

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 940 906**

51 Int. Cl.:

A61M 37/00 (2006.01)

A61M 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2016** **PCT/US2016/026779**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016** **WO16164821**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2016** **E 16718800 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2023** **EP 3280483**

54 Título: **Dispositivo para administrar una sustancia**

30 Prioridad:

08.04.2015 US 201562144842 P

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

12.05.2023

73 Titular/es:

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.0%)

77 Massachusetts Avenue
Cambridge, MA 02139, US y
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(50.0%)

72 Inventor/es:

SCHOELLHAMMER, CARL MAGNUS;
TRAVERSO, CARLO GIOVANNI;
SCHROEDER, AVRAHAM;
POLAT, BARIS;
BLANKSCHTEIN, DANIEL;
LANGER, ROBERT S. y
BRUGGE, WILLIAM

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 940 906 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para administrar una sustancia

5 Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio prioritario de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º 62/144.842, presentada el 8 de abril de 2014 y titulada "Systems, Apparatus, and Methods for Administering a Substance".

10 Campo técnico

La presente divulgación se refiere, en general, a un aparato para suministrar una sustancia a un sujeto. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a un aparato para el suministro de fármacos gastrointestinales mediada por ultrasonidos.

15 Antecedentes

El suministro de macromoléculas a través del tracto gastrointestinal (GI) es una de las áreas de investigación más investigadas en el suministro de fármacos. El suministro a través del tracto GI, sin embargo, todavía se limita a moléculas pequeñas. Incluso el suministro de moléculas pequeñas puede ser un desafío, con la mayoría de los medicamentos que a menudo necesitan formulaciones especializadas para estabilizar el ingrediente farmacéutico activo y proporcionar una absorción óptima en el tracto GI. No existe tecnología para facilitar el suministro rápido de fármacos de GI.

El documento US 2011/0282251 A1 describe unos sistemas para suministrar fluidos, aerosoles y/o energía acústica a sitios objetivo también dentro de las cavidades del cuerpo humano.

El documento US 6 589 173 B1 describe un dispositivo de detección y tratamiento de un tumor canceroso sólido usando ultrasonidos.

El documento WO 2009/153973 A1 describe un medio de mejora de la penetración para un fármaco de enema que tiene un catéter rectal y un globo que, cuando vibra, permite que el fármaco penetre en la pared intestinal.

35 Sumario

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas 1-15.

Una plataforma que podría permitir el suministro de una amplia gama de terapéuticas sin la necesidad de una reformulación costosa y que consume mucho tiempo podría presentar un cambio de paradigma en la ciencia del suministro y tener un amplio impacto clínico. Métodos físicos de suministro de fármacos, tal como un ultrasonido, pueden ser capaces de suministrar macromoléculas evitando la necesidad de un extenso desarrollo de formulaciones. La presente divulgación describe un aparato para administrar una sustancia. En algunas realizaciones, el aparato puede usarse para la administración mediada por ultrasonidos de una sustancia en un lumen corporal, como el recto.

En una realización, un dispositivo para administrar una sustancia incluye un cuerpo alargado que tiene un extremo proximal y un extremo distal, definiendo el cuerpo alargado una cámara interior que se extiende entre el extremo proximal y el extremo distal para dirigir la sustancia al extremo distal, el extremo distal se conecta con una punta, la punta se inserta al menos parcialmente en un orificio de un lumen corporal de un sujeto, incluyendo la punta una abertura para pasar la sustancia desde la cámara interior al lumen corporal, y un transductor para emitir una onda ultrasónica desde la punta al lumen corporal, administrando de este modo la sustancia al tejido en el lumen corporal. La punta del dispositivo incluye una región cóncava para crear un sello hermético a los fluidos entre la punta y el orificio y para reducir la fuga de la sustancia del orificio tras la al menos inserción parcial.

Además, en el presente documento se desvela una punta para un dispositivo para administrar una sustancia, la punta para insertarse al menos parcialmente en el recto de un sujeto, incluye una abertura para pasar la sustancia desde una cámara interior del dispositivo hacia al menos al recto, teniendo la punta una forma configurada para reducir la fuga de la sustancia del recto tras la al menos inserción parcial, y un transductor para emitir una onda ultrasónica desde la punta hacia al menos el recto, administrando de este modo la sustancia al tejido en al menos el recto.

Además, en el presente documento se desvela una funda para un dispositivo para administrar una sustancia que incluye una cubierta para proteger al menos una porción del dispositivo, que incluye la punta, del contacto directo con el recto, comprendiendo la cubierta un material para reducir la atenuación de la onda ultrasónica, siendo el material al menos uno de los acústicamente transparentes y acústicamente conductores, definiendo la cubierta una perforación para alinearse con la abertura. La funda puede incluir una banda elástica alrededor de la abertura de la cubierta configurada para reducir la exposición del dispositivo al recto, una envoltura elástica configurada para reducir la

exposición del dispositivo al recto, una pieza rígida para resbalar sobre la punta, una primera pieza rígida y una segunda pieza rígida para instalarse desde lados opuestos de la punta de tal manera que la primera pieza rígida se conecta a la segunda pieza rígida, y/o una primera pieza rígida unida por una bisagra en el extremo de la punta a una segunda pieza rígida.

5 Además, en el presente documento se desvela un cartucho para un dispositivo para administrar una sustancia que incluye un alojamiento que define un depósito que comprende la sustancia, insertándose el cartucho en la cámara interior para establecer una comunicación de fluidos con el dispositivo.

10 Además, en el presente documento se describe un kit para su uso en la administración de una sustancia que incluye un dispositivo para administrar una sustancia, incluyendo el dispositivo un cuerpo alargado que tiene un extremo proximal y un extremo distal, definiendo el cuerpo alargado una cámara interior que se extiende entre el extremo proximal y el extremo distal para dirigir la sustancia al extremo distal. El kit también incluye una punta para conectar al extremo distal, la punta se inserta al menos parcialmente en un orificio de un lumen corporal de un sujeto, teniendo la punta una forma configurada para reducir la fuga de la sustancia desde el orificio tras la al menos inserción parcial, incluyendo la punta una abertura para pasar la sustancia desde la cámara interior al lumen corporal, y un transductor para emitir una onda ultrasónica desde la punta al lumen corporal. El kit incluye además un cartucho a insertar en la cámara interior para establecer una comunicación de fluidos con el dispositivo, incluyendo el cartucho un alojamiento que define un depósito que comprende la sustancia.

20 También se desvela en el presente documento un método para ensamblar un dispositivo para administrar una sustancia que incluye conectar una punta al extremo distal, la punta se inserta al menos parcialmente en un orificio de un lumen corporal de un sujeto, teniendo la punta una forma configurada para reducir la fuga de la sustancia desde el orificio tras la al menos inserción parcial, incluyendo la punta una abertura para pasar la sustancia desde la cámara interior al lumen corporal y un transductor para emitir una onda ultrasónica desde la punta al lumen corporal. El método también la insertar un cartucho en la cámara interior, incluyendo el cartucho un alojamiento que define un depósito que comprende la sustancia para establecer una comunicación de fluidos con el dispositivo.

30 También se desvela en el presente documento un método para administrar una sustancia que incluye insertar en un orificio del lumen corporal de un sujeto al menos una porción de la punta de un dispositivo, teniendo la punta una forma configurada para reducir la fuga de la sustancia desde el orificio tras la al menos inserción parcial; pasar, a través de una abertura en la punta, la sustancia al lumen corporal; y emitir simultáneamente y/o posteriormente, a través de un transductor en la punta, una onda ultrasónica en el lumen corporal, administrando de este modo la sustancia al tejido en el lumen corporal.

35 Los kits, los métodos y procesos mencionados en la descripción no forman parte de la invención y tienen fines ilustrativos.

40 Debería apreciarse que todas las combinaciones de los conceptos anteriores y los conceptos adicionales expuestos con mayor detalle a continuación (siempre que tales conceptos no sean incompatibles entre sí) se contemplan como parte del objeto inventivo desvelado en el presente documento. En particular, todas las combinaciones del objeto reivindicado que aparecen al final de la presente divulgación se contemplan como parte del objeto inventivo desvelado en el presente documento. También debería apreciarse que a la terminología empleada explícitamente en el presente documento se le debe otorgar el significado más consistente con los conceptos particulares desvelados en el presente documento.

50 Otros sistemas y características resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de los siguientes dibujos y la descripción detallada. Se pretende que todos estos sistemas y características adicionales se incluyan dentro de la presente descripción, estén dentro del alcance de la presente invención y estén protegidos por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

55 El experto en la materia comprenderá que los dibujos son principalmente para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance del objeto inventivo descrito en el presente documento. Los dibujos no están necesariamente a escala; en algunos ejemplos, diversos aspectos del objeto inventivo desvelados en el presente documento pueden mostrarse exagerados o ampliados en los dibujos para facilitar la comprensión de las diferentes características. En los dibujos, los caracteres de referencia similares se refieren, en general, a características similares (por ejemplo, elementos funcionalmente similares y/o estructuralmente similares).

La figura 1 es un diagrama que ilustra las frecuencias de ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

65 La figura 2A es un diagrama que ilustra una celda de difusión de Franz de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 2B es una gráfica que ilustra *ex vivo* el suministro de glucosa a diversos tipos de tejido de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 3A-3E son unas gráficas que ilustran *ex vivo* el suministro de diversas sustancias a diversos tipos de tejido de acuerdo con algunas realizaciones.

5 Las figuras 4A y 4B son unas gráficas que ilustran *ex vivo* el suministro de diversas sustancias a diversos tipos de tejido de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 5A-5C son unas gráficas que ilustran *ex vivo* el suministro de diversas sustancias a diversos tipos de tejido de acuerdo con algunas realizaciones.

10 La figura 6 es una gráfica que ilustra la mejora relativa del suministro debido a la transmisión acústica o agitación de acuerdo con algunas realizaciones.

15 Las figuras 7A-7C son unas imágenes térmicas que ilustran los efectos térmicos del suministro de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 8 es una gráfica que ilustra la mejora relativa del suministro debido a los efectos térmicos de acuerdo con algunas realizaciones.

20 La figura 9A es una gráfica y las figuras 9B-9D son unas imágenes que ilustran la cavitación transitoria de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 10A-10C son unos diagramas que ilustran un mecanismo de suministro mejorado por ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

25 Las figuras 11A y 11B son unas representaciones gráficas que ilustran $\log(P_{glucosa})$ frente al $\log(P_{insulina})$ para el intestino delgado de acuerdo con algunas realizaciones.

30 Las figuras 12A-12D son unas imágenes que ilustran secciones transversales de tejido colónico expuesto a dextrano de 3 kDa o dextrano de 70 kDa activado por fluorescencia con o sin tratamiento con ultrasonidos de 20 kHz de acuerdo con algunas realizaciones.

35 Las figuras 13A y 13B son espectros de NMR de sustancias antes y después de la sonicación, y la figura 13C es una gráfica que ilustra la actividad de una sustancia antes y después del trato con ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 14A es un diagrama de flujo y la figura 14B es un diagrama que ilustra un procedimiento de suministro *en vivo* de acuerdo con algunas realizaciones.

40 Las figuras 15A y 15B son unas imágenes macroscópicas y las figuras 15C y 15D son unas imágenes histológicas que ilustran los efectos de la sonicación en el tejido colónico de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 16 es una representación gráfica del contenido de fármaco en biopsias de tejido normalizado por la masa de las biopsias de tejido de acuerdo con algunas realizaciones.

45 Las figuras 17A y 17B son unas representaciones gráficas de glucosa en sangre relativa, y la figura 17C es una gráfica de glucosa en sangre relativa que ilustra los efectos de la sonicación en la administración de insulina de acuerdo con algunas realizaciones.

50 La figura 18A es una imagen de un dispositivo de sonda de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 18B es un diagrama que ilustra una planificación de tratamiento de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 19A es una gráfica que ilustra los efectos de los ultrasonidos en los marcadores sanguíneos de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 19B es una representación gráfica que ilustra los efectos de los ultrasonidos en las puntuaciones histológicas de acuerdo con algunas realizaciones.

55 La figura 20 es una representación gráfica que ilustra los efectos de los ultrasonidos en las puntuaciones fecales de acuerdo con algunas realizaciones.

60 Las figuras 21A-21D son unas gráficas que ilustran los efectos de los ultrasonidos en la presentación de citoquinas de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 22A-22F son unas imágenes que ilustran los efectos de los ultrasonidos en la histología de acuerdo con algunas realizaciones.

65 Las figuras 23A-23B son unas gráficas que ilustran los efectos de los ultrasonidos en las puntuaciones fecales

totales de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 24 es una gráfica que ilustra los efectos de los ultrasonidos en las puntuaciones histológicas de acuerdo con algunas realizaciones.

5 Las figuras 25A-25E son unas imágenes que ilustran los efectos de los ultrasonidos en la histología de acuerdo con algunas realizaciones.

10 La figura 26 es un esquema que ilustra un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos de acuerdo con la invención.

La figura 27 es un esquema que ilustra un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos y un cartucho de fármacos de acuerdo con algunas realizaciones.

15 La figura 28 es un esquema que ilustra un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos y un depósito de fármacos exterior de acuerdo con algunas realizaciones.

20 La figura 29 es un esquema que ilustra el uso de un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 30 es un esquema que ilustra un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos con un cristal piezoeléctrico equilibrado de acuerdo con algunas realizaciones.

25 La figura 31 es un esquema que ilustra un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos con un árbol oscilante que tiene un saliente de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 32 es un esquema que ilustra un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos con cristales de alta relación de aspecto de acuerdo con algunas realizaciones.

30 La figura 33 es un esquema que ilustra los componentes interiores de un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 34 es un esquema que ilustra una funda con bandas para un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

35 La figura 35 es un esquema que ilustra una funda estirable para un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

40 Las figuras 36A-36C son unos esquemas que ilustran una funda rígida para un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

La figura 37 es un esquema que ilustra un mecanismo de seguridad para una funda para un dispositivo portátil de suministro de fármacos que emite ultrasonidos de acuerdo con algunas realizaciones.

45 La figura 38A es un diagrama que ilustra un régimen de tratamiento de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 38B es una gráfica de barras que ilustra los efectos de los ultrasonidos para el suministro de ácido nucleico en las puntuaciones fecales totales de acuerdo con algunas realizaciones.

50 Las figuras 39A y 39B son unas imágenes para ilustrar la puntuación histológica, y la figura 39C es una gráfica de barras que ilustra los efectos de los ultrasonidos para el suministro de ácido nucleico en las puntuaciones histológicas de acuerdo con algunas realizaciones.

55 La figura 40 es una representación gráfica que ilustra los efectos de la vacunación mediada por ultrasonidos en las puntuaciones corporales de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 41A y 41B son unas imágenes que ilustran un modelo de colitis de animales grandes de acuerdo con algunas realizaciones.

60 Las figuras 42A-45B son unas imágenes de detalles variables que ilustran cambios en la histología de biopsia colónica en un modelo de colitis de animales grandes de acuerdo con algunas realizaciones.

Las figuras 46A y 46B son unas representaciones gráficas que ilustran cambios en el hematocrito y la hemoglobina en un modelo de colitis de animales grandes de acuerdo con algunas realizaciones.

65 La figura 26 describe la invención con la región cóncava. Todas las demás figuras se dejan con fines ilustrativos.

Descripción detallada

Como se muestra en la figura 1, el ultrasonido es una onda de presión longitudinal caracterizada por una amplitud y una frecuencia (por encima del intervalo audible, por ejemplo, superior a 20 kHz). Clínicamente hablando, el ultrasonido se usa en una variedad de entornos, incluida la ultrasonografía, ablación tumoral y litotricia. Estas aplicaciones obstétricas y terapéuticas usan principalmente ultrasonidos de alta frecuencia (por ejemplo, superior a 1 MHz). A frecuencias más bajas (por ejemplo, el intervalo 100 desde aproximadamente 20 kHz hasta aproximadamente 100 kHz en la figura 1), sin embargo, el ultrasonido tiene propiedades únicas que incluyen la capacidad de permeabilizar transitoriamente y propulsar sustancias terapéuticas en el tejido mediante un fenómeno conocido como cavitación transitoria. La cavitación transitoria puede inducirse usando una variedad de configuraciones de sonda ultrasónica, incluyendo emisión axial y radial. Asimismo, la configuración óptima de ultrasonido podría ajustarse en función de la condición que se esté tratando, maximizando la posibilidad de generalización de esta modalidad.

