP

y/o EDN para interrogar tanto alergia temprana como tardía mientras que se diferencia entre ojo seco y alergia a pesar de presentación clínica similar y síntomas. En otras realizaciones, la osmolaridad no se mide, mientras que sí se miden los analitos de interés. Estos ejemplos no pretenden ser limitativos, sino que proporcionan ejemplos de cómo aplicar los dispositivos descritos en el punto de atención.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona, en algunas realizaciones, sistemas, métodos y dispositivos para medir la osmolaridad de un volumen alícuota (a manera de ejemplo no limitativo, de una película lagrimal u otra muestra fluida) junto con la medición de uno o más analitos de interés en el volumen (a manera de ejemplo no limitativo, la presencia y/o concentración de uno o más analitos). En algunas realizaciones, las mediciones de osmolaridad y analito se realizan simultánea o secuencialmente. En algunas realizaciones, la medición de la osmolaridad se realiza primero, seguida de un ensayo para detectar la presencia y/o la concentración de uno o más analitos en el volumen de la muestra. En algunas realizaciones, la medición de osmolaridad se realiza en segundo lugar, después de un ensayo para detectar la presencia y/o la concentración de uno o más analitos en el volumen de muestra. En otras realizaciones, la osmolaridad de la muestra es relativamente constante y solo se analizan los analitos de interés.

En algunas realizaciones, se utiliza cualquier técnica adecuada para medir la osmolaridad de una muestra fluida. En algunas realizaciones, la osmolaridad se mide detectando las propiedades energéticas de la muestra (a manera de ejemplo no limitativo, propiedades térmicas, ópticas y/o eléctricas), tales como transferir energía a la muestra, detectar la energía impartida y usar el resultado de la detección para determinar la osmolaridad. En algunas realizaciones, se utilizan uno o más transductores o electrodos para medir la conductividad eléctrica del fluido, a manera de ejemplo no limitativo, aplicando una señal eléctrica adecuada. Dado que la conductividad eléctrica está relacionada con la concentración de iones del fluido, la osmolaridad del fluido puede determinarse si se aplican correcciones de temperatura y funciones de calibración apropiadas.

Los analitos que pueden medirse en una muestra fluida usando las técnicas, sistemas y dispositivos presentados aquí incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos, metabolitos, electrolitos, moléculas pequeñas, lípidos, azúcares, ácidos nucleicos y proteoglicanos, entre otras unidades estructurales biológicas y conjuntos de orden superior, así como combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los analitos incluyen biomarcadores de proteínas. En algunas realizaciones, los analitos incluyen pero no se limitan a: inmunoglobulinas (a manera de ejemplo no limitativo, inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina G (IgG)), citoquinas (como un ejemplo no limitante, el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factores de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina 1-A), proteínas (S100, lactoferrina, lipocalina, catepsina, BDNF, enolasa, Proteína Catiónica de Eosinófilos ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), PRR4, ZAG2, cistatina, albúmina o similares) o mucinas y otras glicoproteínas (a manera de ejemplo no limitativo, mucina 5 asociada a superficie celular (MUC-5), proteoglicano 4 (PRG4), mucina asociada a la superficie celular 16 (MUC16)). En algunas realizaciones, el procedimiento de detección y/o medición de analitos implica el flujo de la muestra fluida a través de un sustrato de detección. El sustrato de detección de ejemplo no limitativo incluye un sustrato microporoso o una membrana microporosa. En otras realizaciones, el sustrato de detección es uno o más seleccionados entre nitrocelulosa, almohadillas de conjugado de fibra de vidrio, Fusion 5, materiales POREX®, papel, PVDF o similares. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso y la membrana microporosa son equivalentes e intercambiables aquí. En algunas realizaciones, el canal de recolección, el canal capilar y el canal para microfluidos son términos equivalentes e intercambiables en el presente documento. En algunas realizaciones, el sustrato de detección está configurado para análisis cromatográfico, de

flujo o de flujo lateral de uno o más analitos de interés. Otras técnicas de ejemplo no limitativas incluyen impedancia, espectroscopía de impedancia, espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS), transductores electroquímicos, transductores libres de etiquetas tales como resonancia de plasmón superficial, interferometría o similares. Los ensayos para detectar analitos en un volumen de fluido son conocidos por los expertos en la técnica y se describen con más detalle a continuación.

En algunas realizaciones, los sistemas, métodos y dispositivos proporcionados en el presente documento se aplican al análisis de la osmolaridad y la concentración del analito en volúmenes relativamente pequeños de muestras fluidas, tales como un volumen dentro de un rango de aproximadamente 10 nL a aproximadamente 10 μ L o dentro de un rango oscilan entre aproximadamente 50 nL y 250 nL. En algunas realizaciones, el volumen está dentro de un rango entre cualquiera de dos de los siguientes: aproximadamente 10 nL, aproximadamente 20 nL, aproximadamente 30 nL, aproximadamente 40 nL, aproximadamente 50 nL, aproximadamente 60 nL, aproximadamente 70 nL, aproximadamente 80 nL, aproximadamente 90 nL, aproximadamente 100 nL, aproximadamente 150 nL, aproximadamente 200 nL, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 300 nL, aproximadamente 400 nL, aproximadamente 500 nL, aproximadamente 600 nL, aproximadamente 700 nL, aproximadamente 800 nL, aproximadamente 900 nL, aproximadamente 1 μ L, aproximadamente 2 μ L, aproximadamente 3 μ L, aproximadamente 4 μ L, aproximadamente 5 μ L, aproximadamente 6 μ L, aproximadamente 7 μ L, aproximadamente 8 μ L, aproximadamente 9 μ L, o aproximadamente 10 μ L. En algunas realizaciones, el volumen es no más que aproximadamente 20 μ L, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 200 nL, o aproximadamente 50 nL. En algunas realizaciones, el volumen es no más que aproximadamente 10 nL, aproximadamente 20 nL, aproximadamente 30 nL, aproximadamente 40 nL, aproximadamente 50 nL, aproximadamente 60 nL, aproximadamente 70 nL, aproximadamente 80 nL, aproximadamente 90 nL, aproximadamente 100 nL, Aproximadamente 150 nL, aproximadamente 200 nL, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 300 nL, aproximadamente 400 nL, aproximadamente 500 nL, aproximadamente 600 nL, aproximadamente 700 nL, aproximadamente 800 nL, aproximadamente 900 nL, aproximadamente 1 μ L, aproximadamente 2 μ L, aproximadamente 3 μ L, aproximadamente 4 μ L, aproximadamente 5 μ L, aproximadamente 6 μ L, aproximadamente 7 μ L, aproximadamente 8 μ L, aproximadamente 9 μ L, o aproximadamente 10 μ L.

En algunas realizaciones, las mediciones de osmolaridad y analito se realizan en un dispositivo para microfluidos único, tal como un chip para microfluidos. En algunas realizaciones, el dispositivo para microfluidos incluye una pluralidad de regiones de muestra configuradas para recibir un volumen de la muestra fluida, a manera de ejemplo no limitativo, canales para microfluidos, cámaras y similares. En algunas realizaciones, las dimensiones de las estructuras de microfluidos se varían según se desee. En algunas realizaciones, los canales para microfluidos, los canales de ensayo o los canales de desbordamiento como se describen aquí tienen una anchura de canal de aproximadamente 10 μ m, aproximadamente 20 μ m, aproximadamente 30 μ m, aproximadamente 40 μ m, aproximadamente 50 μ m, aproximadamente 60 μ m, aproximadamente 70 μ m, aproximadamente 80 μ m, aproximadamente 90 μ m, aproximadamente 100 μ m, aproximadamente 200 μ m, aproximadamente 300 μ m, aproximadamente 400 μ m, aproximadamente 500 μ m, aproximadamente 600 μ m, aproximadamente 700 μ m, aproximadamente 800 μ m, aproximadamente 900 μ m, o aproximadamente 1 mm. En algunas realizaciones, la profundidad o altura del canal es de aproximadamente 5 μ m, aproximadamente 10 μ m, aproximadamente 20 μ m, aproximadamente 30 μ m, aproximadamente 40 μ m, aproximadamente 50 μ m, aproximadamente 60 μ m, aproximadamente 70 μ m, aproximadamente 80 μ m, aproximadamente 90 μ m,

aproximadamente 100 μm , aproximadamente 150 μm , aproximadamente 200 μm , aproximadamente 250 μm , aproximadamente 300 μm , o aproximadamente 400 μm . En algunas realizaciones, los dispositivos descritos aquí incluyen un canal capilar para realizar la detección de osmolaridad en un volumen de muestra que tiene una anchura de canal de aproximadamente 300 μm y una profundidad de canal de aproximadamente 75 μm . En algunas realizaciones, la anchura de canal es la mayor distancia que conecta dos puntos espaciales de un contorno de sección transversal del canal.