El uso de una modalidad de suministro físico, tal como un ultrasonido, para maximizar el suministro de fármacos al tracto GI podría tener una amplia utilidad clínica. La enfermedad intestinal inflamatoria representa un conjunto de condiciones que pueden ser susceptibles de administración de fármacos asistida por ultrasonido. Este conjunto debilitante de condiciones se asocia con una alta morbilidad y un impacto negativo en la calidad de vida. El subtipo más común es la colitis ulcerosa. El tratamiento de primera línea para la colitis ulcerosa incluye aminosalicilatos administrados por vía oral y/o rectal, siendo este último reconocido como más eficiente, particularmente con actividad leve a moderada de la enfermedad. Sin embargo, un tratamiento rectal (es decir, un enema medicado) eficaz depende directamente del tiempo de retención y de la absorción tisular del fármaco, ambos son un desafío para los pacientes que sufren de diarrea y evacuaciones intestinales frecuentes. Por lo tanto, el uso de ultrasonidos para maximizar las concentraciones mucosas locales de aminosalicilatos en el recto, al tiempo que se reduce el tiempo de retención necesario del enema, puede ser una aplicación potencial de esta tecnología con un impacto y beneficio clínico significativo para los pacientes que actualmente deben autoadministrarse enemas medicados.

Además del suministro terapéutico al recto localmente, una modalidad de suministro físico también podría permitir el suministro sistémico de una amplia gama de compuestos, cambiando la forma en que se atacan y tratan las enfermedades. Este reconocimiento sugiere que el uso de ultrasonidos como plataforma de suministro físico permite suministrar una cantidad significativamente mayor de fármaco en todos los segmentos del tracto GI. Por ejemplo, el ultrasonido permite el suministro de terapéuticas modelo en un amplio intervalo de pesos moleculares en todas las partes del tracto GI *ex vivo*. En algunos casos, esta tecnología podría usarse a través del recto, por ejemplo, para el suministro de terapéuticas tópicas usadas actualmente para la gestión de la enfermedad inflamatoria intestinal.

El tratamiento estándar actual para la enfermedad inflamatoria intestinal es la autoadministración de enemas medicados. Como resultado, la aplicación simultánea de una sonda ultrasónica que también administra el enema medicado no presentaría un obstáculo para la adopción de estos pacientes. Adicionalmente, se ha demostrado anteriormente que concentraciones mucosas más altas de estos agentes se correlacionan con una menor actividad de la enfermedad.

En la presente solicitud se demuestra el uso preclínico de ultrasonidos como modalidad activa de suministro de fármacos a lo largo del tracto GI. Como se muestra en el presente documento, el ultrasonido pudo mejorar efectivamente el suministro de compuestos modelo con un amplio intervalo de pesos moleculares en todas las partes del tracto GI *ex vivo*. Más sorprendente fue el tiempo de tratamiento relativamente corto necesario para esto (un minuto de exposición total a ultrasonidos). La investigación del método de mejora eliminó la posibilidad de que la transmisión acústica o los efectos térmicos explicaran la mejora observada en el suministro del fármaco y sugiere que la cavitación transitoria proporciona una contribución significativa a la mejora del suministro. En efecto, se descubrió que los efectos térmicos y la sonicación con ultrasonidos de 1 MHz no provocaron ninguna mejora en el suministro. Adicionalmente, el aumento de temperatura *in vivo* como resultado del tratamiento se descubrió que era solo de $1,04 \pm 0,66$ °C. Además, la generación de picaduras en muestras de papel de aluminio como resultado de la sonicación con ultrasonidos de 20, 40 o 60 kHz soporta la aparición de cavitación transitoria en las intensidades probadas en este caso. También se cuantificó el efecto de los ultrasonidos de 20 kHz sobre los tamaños teóricos de los poros generados en el tejido y se descubrió que aumenta significativamente como resultado del tratamiento con ultrasonidos. Se podría lograr una mejora aún mayor en el suministro con una investigación adicional sobre el régimen de tratamiento y la implementación del dispositivo.

Basándose en esta comprensión y optimización actuales del suministro gastrointestinal mediado por ultrasonidos (UMGID) *ex vivo*, se probaron dos configuraciones *in vivo*: emisión de ultrasonidos (1) axial y (2) radial en el recto. La capacidad de generar ultrasonidos en múltiples configuraciones en pequeños factores de forma portátiles aptos para la autoadministración en el hogar soportan la generalización de UMGID y su capacidad de ajuste. Esto es primordial para una amplia aplicabilidad clínica y de investigación. En el caso de uso inmediato del suministro rectal para enfermedades tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, donde los enemas ya están establecidos como el tratamiento de referencia, los pacientes pueden usar un pequeño dispositivo portátil que emite ultrasonidos radialmente para lograr un alto grado de permeabilidad circunferencial del tejido, aumentando el suministro de medicamentos. La mejora continua en la miniaturización del ultrasonido podría permitir una variedad de diferentes formatos operativos para permitir una exposición conveniente a ultrasonidos en todas las partes del tracto GI,

incluyendo cápsulas ingeribles emisoras de ultrasonidos para facilitar el suministro sistémico de una manera conveniente.

Se demostró que la emisión axial en cerdos es segura basándose en el examen histológico del tejido y el seguimiento clínico del animal. También se demostró que el ultrasonido mejora significativamente el suministro de mesalamina en un orden de magnitud. El hecho de que este nivel de suministro pueda lograrse con solo un minuto de aplicación de ultrasonidos es indicativo del poder potencial de UMGID. Además, el suministro de insulina como modelo biológico destaca la capacidad de la emisión axial para lograr el suministro sistémico de moléculas más grandes a través del recto y, potencialmente, a través de los diversos segmentos del tracto GI. Debería observarse que, si bien la insulina se eligió por conveniencia experimental, su suministro exitoso es ilustrativo de la capacidad de suministrar productos biológicos localmente en el recto mientras conservan su función. El suministro local de productos biológicos tiene el potencial de ser útil en una variedad de enfermedades. Para la colitis ulcerosa, por ejemplo, el suministro local de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el TNF podría ser beneficioso para regular a la baja los procesos proinflamatorios. Esta tecnología en su forma actual también podría ser beneficiosa en el suministro local de productos quimioterapéuticos y biológicos en el recto para el tratamiento del cáncer colorrectal. En efecto, las estrategias actuales para lograr el suministro local de estos agentes se basan en gran medida en técnicas de formulación, que sufren de bajas eficiencias de carga y carecen de una amplia aplicabilidad para suministrar muchos fármacos.

Además de la emisión axial, la emisión radial se probó en un modelo de colitis murina clínicamente relevante. El tratamiento más eficiente de la colitis leve a moderada es la administración rectal. Sin embargo, la enfermedad activa puede dificultar la retención del medicamento. Por ejemplo, el procedimiento actual para la administración rectal de Rowasa® (mesalamina, 4 g, disponible en Meda Pharmaceuticals, Somerset, New Jersey) para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal requiere que los pacientes en primer lugar vacíen sus intestinos. A continuación, se les indica que se acuesten sobre su lado izquierdo. A continuación, el paciente debe insertar la punta de un aplicador en el recto e infundir suavemente el medicamento. Se indica a los pacientes que permanezcan en esta posición durante al menos 30 minutos y que retengan el enema durante la noche. Esto crea una experiencia precaria e incómoda que debe soportarse todas las noches. Esto es particularmente desafiante para los pacientes con colitis activa que experimentan urgencia con evacuaciones intestinales frecuentes. Incluso cuando este régimen se cumple estrictamente, las tasas de recaída de la enfermedad son altas. Para probar si UMGID tenía la capacidad de promover el suministro rápido de mesalamina y, por lo tanto, mejorar la eficacia del tratamiento, se usó una sonda ultrasónica con emisión radial por su capacidad de permeabilizar una mayor área de tejido. El uso de una sonda ultrasónica de diseño personalizado con un diámetro de eje ≤ 3 mm es indicativo de la capacidad de miniaturizar significativamente esta tecnología. Se descubrió que los ultrasonidos en combinación con un enema medicado mejoran significativamente los índices de enfermedad. La tendencia hacia un mejor resultado clínico en el grupo QOD sugiere que el tratamiento con ultrasonidos QOD puede ser útil en casos menos graves de colitis y en pacientes con adherencia subóptima a la medicación. Los resultados superiores de la enfermedad, tanto clínica como histológicamente, del tratamiento con ultrasonidos QD en comparación con el estándar de atención actual es emocionante y sugiere que UMGID podría permitir lograr la remisión con regímenes de tratamiento más cortos. Por otra parte, proporciona una solución para el suministro acelerado de fármacos en entornos clínicos donde el tiempo de tránsito GI rápido asociado a la enfermedad limita la absorción de la terapéutica. Como resultado, esta tecnología puede eliminar la necesidad de una retención prolongada del enema.

UMGID tiene muchas aplicaciones potenciales que van desde el tratamiento localizado específico del sitio con antiinflamatorios hasta el suministro más amplia de macromoléculas. Con más trabajo, esta tecnología podría miniaturizarse a dimensiones compatibles con la ingestión, permitiendo cápsulas ingeribles emisoras de ultrasonidos para su suministro sistémico. Basándose en los estudios descritos en el presente documento, la tecnología de ultrasonido tiene el potencial de suministrar sustancias tales como nanopartículas, anticuerpos monoclonales o vacunas para modular las respuestas inmunitarias de las mucosas. Adicionalmente, los ultrasonidos podría potencialmente permitir el suministro de nuevas clases de terapéuticas, como terapéuticas basadas en ADN y ARN, donde el suministro requiere superar varias barreras biológicas. Con más estudio, esta tecnología podría resultar invaluable tanto en entornos clínicos como de investigación, permitir terapias mejoradas y la expansión de técnicas de investigación aplicadas al tracto GI, así como nuevos dispositivos médicos para permitir el suministro rectal local y, con el tiempo, la administración oral usando dispositivos ingeribles.

EJEMPLO 1: Uso de prueba de concepto de ultrasonido para el suministro de fármacos ex vivo

Para comprender si el ultrasonido podría permeabilizar de manera segura el tejido de GI para permitir un mejor suministro de fármacos y para identificar las condiciones óptimas para UMGID, se desarrolló una plataforma ex vivo usando tejido de GI de porcino nuevo montado en celdas de difusión de Franz (véase la figura 1a). La atención se centró en el uso de ultrasonidos de baja frecuencia (menos de 100 kHz) dados los datos anteriores que soportan una mayor actividad cavitacional a intensidades típicas en comparación con los ultrasonidos de alta frecuencia (más de 1 MHz) a las mismas intensidades.

A. Configuración experimental

Una solución salina tamponada con fosfato (PBS), hidrocortisona, mesalamina, inulina de Dahlia Tubers (5000 Da) y

dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Misuri). La D-glucosa granular se obtuvo de Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, New Jersey). Se adquirieron dextranos de 3 y 70 kDa fijables con lisina marcados con Rojo de Texas de Invitrogen (Carlsbad, California). Otros permeantes radiomarcados se obtuvieron de American Radiolabeled Chemicals, Inc. (San Luis, Missouri) e incluían glucosa e hidrocortisona marcadas con ^3H y mesalamina marcada con ^{14}C e inulina de 5000 Da. Se prepararon soluciones de los cuatro compuestos a una concentración de 1 mg/ml con un contenido de radiomarcador que oscilaba entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 2,5 %, en función del contenido de radiomarcador de la solución madre.

El Comité de Cuidado Animal del MIT aprobó todos los aspectos de investigación relacionados con animales de este estudio. Todo el tejido se obtuvo de Research 87, Inc. (Boylston, Massachusetts). El tejido de GI (por ejemplo, tejido de lengua, esófago, estómago, intestino y colon) de cerdos Yorkshire se obtuvo dentro de los 20 minutos posteriores a la eutanasia de los animales y se almacenó a aproximadamente 4 °C. Las pruebas de suministro de fármacos se realizaron dentro de las 6 horas posteriores a la eutanasia. Tras el suministro, el tejido porcino nuevo se lavó con PBS y el exceso de grasa se diseccionó cuidadosamente. A excepción del tejido de la lengua, se usó el espesor completo del tejido para la prueba. El tejido se seccionó en piezas de aproximadamente 2 cm por 2 cm y se mantuvo hidratado con PBS. La variabilidad en el espesor del tejido de la lengua impidió el montaje de todo el espesor en las cámaras de difusión. En cambio, la superficie superior se aisló con un dermatomo eléctrico (Zimmer Orthopaedic Surgical Products, Dover, Ohio) hasta un espesor de aproximadamente 700 μm y, a continuación, se diseccionó en secciones de aproximadamente 6,4516 centímetros cuadrados (1 pulgada cuadrada).

Se usó un ultrasonido de baja frecuencia (por ejemplo, menos de 100 kHz) y se administró directamente al tejido y se comparó con controles que consistían en tejido no tratado. La eficacia del suministro se evaluó mediante la cuantificación del suministro de permeantes radiomarcados en y a través del tejido usando celdas de difusión de Franz. La figura 2A es un diagrama que ilustra una celda de difusión Franz 200 de acuerdo con algunas realizaciones. Cada celda de difusión Franz 200 incluye un dispositivo de sonda emisor de ultrasonidos 202, una cámara donante 204, una muestra de tejido 206, una cámara receptora 208 y un puerto de muestreo 210. Cada cámara receptora 208 de múltiples celdas de difusión de Franz 200 (15 mm de diámetro, disponible en PermeGear, Hellertown, Pensilvania) se rellena con PBS y se colocó una sección de tejido de GI nuevo 206 sobre cada cámara receptora 208 con el lado luminal hacia arriba. Cada celda de difusión 200 da como resultado un área de tejido expuesta de aproximadamente 1,77 cm^2 . A menos que se indique lo contrario, las cantidades suministradas representan la cantidad total de permeante suministrado sobre esta área. Para cada celda de difusión 200, se colocó una cámara donante 204 encima del tejido 206, y todo el conjunto se sujetó firmemente para evitar fugas. A continuación, cada cámara donante 204 se llenó con PBS para mantener el tejido 206 hidratado antes del tratamiento. Después de diseccionar todo el tejido necesario y montarlo en las celdas de difusión de Franz, las celdas de difusión se asignaron al azar a los diversos grupos experimentales.

Inmediatamente antes del tratamiento con ultrasonidos, la solución de PBS en cada cámara donante 204 se descartó y se reemplazó con una solución donante, es decir, una solución de 1 mg/ml que contenía un compuesto radiomarcado de interés.

Se generaron frecuencias ultrasónicas de 20, 40 y 60 kHz usando tres generadores de ultrasonidos separados, incluyendo el VCX 500, VCX 130 y una sonda de pedido personalizado, respectivamente (disponibles en Sonics and Materials, Inc., Newtown, Connecticut). Cada sonda o bocina 202 tenía una punta de 13 mm de diámetro para proporcionar una emisión axial de ultrasonidos. Se probaron tres potencias separadas en cada frecuencia y cada una se calibró por calorimetría usando un dewar sin recubrimiento. Se empleó calorimetría debido a que este método específico se usa comúnmente en la bibliografía para estimar la potencia ultrasónica. Las tres potencias a 20 kHz fueron 2,5, 5 y 7,5 W/cm^2 . A 40 kHz las tres potencias fueron 7,3, 10,5 y 13,4 W/cm^2 . A 60 kHz, las tres potencias fueron 9,6, 11,5 y 12,4 W/cm^2 . La diferencia de potencias probadas en cada frecuencia se debió a las sensibilidades y eficiencia de cada generador de ultrasonidos.

Para aplicar los ultrasonidos, la punta de la sonda ultrasónica o bocina 202 se sumergió en la solución permeante en cada cámara donante 204 de tal manera que la punta se colocó aproximadamente a 3 mm de distancia de la superficie del tejido 206. Independientemente de la frecuencia o la potencia, la duración del tratamiento fue de dos minutos usando un ciclo de trabajo del 50 % (5 segundos encendido, 5 segundos apagado), resultando en un minuto de exposición a los ultrasonidos.

Inmediatamente después del tratamiento con ultrasonidos, la solución donante se descartó y cada cámara donante 204 se lavó con PBS para eliminar cualquier material radiomarcado residual no suministrado al tejido 206. La solución receptora se recogió de cada cámara receptora 208 a través del puerto de muestreo 210 de la celda de difusión usando una pipeta de transferencia de 15 ml (disponible en, por ejemplo, VWR, Radnor, Pensilvania) y se transfirieron a viales de centelleo separados. La porción de cada tejido expuesta al compuesto de interés se cortó y también se colocó en viales de centelleo separados, desechando cualquier resto de tejido. El número de repeticiones osciló entre 3 y 10 para cada condición de tratamiento. En general, el tejido no tratado requirió más repeticiones ($n = 6$). El esófago también requirió más repeticiones debido a la falta de uniformidad macroscópica del tejido.

B. Cuantificación de la mejora del suministro

De acuerdo con el tipo de tejido, ya sea de 5 ml (lengua e intestino) o de 10 ml (todos los demás tipos de tejidos) del solubilizante de tejidos Soluene®-350 (disponible en Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) se añadió a los viales de centelleo con tejido expuesto para solubilizar el tejido. Cada mezcla de tejido se calentó y se dejó reposar hasta que el tejido se disolvió por completo. Independientemente del tejido, se tomaron alícuotas de 5 ml de cada mezcla de tejido en un segundo grupo de viales de centelleo para su análisis radiométrico.

Cada una de las soluciones receptoras recogidas se mezclaron minuciosamente y, a continuación, se alicuotó una muestra de 0,5 ml en un segundo grupo de viales de centelleo.