En algunas realizaciones, cada una de las regiones de muestra del dispositivo para microfluidos se utiliza para realizar una función analítica diferente. En algunas realizaciones, el dispositivo incluye una primera región de muestra que incluye al menos un transductor para medir la osmolaridad y una segunda región de muestra que incluye un sustrato de detección para realizar la detección del analito. En realizaciones en las que la osmolaridad y la medición del analito se realizan secuencialmente (a manera de ejemplo no limitativo, la detección de osmolaridad se realiza antes de la detección del analito), las regiones de muestra están en comunicación fluida entre sí (a manera de ejemplo no limitativo, conectados por pasos, agujeros pasantes u otros elementos fluidos) para permitir el flujo del volumen de muestra desde la primera región de muestra a la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, el flujo es accionado por diversos métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, flujo convectivo, flujo impulsado por presión, absorción, acción capilar, evaporación, disolución o combinaciones adecuadas de los mismos. En algunas realizaciones, se introduce un segundo fluido tal como un fluido de lavado en el dispositivo para microfluidos con el fin de desplazar el volumen de la muestra y accionar el flujo a través del sistema. En algunas realizaciones, el flujo de fluido de una muestra viaja desde una de la primera y la segunda regiones de muestra y luego hacia la otra región de muestra de la primera y la segunda regiones de muestra.

En algunas realizaciones, es beneficioso controlar el tiempo y/o la velocidad de flujo entre las diferentes regiones de muestra del dispositivo para microfluidos, a manera de ejemplo no limitativo, con el fin de asegurar un tiempo suficiente para realizar mediciones y facilitar el procesamiento de muestras. En algunas realizaciones, una medición de osmolaridad requiere aproximadamente 1-2 segundos para realizarse. En otras realizaciones del dispositivo, una medición de osmolaridad requiere aproximadamente 3-10 segundos para realizar después de que el sistema espera que se asiente la dinámica de flujo transitorio. De acuerdo con esto, algunas realizaciones de los dispositivos para microfluidos descritos en el presente documento incorporan uno o más mecanismos de medición u otros elementos de control de flujo para asegurar que el volumen de muestra se retiene en la región de muestra durante un período de tiempo apropiado y para evitar el flujo prematuro del volumen de muestra en otras regiones.

En una realización particular, la figura 1 ilustra una vista en sección transversal de un dispositivo 10 para microfluidos para la detección integrada de osmolaridad y analitos de interés que tiene una válvula pasiva como un mecanismo de medición, de acuerdo con algunas realizaciones. En la realización de la figura 1, el chip 100 capilar para microfluidos está integrado en el interior de una cápsula 101 para microfluidos que proporciona una manera conveniente de proteger el contenido en el interior durante la manipulación. La cápsula 101 incluye una superficie interior (indicada por la línea discontinua 102) que define una cavidad que recibe uno o más sustratos 103 de detección (a manera de ejemplo no limitativo, sustratos microporosos tales como nitrocelulosa, almohadillas de conjugado de fibra de vidrio, Fusion 5, materiales Porex, papel, PVDF, o similares) y permite que los sustratos se coloquen verticalmente durante el montaje. En algunas realizaciones, el interior de la cápsula contiene características 104 elevadas que permiten que un depósito 105 de fluido de transferencia (como un ejemplo no limitante, un envase blíster) se rompa cuando se presiona, como se describe con más detalle a continuación. El adhesivo 106

sensible a la presión se coloca sobre la superficie 102 interior de la cápsula y une el sustrato microporoso tanto a la cápsula 101 como al chip 100 capilar para microfluidos, que está sellado por un adhesivo 107 hidrofílico sensible a la presión. En algunas realizaciones, un canal 112 capilar se define entre el adhesivo 107 sensible a la presión y la superficie superior del chip 100 para microfluidos, de tal manera que el adhesivo 107 sirve como una pared del canal 112 y la superficie superior del chip 100 sirve como una segunda pared.

En algunas realizaciones, el canal 112 capilar sirve como una primera región de muestra en la que se realizan mediciones de osmolaridad y la cavidad que contiene el sustrato 103 de detección sirve a la segunda región de muestra en la que se realizan mediciones de analito. En algunas realizaciones, la primera y segunda regiones de muestra del dispositivo 10 están conectadas entre sí por un paso 114 continuo o agujero pasante. En algunas realizaciones, el paso 114 incluye una válvula 108 pasiva que sirve como un mecanismo de medición para controlar el flujo entre las dos regiones de muestra. Por ejemplo, la válvula 108 pasiva incluye una o más características geométricas utilizadas para restringir el flujo de fluido. En algunas realizaciones, la válvula pasiva comprende un cambio brusco en el ángulo de la pared lateral a lo largo de una trayectoria fluida, o una modulación de hidrofiliicidad tal como una franja o región de material sustancialmente hidrófobo encima de una capa generalmente hidrófila. En una realización particular como en la figura 1, un ángulo de transición agudo en la geometría de la válvula proporciona una función de dosificación para los volúmenes de muestra.

Cuando se introduce un volumen de muestra fluida en el dispositivo 10 a través de la entrada 113 del chip 100 para microfluidos, fluirá a través del canal 112 hasta que se detenga por la válvula 108 pasiva. En algunas realizaciones, la osmolaridad del volumen es entonces determinada en el canal 112 utilizando uno o más transductores situados en el canal 112. En algunas realizaciones, los electrodos (no mostrados) están incrustados dentro del canal 112 (a manera de ejemplo no limitativo, en la pared de canal definida por el chip 100). En algunas realizaciones, los electrodos están modelados sobre la superficie del chip 100, tal como por evaporación de metal y posterior ablación por láser, y se usan para determinar cuándo se ha recogido suficiente líquido de muestra en el canal 112. Adicionalmente, en algunas realizaciones, los electrodos en el canal 112 capilar crean un transductor basado en impedancia, de modo que las propiedades energéticas del volumen de la muestra se detectan desde dentro del canal 112 capilar para producir una lectura de muestra indicativa de la osmolaridad del fluido de la muestra.

En algunas realizaciones, una vez que se ha medido la osmolaridad de la muestra, el volumen de muestra se desplaza de la primera región de muestra (el canal 112) a la segunda región de muestra para realizar mediciones de analito. Se utiliza cualquier técnica adecuada para conseguir este desplazamiento del volumen de fluido. En algunas realizaciones, el depósito 105 es presionado externamente por una fuerza de accionamiento (a manera de ejemplo no limitativo, por un pulgar u otro dedo, un tornillo, una característica fija que sobresale en una ranura del sistema lector u otro elemento accionador). Esta fuerza permite que el fluido de transferencia fluya a través de la cápsula 109 para microfluidos y hacia una entrada 110 vertical (que, en algunas realizaciones, está constituida por una válvula pasiva adicional) en el chip 100, a manera de ejemplo no limitativo, por un flujo accionado por presión y/o mecha. En algunas realizaciones, la introducción del fluido de lavado (como un ejemplo no limitante, de aproximadamente 1 μL a aproximadamente 50 μL de volumen) en la primera región de muestra hace que el volumen de muestra pase a través de la válvula 108 pasiva y sobre la región de muestra que contiene el sustrato 103 de detección microporoso. En algunas realizaciones, la entrada 113 o la entrada 110 vertical incluye una o más válvulas unidireccionales. En algunas realizaciones, la una o más válvulas son accionadas por presión de fluido.

En algunas realizaciones, a medida que la muestra fluye hacia el extremo distal del sustrato 103 de detección (a manera de ejemplo no limitativo, el lado derecho del sustrato 103 de detección como se representa en la figura 1), la muestra interactúa con reactivos de ensayo dispuestos sobre o en el sustrato 103 de detección para generar una lectura de muestra indicativa de la concentración de uno o más analitos en el fluido de muestra. En algunas realizaciones, al menos una parte del sustrato 103 de detección está expuesta a través de una ventana 111 en la cápsula 101, permitiendo de este modo la búsqueda óptica de los resultados del ensayo de analito. En otras realizaciones, el chip 100 y el depósito 105 se ensamblan sobre un soporte separado que luego se encaja a presión o se une de otro modo a la cápsula. En una realización de este tipo, el soporte separado proporciona canales para microfluidos que permiten que la comunicación fluida fluya desde el depósito 105, hacia la entrada 110 vertical, a través del canal 112, hacia arriba a través del paso 114 y la válvula 108 pasiva y sobre el sustrato 103 de detección en lugar del plástico de la cápsula.

En una realización particular, la figura 2 ilustra una vista en sección transversal de un dispositivo 20 para microfluidos para la detección integrada de osmolaridad y analitos de interés que tiene una válvula activa como un mecanismo de medición, de acuerdo con algunas realizaciones. Los componentes del dispositivo 20 son generalmente similares a los del dispositivo 10, excepto que el dispositivo 20 incluye una válvula activa como un mecanismo de medición para controlar el flujo de fluido, en lugar de una válvula pasiva. En la realización de la figura 2, el chip 200 capilar para microfluidos incluye una válvula activa compuesta de elementos 202 activos que limitan y/o detienen el flujo de fluido entre la primera región de muestra (canal 203 capilar) y la segunda región de muestra (sustrato 204 de detección). En algunas realizaciones, los elementos 202 activos están situados dentro del orificio 201 pasante, o dentro del canal 203 capilar.

Se utiliza cualquier tipo adecuado de válvula activa para controlar el flujo de fluido dentro del dispositivo 20. A manera de ejemplo no limitativo, la válvula activa incluye elementos que obstruyen físicamente el flujo entre la primera y la segunda regiones de muestra, pero se desplaza tras la aplicación de un estímulo o para permitir el flujo. Como otro ejemplo, la válvula activa incluye características de modulación de la energía superficial que interaccionan con el fluido de la muestra a fin de reducir o evitar un flujo sustancial de fluido. A manera de ejemplo no limitativo, los elementos 202 activos incluyen uno o más electrodos que tienen un revestimiento hidrófobo que impide el flujo de fluido, tal como una monocapa (SAM) montada en superficie de alcanotiol. Por ejemplo, se aplica un campo eléctrico a los electrodos para provocar la electrodisolución de la monocapa superficial de grupos alcanotiol, haciendo por lo tanto transición de la energía de superficie y permitiendo que el fluido pase en el tiempo seleccionado. El voltaje aplicado está dentro de un rango de aproximadamente 1V a aproximadamente 100 V, tal como dentro de un rango de aproximadamente 1V a aproximadamente 10 V. En otras realizaciones se utilizan otros tipos de elementos 202 activos que son capaces de experimentar una transición hidrófoba a hidrófila en respuesta a un estímulo.

En algunas realizaciones, las características de modulación de energía superficial están diseñadas para disolverse tras la exposición al fluido de muestra, permitiendo de este modo el paso a través de la válvula una vez que haya transcurrido un tiempo suficiente para la disolución. A manera de ejemplo no limitativo, los elementos 202 activos detienen el flujo durante aproximadamente 1-30 segundos antes de disolverse y permitir que el fluido fluya libremente a la segunda región de muestreo corriente abajo. Opcionalmente, el dispositivo 20 incluye microcanales adicionales que actúan como respiraderos para permitir que escape aire mientras fluye fluido. Estas aberturas de microcanal están fabricadas a partir de materiales hidrófobos o incluyen recubrimientos de superficie hidrófobos para evitar que el fluido entre en las rejillas de ventilación.

En una realización particular, la figura 3A ilustra una vista en sección transversal de un dispositivo 30 para microfluidos para la detección integrada de osmolaridad y analitos de interés que utiliza interacciones de energía superficial para retrasar el flujo de fluido, de acuerdo con algunas realizaciones. Los componentes del dispositivo 30 para microfluidos son generalmente similares a los de los dispositivos 10 y 20 excepto como se especifica más adelante. Similar a los dispositivos 10 y 20, el dispositivo 30 incluye un chip 300 capilar para microfluidos y un sustrato 301 de detección dentro de una cápsula microfluida 302. En algunas realizaciones, el chip 300 y el sustrato 301 están sellados y enlazados entre sí por una capa de adhesivo 303 sensible a la presión. Particularmente, el sustrato 301 de detección está situado encima del chip 300 para microfluidos, en lugar de por debajo como en los dispositivos 10 y 20. Un canal 304 capilar está definido por la superficie superior del chip 300 y la capa de material adhesivo 303 sensible a la presión. En algunas realizaciones, la viruta y el depósito se ensamblan sobre un soporte separado que luego se encaja a presión o se une de otra forma a la cápsula. En una realización de este tipo, el soporte separado proporciona canales para microfluidos que permiten que la comunicación fluida fluya desde el depósito hasta la entrada vertical a través del canal a través del paso y válvula pasiva y sobre el sustrato de detección en lugar de los plásticos de la cápsula. En ciertas realizaciones, el portador contiene un depósito para microfluidos para retrasar el flujo o proporcionar capacidad de fluido para atrapar burbujas después del estallido inicial del depósito principal.

En algunas realizaciones, el canal 304 sirve como una primera región de muestra para realizar mediciones de osmolaridad del volumen de muestra, mientras que el sustrato 301 de detección sirve como segunda región de muestra para la detección de analito, similar a las otras realizaciones descritas en el presente documento. La primera y segunda regiones de muestra están acopladas de manera fluida a través de un orificio pasante o paso 305 formado en la capa de adhesivo 303 sensible a la presión por encima de una abertura 306 en el chip de sustrato. En algunas realizaciones, el paso 305 y el canal 304 capilar no incluyen válvulas u otros mecanismos de medición para restringir el flujo de fluido. En su lugar, el dispositivo 30 utiliza interacciones de energía de superficie del volumen de muestra fluida con la capa 303 adhesiva para controlar el flujo de fluido entre la primera y la segunda regiones de muestra. En algunas realizaciones, la hidrofiliidad y/o hidrofobicidad de la capa 303 adhesiva se ajusta como se desea para lograr el control sobre el flujo de fluido. A manera de ejemplo no limitativo, la capa 303 adhesiva incluye una capa interna hidrófoba (a manera de ejemplo no limitativo, una capa de PET de 75 μm) situada entre dos capas exteriores hidrófilas (a manera de ejemplo no limitativo, capas de 25 μm). En algunas realizaciones, este material adhesivo de capas múltiples ralentiza el flujo del volumen de muestra a través del canal 304 para permitir un tiempo suficiente para medir osmolaridad en el canal 304 y retrasar la entrada de la muestra al sustrato 301 de detección en la segunda región de muestra. Como con otras realizaciones en la figura 1 y la figura 2, los componentes de reacción para la mitad de un ELISA en sándwich se secan, siembran y de otra manera se inmovilizan (covalentemente, iónicamente, hidrófobos, no específicos, adsorbidos) en el canal 304, en algunas realizaciones. En otras realizaciones, los componentes de reacción para la mitad de un ELISA en sándwich se secan, se manchan o se inmovilizan de otro modo (covalentemente, iónicamente, por hidrofobicidad, de forma no específica) en la abertura 306. En aun otras realizaciones, los componentes de reacción para la mitad de un ELISA en sándwich se secan, siembran o de otro modo se inmovilizan (covalentemente, iónicamente, por hidrofobicidad, de forma no específica) sobre el sustrato 301. En algunas realizaciones, tales componentes de reacción comprenden anticuerpos o fragmentos de enlace a antígenos de los mismos, sitios de enlace a anticuerpos biosintéticos, aptámeros, variables de fragmentos de cadena corta, y similares. En ciertas realizaciones, la segunda mitad de un ELISA en sándwich se seca, se siembra o se inmoviliza de otro modo (covalentemente, iónicamente, por hidrofobicidad, de forma no específica) dentro del canal 304, abertura 306 o sustrato 301. Marcadores

apropiados tales como tintes fluorescentes, nanopartículas, enzimas, electroquimioluminiscentes, quimioluminiscentes, HCR, nanoesferas luminiscentes, nanopartículas reflectantes, marcadores rédox, estreptavidina, avidina, neutravidina, biotina, colorantes quelados con europio, fósforos con conversión ascendente, sistemas FRET, marcadores plasmónicos, etc., acompañan la mitad de detección del ELISA sándwich, en algunas realizaciones.

Reactivos, configuraciones de sustrato y procedimientos para fabricar y utilizar sustratos para detectar la presencia y/o concentración de analitos de interés, de ejemplo no limitativos, se encuentran, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos No. 6,319,676; 5,141,850; 5,602,040; 5,656,503; 5,714,389; 5,591,645; 5,989,921; 6,319,676; 6,485,982; 7,763,454; y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de América publicada No. US2015/0017068. Patentes de los Estados Unidos No. 5,714,389; 5,989,921 y 6,485,982 describen sustratos de ensayo en los que un analito de interés se captura directamente en una región de ensayo mediante un enlazante inmovilizado para el analito (a manera de ejemplo no limitativo, un anticuerpo antianalito) inmovilizado en la región de ensayo. En este enfoque, el analito unido a un segundo enlazante marcado para el analito (a manera de ejemplo no limitativo, un segundo anticuerpo anti-analito) en forma de un "medio sándwich" está unido en la región de ensayo. Las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,319,676 y 5,141,850 describen sustratos de ensayo en los que un analito de interés es capturado indirectamente en la región de ensayo a través de un enlazante inmovilizado (como un ejemplo no limitante, avidina o estreptavidina) que se enlaza a un enlazante (biotina) acoplado covalentemente a un enlazante para el analito de interés (a manera de ejemplo no limitativo, un anticuerpo antianalito). En este enfoque, un "sándwich completo" que comprende un complejo de una unidad estructural de enlace capturable (como un ejemplo no limitante, un anticuerpo antianalito biotinilado) -unidad estructural detectable de enlace a un analito- (a manera de ejemplo no limitativo, un anticuerpo marcado anticuerpo antianalito) a medida que el fluido atraviesa el sustrato y luego se captura en la región de prueba a través de una unidad estructural de enlace (a manera de ejemplo no limitativo, avidina o estreptavidina) que se enlaza a la unidad estructural de enlace capturable.