A continuación, se añadieron aproximadamente 15 ml de cóctel de centelleo Hionic-Fluor™ (disponible en Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) a cada una de las muestras alícuotas de solución receptora y a las muestras alícuotas de tejido y se dejó reposar durante aproximadamente una hora para que la señal se equilibrara. Las muestras se evaluaron en un contador de centelleo líquido Tri-Carb® (disponible en Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts).

En primer lugar, el transporte de glucosa tritiada se evaluó como un permeante modelo comparando su suministro a todos los segmentos principales del tracto GI. Se utilizó unos ultrasonidos de 20 kHz y se calibró a una intensidad de 7,5 W/cm². Esta intensidad se seleccionó basándose en mediciones de calorimetría que demostraron un aumento insignificante en la temperatura de la solución de acoplamiento, minimizando de este modo los efectos térmicos. La figura 2B es una gráfica que ilustra una valoración *in vitro* que compara el suministro de glucosa radiomarcada en la piel, el intestino y el tejido del colon con ultrasonido (20 kHz) o sin ultrasonido (Control) de acuerdo con algunas realizaciones. La masa de glucosa suministrada al tejido de GI aumentó hasta en un orden de magnitud cuando el suministro se combinó con un minuto de tratamiento con ultrasonidos (prueba t de Student de dos colas, $P < 0,03$).

Para comprender mejor las dependencias de frecuencia e intensidad e identificar los parámetros óptimos de UMGID, el suministro de glucosa se probó usando tres frecuencias distintas, 20, 40 y 60 kHz a tres intensidades separadas para cada frecuencia en todos los tipos de tejido del tracto GI. Debido a que se planteó la hipótesis de que la cavitación transitoria era el mecanismo dominante, estas frecuencias se eligieron para garantizar que se pudiera superar el umbral de cavitación.

Las figuras 3A-3E son unas gráficas que ilustran valoraciones *in vitro* del suministro de permeantes radiomarcados a una concentración de 1 mg/ml en la cámara donante en diferentes tipos de tejido con tratamiento o sin tratamiento (Control) de acuerdo con algunas realizaciones. En la figura 3A, se compara la cantidad de glucosa suministrada a diversos tejidos del tracto GI con ultrasonido (20 kHz) y sin ultrasonido (Control). El tratamiento utilizó una bocina de ultrasonidos de 20 kHz calibrada calorimétricamente a 7,5 W/cm². En la figura 3B, la cantidad de glucosa suministrada al intestino y al tejido del colon se comparó con el Control usando ultrasonidos de 20 kHz y 40 kHz a la intensidad más baja considerada para cada frecuencia.

Para evaluar el efecto del peso molecular del analito y debido a que la glucosa se absorbe activamente a través del tracto GI por los transportadores de glucosa, esta misma valoración se realizó usando inulina (5000 Da). La inulina fue elegida por su falta de absorción activa reconocida a través del epitelio del GI. Como resultado de esta prueba, se descubrió que el suministro mejoraba mucho a frecuencias de 20 y 40 kHz en comparación con 60 kHz. El suministro fue relativamente insensible a la intensidad en todas las frecuencias. En la figura 3C, la cantidad de 5000 Da de inulina suministrada al intestino y al tejido del colon se comparó con el Control usando ultrasonidos de 20 kHz y 40 kHz a la intensidad más baja considerada para cada frecuencia.

Después de haber demostrado que los ultrasonidos pueden mejorar el suministro de todos los tipos de tejido que se encuentran en el tracto GI *ex vivo* e identificado las condiciones óptimas de tratamiento con esta modalidad de suministro, se estudió el suministro de terapéuticas tópicas usadas actualmente para la gestión de la enfermedad inflamatoria intestinal mediante emisión axial de 20 y 40 kHz. Se ha demostrado anteriormente que concentraciones mucosas más altas de estos agentes se correlacionan con una menor actividad de la enfermedad. La mesalamina radiomarcada (ácido 5-aminosalicílico) y la hidrocortisona, ambos tratamientos tópicos reconocidos para la enfermedad inflamatoria intestinal, fueron evaluados con UMGID. La mesalamina se evaluó en el intestino delgado y grueso donde se usa clínicamente. La hidrocortisona se evaluó en todo el tracto GI de acuerdo con su aplicación clínica más amplia. Todos los tiempos de tratamiento se mantuvieron en 1 minuto de exposición total a los ultrasonidos, garantizando un régimen de tratamiento práctico compatible con la naturaleza de alto rendimiento de la endoscopia clínica, así como con los enemas autoadministrados por el paciente. El suministro de mesalamina al intestino fue de $14,97 \pm 5,10$, $41,52 \pm 4,45$ y $44,43 \pm 3,67$ µg sin ultrasonido (control), y con 20 y 40 kHz, respectivamente. El suministro al colon fue de $18,40 \pm 2,73$, $73,70 \pm 8,39$ y $47,37 \pm 3,05$ µg para el control, 20 y 40 kHz, respectivamente. El suministro de hidrocortisona se mejoró de 2 a 5 veces en todo el tracto gastrointestinal también usando ultrasonidos de 20 y 40 kHz.

En la figura 3D, la cantidad del compuesto de hidrocortisona clínicamente relevante suministrado al intestino y al tejido del colon se compara con el Control usando ultrasonidos de 20 kHz y 40 kHz a la intensidad más baja considerada para cada frecuencia. En la figura 3E, la cantidad del compuesto de mesalamina clínicamente relevante suministrado al intestino y al tejido del colon se compara con el Control usando ultrasonidos de 20 kHz y 40 kHz a la intensidad más

baja considerada para cada frecuencia. Las gráficas de las figuras 4A-4B también ilustran estas valoraciones *in vitro* que comparan el suministro de hidrocortisona y mesalamina marcadas radiactivamente, respectivamente, en tejido de intestino y colon con ultrasonidos (20 kHz o 40 kHz) o sin ultrasonidos (Control) de acuerdo con algunas realizaciones. Como muestran estas gráficas, el ultrasonido mejora significativamente el suministro de hidrocortisona y mesalamina al tejido.

Las figuras 5A-5B son unas gráficas que ilustran valoraciones adicionales *in vitro* de permeantes radiomarcados en diferentes tipos de tejido con tratamiento o sin tratamiento (Control) de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 5A representa el suministro de glucosa (n=3-7), la figura 5B representa el suministro de inulina (n=3-9), y la figura 5C representa el suministro de hidrocortisona (n=6). El tratamiento fue una exposición de un minuto a ultrasonidos de 20 kHz, 40 kHz o 60 kHz (solo glucosa e inulina) a una intensidad de 2,5 W/cm², 7,3 W/cm², y 9,6 W/cm² respectivamente. Las barras de error representan una desviación estándar.

EJEMPLO 2: Caracterización de los mecanismos subyacentes a la mejora del suministro

Basándose en estudios previos que evaluaron fenómenos asociados con la transmisión de ultrasonidos a través de líquidos, uno o más mecanismos podrían estar contribuyendo a la mejora observada, incluyendo, pero no limitados a: (1) transmisión acústica, (2) efectos térmicos y (3) cavitación transitoria. Para dilucidar qué mecanismos son dominantes, el suministro de glucosa tritiada al intestino delgado se evaluó bajo los efectos aislados de agitación de la cámara donante (para imitar la agitación general que reduciría la capa límite de difusión), así como la sonicación con ultrasonidos de 1 MHz a una intensidad por debajo del umbral para la cavitación transitoria para aislar el efecto de la transmisión acústica y el calentamiento del tejido. Estos regímenes se compararon con el suministro usando ultrasonidos de 20 y 40 kHz.

A. Transmisión acústica

Para investigar el impacto de la transmisión acústica y la agitación, las muestras de tejido se montaron en celdas de difusión de Franz como se ha detallado anteriormente. Se usó como permeante modelo una solución de glucosa de 1 mg/ml enriquecida con 2 μ Ci/ml de glucosa tritiada. Inmediatamente antes del tratamiento, la cámara donante se llenó con 1,5 ml de la solución de glucosa y se añadió una barra de agitación magnética de 5 mm. A continuación, se tapó la cámara del donante y se colocó una placa de agitación invertida encima de las celdas, garantizando la agitación de la solución donante sin que la barra de agitación agitase directamente el tejido. Un agitador magnético de 9 posiciones Bell-ennium™ (disponible en Bellco Glass, Inc., Vineland, New Jersey) se usó para agitar la cámara receptora a 500 RPM. Las cámaras donantes se agitaron durante dos minutos en total y a continuación se retiraron inmediatamente. A continuación, se desmontó la celda de difusión y se tomaron muestras de la solución receptora y del tejido para su análisis radiométrico de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Las muestras agitadas se compararon con muestras tratadas con la misma solución de glucosa y unas de ultrasonidos de 20 kHz a 2,5 W/cm² y ultrasonido de 40 kHz a 7,3 W/cm², de acuerdo con las mismas condiciones de tratamiento detalladas anteriormente. Cada grupo de estudio utilizó 6 repeticiones. La agitación mejoró el suministro en un factor de 2,10 en comparación con el control. Sin embargo, esa mejora y la cantidad absoluta de glucosa fue significativamente menor que la lograda con el ultrasonido de 40 kHz.

Para investigar las contribuciones de la cavitación transitoria y la transmisión acústica al mecanismo de mejora, el tejido fue tratado con ultrasonidos con un ultrasonido de 1 MHz para lograr la misma energía suministrada al tejido que la suministrada usando la intensidad más alta considerada en este estudio (40 kHz a una intensidad de 13,4 W/cm²). En particular, se eligió 1 MHz debido a que induce una cavitación estable y una transmisión acústica sin cavitación transitoria, ya que se reconoce que el umbral para la cavitación transitoria está muy por encima de las intensidades alcanzables clínicamente. Por lo tanto, cualquier mejora en el suministro sería el resultado de la transmisión acústica o la cavitación estable.

El mayor diámetro de las sondas de ultrasonidos de alta frecuencia disponibles comercialmente requería el uso de una celda de difusión más grande. Específicamente, se utilizaron celdas de difusión de 29 mm de diámetro con volúmenes de cámara receptora de 29 ml. Estas celdas de difusión dan como resultado un área de tejido expuesta de 6,6 cm². El tejido se montó como se ha descrito anteriormente. La cámara donante se llenó con una solución de 1 mg/ml que contenía glucosa tritiada. Se generó un ultrasonido de 1 MHz usando una sonda ultrasónica Dynatron D125 programada digitalmente a una intensidad de 2 W/cm² (determinado en 5,22 W mediante calorimetría) y operación continua (disponible en Dynatronics, Salt Lake City, Utah). Debido a la potencia reducida, el tratamiento se llevó a cabo durante más de dos minutos. Específicamente, se expuso el tejido para mantener constante la potencia ultrasónica total suministrada al tejido a la intensidad más alta probada (40 kHz a 13,4 W/cm²). El tiempo de tratamiento resultante, por lo tanto, fue de 3,4 minutos. Postratamiento, la solución donante se descartó y el tejido se lavó y seccionó como se ha descrito anteriormente. Cada condición de tratamiento (ultrasonidos de 1 MHz o sin ultrasonidos) se repitió tres veces. Como resultado de las diferencias en el tiempo de exposición a la glucosa y el área de tejido expuesta, los resultados se presentan como la proporción de glucosa suministrada al tejido tratado y no tratado.

La figura 6 es una gráfica que ilustra la mejora relativa en el suministro de glucosa al intestino delgado como resultado

del tratamiento con ultrasonidos de 1 MHz ajustado a 2 W/cm^2 (5,22 W reales) durante 3,4 min ($n = 3$), agitación de la cámara donante (control $n = 5$, agitación $n = 6$), y ultrasonidos de 40 kHz ajustado a una intensidad de $13,4 \text{ W/cm}^2$ (control $n = 5$, ultrasonido $n = 3$) la mejora cuantificada del suministro a partir de la agitación de la cámara donante o ultrasonidos a 20 kHz o 40 kHz en relación con los ultrasonidos a 1 MHz de acuerdo con algunas realizaciones. Este tratamiento no dio como resultado una mejora en el suministro de glucosa. Como se muestra en la figura 7, la mejora del suministro mediante ultrasonidos a 20 kHz o 40 kHz es superior a la agitación o al uso de ultrasonidos de 1 MHz. Los asteriscos (**) indican una diferencia estadística entre el tratamiento y su respectivo control determinada por una prueba t de Student de dos colas.

B. Efectos térmicos

Para comprender mejor el papel de los efectos térmicos en la mejora del suministro, el tejido intestinal fue tratado *ex vivo*, y la temperatura del tejido se controló de manera remota durante el transcurso del tratamiento. Específicamente, el tejido se montó en celdas de difusión de Franz de 15 mm de diámetro como se ha descrito anteriormente. A continuación, el tejido se trató durante dos minutos con ultrasonidos de 20 kHz ajustado a una intensidad de $7,5 \text{ W/cm}^2$ a un ciclo de trabajo del 50 % (un minuto de ultrasonidos). Durante el tratamiento, la temperatura de la cámara donante se monitorizó de manera remota usando una cámara termográfica (por ejemplo, FLIR® E50, disponible en FLIR Systems, Wilsonville, Oregón). Inmediatamente después del tratamiento, se descartó la solución de acoplamiento y se tomaron imágenes de la superficie del tejido con la cámara térmica para cuantificar la temperatura del tejido. Se realizaron tres réplicas biológicas. Se observó que la temperatura medida estaba por debajo de 40°C .

Las figuras 7A-7C son mapas de calor infrarrojos representativos capturados usando la cámara termográfica de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 7A es una imagen térmica de la cámara donante capturada antes del tratamiento ($t=0$). El tratamiento consiste en ultrasonidos de 20 kHz ajustados a una intensidad de $7,5 \text{ W/cm}^2$ en un ciclo de trabajo del 50 % durante 2 minutos en total. La figura 7B es una imagen térmica de la cámara donante capturada después de dos minutos de tratamiento ($t=2$ minutos). La figura 7C es una imagen térmica del tejido intestinal capturada inmediatamente después de haber descartado la solución de acoplamiento después del tratamiento. Los límites inferior y superior de temperatura en el campo de visión se muestran en el lado derecho de cada imagen. La temperatura mostrada en la parte superior izquierda de cada imagen es la temperatura en el punto de mira.

Las temperaturas observadas anteriormente durante el tratamiento con ultrasonidos se usaron para probar si calentar el tejido podría mejorar el suministro. Específicamente, se montaron muestras de tejido separadas en celdas de difusión de Franz de 15 mm de diámetro. El tratamiento térmico se aplicó usando un baño de agua circulante (disponible en, por ejemplo, VWR International, Radnor, Pensilvania). Específicamente, se ajustó un tubo con un diámetro exterior de 7 mm a la entrada y salida del baño de agua y se aisló. A continuación, este tubo se colocó en la cámara donante de la celda de difusión en una orientación que garantizaba que la cámara donante se llenaría y mantendría un nivel fijo de fluido. El baño de agua se llenó con agua desionizada y se ajustó a una temperatura de 40°C usando el controlador de temperatura digital y se confirmó con un termómetro. El tratamiento consistió en dos o cinco minutos de flujo continuo de agua calentada sobre el tejido. Para controlar cualquier alteración del tejido como resultado del flujo de agua, las celdas de difusión separadas también se trataron de manera similar con agua a temperatura ambiente. Inmediatamente después del tratamiento, la cámara donante se llenó con una solución de 1 mg/ml que contenía glucosa tritiada. Se permitió que esta solución se difundiera durante dos minutos manteniendo constante el tiempo de contacto del permeante a lo largo de los experimentos. Después de la exposición, el tejido y la cámara receptora se recogieron y se tomaron muestras del contenido radiométrico como se ha descrito anteriormente. Se realizaron tres repeticiones biológicas para cada tratamiento de baño de agua.

Se descubrió que el tratamiento de tejido *ex vivo* montado en celdas de difusión de Franz usando ultrasonidos de 20 kHz a $7,5 \text{ W/cm}^2$ elevaba la temperatura de la cámara donante a 40°C al final del tratamiento. No hubo diferencia entre la temperatura de la cámara donante y la temperatura de la sonda al final del tratamiento. Por lo tanto, se probó la mejora en el suministro como resultado del calentamiento del tejido a 40°C . La figura 8 es una gráfica que ilustra la mejora relativa en el suministro de glucosa al intestino delgado como resultado de exponer el tejido a agua mantenida a 40°C usando un baño de agua circulante durante dos o cinco minutos ($n = 3$ para cada tratamiento) de acuerdo con algunas realizaciones. El control consistió en hacer recircular agua a temperatura ambiente durante dos o cinco minutos. Esto se comparó con la mejora en el suministro usando ultrasonidos de 20 kHz ajustados a una intensidad de $7,5 \text{ W/cm}^2$ con un ciclo de trabajo del 50 % durante 2 minutos en total (control $n = 5$, ultrasonido $n = 3$). Los asteriscos (**) indican una diferencia estadística entre el tratamiento y su respectivo control determinada por una prueba t de Student de dos colas. El calentamiento del tejido del intestino delgado *ex vivo* a 40°C durante dos o cinco minutos no proporcionó una mejora en el suministro en comparación con el control.