En otra realización, el dispositivo está configurado para analizar una muestra de fluido, que comprende un alojamiento que define una entrada de fluido; una región de procesamiento de muestras dispuesta dentro del alojamiento en comunicación fluida con la entrada de fluido y configurada para recibir un volumen de la muestra fluida, comprendiendo la región de procesamiento de muestras un sustrato de detección configurado para permitir la detección de uno o más analitos en el volumen para generar una primera lectura de muestra; y un depósito de fluido dispuesto dentro del alojamiento y en comunicación fluida con la región de procesamiento de muestras, conteniendo el depósito de fluido un fluido que, cuando se transfiere a la región de procesamiento de muestras, es capaz de hidratar un reactivo dispuesto dentro de la región de procesamiento de la muestra y/o lavando el sustrato de detección durante el funcionamiento del dispositivo.

En diversas realizaciones, el dispositivo 10, 20 o 30 en las figuras 1, 2 y 3A omite la primera región de muestra y solo contiene la segunda región de muestra, a manera de ejemplo no limitativo, cuando se desea la detección de un analito y/o medición de la concentración de uno o más analitos. En estas realizaciones, la segunda región de muestra se denomina región de procesamiento de muestras. En algunas realizaciones, el dispositivo como se describe en el presente documento incluye solamente la segunda región de muestra. En otras realizaciones, el volumen de muestra que se va a examinar es impulsado directamente desde una entrada y/o una entrada vertical a la segunda región de muestra antes de viajar a la primera región de muestra. En realizaciones alternativas, el volumen de muestra viaja a la primera región de muestra y luego a la segunda región de muestra.

En una realización particular, las figuras 3B y 3C ilustran ejemplos de resultados de flujo obtenidos usando un dispositivo para microfluidos que implementa un mecanismo de retardo de flujo basado en energía superficial, similar al dispositivo 30 de la figura 3A. La figura 3B ilustra el flujo retardado de un fluido de muestra que contiene un colorante alimentario rojo en una membrana microporosa (una membrana de nitrocelulosa modelada) que actúa como la segunda región de muestra. Una estructura de este tipo permite que el flujo capilar conduzca la reacción de corriente abajo, ya que el flujo impulsado por presión es absorbido por el área de papel grande, atravesado por el canal lateral de la membrana, y luego gira alrededor para ejecutar un ensayo cromatográfico. La figura 3C es un gráfico que ilustra la relación entre el diámetro del orificio pasante y el tiempo de retardo antes de humedecer el sustrato microporoso. Cuando el diámetro del orificio es de 200 μm , se observa una gran cantidad de variabilidad en el tiempo de retardo, que oscila entre aproximadamente 0 segundos y aproximadamente 60 segundos. Sin embargo, la variabilidad es menor para dispositivos con diámetros de orificios de 300 μm y 400 μm , los cuales presentan tiempos de retardo de aproximadamente 10 segundos. En la realización de la figura 3B, la abertura del sustrato del chip es de aproximadamente 300 μm de diámetro, lo que sugiere que la proporción ideal para el diámetro del orificio pasante del adhesivo sensible a la presión con respecto al diámetro de apertura del sustrato del chip está en un rango de aproximadamente 0.5:1 a aproximadamente 2:1.

En una realización particular, las figuras 4A y 4B ilustran un dispositivo 40 para microfluidos para la detección integrada de osmolaridad y analitos de interés que tienen una válvula pasiva, de acuerdo con algunas realizaciones. En la realización de la figura 4A, que ilustra una vista despiezada del dispositivo 40, el chip 400 capilar para microfluidos se ensambla en capas con un adhesivo 401 hidrófilo sensible a la presión que forma una superficie del canal capilar inferior, una capa 403 adhesiva sensible a la presión de doble cara que sella los microfluidos 404 sobre la superficie superior del chip 400. La capa 403 de doble cara se extiende hasta los orificios 405 de entrada y salida de fluido, que aceptan el fluido de lavado y permiten que escape aire, respectivamente. Un sustrato 406 de detección (a manera de ejemplo no limitativo, una membrana o sustrato microporoso), que actúa como la segunda región de muestra, se sella a presión contra el adhesivo 403 sensible a la presión de doble cara. La figura 4B muestra una vista en sección transversal del dispositivo para microfluidos ensamblado 40, en el que son visibles detalles de la válvula 407 pasiva, la entrada 408 de fluido y el canal 409 capilar. En algunas realizaciones, el canal 409 capilar sirve como la primera región de muestra para analizar osmolaridad, y el sustrato 406 de detección sirve como la segunda región de muestra para detectar uno o más analitos de interés. En algunas realizaciones, un volumen de muestra se recoge en el canal 409 capilar de la primera región de muestra y se limita a fluir hacia la segunda región de muestra por la válvula 407 pasiva a través de los mecanismos discutidos anteriormente. En algunas realizaciones, tras la introducción del fluido de lavado en el canal 409 a través de la entrada 408 de lavado, el volumen de la muestra se desplaza desde el canal 409 y hacia el sustrato 406 de detección de la segunda región de muestra.

En una realización particular, la figura 5A ilustra una vista superior (izquierda) y una vista inferior (derecha) de un dispositivo 50 para microfluidos ensamblado para la detección integrada de osmolaridad y analitos de interés, de acuerdo con algunas realizaciones. De forma similar a las otras realizaciones proporcionadas en el presente documento, el dispositivo 50 incluye una cápsula 500 microfluida y un chip 501 para microfluidos. La cápsula 500 incluye una ventana 502 a través de la cual una parte del sustrato 503 de detección (a manera de ejemplo no limitativo, un sustrato microporoso) es visible. En algunas realizaciones, el sustrato 503 está dispuesto de tal manera que la lectura de un ensayo de flujo lateral u otro ensayo de detección de analito se observa a través de la ventana 502 (a manera de ejemplo no limitativo, por un usuario o un dispositivo de detección tal como un sistema lector). En algunas realizaciones, el dispositivo 50 incluye

también un depósito 504 de fluido (a manera de ejemplo no limitativo, un envase blíster que contiene un volumen de fluido que se utiliza, como ejemplos no limitantes, como fluido de transferencia, fluido de lavado y/o un fluido de hidratación) que es accionado mecánicamente para liberar un volumen de fluido para desplazar la muestra fluida que se está probando desde los canales capilares del chip 501 para microfluidos al sustrato 503 de detección, como se describió anteriormente. En la realización de la figura 5A, se expone la superficie exterior del envase blíster. En algunas realizaciones, el envase blíster está sustancialmente cubierto excepto por un pequeño orificio para permitir el accionamiento. En algunas realizaciones, se utiliza una configuración del envase blíster para evitar que un usuario acceda al envase blíster para minimizar el potencial de accionamiento y ruptura accidental. La figura 5B muestra una realización de un dispositivo para microfluidos ensamblado para la detección combinada de osmolaridad y analitos de interés, o la detección separada de osmolaridad y analitos de interés. En esta realización particular, la funda 505 integrada protege la punta del chip para microfluidos, la ventana y el sustrato de detección, y la funda 505 integrada se retira una vez que el dispositivo se coloca sobre un dispositivo de tipo pluma y está listo para el ensayo. El depósito 506 de envase de ampolla está protegido contra la interacción del usuario por la cápsula (alojamiento), pero el orificio 507 de cápsula/alojamiento permite que un émbolo (no mostrado, a manera de ejemplo no limitativo, un émbolo de tamaño adecuado externo al dispositivo 50 para microfluidos) rompa el blíster y proporcione flujo impulsado por presión a través de la red microfluida dentro del portador 508, que se acopla al chip 509 de osmolaridad de microfluidos a través del adhesivo 510 sensible a la presión. En algunas realizaciones, las alas 511 de cápsula y las pestañas 512 proporcionan características mecánicas de acoplamiento para la pluma opuesta, las características 513 de sujeción permiten al usuario sujetar y manejar fácilmente el dispositivo como un todo.

Las realizaciones antes mencionadas permiten, en algunas realizaciones, que tanto la osmolaridad como otros analitos de interés se cuantifiquen en la misma plataforma con un mínimo de interacción del usuario. En algunas realizaciones, los dispositivos para microfluidos descritos en el presente documento se proporcionan en diversos formatos diferentes para facilitar la recolección de muestras y la lectura de resultados de medición. A manera de ejemplo no limitativo, el dispositivo para microfluidos se proporciona como una unidad desechable que se usa junto con un dispositivo tipo pluma. En algunas realizaciones, el dispositivo de pluma está configurado para recibir y acoplar un dispositivo para microfluidos. En algunas realizaciones, el dispositivo de pluma valida el dispositivo para microfluidos y señala al usuario que el dispositivo para microfluidos no está utilizado y listo para muestrear. En algunas realizaciones, el usuario retira una funda protectora que mantiene limpia la punta de muestreo y utiliza la punta de muestreo para recoger las lágrimas de un paciente (a manera de ejemplo no limitativo, de un solo ojo o de ambos ojos).

En algunas realizaciones, los sistemas, dispositivos y métodos como se describen aquí incluyen una unidad de base. En algunas realizaciones, la unidad de base está unida reversiblemente al dispositivo para microfluidos. En otras realizaciones, la fijación reversible es una o más seleccionadas entre: una unión mecánica, una comunicación fluida y una comunicación eléctrica o electrónica. En algunas realizaciones, una vez completada la recolección de la muestra, el dispositivo de pluma y el dispositivo para microfluidos acoplado se acoplan entonces a una unidad de base (a manera de ejemplo no limitativo, un dispositivo de lectura) que activa automáticamente cualquier válvula activa para permitir la liberación y el flujo del lavado fluido, y luego realiza el ensayo de detección de analito y/o genera una lectura de las lecturas de muestra registradas. En otras realizaciones, una vez completada la recolección de la muestra, el dispositivo de pluma y el dispositivo para microfluidos acoplado se acoplan entonces a una unidad de base (a manera de ejemplo no limitativo, un dispositivo de lectura) que baja automáticamente un émbolo para

eventualmente estallar un paquete blíster que permite liberación y flujo de un fluido de transferencia a través del circuito para microfluidos, y luego realiza el ensayo de detección de analito y/o genera una lectura de las lecturas de muestra registradas. En algunas realizaciones, el usuario retira el dispositivo para microfluidos del dispositivo de pluma después de la recolección de lágrimas y coloca el dispositivo para microfluidos en la unidad de base, que entonces realiza automáticamente el accionamiento y muestra los resultados de la lectura de la muestra. En tales realizaciones, el dispositivo de pluma comunica la lectura de osmolaridad registrada a la unidad de base (a manera de ejemplo no limitativo, usando métodos de comunicación inalámbrica) mientras que la unidad de base lleva a cabo el análisis de analito de interés. Dado el gran número de analitos que pueden ser buscados por este sistema, en algunas realizaciones, el dispositivo para microfluidos desechable contiene marcas, tales como un código de barras o código de barras bidimensional, que permiten a la unidad de base reconocer parámetros de ensayo relevantes (a manera de ejemplo no limitativo, tiempo, intensidad, longitudes de onda de excitación, longitudes de onda de emisión o número de analitos) y realizar los procedimientos de ensayo apropiados. En realizaciones alternativas, el propio dispositivo para microfluidos proporciona una lectura óptica semicuantitativa o cualitativa de los analitos de interés que es leída directamente por el usuario.

En algunas realizaciones, los dispositivos de pluma incluyen mecanismos para detectar y señalar al usuario una vez que se ha recogido un volumen suficiente de fluido lagrimal (a manera de ejemplo no limitativo, señales audibles incluyendo sonidos o similares, señales visuales que incluyen luces o similares, señales hápticas incluyendo vibraciones o similares). En algunas realizaciones, el usuario retira entonces el dispositivo para microfluidos desechable, presiona manualmente el blíster para liberar el fluido del blíster, y luego coloca el dispositivo para microfluidos en la unidad de base para su análisis.

Los sistemas, dispositivos y métodos descritos en el presente documento son compatibles con una amplia variedad de formatos de ensayo. Un ejemplo no limitativo de ensayo incluye uno o más seleccionados de: un ensayo basado en el ensayo inmunoenzimático (ELISA), un ELISA en sándwich, un ELISA competitivo, una detección basada en nanopartículas, una detección basada en resonancia de plasmón superficial (SPR) una detección electroquímica, una detección cromatográfica, un flujo a través de ensayos, un flujo lateral y similares. En algunas realizaciones, el sustrato microporoso sirve para capturar el fluido de lavado mientras la reacción de ensayo se realiza dentro del canal capilar. A modo de ejemplo no limitativo, en ciertas realizaciones, tanto la impedancia indicativa de osmolaridad como una medida de impedancia diferencial se hacen a medida que las nanopartículas se acumulan en una disposición de electrodos interdigitadas dentro del canal capilar, en comparación con una serie de electrodos interdigitadas corriente arriba con anticuerpos no específicos unidos. En otras realizaciones, tanto la impedancia (osmolaridad) como una medición electroquímica se realizan dentro del canal capilar. En realizaciones alternativas, se realiza una medición de impedancia indicativa de osmolaridad dentro del canal capilar y el sustrato microporoso actúa como un sustrato de flujo lateral para permitir la detección fluorescente.

En algunas realizaciones, los sustratos proporcionados en el presente documento tienen geometrías configuradas para aumentar la homogeneización del flujo sobre la región de la muestra para minimizar los efectos de la falta de homogeneidad del sustrato (a manera de ejemplo no limitativo, de la varianza de fabricación, anisotropías locales en la densidad del sustrato), atasco (a manera de ejemplo no limitativo, debido a que la materia en partículas y la reticulación biológica se acumulan dentro de los poros del sustrato), y/u otras fuentes de anisotropía fluida. En algunas realizaciones, las geometrías están diseñadas para generar regiones predeterminadas de mayor resistencia al flujo en el sustrato de detección. Aprovechando la resistencia al flujo de esta manera, se pueden utilizar retardos

temporizados, expansión de flujo predecible y/o contracción de flujo para asegurar que se reduce o se evita cualquier nanopartícula o reticulación biológica que de otro modo pueda causar el taponamiento y la humectación no uniforme de las regiones de la muestra. En algunas realizaciones, de manera similar, los sustratos están configurados operativamente para estimular la transferencia de fluido desde el canal capilar hasta al menos una región específica de una membrana, al mismo tiempo que impulsa el desbordamiento impulsado por presión para que se desvíen en lugar de entrar en la segunda región de muestra. En algunas realizaciones, la al menos una región específica es la primera o la segunda región de muestra. En otras realizaciones, los sustratos se forman operativamente para permitir que el fluido de transferencia fluya preferentemente corriente abajo antes de los componentes de reacción de un ELISA para hidratar anticuerpos de captura embebidos, ya que pequeños volúmenes de fluido lagrimal pueden ser insuficientes para rehidratar pilares de alta resistencia de anticuerpo dentro de una membrana de nitrocelulosa en el momento en que el bolo de lágrima ha fluido más allá de la primera región de muestra.

Las figuras 6A a 6E ilustran sustratos de detección de ejemplo con geometrías para conseguir un frente de fluido sustancialmente isotrópico (uniforme) cuando el fluido atraviesa la segunda región de muestra en la dirección del flujo, de acuerdo con muchas realizaciones. Las figuras 6F a 6G muestran ejemplos no limitativos de distribución de nanopartículas no homogéneas, anisotrópicas, como resultado directo de las condiciones iniciales de la distribución de nanopartículas corriente arriba y el flujo no modificado resultante. Específicamente, la figura 6F muestra cómo las nanopartículas sembradas en la línea central (en la parte inferior de la figura) fluyen verticalmente hacia arriba mientras que se enfocan en una trayectoria central por el fluido más rápido que impide que las nanopartículas lleguen a los bordes de la región de captura a rayas. La figura 6G muestra el ejemplo opuesto, en el que las nanopartículas sembradas a través de la anchura de la tira son empujadas hacia los bordes, dando como resultado una señal solamente en los bordes exteriores de la región de captura a rayas. En consecuencia, la figura 6A muestra un patrón que enfoca el flujo hacia el centro ya que hay menos resistencia que en los bordes largos del patrón, lo cual es útil para detectar nanopartículas raspadas a lo largo de toda la anchura de la membrana: dado que las nanopartículas añaden resistencia al recorrido del fluido, una franja de nanopartículas horizontales tiende a tener fluido preferentemente fluir hacia abajo por el medio y depositar las nanopartículas en los bordes lejanos de la tira, por lo tanto, centrando el flujo en el centro ayuda a crear un perfil de flujo más uniforme. La figura 6B muestra una realización particular de un diseño útil para impulsar fluido hacia los bordes, para compensar cuando las nanopartículas son sembradas (o son transferidas sobre la membrana) por el centro. Las figuras 6C a 6D muestran ejemplos no limitativos de diferentes tipos de estructuras de control de flujo incluyendo constricciones, expansiones y resistencias corriente abajo que hacen que el flujo sea más uniforme cambiando la resistencia en sección transversal. Además, estas estructuras de las figuras 6C-D cuentan con una resistencia descendente que ayuda a equilibrar y evitar las inestabilidades aleatorias de desplazar el flujo de un lado de la membrana a la otra. Estos enfoques son muy importantes cuando se analizan pequeños volúmenes de muestra dado que el frente de flujo de muestra puede no permitir el transporte uniforme de unidades estructurales detectables a través del canal de fluido o una región de detección sin guía, tantas veces, las unidades estructurales detectables introducen una resistencia que cambia con el tiempo y el espacio a medida que la muestra fluye a través de la membrana, especialmente si las unidades estructurales detectables usan nanopartículas como marcadores.