C. Cavitación transitoria

El hecho de que calentar el tejido no proporcione una mejora en el suministro sugiere que los efectos térmicos no contribuyen significativamente al suministro observado usando ultrasonidos de baja frecuencia durante los intervalos de tiempo indicados. La transmisión acústica, de manera similar, parecería no contribuir significativamente al mecanismo de mejora basado en el uso de ultrasonidos de 1 MHz que no permiten ninguna mejora en el suministro.

En conjunto, estos resultados eliminan la posibilidad de transmisión acústica o efectos térmicos para explicar el aumento observado en el suministro de fármacos y sugieren que el UMGID es el resultado de una cavitación transitoria.

Para confirmar la generación de cavitación transitoria mediante la aplicación de las diversas sondas de ultrasonidos de baja frecuencia probadas en este estudio en una configuración experimental *ex vivo*, se llevaron a cabo unos experimentos de picadura de papel de aluminio. Las picaduras de papel de aluminio se validaron anteriormente como un ensayo para la cavitación transitoria.

Para evaluar si se produce cavitación transitoria usando 20 kHz, 40 kHz o 60 kHz a las intensidades utilizadas en este estudio *ex vivo*, las picaduras resultantes del tratamiento con ultrasonidos se cuantificaron en papel de aluminio como se ha hecho anteriormente en la bibliografía (17, 18). Se cortaron láminas de papel de aluminio en trozos de una pulgada cuadrada, evitando las arrugas. Usando grasa de vacío, los cuadrados de lámina de aluminio se montaron en la cámara receptora de una celda de difusión de Franz de 15 mm de diámetro. La grasa de vacío permitió que el papel de aluminio se adhiriera a la cámara receptora de las celdas de difusión. A continuación, la cámara receptora se llenó con PBS y la celda se sumergió en el PBS. Las muestras fueron tratadas con uno de los ultrasonidos de 20 kHz, 40 kHz o 60 kHz a la mayor intensidad considerada para cada frecuencia durante 2 segundos. La punta de la bocina se colocó 1 cm por encima de la superficie del papel de aluminio. Esto garantizó que el número de picaduras discretas no fuera demasiado numeroso para cuantificar. Después del tratamiento, las muestras se despegaron con cuidado de las cámaras receptoras y se montaron en cartulina gruesa. A continuación, se escanearon con un escáner de superficie plana CanoScan 8800F (disponible en Canon, Tokio, Japón) a 1200 ppp en modo de escala de grises y guardado en formato de archivo BMP. A continuación, se contaron las picaduras manualmente a partir de estas imágenes.

La figura 9A es una gráfica que ilustra el número de picaduras observadas en los experimentos de picaduras de papel de aluminio anteriores cuando se trata con ultrasonidos de 20 kHz, 40 kHz o 60 kHz durante 2 segundos a la intensidad más alta considerada para cada frecuencia ($n = 5$ para cada frecuencia) de acuerdo con algunas realizaciones. Las figuras 9B, 9C y 9D son unas imágenes representativas de las muestras de papel de aluminio picado tratadas con ultrasonidos de 20 kHz, 40 kHz o 60 kHz, respectivamente. La barra de escala en estas imágenes representa 3 mm. Se descubrió que el número de picaduras generadas con 20 y 40 kHz era estadísticamente mayor que el número de picaduras generadas con ultrasonidos de 60 kHz (ANOVA unidireccional con comparaciones múltiples, $P < 0,023$). Por el contrario, no se observaron picaduras cuando se aplicó un ultrasonido de 1 MHz.

Debido a que estos resultados sugieren que se está produciendo una cavitación transitoria, se calcularon los tamaños teóricos de los poros generados en el intestino delgado como resultado del tratamiento con ultrasonidos de 20 kHz utilizando la teoría del transporte obstaculizado con glucosa e inulina radiomarcadas como permeantes modelo.

Células de difusión Side-Bi-Side™ (disponibles de PermeGear, Hellertown, Pensilvania) con diámetros interiores de 9 mm se usaron para determinar la permeabilidad. Se colocó tejido entre las dos cámaras y se sujetó junto con el lado luminal orientado hacia la cámara donante. Se agregaron barras de agitación a las cámaras donante y receptora y se agitaron usando el agitador magnético de 9 posiciones Bell-ennium™.

La solución donante consistía en 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de 3H-glucosa y 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de inulina marcada 14C. Cada cámara donante se llenó con 3 ml de esta solución y la solución receptora se llenó con 3 ml de PBS nuevo. A intervalos de 10 minutos en el transcurso de una hora, se tomaron muestras de 100 μl de la cámara receptora y se reemplazaron con un volumen igual de PBS nuevo. A continuación, se añadieron 15 ml de flúor iónico a estas muestras y se analizaron para descomposición tritiada y descomposición 14C. Se realizaron siete repeticiones para las muestras de control y 17 para las muestras tratadas. La necesidad de más repeticiones para el grupo tratado con ultrasonidos se debió a la naturaleza heterogénea de la permeabilización.

Las figuras 10A-10C son diagramas que ilustran un mecanismo hipotético de suministro de GI potenciado por ultrasonido. Como se muestra en la figura 10A, la emisión de ultrasonidos desde la punta de la sonda o bocina 1000 da como resultado la formación de burbujas de cavitación en el fluido de acoplamiento 1002 por encima del tejido 1004. A medida que continúa el tratamiento, el número de burbujas nucleadas aumenta y las burbujas se mueven alrededor caóticamente y aumentan de tamaño a través de un proceso conocido como difusión rectificadora mostrado en la figura 10B. Por último, algunas de las burbujas alcanzan un tamaño umbral por encima del que ya no son estables. Estas burbujas implosionan, creando un chorro de fluido, conocido como un microchorro, que choca contra el tejido y conduce el fármaco al interior del tejido como se muestra en la figura 10C.

Para aclarar adicionalmente el mecanismo de mejora de UMGID, las estimaciones teóricas del tamaño de los poros se realizaron usando la teoría del transporte obstaculizado, que se ha usado anteriormente para modelar la difusión a través de las membranas. La permeabilidad P de una molécula que atraviesa una membrana porosa puede expresarse de la siguiente manera en la Ecuación 1:

$$P = CDF(\lambda) \quad (1)$$

donde C es una constante que depende únicamente de las propiedades de la membrana, D es el coeficiente de difusión libre de la molécula en solución, y $F(\lambda)$ se conoce como el factor de impedimento que depende de la relación

λ del radio hidrodinámico de la molécula y el radio del poro de la membrana. La expresión más avanzada de $F(\lambda)$ es de la siguiente manera en la Ecuación 2:

$$F(\lambda) = 1 + \frac{9}{8}\lambda \ln \lambda - 1,56034\lambda + 0,528155\lambda^2 + 1,91521\lambda^3 - 2,81903\lambda^4 + 0,270788\lambda^5 + 1,10115\lambda^6 - 0,435933\lambda^7 \quad (2)$$

Debido a que tanto C y el tamaño de poro de membrana (incrustado en λ) en la Ecuación 1 son desconocidos, pueden usarse dos moléculas permeantes para eliminar C de la siguiente manera en la Ecuación 3:

$$\frac{P_x}{P_y} = \frac{D_x F(\lambda_x)}{D_y F(\lambda_y)} = K \quad (3)$$

La única incógnita en la Ecuación 3 es el tamaño de poro en λ . Por lo tanto, P puede determinarse experimentalmente para cada permeante para estimar el tamaño de poro de membrana. La permeabilidad puede encontrarse usando la siguiente expresión en la Ecuación 4:

$$P_i = \frac{1}{AC_i} \frac{dQ_i}{dt} \quad (4)$$

donde A es el área de la membrana expuesta al permeante, C_i es la concentración del permeante en la cámara donante, y dQ_i/dt es la pendiente de la representación gráfica de la cantidad de permeante en la cámara receptora frente al tiempo después de la fase de retraso.

Se descubrió que la permeabilidad de cada molécula en el tejido no tratado con ultrasonidos era de $1,28 \times 10^{-4} \pm 5,05 \times 10^{-5}$ y $1,36 \times 10^{-5} \pm 6,77 \times 10^{-6}$ cm/min respectivamente. En muestras tratadas con ultrasonidos, la permeabilidad promedio de la glucosa y la inulina fue de $1,95 \times 10^{-4} \pm 4,84 \times 10^{-5}$ y $2,94 \times 10^{-5} \pm 1,36 \times 10^{-5}$ cm/min respectivamente. Se descubrió que el ultrasonido dio como resultado una permeabilidad estadísticamente más alta tanto para la glucosa como para la inulina (prueba t de Student de dos colas, $P \leq 0,008$). Estos valores, junto con los coeficientes de difusión y los radios hidrodinámicos de la glucosa y la inulina, se usaron en las Ecuaciones 1-4 para calcular los tamaños de poro teóricos generados cuando el intestino delgado porcino se trató con 20 kHz durante 2 minutos con un ciclo de trabajo del 50 %. Se presenta un intervalo de confianza del 95 % de la pendiente de regresión con tamaño de muestra n y radio de la membrana al cuadrado r^2 en la TABLA 1.

TABLA 1

	n	Pendiente	r^2
Control	7	$1,26 \pm 0,38$	0,94
Tratado (20 kHz)	17	$1,55 \pm 0,64$	0,68

De la Ecuación 3 anterior, puede verse que una representación gráfica de $\log(P_x)$ frente al $\log(P_y)$ debería producir una curva lineal con una pendiente de uno y una intersección y de $\log(K)$. Por lo tanto, se ajustaron regresiones lineales tanto al Control como a las representaciones gráficas tratadas del $\log(P_{glucosa})$ frente al $\log(P_{inulina})$, y se requería que el intervalo de confianza del 95 % de la pendiente contuviera el valor teórico de uno. El hecho de que la pendiente teórica de uno esté contenida en el intervalo de confianza del 95 % de ambos grupos experimentales soporta la validez de este análisis y, por lo tanto, es razonable deducir el tamaño de los poros usando las Ecuaciones 2 y 3.

Las figuras 11A y 11B son unas representaciones gráficas que ilustran $\log(P_{glucosa})$ frente a $\log(P_{inulina})$ para el intestino delgado de acuerdo con algunas realizaciones. En particular, la figura 11A representa esta relación en tejido no tratado mientras que la figura 11B muestra la relación en tejido tratado con ultrasonidos de 20 kHz en un ciclo de trabajo del 50 % durante dos minutos (es decir, un minuto total de exposición a los ultrasonidos).

Se calcularon valores de K para cada muestra usando la Ecuación 3 anterior. Las estimaciones de tamaño de poro promedios, inferiores y superiores se basan en el valor promedio de K y el intervalo de confianza del 95 % para K .

La TABLA 2 proporciona estimaciones del radio de tamaño de poro inferiores, promedios y superiores creadas en el tejido del intestino delgado como resultado de la exposición a ultrasonidos usando este modelo. Se descubrió que el límite superior de los radios de poros teóricos calculados en el intestino no tratado era de 53 Å, en comparación con un límite superior de 90 Å en muestras tratadas.

TABLA 2

	Tamaño de poro (Angstrom)		
	Inferior	Promedio	Superior
Control	41,6	46,3	53,7
Tratado (20 kHz)	53,4	65,2	90,6

Para visualizar la impregnación de moléculas y caracterizar la distribución tisular del suministro de analitos mediada

por ultrasonidos, se trató el tejido colónico *in vitro* con dextrano marcado con rojo de Texas en la cámara donante. Específicamente, el tejido porcino se montó en celdas de difusión de Franz de 15 mm de diámetro como se ha descrito anteriormente. La piel se trató con ultrasonidos de 20 kHz a la potencia más alta considerada como se ha descrito anteriormente. La solución de acoplamiento contenía dextrano de 3 kDa o dextrano de 70 kDa a una concentración de 1 mg/ml. Inmediatamente después del tratamiento, la solución de acoplamiento se descartó y el tejido se lavó minuciosamente con PBS para eliminar cualquier resto de dextrano. A continuación, la celda de difusión se desmontó y el tejido expuesto a dextrano se diseccionó cuidadosamente y se fijó en formalina al 10 %. A continuación, las secciones de tejido se montaron en bloques de parafina. A continuación, se montaron dos secciones de 8 µm de espesor separadas por un paso de 200 µm en un portaobjetos de microscopio de vidrio para obtener imágenes posteriores del tejido. Las muestras de tejido no tratadas con ultrasonidos también se expusieron a dextrano manteniendo constante el tiempo de contacto del permeante (2 minutos). Estas muestras se procesaron posteriormente de manera similar.

Se tomaron imágenes de los portaobjetos de histología resultantes con un microscopio multifotónico FluoView™ FV1000MP (disponible en Olympus, Tokio, Japón) con un objetivo de 25x, 1,05 N.A. Las muestras se excitaron a 860 nm usando un láser pulsado Ti-Sapphire (disponible en Spectra-Physics, Santa Clara, CA). La emisión se recogió con un filtro de paso de banda de 607/70 nm, y se tomaron imágenes del colágeno mediante una segunda generación de armónico a 430 nm. Los canales de imagen individuales se combinaron en el programa ImageJ.

Las figuras 12A-12D son unas imágenes microscópicas multifotónicas de secciones transversales del tejido colónico expuesto a dextrano de 3 kDa o dextrano de 70 kDa marcado con rojo de Texas con o sin tratamiento con ultrasonidos de 20 kHz de acuerdo con algunas realizaciones. Se muestran el canal rojo y el segundo armónico. La barra de escala representa 500 µm.

Sin ultrasonido, no hubo impregnación visible de dextrano de 3 o 70 kDa en el tejido colónico. Esto contrasta con el uso de ultrasonidos de 20 kHz, lo que permitió una penetración significativa de dextrano de 3 y 70 kDa en el tejido. Se observó dextrano en todo el espesor del tejido colónico cuando se utilizó ultrasonido. Esto sugiere que el ultrasonido permite que el fármaco penetre rápidamente en el tejido. Esto se confirmó además analizando la distribución de compuestos radiomarcados entre el tejido y la cámara receptora. El contenido de permeante en el tejido fue significativamente mayor que el presente en la cámara receptora como resultado del tratamiento con ultrasonidos. El suministro de inulina al tejido colónico, por ejemplo, dio como resultado 90 veces más inulina en el tejido en comparación con el promedio de la cámara receptora.

EJEMPLO 3: Efectos del trato con ultrasonidos en la estructura y función del compuesto terapéutico

El efecto de la sonicación en la estructura molecular de la mesalamina y la hidrocortisona se investigó analizando las moléculas después del trato con ultrasonidos mediante resonancia magnética nuclear (NMR). Se prepararon muestras de mesalamina e hidrocortisona a una concentración de 4 mg/ml en DMSO deuterado. Se sometieron a tratamiento con ultrasonidos muestras de 1,5 ml con ultrasonidos de 20 kHz a la intensidad más alta considerada como se ha descrito anteriormente. Se realizaron tres réplicas biológicas. Se usaron muestras no tratadas con ultrasonidos como control. Se usó un espectrómetro Varian 500 (1H, 500 MHz) para registrar los espectros de NMR 1H, a continuación se procesaron usando el software Mnova NMR (disponible en Mestralab Research, A Coruña, España). Los espectros de NMR 1H se referenciaron con desplazamientos de disolvente no deuterado residual (DMSO-d5 = 2,5 ppm). Todos los cambios se presentan en ppm. Obsérvese la desaparición del estándar de tetrametilsilano (TMS) interior volátil después del tratamiento con ultrasonidos, que se llevó a cabo en un vial sin tapar.

Las figuras 13A-13B representan espectros de NMR representativos de mesalamina e hidrocortisona antes y después de la sonicación de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 13A muestra espectros de NMR representativos de mesalamina después de la sonicación 1300 y antes de la sonicación 1302. Después de la sonicación 1300: NMR 1H (500 MHz, DMSO) δ Mayoría: 7,16 (1H, d, J = 2,8 Hz); 6,90-6,87 (1H, dd, J = 2,8, 8,8 Hz); 6,70 (1H, d, J = 8,8 Hz). Minoría: 7,10 (1H, d, J = 3,1 Hz); 6,98-6,96 (1H, dd, J = 3,1, 8,9 Hz); 6,67 (1H, d, J = 8,9 Hz). Antes de la sonicación 1302: NMR 1H (500 MHz, DMSO) δ 7,12 (1H, d, J = 2,8 Hz); 6,87-6,84 (1H, dd, J = 2,8, 8,8 Hz); 6,68 (1H, d, J = 8,8 Hz).