Con respecto a las figuras 6A a 6E, en algunas realizaciones, los sustratos de detección son membranas microporosas o sustratos microporosos, como se ha discutido anteriormente. En algunas realizaciones, los sustratos incluyen una o más geometrías diseñadas para producir restricciones de flujo. Tales geometrías se fabrican por diversos

métodos, como ejemplos no limitativos, perforación, calentamiento, marcado, deposición de cera, deposición de anticuerpos u otras proteínas, unión covalente de polímeros de alta resistencia o compuestos inorgánicos, o modelado por láser. En la representación de las figuras 6A a 6E, el flujo de fluido está diseñado para hacer que el volumen de muestra migre a través del sustrato (de abajo hacia arriba) para aprovechar los efectos de la región de entrada y expansiones de flujo después de una restricción para aumentar la homogeneización del flujo. Por ejemplo, el sustrato de la figura 6A incluye una serie de aberturas alargadas paralelas cerca del centro del sustrato. Las longitudes de las aberturas disminuyen al moverse de los bordes del sustrato al centro. El sustrato de la figura 6B es similar al de la figura 6A, excepto que las longitudes de las aberturas aumentan al moverse desde los bordes del sustrato al centro. El sustrato de la figura 6C incluye una pluralidad de pequeñas aberturas dispuestas en un patrón de rejilla. El sustrato de la figura 6D se forma en una forma de reloj de arena, de manera que la parte central del sustrato es significativamente más estrecha que los extremos. El sustrato de la figura 6E incluye una abertura de forma ovalada en la porción central, de manera que el extremo superior del sustrato se enlaza al extremo inferior del sustrato mediante dos tiras de material relativamente estrechas.

Ciertas realizaciones proporcionadas aquí también se prestan a enfocar el flujo para permitir regiones de muestra paralelas dentro de cada membrana. Las realizaciones de las figuras 6D y 6E incluyen una serie de canales paralelos en la porción superior del sustrato que son susceptibles de procesamiento de muestras paralelas. En algunas realizaciones, estos canales están diseñados para aprovechar la homogeneización de flujo aumentada que se produce después de que el volumen de muestra pase de las regiones restringidas a las regiones expandidas del sustrato.

En algunas realizaciones, los volúmenes de fluido usados son extremadamente pequeños, como se ha discutido anteriormente. En otras realizaciones, los volúmenes de fluido incluyen uno o más seleccionados entre: un volumen de fluido de muestra, un volumen de fluido de lavado y un volumen de fluido de transferencia. Por consiguiente, en diversas realizaciones, una o más características adicionales se integran en el canal capilar y/o sustrato de detección para controlar el flujo y medir con precisión la muestra. Un ejemplo no limitativo de tal característica son los cambios de alta frecuencia espacial en la energía superficial dentro del canal capilar, que se sabe que actúan como protuberancias de velocidad que cambian la forma del menisco de retroceso durante la evaporación, retardan eficazmente el movimiento del volumen de fluido. De forma similar, en algunas realizaciones, se modelan en el sustrato canales de serpentina u otros retardos de detección para modular la temporización del ensayo y mejorar la sensibilidad del ensayo (a manera de ejemplo no limitativo, un flujo más lento da lugar a tiempos de reacción más largos en las regiones de muestra).

En una realización particular, la figura 7 ilustra realizaciones de patrones de sustrato de detección que efectúan retardos de temporización de fluidos, de acuerdo con muchas realizaciones. En algunas realizaciones, los sustratos de detección son membranas microporosas o sustratos microporosos, como se discutió anteriormente. En algunas realizaciones, las geometrías de los sustratos de detección están diseñadas para influir en la longitud del retardo de temporización, proporcionando con ello control sobre diversos parámetros de ensayo. Por ejemplo, los sustratos 700, 701, 702 y 703 exhiben cantidades decrecientes de estructuras de canal en serpentina, teniendo el sustrato 700 la mayoría de estructuras en serpentina y no teniendo el sustrato 703 estructuras en serpentina. La cantidad de estructuras en serpentina en el sustrato influye en la cantidad por la cual se retrasa el flujo de fluido a través del sustrato, como lo demuestran las diferentes extensiones a las que han avanzado los bordes 704, 705, 706, 707 de pigmento a través de sus sustratos respectivos 700, 701, 702, y 703. Particularmente, el sustrato altamente

serpentino 700 exhibe el mayor retardo de tiempo del flujo de fluido, mientras que el sustrato 703 lineal presenta el menor retardo de flujo de fluido.

En una realización particular, la figura 8 ilustra una realización preferida de un polímero de nitrocelulosa microporoso 800 (línea discontinua) unido a un chip para microfluidos de policarbonato con electrodos de impedancia integrados. En esta realización, tras la recolección de nanolitros de fluido lagrimal en la punta, el fluido lagrimal se analiza primero para determinar la osmolaridad lagrimal como se muestra en la figura 8A. En la misma realización, el accionamiento subsiguiente de un depósito de envase blíster a través de un émbolo accionado por un motor controlado por ordenador (no mostrado) crea un pulso de aire que empuja la lágrima desde el canal 801 de recolección más allá de la válvula 802 pasiva (válvula de ventilación), microporosa de nitrocelulosa, que está modelada con una estructura 803 de lengüeta (que desciende sustancialmente en la parte superior de la válvula 802 pasiva) como se muestra en la figura 8B. La figura 8C exhibe la muestra de lágrimas 804 completamente impregnada sobre la membrana microporosa después del accionamiento inicial del depósito de ampolla, pero antes de la ruptura. En esta realización particular, mientras se espera que se produzca una ráfaga de burbujas y un flujo de regulador en funcionamiento para impulsar el ensayo en la figura 8D, la muestra de lágrimas se incuba con el complejo detector que comprende nanopartículas de quelato de europio fluorescentes funcionalizadas con anticuerpos (mostradas bajo iluminación ultravioleta (UV) con un filtro rojo de paso largo). Después de la ruptura de la ampolla, el regulador viaja a través del microcanal 805, hacia abajo a través de la válvula 806 de punta, hacia atrás a través del canal 801, hacia arriba a través de la válvula 802 de ventilación, a la lengüeta 803, desencadenando así el flujo del complejo de nanopartícula/lágrimas reaccionado sobre la segunda región 807 de muestreo, como se muestra en la figura 8E. En esta realización, el regulador se acumula encima de la válvula de ventilación y la lengüeta mientras suministra la reacción de flujo lateral, creando una bóveda 808 de fluido, ilustrada por el reflejo de lente de las cuatro luces de iluminación. En esta realización, el sustrato microporoso está modelado con canales 809 de desbordamiento, adyacentes a la válvula 802. En algunas realizaciones, los canales 809 de desbordamiento ayudan a mitigar el riesgo de la bóveda de incorporación de fluidos y la formación de crestas sobre el ensayo de flujo lateral, que proporciona una trayectoria de cortocircuito para que el fluido se mueva sobre la membrana en vez de a través de la membrana. La figura 8F muestra el resultado del ensayo completo en el que el bolo 810 inicial del complejo de nanopartículas/lágrima que ha reaccionado se ha diseminado para coincidir con el contorno de la estructura de membrana microporosa. En algunas realizaciones, el espesor del bolo 810 está controlado por la concentración inicial, la distribución, la densidad de carga, el estado de reticulación y el volumen de las nanopartículas sembradas sobre la membrana microporosa. En algunas realizaciones, configurando la segunda región de muestra para buscar solo un subconjunto del volumen total disponible, el ensayo hace que la intensidad del punto 811 sea relativamente independiente del volumen. En algunas realizaciones, dentro de los límites de linealidad del ensayo, cuanto mayor es la concentración del analito en la lágrima, mayor es la intensidad del punto 811, y cuanto menor es la concentración, menor es la intensidad.