La figura 13B muestra espectros de NMR representativos de hidrocortisona después de la sonicación 1304 y antes de la sonicación 1306. Después de la sonicación 1304: NMR 1H (500 MHz, DMSO) δ 5,56 (1H, s); 5,19 (1H, s); 4,52-4,47 (1H, d, J = 19,1 Hz); 4,30 (1H, bm); 4,25 (1H, bm); 4,09-4,05 (1H, d, J = 19,1 Hz); 2,56 (1H, m); 2,40 (2H, m); 2,20 (2H, m); 2,07 (1H, m); 1,90 (3H, m); 1,78 (1H, m); 1,65 (2H, m); 1,54 (1H, m); 1,40 (1H, m); 1,36(3H, s); 1,26 (1H, m); 0,99 (1H, m); 0,85 (1H, m); 0,74(3H, s). Antes de la sonicación 1306: NMR 1H (500 MHz, DMSO) δ 5,56 (1H, s); 5,19 (1H, s); 4,67 (1H, m); 4,52-4,47 (1H, dd, J = 5,9, 19,1 Hz); 4,29 (1H, d, J = 3,32); 4,25 (1H, p, J = 3,32); 4,10-4,05 (1H, dd, J = 5,9, 19,1 Hz); 2,56 (1H, m); 2,40 (2H, m); 2,20 (2H, m); 2,07 (1H, m); 1,92(3H, m); 1,78 (1H, m); 1,65 (2H, m); 1,54 (1H, m); 1,40 (1H, m); 1,36(3H, s); 1,26 (1H, m); 0,99 (1H, m); 0,85 (1H, m); 0,74(3H, s). Se realizaron tres réplicas biológicas para muestras tratadas con ultrasonidos y no tratadas con ultrasonidos.

El intercambio de deuterio se produce como protones lábiles en el intercambio del analito con el disolvente deuterado en el que se disuelve. Este intercambio se cataliza durante la reacción de ultrasonido y es evidente en las muestras

posteriores a los ultrasonidos, como se muestra en las figuras 13A-13B. El reemplazo de protones por deuterio da como resultado la pérdida de señal, se muestra como una reducción en las fracciones de integración o la desaparición del pico por completo. Otras indicaciones de intercambio de deuterio incluyen un ligero ensanchamiento de la forma del pico, un cambio en la ubicación del pico y un ligero cambio en los valores de acoplamiento J. Estos cambios reflejan el equilibrio natural de los protones lábiles en solución y no reflejan cambios en la estructura molecular general.

Por último, también se evaluó el efecto de la sonicación sobre la estructura de insulina. Se formularon doscientas unidades de insulina de acción rápida en 10 ml de PBS. A continuación, esta muestra se trató con ultrasonidos, con ultrasonidos de 20 kHz a la intensidad más alta considerada como se ha descrito anteriormente. Se realizaron tres repeticiones biológicas para los grupos tratados con ultrasonidos y no tratados con ultrasonidos. La estructura de insulina se analizó mediante HPLC analítica de fase inversa usando una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μ m) (disponible en Agilent, Lexington, Massachusetts), con un gradiente de fase móvil del 95 % al 5 % de ácido acético (1,5 %) en agua en acetonitrilo durante 15 minutos. La figura 13D es una gráfica que ilustra el impacto de la sonicación en la función de la insulina de acuerdo con algunas realizaciones. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar. No se encontraron diferencias estadísticas en la concentración de insulina activa como resultado de la sonicación con 20 kHz ajustada a una intensidad de 7,5 W/cm² (prueba t de Student de dos colas, P = 0,48).

EJEMPLO 4: Estudios de suministro en vivo

Dada la eficacia del UMGID *in vitro*, así como las observaciones previas de que el suministro de fármacos por métodos tradicionales es, en general, mayor *en vivo* que *in vitro*, esta tecnología puede traducirse en grados aún mayores de mejora del suministro de fármacos *en vivo*. Además, se probaron dos configuraciones diferentes de UMGID *en vivo* para su eficacia de suministro: emisión axial en cerdos y emisión radial en ratones (descritas a continuación).

A. Suministro *in vivo* usando UMGID axial en cerdos

La figura 14A es un diagrama de flujo que describe el procedimiento para el suministro *en vivo* de acuerdo con algunas realizaciones. En la etapa 1400, el sujeto está preparado para el procedimiento. Se seleccionó un modelo porcino para este estudio debido a la similitud entre sus características anatómicas y las de los sujetos humanos, incluyendo la arquitectura del tejido, tamaño y metabolismo. Se utilizaron cerdos Yorkshire hembras y machos de entre 45 y 80 kg de peso para un estudio basado en la disponibilidad de sexo del proveedor. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité de Cuidado Animal del Instituto Tecnológico de Massachusetts. Antes de cada experimento, el animal estuvo en ayunas durante la noche. La sedación se indujo con inyección intramuscular de tiletamina Telazol®, 5 mg/kg (disponible en Zoetis, Inc., Florham, New Jersey), xilazina 2 mg/kg y atropina 0,04 mg/kg. A continuación, se intubó al animal y se mantuvo la sedación con isoflurano (1-3 % inhalado).

En la etapa 1402, se limpia el recto del sujeto, por ejemplo, con un enema de agua de grifo. En el estudio, se confirmó que el recto estaba limpio por colonoscopia antes del tratamiento.

En la etapa 1404, se instila un enema medicado. En el estudio, se preparó e instiló una solución de PBS de mesalamina al mismo volumen (60 ml) y concentración (66,6 mg/ml) usada clínicamente.

En la etapa 1406, se aplicó ultrasonido. En el estudio, las pruebas de Control y Tratamiento se realizaron en días separados. Para las pruebas de tratamiento, se aplicó el tratamiento de ultrasonidos usando una bocina de 20 kHz durante 2 minutos a un ciclo de trabajo del 50 % a una intensidad de 7,5 W/cm². Para las pruebas de control, se insertó la sonda ultrasónica en el colon, pero no encendida (n = 16).

Adicionalmente, también se cuantificó el aumento de temperatura como resultado del tratamiento con ultrasonidos. Para hacer esto, se colocó directamente un termopar (disponible en, por ejemplo, Kruuse, Langeskov, Dinamarca) en el recto durante el tratamiento. Las mediciones de temperatura se registraron continuamente a lo largo del tratamiento de 2 minutos. Con respecto a la temperatura, se descubrió que este tratamiento resultó en un aumento promedio en la temperatura de $1,04 \pm 0,66$ C (n = 3). Se esperaba un efecto mínimo sobre la temperatura dado el corto tiempo de tratamiento y el volumen del enema (60 ml). El aumento insignificante de la temperatura soporta adicionalmente la hipótesis de que los efectos térmicos no son responsables del aumento en el suministro de fármaco.

En la etapa 1408, se realiza una biopsia del tejido para una evaluación adicional. Se tomaron biopsias de las áreas colónicas tratadas con ultrasonido usando fórceps de biopsia endoscópica (disponibles en, por ejemplo, US Endoscopy, Mentor, Ohio) para la evaluación del suministro de fármacos, así como el análisis histológico (n = 13).

La figura 14B es un diagrama que ilustra esta configuración experimental de acuerdo con algunas realizaciones. Se diseñó un prototipo de sonda de mano 1410 para suministrar un enema medicado 1412 para incluir un emisor de ultrasonidos 1414 y un dispositivo de suministro de enemas 1416. En la figura 14B, la sonda 1410 se muestra insertada en el recto de un sujeto para suministrar el enema medicado y los ultrasonidos de 20 kHz. En algunas realizaciones, los dispositivos de sonda de mano son livianos, con dimensiones susceptibles de inserción en el recto de un sujeto. Por ejemplo, el tamaño de la punta de la sonda que se inserta puede ser comparable al tamaño de un colonoscopio

estándar.

La monitorización clínica de los animales demostró la seguridad inicial general. Las evaluaciones de seguridad se realizaron a través de la inserción de la sonda de 20 kHz en el recto seguido de biopsias del sitio tratado y un área adyacente no tratada de la mucosa colónica. El examen histológico demostró solo una alteración epitelial menor, < 5 %, del área tratada examinada de acuerdo con lo determinado por un patólogo clínico. Específicamente, hubo un desorden celular menor en las muestras de control, que se determinó que era una perturbación debida al procedimiento de fijación. En las muestras tratadas con ultrasonido, se observó una saponificación irregular del tejido adiposo. Además, se observó una congestión mínima de los vasos capilares intramucosos ubicados en la submucosa superficial. No hubo evidencia de daño epitelial y se mantuvo la integridad de la mucosa. Las figuras 15A-15B son unas vistas macroscópicas de tejido tratado y no tratado, respectivamente. Las figuras 15C-15D son unas vistas histológicas de tejido tratado y no tratado, respectivamente. El área delineada 1500 indica una saponificación localizada menor de la musculatura, < 5 %, del área tratada examinada. La barra de escala representa 100 µm.

A continuación, se evaluó la eficacia del suministro de mesalamina con el mismo régimen de tratamiento de 1 minuto que se usó en las pruebas *in vitro*. Un enema de mesalamina a la concentración y el volumen usados clínicamente (mesalamina Rowasa®, 4 g (disponible en Meda Pharmaceuticals, Somerset, New Jersey) en suspensión de 60 ml) se instiló en el recto porcino, seguido inmediatamente del UMGID. La cuantificación de mesalamina basada en cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) en biopsias de tejido tomadas inmediatamente después del UMGID demostró un aumento de 22,4 veces en el suministro usando ultrasonidos en comparación con el tejido colónico no tratado con ultrasonidos ($P = 4,06 \times 10^{-4}$). La figura 16 es una gráfica que ilustra el contenido de fármaco de mesalamina en biopsias de tejido normalizado por la masa de la biopsia de tejido como resultado de la colocación de un enema de mesalamina en el colon sin (Control) y con (Tratamiento) ultrasonidos de 20 kHz de acuerdo con algunas realizaciones. Cada punto representa una réplica biológica ($n = 16$ para Control, $n = 13$ para Tratamiento). El valor P representa una prueba t de Student de dos colas. Debería observarse además que se descubrió que la mitad de las muestras no tratadas tenían un contenido de fármaco por debajo del límite de detección (50 ng/g de tejido). Se usó espectroscopía de NMR ^1H para confirmar la estabilidad química de la mesalamina después del tratamiento con ultrasonidos (véase el Ejemplo 3 anterior).

Además del suministro de mesalamina, insulina, un modelo biológico, fue evaluado para determinar el potencial del UMGID para suministrar moléculas más grandes biológicamente activas. El mismo tratamiento de ultrasonido de 1 minuto con un enema de insulina resultó en una fuerte respuesta hipoglucémica. Las figuras 17A-17B son unas gráficas que ilustran la normalización de la glucosa en sangre a sus valores iniciales como resultado de la colocación de un enema que contiene 100U de insulina sin o con, respectivamente, tratamiento simultáneo de ultrasonidos de 20 kHz de acuerdo con algunas realizaciones. Cada curva individual en las figuras 17A-17B es una repetición biológica. La figura 17C es una gráfica de barras que representa el promedio y la desviación estándar después de 40 minutos de monitorización. El valor P representa una prueba t de Student de dos colas. De manera similar, se descubrió que el trato con ultrasonidos de la insulina no tiene impacto en su estructura de proteína activa (véase el Ejemplo 3 anterior). El suministro exitoso de medicamentos que varían en peso molecular en un orden de magnitud soporta la amplia aplicabilidad probable del UMGID.

B. Suministro *in vivo* usando UMGID radial en ratones

La relevancia clínica de la mejora en el suministro de mesalamina se analizó en un modelo murino de colitis aguda inducida por sulfato de sodio de dextrano (DSS). Se eligió este modelo murino debido a que se reconoce que no se beneficia de la administración tópica de mesalamina. Por lo tanto, la mejora en los índices de enfermedad en este modelo como resultado del tratamiento con ultrasonidos enfatizaría el impacto del UMGID. Dada la anatomía colónica y la naturaleza a menudo circunferencial de la afectación de la colitis, se planteó la hipótesis de que el UMGID radial sería más beneficioso para dirigir el tratamiento sobre el área más grande del tejido inflamado.

La emisión radial se consiguió usando una sonda ultrasónica en miniatura diseñada a medida con dimensiones susceptibles de insertarse directamente en el colon del ratón (diámetro de la sonda ≤ 3 mm) de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 18A es una imagen de la punta de la sonda ultrasónica con un diámetro de eje de 2 mm. Los dos salientes mostrados tienen un diámetro de 3 mm y mejoran la emisión de ultrasonido radial. Se descubrió que este dispositivo resultó en un aumento de temperatura no medible como resultado del corto tiempo de tratamiento y se confirmó la formación de picaduras en muestras de papel de aluminio.

La tolerabilidad de este dispositivo se probó por primera vez en animales sanos en ausencia de colitis. Específicamente, el efecto de la inserción diaria de la sonda y la inserción de la sonda seguida de la sonicación se probaron durante el curso de 14 días para su comparación posterior con los grupos de enfermedades. La figura 18B es un diagrama que ilustra la planificación de inducción y de tratamiento de la colitis para la UMGID radial *in vivo* de la mesalamina de acuerdo con algunas realizaciones. El resultado de la inserción repetida de la sonda y la inserción de la sonda seguida de la sonicación se compararon con un grupo de control que no recibió manipulación. El tratamiento siguió el régimen diario (QD) presentado en la figura 18B. Se descubrió que el tratamiento fue bien tolerado y todos los animales estuvieron libres de signos clínicos de angustia durante el período de 14 días.

Con respecto al potencial de traumatismo local inducido directamente en el colon en animales sanos, se evaluó a los ratones antes y después de la inserción de la sonda con y sin ultrasonidos para determinar que el tratamiento resultó en un traumatismo localizado que condujo a sangrado rectal o inflamación. En un examen macroscópico, los órganos parecían normales sin que se observaran equimosis sobre los órganos.

La figura 19A es una gráfica de barras que ilustra el efecto del ultrasonido rectal en los marcadores sanguíneos de acuerdo con algunas realizaciones. Con respecto a los niveles de hematocrito y hemoglobina, un análisis de varianza unidireccional mostró que no había diferencia estadística entre el hematocrito o la hemoglobina normalizados finales de cualquier grupo, lo que sugiere que la inserción de la sonda y la sonicación no inducen una pérdida de sangre significativa y se toleran bien. En la figura 19A, el hematocrito y la hemoglobina se normalizaron al día 1 para animales sanos (Control), recibiendo los animales sanos una inserción de sonda diaria (inserción de sonda) y recibiendo los animales sanos sonicación con ultrasonidos (US) diariamente. Si bien se usaron cinco animales en cada grupo, algunas muestras de sangre del día 1 y el día 14 se coagularon, lo que resultó en menos de cinco valores para algunos grupos.

Se seleccionó el examen histológico en el día 14 para evaluar el efecto de la dosificación repetida y permitir la comparación con los resultados de animales con enfermedad inducida que recibieron un curso de tratamiento de 14 días utilizado clínicamente. Las puntuaciones de histología también mostraron que tanto el grupo de inserción de la sonda como los grupos de US tenían puntuaciones de histología estadísticamente mejores que cualquier otro grupo al que se le había inducido la enfermedad (análisis unidireccional de pruebas de varianza con comparaciones múltiples, $P < 0,015$). La figura 19B es una gráfica que ilustra el efecto de la ecografía rectal en las puntuaciones histológicas de las secciones de tejido en el día 14 de acuerdo con algunas realizaciones. Se muestran la media, los percentiles 25 y 75, y las patillas indican los puntos de datos más extremos.

Las puntuaciones fecales totales de los animales sanos que recibieron tratamiento también fueron normales. Específicamente, una prueba t pareada de dos colas entre los grupos de inserción de sonda y ultrasonidos no mostró diferencias significativas entre sus puntuaciones en ningún día. La desviación estándar más grande observada en la puntuación fecal total para el Control, la Inserción de sonda y los grupos de US durante la prueba de 14 días fue de 0,54, 2,68 y 3,28, respectivamente. La desviación estándar promedio para cada grupo durante la prueba de 14 días fue de 0,17, 0,99 y 1,56, respectivamente. La figura 20 es una gráfica que ilustra el efecto del ultrasonido rectal en la puntuación fecal de acuerdo con algunas realizaciones.

La tolerabilidad del tratamiento se corroboró adicionalmente con la cuantificación de las citoquinas en tejido colónico. Los niveles de citoquinas que se sabe que aumentan como resultado de la inflamación aguda se perfilaron a partir del tejido colónico. Para evaluar adicionalmente la toxicidad potencial resultante de solo el UMGID, se realizó la expresión de citoquinas, incluidas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-17 a partir de tejido colónico de los tres grupos. Las figuras 21A-21D son unas gráficas que ilustran el efecto del ultrasonido rectal en la presentación de citoquinas ($n = 4$ repeticiones biológicas para todos los grupos) de acuerdo con algunas realizaciones. En particular, la figura 21A ilustra los niveles de citoquinas de TNF- α , la figura 21B ilustra los niveles de citoquinas de IFN- γ , la figura 21C ilustra los niveles de citoquinas de IL-6, y la figura 21D ilustra los niveles de citoquinas de IL-17. Los recuentos se evaluaron usando el panel inflamatorio de ratón (disponible en nanoString Technologies, Seattle, Washington), que cuenta físicamente el número de cadenas de mRNA presentes en la muestra y normaliza estos recuentos entre las muestras usando controles interiores de inserción positiva. Todas las gráficas representan promedios y desviaciones estándar. Los tamaños de muestra indicados son réplicas biológicas. No se encontró diferencia estadística en los niveles de expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ , IL-6 o IL-17 entre grupos de tratamiento (análisis unidireccional de pruebas de varianza con comparaciones múltiples). La toxicidad evaluada a través de la ausencia de anemia, puntuación fecal baja, puntuaciones histológicas bajas y niveles normales de citoquinas soportan la probable seguridad de esta modalidad de suministro de fármacos en el tracto GI.

Para evaluar el potencial de cavitación que se produce en otras partes del cuerpo, se realizó examen histológico de hígado, bazo, páncreas, riñón, intestino delgado y colon en animales sanos que recibieron la inserción de la sonda o la inserción de la sonda seguida de la sonicación. La evaluación ciega de la histología por parte de un patólogo clínico determinó que el tejido más allá del colon tenía una arquitectura normal sin anomalías citológicas en todos los grupos. Solo en el grupo que recibió la inserción de la sonda y la sonicación hubo una alteración menor del colon únicamente. La puntuación histológica para el tejido colónico de estos animales fue estadísticamente mejor que la puntuación observada para cualquier grupo que tuviera colitis inducida. Las figuras 22A-22F son unas imágenes histológicas representativas de un hígado, bazo, páncreas, riñón, intestino delgado y colon de ratón, respectivamente, después de un régimen de tratamiento de 14 días de ningún tratamiento ($n = 5$), inserción de la sonda sin encenderla ($n = 5$) o inserción de la sonda y sonicación ($n = 5$). La barra de escala representa 200 μm .

La toxicidad mínima evaluada a través de la ausencia de anemia, puntuación fecal baja, puntuaciones histológicas bajas y niveles normales de citoquinas soportan la probable seguridad de esta modalidad de suministro de fármacos en el tracto GI.

Como se muestra en la figura 18B, se indujo colitis con DSS al 3 % p/p administrado *ad libitum* durante siete días con la administración del tratamiento concurrente a partir del día 2. La administración de mesalamina en combinación con

tratamientos de ultrasonido de QD, así como cada dos días (QOD), permitió una recuperación significativamente más rápida de los síntomas de la colitis en comparación con la administración diaria de un enema de mesalamina solo (el estándar de atención actual), de acuerdo con lo evaluado por la puntuación fecal total. Específicamente, ambos grupos que recibieron tratamientos con ultrasonido demostraron puntuaciones fecales totales mejoradas en comparación con el grupo de enfermedad y el grupo de enema desde el día 12 en adelante (ANOVA unidireccional con comparaciones múltiples, $P < 0,047$) y demostró puntuaciones fecales totales inferiores a 4 el día 14. Esto contrasta con los dos grupos de enfermedades que no recibieron tratamiento y los que recibieron solo enemas de mesalamina de QD, que todavía demostraron puntuaciones fecales totales significativamente elevadas en el día 14.

Las figuras 23A-23B son unas gráficas que ilustran la puntuación fecal total para animales sanos (Control) y animales con colitis inducida por DSS: no reciben tratamiento (Enfermedad), reciben un enema de mesalamina diariamente (Enema de fármacos de QD), reciben un enema de mesalamina con tratamiento de ultrasonidos diariamente (QD de tratamiento de US), y reciben un enema de mesalamina con tratamiento de ultrasonido cada dos días (QOD de tratamiento de US) de acuerdo con algunas realizaciones. Todos los grupos estaban compuestos por 5 animales. El asterisco (*) indica una diferencia estadística entre los grupos de tratamiento con ultrasonidos y los grupos que no recibieron tratamiento o solo recibieron un enema de mesalamina (análisis unidireccional de pruebas de varianza con comparaciones múltiples, $P < 0,047$).

Además de la puntuación fecal total, el tejido colónico se evaluó histológicamente al final de la prueba de forma ciega. La figura 24 es una gráfica que ilustra las puntuaciones histológicas de las secciones de tejido en el día 14 de acuerdo con algunas realizaciones. Se muestran la media, el percentil 25 y el 75. Las patillas indican los puntos de datos más extremos. El asterisco (*) indica una diferencia estadística entre el grupo de QD de ultrasonidos y todos los demás grupos de colitis (análisis unidireccional de pruebas de varianza con comparaciones múltiples, $P < 2,9 \times 10^{-4}$).

Las figuras 25A-25E son unas imágenes histológicas del tejido colónico en el día 14 de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 25A es una Puntuación 0 (tejido sano), la figura 25B es una Puntuación 1, la figura 25C es una Puntuación 2, la figura 25D es una Puntuación 3, y la figura 25E es una Puntuación 4 (tejido enfermo). La barra de escala para las figuras 25A y 25E representa 500 μm . La barra de escala para las figuras 25B-25D representa 200 μm . El grupo de QD de tratamiento con ultrasonidos tuvo una puntuación histológica estadísticamente más baja que cualquier otro régimen de tratamiento y el grupo de enfermedad. El tejido en el grupo de QD de tratamiento con ultrasonidos parecía tener significativamente menos erosión del epitelio y solo un acortamiento menor de las criptas en comparación con los otros grupos de colitis.

C. Evaluación de la masa de fármacos a partir de biopsias colónicas

El tejido se trituró y se mezcló con solución salina tamponada con fosfato y se precipitó con ácido tricloroacético al 10 %. El sobrenadante resultante se extrajo con acetato de etilo. Este extracto se secó con sulfato de sodio anhidro, se transfirió a un tubo de vidrio y se evaporó a sequedad bajo nitrógeno. A continuación, la muestra se reconstituyó con tolueno y se derivatizó con N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida y trimetilclorosilano (BSTFA + TMCS), 99:1 (disponible en Sigma Aldrich, San Luis, Missouri) y se calentó a 60 °C durante 30 minutos. Por último, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se analizó por GC/MS. Un cromatógrafo de gases Agilent 5973 MSD/6890 con una columna Rtx-5 de 30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,1 μm (disponible en Restek Corporation, Bellefonte, Pensilvania) se utilizó para el análisis. Esta evaluación fue realizada por MPI Research Inc. (State College, Pensilvania) de forma ciega.

D. Suministro de insulina

Además de la preparación mencionada anteriormente, se colocó un catéter venoso central en la vena femoral usando la técnica de Seldinger para permitir el muestreo frecuente de sangre. Antes del suministro de insulina, se extrajeron muestras de sangre de 4 ml de la vena femoral para cuantificar los niveles iniciales de glucosa en sangre del animal. Se logró una lectura en tiempo real usando un medidor de glucosa en sangre TRUEtrack® (disponible en Nipro Diagnostics Inc., Fort Lauderdale, Florida). La muestra de sangre restante se guardó en un tubo de extracción de sangre con fluoruro de sodio y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para minimizar el metabolismo adicional de glucosa. Todos los datos mostrados representan los valores de glucosa en sangre cuantificados de los tubos de recogida de sangre, que se evaluó de forma ciega.

Una vez que se limpió el recto y se cuantificó la glucosa en sangre de referencia del animal, se instiló un enema de 10 ml conteniendo 100 unidades de insulina aspart de acción rápida NovoLog® (disponible en Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca) en el colon y se tomaron muestras de sangre a intervalos de aproximadamente 2 minutos. El régimen de tratamiento con ultrasonidos no cambió con respecto al usado para la prueba de mesalamina. La glucosa en sangre se monitorizó durante al menos 40 minutos, en función del efecto del experimento sobre la glucosa en sangre. Cuando fue necesario, se corrigió la hipoglucemia con bolos intravenosos de dextrosa al 50 % (solo necesarios cuando se realizó el tratamiento con ultrasonidos). Los valores de glucosa en sangre presentados están normalizados por el valor inicial del animal, definido como el último valor de glucosa en sangre observado antes de la administración de insulina. Cada régimen de tratamiento se repitió tres veces.

E. Modelo de colitis murina inducida por sulfato de sodio de dextrano

Se compraron ratones hembra C57BL/6 de quince semanas de edad en Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts) para la inducción y el tratamiento de la colitis inducida por sulfato de sodio de dextrano (DSS). Se utilizaron cinco animales por grupo. Esto se basó en cálculos de potencia utilizando los resultados en cerdos que demostraron un aumento de orden de magnitud en el suministro de fármacos usando ultrasonidos. Por lo tanto, se esperaba de manera conservadora una mejora similar en la puntuación de la deposición a la observada en experimentos anteriores en ratas con mesalamina administrada al 3 % y al 30 %. Usando un nivel de significancia de 0,05, un tamaño de muestra de 5 animales por grupo logra una potencia del 90 % para detectar la diferencia proporcionada de 4 en la puntuación de la deposición dada la mejora esperada del orden de magnitud en el suministro de mesalamina observada en el modelo porcino. Cada jaula (grupo) fue usada tal como fue recibida y asignada aleatoriamente a los grupos experimentales por los investigadores que realizaban el trabajo. El día 1, se extrajo sangre de todos los ratones y se tomó un peso inicial de cada animal. La colitis se indujo con sal sódica de sulfato de dextrano (DSS) de 40-50 kDa (disponible en, por ejemplo, Affymetrix Inc., Santa Clara, California). A partir del día 1, se administró una solución de DSS al 3 % p/p en agua para beber *ad libitum*. Los días 3 y 5, la solución para beber se reemplazó con solución de DSS nueva. El día 7, la solución de DSS se eliminó y se reemplazó con agua para beber normal.

El tratamiento se administró a partir del día 2. El tratamiento consistió en un enema de mesalamina solo o en combinación con ultrasonidos. El enema consistía en mesalamina (66,6 mg/ml) en una solución de carboximetilcelulosa al 0,5 % p/p (disponible en, por ejemplo, Sigma-Aldrich San Luis, Missouri) en PBS. En esta situación, se fabricó una sonda de 40 kHz de diseño personalizado para permitir la inserción en el colon (Sonics and Materials, Inc., Newtown, Connecticut). El árbol tenía 2 mm de diámetro y contenía dos, salientes de 3 mm de diámetro a intervalos de media longitud de onda para lograr la emisión radial de ultrasonidos. La potencia del tratamiento con ultrasonidos se calibró a 4,0 W por calorimetría. La sonda se insertó en el recto y se encendió durante 0,5 segundos. Los animales fueron monitorizados diariamente en peso, consistencia fecal y para la presencia de sangre oculta en heces usando tarjetas Hemocult (Beckman Coulter, Pasadena, California).

La consistencia fecal y la presencia de sangre se puntuaron basándose en protocolos publicados anteriormente. Específicamente, la consistencia de la deposición se puntuó de la siguiente manera: (1) heces normales en forma de sedimentos, (2) sedimentos de la deposición que se trituran fácilmente, (3) suave, la deposición acuosa con presencia de gránulos o (4) diarrea. La presencia de sangre se confirmó mediante pruebas de hemocultismo diarias. Se puntuaron (1) los animales con resultados de hemocultismo negativos. Los resultados positivos de hemocultismo se estratificaron adicionalmente de la siguiente manera: (2) heces con motas discretas de sangre en la superficie, (3) heces manchadas de sangre o (4) heces completamente cubiertas de sangre o presencia de manchas de sangre alrededor del ano. La puntuación fecal total fue la suma de la puntuación de consistencia y sangre. Por lo tanto, la puntuación fecal total osciló entre 2 y 8. Si no se pudieron recoger las heces en un día individual, a ese animal se le asignó una puntuación fecal total de 8.

El día 14, se tomó un peso final y se evaluó la puntuación fecal. Se extrajo sangre y se sacrificó al animal. Inmediatamente después de la eutanasia, se diseccionó el colon y se obtuvieron imágenes macroscópicas. A continuación se fijó en formalina al 10 %. Una vez fijado, el colon se seccionó en 2-6 piezas y se montó en parafina. Se tomaron dos secciones de 8 µm de cada bloque de parafina separadas una distancia de 200 µm. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y se montaron en portaobjetos de microscopio de vidrio.

El examen histológico fue realizado por un patólogo clínico en el Hospital General de Massachusetts de una forma simple ciego. Las puntuaciones se determinaron de acuerdo con los protocolos publicados anteriormente con una ligera modificación de la siguiente manera en la TABLA 3:

Puntuación	Descripción
0	Mucosa colónica normal con preservación de la arquitectura de criptas normal.
1	Acortamiento de las criptas con infiltrado inflamatorio crónico moderado por encima de la muscularis mucosae.
2	Base de la mucosa borrada, pero se conservan el epitelio superficial residual y la porción superior de la cripta.
3	Borrado completo de la mucosa con inflamación crónica de la lámina propia y solo presente el epitelio superficial residual.
4	Borrado completo y erosión de la superficie de la mucosa con detritos fibrinopurulentos presentes.

Cada sección transversal de tejido presente en el portaobjetos del microscopio (n = 2-6) se puntuó individualmente entre 0 y 4 con un porcentaje de afectación correspondiente (redondeado al cuartil más cercano). A continuación, se promedió la puntuación resultante de cada sección transversal examinada para cada animal en un grupo de estudio dado para determinar la puntuación histológica de ese grupo de estudio.

Se usó una cohorte separada de animales a los que no se les indujo la enfermedad para probar la seguridad y la

tolerabilidad de los ultrasonidos en el recto. El efecto de la inserción de la sonda en el recto ($n = 5$) y la inserción de la sonda seguida de sonicación ($n = 5$) se probaron en animales sanos para evaluar cualquier posible efecto negativo del tratamiento solo. La inserción de la sonda y la sonicación se administraron diariamente usando el mismo régimen de tratamiento de QD detallado anteriormente y representado visualmente en la figura 18B. Estos grupos se compararon con un grupo de control que no recibió tratamiento ($n = 5$). La puntuación fecal total se evaluó diariamente y el hematocrito y la hemoglobina se cuantificaron el día 1 y el día 14. El día 14, los animales fueron sacrificados y el hígado, bazo, páncreas, riñón, intestino delgado y colon fueron cuidadosamente disecados, fijados en formalina, montados en parafina, y seccionados y teñidos como se ha descrito anteriormente. Adicionalmente, se guardó una muestra separada de tejido colónico y se congeló inmediatamente a -80°C para la determinación de citoquinas.

Estas muestras de tejido se procesaron para extraer ARN. El ARN se aisló usando un kit Ambion Purelink RNA Mini siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y la calidad del ARN resultante se determinaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). El mARN de citoquinas se cuantificó usando el Panel inflamatorio de ratón de nanoString Technologies (Seattle, Washington) siguiendo el protocolo del fabricante. Específicamente, se añadieron 100 ng de ARN total de cada muestra en un pocillo de muestra distinto suministrado por el fabricante. A continuación, 600 campos de visión fueron automáticamente tomados como imágenes y contados por el analizador digital nCounter® (NanoString Technologies Inc., Seattle, Washington) para determinar el número de moléculas presentes para cada gen. El equipo normalizó automáticamente los recuentos de cada muestra usando los controles incorporados de inserción positiva.

Se realizó un análisis estadístico para el trabajo porcino *in vitro* y *en vivo* usando pruebas t de Student de dos colas para determinar la significación estadística. Se realizó un análisis estadístico para el trabajo con ratones *en vivo* usando pruebas de análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con comparaciones múltiples. Los intervalos de confianza para las pendientes de regresión se construyeron usando intervalos de confianza del 95 % basados en la normal. No se excluyó ninguna muestra del análisis en este estudio. La significación estadística se definió en todo momento como $P < 0,05$. Todos los cálculos se realizaron con el software MatLab® R2014a (disponible en MathWorks, Natick, MA).

EJEMPLO 5: Dispositivos para el suministro mejorado de ultrasonidos

La figura 26 es una vista lateral de un dispositivo de suministro de fármacos emisor de ultrasonidos portátil reutilizable 2600 para la autoadministración de una solución medicada en el colon de acuerdo con la invención. El dispositivo 2600 incluye una carcasa 2602, que puede tener forma cilíndrica con un ahusamiento a lo largo del dispositivo. La carcasa 2602 puede incluir o definir un control de potencia (por ejemplo, un botón o interruptor) 2604 para encender o apagar el dispositivo. La carcasa puede incluir una región cóncava 2606 que soporta la sujeción, colocación y/o agarre del dispositivo por parte de un usuario. El control de potencia 2604 y la región cóncava 2606 pueden ubicarse hacia el extremo proximal del dispositivo, mientras que el extremo distal opuesto incluye una punta 2608 para su inserción en el colon. La base proximal de la punta 2608 incluye una región cóncava 2610 para crear un sello alrededor de la punta 2608 y el recto. La punta 2608 define al menos una abertura 2612 para suministrar una sustancia desde el interior del dispositivo. La al menos una abertura 2612 puede orientarse radialmente (como se muestra en la figura 26) o axialmente al dispositivo 2600.