La figura 9 ilustra una realización preferida de un polímero 900 de nitrocelulosa (línea discontinua) unido a un chip 901 para microfluidos de policarbonato con electrodos de impedancia integrados como se muestra en la figura 9A. Tras la recolección de nanolitros de fluido lagrimal en el extremo 902 más a la izquierda, el fluido lagrimal se analiza en primer lugar para determinar la osmolaridad lagrimal mientras que en el canal 903 de la figura 9B. El accionamiento subsiguiente de un depósito de envase blíster a través de un émbolo accionado por un motor controlado por ordenador, (no mostrado), crea un pulso de aire que se desplaza hacia abajo por el canal 904, a través de la válvula 905 de punta, empuja la lágrima pasando la válvula 906 de ventilación pasiva y sobre la membrana

microporosa, que está configurada con una estructura 907 de lengüeta (que es presionada sustancialmente en la parte superior de la válvula de ventilación por una protrusión de dedo de policarbonato que se proyecta hacia abajo desde la parte superior del alojamiento de plástico de soporte (no mostrado), dando como resultado la transferencia de muestra inicial como se muestra en la figura 9C. En esta realización particular mostrada en la figura 9, se incluyen nanopartículas quelatadas con Eu funcionalizadas con anticuerpos en la válvula 906 de ventilación antes de ejecutar el ensayo, en lugar de hacerlo en la membrana de nitrocelulosa, permitiendo que la lágrima y las nanopartículas se incuben mientras están en el canal de recolección. Como se evidencia en la figura 9C, los anticuerpos 908 de captura sembrados y multiplexados crean una resistencia fluida que evita que volúmenes de nanolitros pequeños de fluido rehidraten eficazmente la región de muestra. Esto también se ve en la FIG. 9D bajo iluminación UV filtrada en rojo, donde el resplandor de las nanopartículas 909 se excluye efectivamente de las manchas de anticuerpo de captura. Debido a que la totalidad del analito de señal de interés está contenida dentro del bolo inicial de fluido, la constricción 910 fluida corriente abajo crea un aumento en la resistencia descendente que hace que el fluido de muestra fluya preferentemente a través de los puntos de captura en lugar de alrededor de los puntos de captura, teniendo ahora los puntos menor resistencia que a través del centro del canal, facilitando el ensayo cromatográfico en el que las nanopartículas fluyen sobre el anticuerpo de captura, como se muestra en la figura 9E. Un resultado 911 multiplexado se ve en la figura 9F, como resultado del inmunoanálisis en sándwich capturando una serie de analitos de interés ligados al complejo de detección de interés dentro del fluido de la muestra a medida que fluía hacia adelante. Además, los canales 912 de desbordamiento que rodean el canal de ensayo absorben el exceso de fluido para evitar que una cúpula de regulador fluya sobre la parte superior del sustrato microporoso y que proporcione al regulador de funcionamiento una trayectoria de menor resistencia distinta de la segunda región de muestra.

En algunas realizaciones, dos elementos seleccionados entre los siguientes están en comunicación fluida entre sí: un canal capilar, un sustrato de detección, un sustrato microporoso, una cápsula, un chip capilar, una cavidad definida por una pared interior de una cápsula, un depósito, un conducto conectado de forma fluida al sustrato de detección, una válvula, una entrada vertical y una entrada.

En algunas realizaciones, los sistemas, dispositivos y métodos como se describen en el presente documento incluyen un envase blíster o uso del mismo. En algunas realizaciones, el envase blíster incluye al menos un volumen cerrado y sellado configurado para contener un volumen de fluido en su interior. En algunas realizaciones, el volumen de fluido encerrado dentro del envase de ampolla es liberado de una manera predeterminada cuando se aplica un elemento de accionamiento al envase de ampolla. En algunas realizaciones, el elemento de accionamiento es externo o está dentro de los dispositivos o sistemas como se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, el volumen de fluido dentro del blíster es suficiente para lavar la primera región de muestra, la segunda región de muestra o uno o más elementos dentro del dispositivo o sistema como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el volumen de fluido dentro del blíster es suficiente para transferir el fluido de muestra a la primera región de muestra, a la segunda región de muestra o a uno o más elementos dentro del dispositivo o sistema como se describe en la presente, de modo que el sistema o dispositivo genere un primera lectura de muestra válida o una segunda lectura de muestra válida basada en el fluido de muestra transferido de este modo. En algunas realizaciones, el volumen de fluido dentro del blíster está dentro de un rango de aproximadamente 10 nL a aproximadamente 50 μ L, o dentro de un rango de aproximadamente 50 nL a 500 nL. En algunas realizaciones, el volumen de fluido está dentro de un rango entre cualquiera de dos de los siguientes: aproximadamente 10 nL, aproximadamente 20 nL, aproximadamente 30 nL, aproximadamente 40 nL, aproximadamente 50 nL, aproximadamente 60 nL,

5 aproximadamente 70 nL, aproximadamente 80 nL, Aproximadamente 90 nL,
 aproximadamente 100 nL, aproximadamente 150 nL, aproximadamente 200 nL,
 aproximadamente 250 nL, aproximadamente 300 nL, aproximadamente 400 nL,
 aproximadamente 500 nL, aproximadamente 600 nL, aproximadamente 700 nL,
 aproximadamente 800 nL, aproximadamente 900 nL, aproximadamente 1 μ L,
 aproximadamente 2 μ L, aproximadamente 3 μ L, aproximadamente 4 μ L, aproximadamente
 5 μ L, aproximadamente 6 μ L, aproximadamente 7 μ L, aproximadamente 8 μ L,
 aproximadamente 9 μ L, aproximadamente 10 μ L, aproximadamente 11 μ L,
 10 aproximadamente 12 μ L, aproximadamente 13 μ L, aproximadamente 14 μ L,
 aproximadamente 15 μ L, aproximadamente 16 μ L, aproximadamente 17 μ L,
 aproximadamente 18 μ L, aproximadamente 19 μ L, aproximadamente 20 μ L,
 aproximadamente 21 μ L, aproximadamente 22 μ L, aproximadamente 23 μ L,
 aproximadamente 24 μ L, aproximadamente 25 μ L, aproximadamente 26 μ L,
 aproximadamente 27 μ L, aproximadamente 28 μ L, aproximadamente 29 μ L,
 15 aproximadamente 30 μ L, aproximadamente 31 μ L, aproximadamente 32 μ L,
 aproximadamente 33 μ L, aproximadamente 34 μ L, aproximadamente 35 μ L,
 aproximadamente 36 μ L, aproximadamente 37 μ L, aproximadamente 38 μ L,
 aproximadamente 39 μ L, aproximadamente 40 μ L, aproximadamente 41 μ L,
 aproximadamente 42 μ L, aproximadamente 43 μ L, aproximadamente 44 μ L,
 20 aproximadamente 45 μ L, aproximadamente 46 μ L, aproximadamente 47 μ L,
 aproximadamente 48 μ L, aproximadamente 49 μ L, o aproximadamente 50 μ L. En algunas
 realizaciones, el volumen de fluido no es más de aproximadamente 20 μ L,
 aproximadamente 250 nL, aproximadamente 200 nL, o aproximadamente 50 nL. El
 volumen de fluido no es mayor que aproximadamente 10 nL, aproximadamente 20 nL,
 25 aproximadamente 30 nL, aproximadamente 40 nL, aproximadamente 50 nL,
 aproximadamente 60 nL, aproximadamente 70 nL, aproximadamente 80 nL,
 aproximadamente 90 nL, aproximadamente 100 nL, aproximadamente 150 nL,
 aproximadamente 200 nL, aproximadamente 250 nL, aproximadamente 300 nL,
 aproximadamente 400 nL, aproximadamente 500 nL, aproximadamente 600 nL,
 30 aproximadamente 700 nL, aproximadamente 800 nL, aproximadamente 900 nL,
 aproximadamente 1 μ L, aproximadamente 2 μ L, aproximadamente 3 μ L, aproximadamente
 4 μ L, aproximadamente 5 μ L, aproximadamente 6 μ L, aproximadamente 7 μ L,
 aproximadamente 8 μ L, aproximadamente 9 μ L, aproximadamente 10 μ L,
 aproximadamente 11 μ L, aproximadamente 12 μ L, aproximadamente 13 μ L,
 35 aproximadamente 14 μ L, aproximadamente 15 μ L, aproximadamente 16 μ L,
 aproximadamente 17 μ L, aproximadamente 18 μ L, aproximadamente 19 μ L,
 aproximadamente 20 μ L, aproximadamente 21 μ L, aproximadamente 22 μ L,
 aproximadamente 23 μ L, aproximadamente 24 μ L, aproximadamente 25 μ L,
 aproximadamente 26 μ L, aproximadamente 27 μ L, aproximadamente 28 μ L,
 40 aproximadamente 29 μ L, aproximadamente 30 μ L, aproximadamente 31 μ L,
 aproximadamente 32 μ L, aproximadamente 33 μ L, aproximadamente 34 μ L,
 aproximadamente 35 μ L, aproximadamente 36 μ L, aproximadamente 37 μ L,
 aproximadamente 38 μ L, aproximadamente 39 μ L, aproximadamente 40 μ L,
 aproximadamente 41 μ L, Aproximadamente 42 μ L, aproximadamente 43 μ L,
 45 aproximadamente 44 μ L, aproximadamente 45 μ L, aproximadamente 46 μ L,
 aproximadamente 47 μ L, aproximadamente 48 μ L, aproximadamente 49 μ L o
 aproximadamente 50 μ L.