El dispositivo 2600 también puede definir un puerto 2614 para recibir un cartucho que contenga una sustancia para su suministro desde el dispositivo. La figura 27 ilustra un cartucho de este tipo 2700, que puede ser reemplazable. El cartucho 2700 puede tener un reborde superior 2702 para permitir que el cartucho permanezca en su lugar una vez insertado en el dispositivo. Como alternativa o además de un cartucho, el dispositivo 2600 puede recibir la sustancia desde un recipiente exterior 2800, que puede ser comprimible, permitiendo de este modo que el usuario expulse manualmente la sustancia comprimiendo el recipiente 2800. El recipiente 2800 puede estar conectado al dispositivo 2600 con, por ejemplo, un tubo flexible 2802.

La carcasa del dispositivo, excluyendo la punta, puede incluir un recubrimiento de goma o material que permita al usuario sujetar el dispositivo de manera segura. La punta puede incluir un recubrimiento o material sin fricción o de baja fricción que permita una inserción suave de la punta en el recto. En algunas realizaciones, la carcasa y/o la punta son resistentes al agua o impermeables para su limpieza. Las dimensiones del dispositivo incluyen una longitud de aproximadamente 14 cm a aproximadamente 40 cm, un diámetro de aproximadamente 4 cm a aproximadamente 6 cm en la parte superior del dispositivo, y un diámetro de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 3 cm en la punta del dispositivo.

La figura 29 es un diagrama que ilustra el uso del dispositivo 2600 de acuerdo con algunas realizaciones. La punta 2608 del dispositivo 2600 se ha insertado en un intestino 2900 de tal manera que la región cóncava 2610 forma un sello con el recto y las aberturas 2612 están en comunicación de fluidos con el colon. Una vez activado el dispositivo 2600, se emite el ultrasonido de baja frecuencia 2902 desde la punta 2608, maximizando la emisión radial. Como se muestra en el recuadro ampliado 2904, la emisión de baja frecuencia 2902 permite el suministro de la sustancia 2906 liberada desde las aberturas 2612 al intestino de tal manera que penetra en el epitelio intestinal 2900.

La figura 30 muestra el mecanismo de ultrasonidos de un dispositivo 3000 de acuerdo con algunas realizaciones. El dispositivo 3000 emite ultrasonidos usando un cristal piezoeléctrico equilibrado 3002 (con un apoyo 3004 para

equilibrar el cristal) conectado a un árbol oscilante 3006. El cristal piezoeléctrico 3002 se expande y se contrae, haciendo que el árbol 3006 oscile a frecuencias ultrasónicas. El cristal piezoeléctrico 3002 puede ser titanato de circonato de plomo (PZT), cuarzo o cerámica. De manera ideal, el cristal piezoeléctrico 3002 tiene una alta eficiencia de conversión eléctrica a mecánica y una salida térmica baja. La frecuencia de ultrasonido emitida desde la punta 2608 del dispositivo 3000 puede ser de aproximadamente 15 kHz a aproximadamente 500 kHz o de aproximadamente 500 kHz a aproximadamente 3000 kHz. La longitud del árbol oscilante 3006 puede ser de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 7 cm, y el diámetro del árbol oscilante puede ser de aproximadamente 0,1 cm a aproximadamente 2,0 cm. La figura 31 muestra el mecanismo de ultrasonidos de un dispositivo 3100 de acuerdo con otra realización, en el que el árbol oscilante 3006 tiene un saliente 3102. Uno o más salientes 3102 pueden colocarse a lo largo del árbol 3006 y usarse para maximizar la emisión radial. El diámetro de un saliente 3102 puede ser menor que aproximadamente 1,0 cm más allá del diámetro del árbol oscilante 3006.

La figura 32 muestra el mecanismo de ultrasonidos de un dispositivo 3200 de acuerdo con algunas realizaciones. El dispositivo 3200 emite ultrasonidos usando una pila de alta relación de aspecto de cristales piezoeléctricos circulares 3202 (con una placa de soporte de apoyo 3204) integrada directamente en la punta de inserción 2608. Los cristales pueden estar recubiertos con un material impermeable y/o acústicamente transparente 3206 para conducir la emisión de ultrasonidos radial.

La figura 33 muestra los componentes interiores de un dispositivo 3300 de acuerdo con algunas realizaciones. El dispositivo 3300 incluye un puerto o depósito 3302 para recibir un cartucho con la sustancia o la propia sustancia. Un conducto (por ejemplo, una aguja) 3304 se usa para establecer una comunicación de fluidos con la sustancia en el cartucho/depósito. El dispositivo 3300 puede tener una bomba que impulsa la sustancia desde el cartucho/depósito hasta el extremo distal del dispositivo a través de uno o más canales de fluido 3308 para la elución desde al menos una abertura en la punta. El dispositivo 3300 puede incluir una batería 3310 para alimentar los componentes interiores y/o un termopar 3312 en el extremo distal para proporcionar una monitorización del calor en tiempo real.

El dispositivo puede estar diseñado para permitir una rápida evacuación de la sustancia, por ejemplo, en menos de unos 20 segundos. La punta puede definir unas aberturas en ángulo que permitan pulverizar la sustancia desde la punta, lo que permite un recubrimiento máximo del tejido con la sustancia. Las aberturas pueden tener un ángulo de aproximadamente 45° a aproximadamente 90° con respecto a la punta de ultrasonidos circunferencial para permitir que la sustancia se pulverice o agite, lo que permite el recubrimiento radial de la sustancia al tejido. En una realización alternativa, la sustancia puede ser eluida a través del centro del árbol de emisión de ultrasonidos, permitiendo la atomización y pulverización de la sustancia.

La punta del dispositivo puede incluir el árbol de emisión de ultrasonido o la pila de cristal, al menos una abertura de elución y/o un termopar una monitorización del calor en tiempo real. La longitud de la punta puede ser de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 10 cm; el radio puede ser de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 3 cm. La punta puede ser fija o extraíble para permitir puntas intercambiables para permitir el tratamiento de diversas condiciones y ubicaciones anatómicas, particularmente el tejido mucoso. Las ubicaciones anatómicas para el uso del dispositivo pueden incluir, pero no se limitan a, el recto, la vagina, la oreja, la nariz y la cavidad bucal (por ejemplo, boca, mejilla o lengua).

La punta del dispositivo puede cubrirse con una funda para proteger la punta del contacto directo con el tejido anal y la materia fecal. Las figuras 34, 35 y 36A-36C son unas vistas de diferentes fundas de acuerdo con algunas realizaciones. La funda puede ser lavable o desechable. Una funda puede cubrir toda la porción del dispositivo que se inserta en el cuerpo. El material de la funda puede ser acústicamente transparente/conductor (es decir, no permite la atenuación de la señal ultrasónica). El material de la funda puede ser sin fricción o de baja fricción para permitir una fácil inserción y extracción del dispositivo del cuerpo.

En algunas realizaciones, como se muestra en la figura 34, el extremo proximal de una funda incluye una banda (por ejemplo, elástica) 3400 para sellar alrededor de la punta de la sonda. El extremo distal opuesto de la funda puede incluir un gel o líquido 3402, y el extremo distal de la funda puede definir al menos una perforación 3404 para alinearse con al menos una abertura en la punta. El gel o líquido 3402 permite una conductancia adecuada de la señal ultrasónica desde el emisor de la punta a través de la funda. En otras realizaciones, una funda (por ejemplo, con propiedades elásticas) se estira para envolverse alrededor y/o sobre la punta de una sonda. La funda preinstalada como se muestra en la figura 35A permite un sellado hermético alrededor de todas las porciones de la punta de la sonda cuando se estira sobre la punta de la sonda como se muestra en la figura 35B.

Una funda puede tener indicadores visuales para ayudar al paciente a alinear al menos una perforación 3404 con al menos una abertura en la punta. Como alternativa, tras la elución de la sustancia del dispositivo, la funda puede ser perforada por y donde la sustancia se elude del dispositivo.

La figura 36A es una vista lateral de una funda 3600 fabricada de un material rígido (por ejemplo, plástico duro) que se adapta estrechamente a la forma de la punta y define al menos una perforación 3404 para alinearse con al menos una abertura en la punta. La funda puede tener propiedades y dimensiones transparentes/conductoras de ultrasonidos para permitir la cobertura de toda la punta insertada. Puede incluirse un gel o líquido 3402 para una conductancia

adecuada de la señal ultrasónica desde el emisor de la punta a través de la funda. La figura 36B muestra una funda rígida que comprende al menos dos piezas separadas que se unen entre sí alrededor y/o sobre la punta del dispositivo. Como alternativa, las dos piezas separadas pueden estar inicialmente conectadas en un extremo (por ejemplo, mediante un mecanismo de bisagra 3600 que permite que las dos piezas de la funda hagan clic y se sujeten alrededor de la punta de la sonda) como se muestra en la figura 36C. La figura 37A es una vista lateral en sección transversal de al menos parte de una funda para ilustrar el espesor de la pared de acuerdo con algunas realizaciones. La pared interior de la funda incluye un gancho, pestillo y/u otro mecanismo de seguridad 3700 configurado para alinearse con una muesca receptora u otro mecanismo de seguridad 3702 en el cuerpo del dispositivo de sonda 3704 como se muestra en la figura 37B de acuerdo con algunas realizaciones.

EJEMPLO 6: Suministro de ácidos nucleicos

Algunas realizaciones pueden usarse para suministrar ácidos nucleicos, como un dúplex de ARN sintético diseñado para atacar específicamente a un mRNA particular para su degradación (un siARN). El suministro de un siARN (sin encapsular) contra la proteína de señalización celular del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se probó en un modelo de colitis con sulfato de sodio de dextrano (DSS) de acuerdo con algunas realizaciones. La figura 38A es un diagrama que ilustra el régimen de tratamiento de acuerdo con algunas realizaciones. Se administraron menos de 200 ng de siARN no encapsulado (en comparación con miles de nanogramos de siARN encapsulado) por vía rectal. La figura 38B es una gráfica de barras que ilustra el efecto del suministro de ultrasonidos y siARN (frente a el suministro de siARN solamente) en las puntuaciones fecales totales de acuerdo con algunas realizaciones. El siARN fue suministrado efectivamente por ultrasonidos, indicando un valor clínico superior.

La histología fue revisada de forma ciega por un patólogo clínico de acuerdo con métricas similares a las descritas anteriormente. La figura 39A es una imagen histológica de un tejido sano (Puntuación 0), y la figura 39B es una imagen histológica de un tejido enfermo (puntuación 4). La figura 39C es una gráfica de barras que ilustra las puntuaciones de histología, que fueron significativamente mejores para los animales que recibieron el siARN y el ultrasonido.

Este estudio demuestra el suministro exitoso de ácidos nucleicos con relevancia terapéutica. Las secuencias de ácido nucleico pueden diseñarse para una mayor sinergia con los ultrasonidos. Es decir, determinadas secuencias de ácidos nucleicos pueden experimentar un mayor realce como resultado de los ultrasonidos. Considerando que los métodos actuales necesitan la formulación de candidatos a fármacos potenciales para permitir su suministro para una evaluación adicional, que es muy difícil, esta tecnología puede usarse para seleccionar candidatos a fármacos mediante el suministro de moléculas complejas sin ninguna formulación.

EJEMPLO 7: Vacunación mediada por ultrasonidos

La respuesta inmunitaria puede sesgarse basándose en la ruta de administración del antígeno. Por ejemplo, la vacunación en las superficies de las mucosas contra enfermedades que infectan las superficies de las mucosas puede ser beneficiosa, y los ultrasonidos pueden aumentar preferentemente la respuesta inmunitaria de acuerdo con algunas realizaciones.

Se probó la vacunación contra la infección por *Clostridium difficile* (C. diff) de acuerdo con algunas realizaciones. Un germen que se propaga a través de las heces, C. diff es un candidato modelo para este estudio. Las infecciones por C. diff son comunes en los hospitales y tienen una alta tasa de recurrencia. Después de que los antibióticos acaban con la flora natural del intestino, C. diff coloniza el intestino y secreta las toxinas A y B, que atacan el epitelio intestinal. Se necesitan antibióticos aún más potentes para tratar el C. diff, tal como fidaxomicina, metronidazol y vancomicina. Los ratones se vacunaron contra la infección por C. diff a través del tracto GI para sesgar la respuesta inmunitaria a los anticuerpos secretados para prevenir la colonización de acuerdo con algunas realizaciones. Las toxinas A y B inactivadas se usaron como antígeno modelo.

El contenido total de proteína usado para las inmunizaciones varía ampliamente, pero los estudios sugieren dosis relativamente grandes de toxoide mezclado con adyuvante. Sin embargo, la vacunación del GI mediada por ultrasonidos usó solo 10 μ g de toxoide total y ningún adyuvante para un tratamiento y dos refuerzos. Se recogieron sangre y lavado colónico después de cada vacunación. Los animales se expusieron a células vegetativas de C. diff y toxina. Su salud fue monitorizada para pérdida de peso y consistencia fecal. La figura 40 es una representación gráfica del peso relativo durante los seis días posteriores a la exposición de acuerdo con algunas realizaciones. El grupo vacunado de GI mediado por ultrasonidos (ultrasonidos) mostró puntuaciones corporales estadísticamente superiores hasta el día 4 después de la exposición que el grupo de control y un tercer grupo vacunado mediante administración subcutánea (aguja). Se observaron resultados similares en las puntuaciones fecales. No se demostró ningún beneficio para el grupo de agujas, destacando de este modo la dificultad de vacunar contra el C. diff.

Este estudio demuestra una protección superior proporcionada por la vacunación mucosa mediada por ultrasonidos contra la enfermedad, incluyendo algunas enfermedades que carecen de una vacuna efectiva actual. De acuerdo con algunas realizaciones, la vacunación mediada por ultrasonidos puede permitir sesgar la respuesta inmunitaria a la de una respuesta de inmunoglobulina A (IgA) secretada, lo que sería beneficioso para prevenir enfermedades que invaden a través de las superficies mucosas, como el C. diff y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

EJEMPLO 8: Modelo de colitis de animales grandes

Un modelo de enfermedad para probar un dispositivo a escala humana sería beneficioso. Se desarrolló un modelo de colitis en un cerdo mediante la instilación de sulfato de sodio de dextrano (DSS) en el recto, lo que resulta en una inflamación. Se confirmó un régimen de administración para inducir colitis reproducible y duradera en cerdos basándose en la histología y los marcadores sanguíneos. Se han monitorizado tres animales para la potencia estadística.

La figura 41A es una imagen de un colon de cerdo sano capturada a través de un colonoscopio. La figura 41B es una imagen de un colon de cerdo con colitis capturada a través de un colonoscopio de acuerdo con algunas realizaciones. Las figuras 42A-42C son unas imágenes de diversos detalles que ilustran la histología de biopsia colónica de animales sanos con mucosa colónica normal que tienen estructuras conservadas. Las figuras 43A y 43B son unas imágenes de diversos detalles que ilustran la histología de una biopsia colónica de inducción de enfermedad tomadas 7 días después de la inducción de la enfermedad. Estas imágenes muestran la enfermedad total, en este caso, colitis aguda severa. Las figuras 44A y 44B son unas imágenes de diversos detalles que ilustran la histología de una biopsia colónica de inducción de la enfermedad tomada 14 días después de la inducción de la enfermedad. Estas imágenes muestran una colitis aguda grave comparable a la presentación el día 7. Las figuras 45A y 45B son unas imágenes de diversos detalles que ilustran la histología de una biopsia colónica de inducción de la enfermedad tomada 21 días después de la inducción de la enfermedad. Estas imágenes muestran una colitis aguda grave comparable a la presentación del día 14. Los detritos fibrinopurulentos también son visibles en estas imágenes.

Se evaluaron los marcadores sanguíneos de hematocrito (es decir, el porcentaje de glóbulos rojos en la sangre) y hemoglobina. Las figuras 46A y 46B son unas representaciones gráficas que ilustran los cambios en el hematocrito y la hemoglobina, respectivamente, durante este período de tiempo. Una disminución estadísticamente significativa tanto en el hematocrito como en la hemoglobina demuestra pérdida de sangre por inflamación en el recto.

De acuerdo con algunas realizaciones, este modelo de colitis permitirá probar la eficacia preclínica de dispositivos de tamaño humano.

Conclusión

Si bien en el presente documento se han descrito e ilustrado diversas realizaciones inventivas, los expertos en la materia imaginarán fácilmente una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar la función y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en el presente documento, y cada una de tales variaciones y/o modificaciones se considera que está dentro del alcance de las realizaciones inventivas descritas en el presente documento. Más en general, los expertos en la materia apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritos en el presente documento están destinados a ser ejemplos, y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o las configuraciones dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las que se usen las enseñanzas de la invención. Los expertos en la materia reconocerán o podrán determinar usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones inventivas específicas descritas en el presente documento. Por lo tanto, debe entenderse que las realizaciones anteriores se presentan únicamente a modo de ejemplo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a las mismas, las realizaciones inventivas pueden practicarse de manera diferente a como se ha descrito y reivindica específicamente.

Las realizaciones descritas anteriormente pueden implementarse en cualquiera de numerosas formas. Por ejemplo, las realizaciones de diseño y fabricación de las estructuras de retención/suministro descritas en el presente documento pueden implementarse usando hardware, software o una combinación de los mismos. Cuando se implementan en software, el código de software puede ejecutarse en cualquier procesador adecuado o recopilación de procesadores, se proporcionen en un solo ordenador o distribuidos entre varios ordenadores.