En algunas realizaciones, el sistema, dispositivos y métodos como se describen en el
 presente documento incluyen una interfaz. En otras realizaciones, la interfaz está situada
 50 entre la primera y la segunda regiones de muestra. En aún realizaciones adicionales, la
 interfaz está configurada para minimizar la cantidad de membrana desnuda con la que
 interactúa el fluido de muestra. En algunas realizaciones, la interfaz está configurada y
 localizada para minimizar la cantidad de membrana desnuda con la que interactúa el fluido

de muestra.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente descripción proporciona sistemas, métodos y dispositivos que facilitan la integración de la recolección microfluida de lágrimas y ensayos biológicos de analitos de interés en un único dispositivo receptor. Diversas realizaciones del dispositivo integrado aquí descrito permiten la recolección de lágrimas a escala de nanolitros, la medición precisa del fluido lagrimal, un retardo de movimiento de fluido para facilitar la medición de la osmolaridad lagrimal, la incubación de lágrimas con conjugados de detección, la transferencia cronometrada de nanolitros de fluido a la región de muestra, y/o características para permitir un lavado accionado por blíster y una cuantificación óptica de una pluralidad de analitos de interés. En algunas realizaciones, los resultados de tales análisis se aplican al tratamiento y monitorización de una amplia variedad de afecciones oculares, tales como enfermedad de ojo seco, glaucoma, retinopatía diabética, alergia, queratocono, degeneración macular u otras enfermedades oculares. A manera de ejemplo no limitativo, las lecturas de muestra generadas usando los enfoques descritos aquí se usan como base para ajustar la planificación del tratamiento para diversas condiciones oculares.

Como se usa aquí, A y/o B abarca uno o más de A o B, y combinaciones de los mismos tales como A y B.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor que interviene, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de dicho rango y cualquier otro valor establecido o que interviene en ese rango establecido, está comprendido dentro de la divulgación proporcionada en este documento. En algunas realizaciones, los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños se incluyen independientemente en los rangos más pequeños, y también se incluyen dentro de la descripción, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos de los límites, los rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la descripción proporcionada en este documento.

En algunas realizaciones, los rangos se expresan aquí desde "aproximadamente" un valor particular, y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa tal rango, otra realización incluye desde el valor particular y/o hacia el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los puntos extremos de cada uno de los rangos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro extremo. El término "aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un rango que es 10% más o menos desde un valor numérico indicado dentro del contexto del uso particular.

A menos que se especifique lo contrario, los procedimientos y procesos descritos actualmente se llevan a cabo en cualquier orden. A manera de ejemplo no limitativo, en algunas realizaciones con la etapa (a) primero, seguido por la etapa (b), y después la etapa (c) se realiza un método que describe las etapas (a), (b) y (c). O, en algunas realizaciones, el procedimiento se realiza en un orden diferente tal como, a manera de ejemplo no limitativo, con la etapa (b) seguida en primer lugar por la etapa (c) y después la etapa (a). Además, en algunas realizaciones, dichas etapas se realizan simultáneamente o separadamente a menos que se especifique lo contrario con particularidad.

Las dimensiones específicas de cualquiera de los aparatos, dispositivos, sistemas y componentes de los mismos, de la presente descripción, se pueden variar fácilmente

dependiendo de la aplicación pretendida, como resultará evidente para los expertos en la técnica en vista de la descripción en el presente documento. Además, se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son solo para fines ilustrativos y que se pueden sugerir a los expertos en la materia diversas modificaciones o cambios a la luz de la misma y se incluyen dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones anexas. Son posibles numerosas combinaciones diferentes de realizaciones descritas en el presente documento, y dichas combinaciones se consideran parte de la presente descripción. Además, todas las características discutidas en conexión con cualquier realización de la presente invención se pueden adaptar fácilmente para su uso en otras realizaciones de la presente invención. El uso de diferentes términos o números de referencia para características similares en diferentes realizaciones no implica necesariamente diferencias distintas a las expresamente establecidas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se considera que cualquier referencia a "o" en este documento abarque "y/o" a menos que se indique lo contrario. Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, el término "aproximadamente" o el término "aproximado a" se refiere a variaciones de +/- 1%, +/- 2%, +/- 3%, +/- 4%, +/- 5%, +/- 6%, +/- 7%, +/- 8%, +/- 9%, +/- 10%, +/- 11%, +/- 12%, +/- 14%, +/- 15%, +/- 16%, +/- 17%, +/- 18%, +/- 19%, +/- 20%, +/- 22%, o +/- 25%, dependiendo de la realización. A manera de ejemplo no limitativo, aproximadamente de 100 metros representa un rango de 95 metros a 105 metros, 90 metros a 110 metros, o 85 metros a 115 metros, dependiendo de las realizaciones.

Ejemplo 1.

Este ejemplo describe el funcionamiento de un dispositivo capaz de medir tanto la osmolaridad como la cantidad de un analito de interés en un pequeño volumen de una muestra de fluido.

El dispositivo se construyó y se operó como se ha discutido anteriormente en relación con las figuras 8 y 9. Como se ilustra en la figura 8, se aplicaron aproximadamente 150 nL de lágrima humana combinada con 250 ng/mL de IgE a la entrada de fluido de un dispositivo ensamblado. El dispositivo ensamblado impide que el fluido pase dentro del tubo capilar mientras se busca la impedancia y la temperatura de la muestra. La introducción de la muestra provocó una fuerte reducción de la impedancia que provocó que un programa de ordenador comenzara a bajar un émbolo para romper el depósito de envase de blíster dispuesto dentro de la cápsula/envoltura del dispositivo ensamblado. Una vez que el flujo de burbujas y el fluido de transferencia viajaron a través del sistema, apareció una mancha de 36 píxeles de diámetro con una intensidad media de 8 bits de 52.74, mientras que la media de fondo ascendente de un punto idéntico mostró 28.14 y 20.23 corriente abajo, dando como resultado una señal final de $52.74 - ((28.14 + 20.23)/2) = 28.56$ del canal rojo. Una configuración equivalente usando 100 ng/mL de IgE incorporada resultó en una intensidad de mancha de 34.12, una media de fondo ascendente de 28.88 y una intensidad de 21.71, lo que da como resultado una señal final de $34.12 - ((28.88 + 21.71)/2) = 8.83$, mientras que una muestra de lágrima de control sana y sin descomposición dio como resultado una intensidad de mancha de 21.91, un fondo de 23.46 corriente arriba y un fondo de corriente abajo de 19.03, resultando en una señal final de $21.91 - ((23.46 + 19.03)/2) = 0.67$. La relación señal/ruido de los 250 ng/mL fue de 42.3, mientras que la relación señal/ruido de la muestra de 100 ng/mL fue de 13.2. Este experimento demostró la detección y cuantificación de analitos de interés en volúmenes de muestra muy pequeños. Aunque el dispositivo era

capaz de medir asimismo la osmolaridad, se contempla que los dispositivos puedan configurarse para medir la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos de interés en una muestra de ensayo.

- 5 Aunque se han mostrado y descrito aquí realizaciones preferidas de la presente invención, será evidente para los expertos en la técnica que tales realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solamente. Ahora, para los expertos en la técnica, serán evidentes numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que se pueden emplear diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento en la práctica de la invención. Se pretende que las
- 10 siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos por las mismas.

La divulgación completa de cada uno de los documentos de patente y artículos científicos mencionados aquí se incorpora como referencia para todos los fines.

- 15 La invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o de sus características esenciales. Por lo tanto, las realizaciones anteriores deben considerarse en todos los aspectos ilustrativas más que limitativas de la invención descrita en el presente documento. El alcance de la invención está indicado así por medio de las reivindicaciones adjuntas más que por la descripción anterior, y todos los cambios que
- 20 están dentro del significado y rango de equivalencia de las reivindicaciones se consideran abarcados por las mismas.