Además, debería tenerse en cuenta que un ordenador puede incorporarse en cualquiera de varias formas, como un ordenador montado en bastidor, un ordenador de sobremesa, un ordenador portátil o de tableta. Adicionalmente, un ordenador puede estar integrado en un dispositivo que, en general, no se considera un ordenador pero con capacidades de procesamiento adecuadas, incluyendo un asistente digital personal (PDA), un teléfono inteligente o cualquier otro dispositivo electrónico portátil o fijo adecuado.

También, un ordenador puede tener uno o más dispositivos de entrada y salida. Estos dispositivos pueden usarse, entre otras cosas, para presentar una interfaz de usuario. Los ejemplos de dispositivos de salida que pueden usarse para proporcionar una interfaz de usuario incluyen impresoras o pantallas de visualización para la presentación visual de la salida y altavoces u otros dispositivos generadores de sonido para la presentación audible de la salida. Los ejemplos de dispositivos de entrada que pueden usarse para una interfaz de usuario incluyen teclados y dispositivos señaladores, como ratones, almohadillas táctiles y tabletas digitalizadoras. Como otro ejemplo, un ordenador puede recibir información de entrada a través del reconocimiento de voz o en otro formato audible.

Tales ordenadores pueden estar interconectados por una o más redes en cualquier forma adecuada, incluyendo una

red de área local o una red de área amplia, tal como una red empresarial y una red inteligente (IN) o Internet. Dichas redes pueden basarse en cualquier tecnología adecuada y pueden operar de acuerdo con cualquier protocolo adecuado y pueden incluir redes inalámbricas, redes cableadas o redes de fibra óptica.

Los diversos métodos o procesos (por ejemplo, de diseñar y fabricar la estructura de retención/suministro descrita anteriormente) descritos en el presente documento puede estar codificados como software ejecutable en uno o más procesadores que emplean una cualquiera de una variedad de sistemas operativos o plataformas. Adicionalmente, dicho software puede escribirse usando cualquiera de diversos lenguajes de programación adecuados y/o herramientas de programación o secuencias de comandos, y también puede compilarse como código de lenguaje de máquina ejecutable o código intermedio que se ejecuta en un marco de trabajo o máquina virtual.

También, diversos conceptos inventivos pueden incorporarse como uno o más métodos, de los que se ha proporcionado un ejemplo. Las acciones realizadas como parte del método podrán ordenarse de cualquier forma idónea. Por consiguiente, pueden construirse realizaciones en las que las acciones se realicen en un orden diferente al ilustrado, lo que puede incluir realizar algunas acciones simultáneamente, aunque se muestren como acciones secuenciales en las realizaciones ilustrativas.

Las publicaciones, solicitudes patentadas, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento incluyen las siguientes referencias:

1. Alex *et al.*, "Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-Induced Colitis", *Enfermedades inflamatorias del intestino* 15, 341-352 (2009).
2. Barr *et al.*, "Intestinal Drug Absorption and Metabolism I: Comparison of Methods and Models to Study Physiological Factors of *In Vitro* and *In Vivo* Intestinal Absorption", *J. Farm. Sci.* 59, 154-163 (1970).
3. Bawiec *et al.*, "Finite Element Static Displacement Optimization of 20-100 kHz Flexural Transducers for Fully Portable Ultrasound Applicator", *Ultrasonidos* 53, 511-517 (2012).
4. Brothie *et al.*, "Characterization of Acoustic Cavitation Bubbles in Different Sound Fields", *J. Fís. Química. B* 114, 11010-11016 (2010).
5. Capurso *et al.*, "Development of a pH-Responsive Particulate Drug Delivery Vehicle for Localized Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease", *Yale J. Biol. & Med.* 84, 285-288 (2011).
6. Cerutti, "Location, Location, Location: B-cell Differentiation in the Gut Lamina Propria", *Inmunol. de mucosas*. 1, 8-10 (2008).
7. Cerutti *et al.*, "Immunoglobulin Responses at the Mucosal Interface", *Revisión anual de inmunología* 29, 273-293 (2011).
8. Ciarleglio *et al.*, "Rowasa Suspension Enema (Mesalamine, USP)", *Enfermería de gastroenterología KW* - 12 (1989).
9. Coleman *et al.*, "Acoustic Performance and Clinical Use of a Fiberoptic Hydrophone", *Ultrasonido en Med. y Biol.* 24, 143-151 (1998).
10. Cooper *et al.*, "Clinicopathologic Study of Dextran Sulfate Sodium Experimental Murine Colitis", *Lab. Invest.* 69(2), 238-249 (1993).
11. Danese *et al.*, "Ulcerative Colitis", *N. Engl. J. Med.* 365, 1713-1725 (2011).
12. Dechadilok *et al.*, "Hindrance Factors for Diffusion and Convection in Pores", *Indus. e ing. química Res.* 45, 6953-6959 (2006).
13. Ensign *et al.*, "Oral Drug Delivery with Polymeric Nanoparticles: The Gastrointestinal Mucus Barriers", *Revisiones avanzadas de suministro de fármacos* 64, 557-570 (2012).
14. Frieri *et al.*, "Mucosal 5-aminosalicylic Acid Concentration Inversely Correlates with Severity of Colonic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis", *Gut* 47, 410-414 (2000).
15. Giannasca *et al.*, "Serum Antitoxin Antibodies Mediate Systemic and Mucosal Protection from Clostridium Difficile Disease in Hamsters", *Infección e inmunidad* 67(2), 527-538 (1999).
16. Holland, "Thresholds for Transient Cavitation Produced by Pulsed Ultrasound in a Controlled Nuclei Environment", *J. Acoust. Soc. Am.* 88, 2059-2069 (1990).
17. Horowitz *et al.*, "The Nuclear Permeability, Intracellular Distribution, and Diffusion of Inulin in the Amphibian Oocyte", *J. Biol. de célula* 60, 405 (1974).
18. Karaca-Mandic *et al.*, "Impact of New Drugs and Biologics on Colorectal Cancer Treatment and Costs", *J. Práctica Oncológica* 7, e30s-e37s (2011).
19. Kedia, "Once-Daily MMX Mesalamine for the Treatment of Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis", *Terapéutica y gestión de riesgos clínicos* 3, 919-927 (2007).
20. Kennedy, "Innovation: High-Intensity Focused Ultrasound in the Treatment of Solid Tumours", *Nat. Rev. Cáncer* 5, 321-327 (2005).
21. Kyne *et al.*, "Clostridium Difficile Toxoid Vaccine in Recurrent C. difficile-Associated Diarrhea", *Gastroenterología* 128(3), 764-770 (2005).
22. Leighton, *La burbuja acústica* (Academic Press 1997).
23. Li *et al.*, "Passive Cavitation Detection during Pulsed HIFU Exposures of *Ex Vivo* Tissues and *In Vivo* Mouse Pancreatic Tumors", *Ultrasonido en Med. y Biol.* 40, 1523-1534 (2014).
24. Lin *et al.*, "Factors Affecting Responsivity of Unilamellar Liposomes to 20 kHz Ultrasound", *Langmuir* 20, 6100-6106 (2004).

25. Lin *et al.*, "PEG-Lipids and Oligo (ethylene glycol) Surfactants Enhance the Ultrasonic Permeabilizability of Liposomes", *Langmuir* 19, 1098-1105 (2003).
26. Liu *et al.*, "Non-Invasive Assessment and Control of Ultrasound-Mediated Membrane Permeabilization", *Farm. Res.* 15, 918-924 (1998).
- 5 27. Malkov *et al.*, "Multiplexed Measurements of Gene Signatures in Different Analytes Using the Nanostring nCounter™ Assay System", *Res. BMC. Notas* 2, 80 (2009).
28. Marshall *et al.*, "Putting Rectal 5-Aminosalicylic Acid in Its Place: The Role in Distal Ulcerative Colitis", *Am. J. Gastroenterología* 95, 1628-1636 (2000).
29. Morrow *et al.*, "DNA Drugs Come of Age", *Científico americano* 303, 48-53 (2010).
- 10 30. Naganuma *et al.*, "Measurement of Colonic Mucosal Concentrations of 5-Aminosalicylic Acid Is Useful for Estimating Its Therapeutic Efficacy in Distal Ulcerative Colitis: Comparison of Orally Administered Mesalamine and Sulfasalazine", *Enfermedades inflamatorias del intestino* 7, 221-225 (2001).
31. Nakashima *et al.*, "Rebamipide Enema is Effective for Treatment of Experimental Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis in Rats", *Dig. Dis. Ciencia* 50, S124-S131 (2005).
- 15 32. Neurath, "Cytokines in Inflammatory Bowel Disease", *Nature Reseñas de inmunología* 14, 329-342 (2014).
33. Neurath, "New Targets for Mucosal Healing and Therapy in Inflammatory Bowel Diseases", *Inmunol. de mucosas* 7, 6-19 (2014).
34. Pavlin *et al.*, "Clinical Use of Ultrasound Biomicroscopy", *Oftalmología* 98, 287-295 (1991).
35. Peck *et al.*, "Hindered Diffusion of Polar Molecules Through and Effective Pore Radii Estimates of Intact and Ethanol Treated Human Epidermal Membrane", *Farm. Res.* 11, 1306-1314 (1994).
- 20 36. Pecot *et al.*, "RNA Interference in the Clinic: Challenges and Future Directions", *Nat. Rev. de cáncer* 11, 59-67 (2011).
37. Pelekasis *et al.*, "Secondary Bjerknes Forces Between Two Bubbles and the Phenomenon of Acoustic Streamers", *J. Mecánica de fluidos* 500, 313-347 (1999).
- 25 38. Prentice *et al.*, "Membrane Disruption by Optically Controlled Microbubble Cavitation", *Nat. física* 1, 107-110 (2005).
39. Sann *et al.*, "Efficacy of Drugs Used in the Treatment of IBD and Combinations Thereof in Acute DSS-Induced Colitis in Mice", *Ciencias de la vida* 92, 708-718 (2013).
40. Schoellhammer *et al.*, "Ultrasound-Mediated Gastrointestinal Drug Delivery", *Ciencia Medicina traslacional* 7(310), 310ra168 (2015).
- 30 41. Schultz *et al.*, "Determination of the Effective Hydrodynamic Radii of Small Molecules by Viscometry", *J. Gen. Fisiol.* 44, 1189 (1961).
42. Seibold *et al.*, "Topical Therapy Is Underused in Patients with Ulcerative Colitis", *J. Enfermedad de Crohn y Colitis JA* 8, 56-63 PB (2014).
- 35 43. Seto *et al.*, "Effects of Ultrasound and Sodium Lauryl Sulfate on the Transdermal Delivery of Hydrophilic Permeates: Comparative *In Vitro* Studies with Full-Thickness and Split-Thickness Pig and Human Skin", *J. Versión controlada* 145, 26-32 (2010).
44. Škalko-Basnet, "Biologics: The Role of Delivery Systems in Improved Therapy", *Biológicos: Objetivos y terapia* 8, 107-114 (2014).
- 40 45. Stein, Canales, Portadores y Bombas: Una introducción al transporte de membrana (Elsevier Sci. 2012).
46. Tezel *et al.*, "Description of Transdermal Transport of Hydrophilic Solutes During Low-Frequency Sonophoresis Based on a Modified Porous Pathway Model", *J. Farm. Ciencia* 92, 381-393 (2003).
47. Tezel *et al.*, "Low-Frequency Ultrasound as a Transcutaneous Immunization Adjuvant", *Vacuna* 23(29) 3800-3807 (2005).
- 45 48. Torres *et al.*, "Evaluation of Formalin-Inactivated Clostridium-Difficile Vaccines Administered by Parenteral and Mucosal Routes of Immunization in Hamsters", *Infección e inmunidad* 63, 4619-4627 (1995). Veereman, "Pediatric Applications of Inulin and Oligofructose", *J. Nutrición* 137, 2585S-2589S (2007).
49. Vong *et al.*, "An Orally Administered Redox Nanoparticle That Accumulates in the Colonic Mucosa and Reduces Colitis in Mice", *Gastroenterología* 143, 1027-1036.e3 (2012).
- 50 50. Wang *et al.*, "A Chimeric Toxin Vaccine Protects Against Primary and Recurrent Clostridium difficile Infection", *Infección e inmunidad* 80(8), 2678-2688 (2012).
51. Wilson *et al.*, "Orally Delivered Thioketal Nanoparticles Loaded with TNF- α -siRNA Target Inflammation and Inhibit Gene Expression in the Intestines", *Materiales naturales* 9(11), 923-928 (2010).
52. Wirtz *et al.*, "Chemically Induced Mouse Models of Intestinal Inflammation", *Nature Protocolos* 2, 541-546 (2007).
- 55 53. Wolf *et al.*, "Inflammatory Bowel Disease: Sorting Out the Treatment Options", *Clínica Cleveland J. Med.* 69, 621-626 (2002).
54. Zhu *et al.*, "Large Intestine-Targeted, Nanoparticle-Releasing Oral Vaccine to Control Genitoretal Viral Infection", *Nature Med.* 18, 1291-1296 (2012).

Todas las definiciones, tal como se definen y usan en el presente documento, deberían entenderse como un control sobre las definiciones del diccionario, las definiciones en los documentos a los que se hace referencia en el presente documento y/o los significados ordinarios de los términos definidos.

Los artículos indefinidos "un/o" y "una", como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, salvo que se indique claramente lo contrario, deberían entenderse que significan "al menos uno".

La expresión "y/o", como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse que significa "cualquiera o ambos" de los elementos así vinculados, es decir, elementos que están presentes conjuntivamente en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Los elementos múltiples enumerados con "y/o" deberían interpretarse de la misma manera, es decir, "uno o más" de los elementos así vinculados. Opcionalmente, pueden estar presentes otros elementos además de los elementos específicamente identificados por la cláusula "y/o", relacionados o no con los elementos específicamente identificados. De este modo, a modo de ejemplo no limitante, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con un lenguaje abierto como "que comprende" puede referirse, en una realización, a A solamente (incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a B solamente (incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra realización adicional, tanto a A como a B (incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "o" debería entenderse que tiene el mismo significado que "y/o" como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, al separar elementos en una lista, "o" o "y/o" se interpretará como inclusivo, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluyendo más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, artículos adicionales no listados. Solo los términos claramente que indica lo contrario, como "solo uno de" o "exactamente uno de", o, cuando se usa en las reivindicaciones, "que consiste en", se referirá a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o" como se usa en el presente documento solo se interpretará como una indicación de alternativas exclusivas (es decir, "uno o el otro pero no ambos") cuando esté precedido por términos de exclusividad, tales como "cualquiera", "uno de", "solo uno de", o "exactamente uno de". "Que consiste esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado ordinario como se usa en el campo de la ley de patentes.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, debería entenderse que significa al menos un elemento seleccionado de uno o más de los elementos de la lista de elementos, pero no incluyendo necesariamente al menos uno de todos y cada uno de los elementos enumerados específicamente en la lista de elementos y no excluyendo ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que opcionalmente puedan estar presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a los que se refiere la expresión "al menos uno", relacionados o no con los elementos específicamente identificados. De este modo, a modo de ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos uno de A o B", o, equivalentemente "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de B); en otra realización, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en otra realización adicional, a al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, incluyendo opcionalmente más de uno, B (y opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, todas las expresiones de transición como "que comprende", "que incluye", "que lleva", "que tiene", "que contiene", "que implica", "que retiene", "compuesto de", y similares deben entenderse abiertos, es decir, significan que incluyen, pero no limitados a.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (2600) para administrar una sustancia, comprendiendo el dispositivo:

5 un cuerpo alargado (2606) que tiene un extremo proximal y un extremo distal, definiendo el cuerpo alargado una cámara interior que se extiende entre el extremo proximal y el extremo distal para dirigir la sustancia al extremo distal, conectando el extremo distal con una punta (2608), insertándose la punta al menos parcialmente en un orificio de un lumen corporal de un tracto gastrointestinal de un sujeto, comprendiendo la punta:

10 una abertura (2612) para pasar la sustancia desde la cámara interior al lumen corporal; y
un transductor para emitir una onda ultrasónica desde la punta hacia el lumen corporal, administrando de este modo la sustancia al tejido en el lumen corporal;
estando el dispositivo **caracterizado por que** la punta incluye una región cóncava (2610) para crear un sello hermético a los fluidos entre la punta y el orificio, y para reducir la fuga de la sustancia del orificio tras la al menos inserción parcial.

15 2. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además una funda que comprende:
una cubierta para proteger al menos una porción del dispositivo, que incluye la punta, del contacto directo con el recto, comprendiendo la cubierta un material para reducir la atenuación de la onda ultrasónica, siendo el material al menos uno de los acústicamente transparentes y acústicamente conductores, definiendo la cubierta una perforación para alinearse con la abertura, en donde al menos una de:

la funda comprende una banda elástica alrededor de la abertura de la cubierta configurada para reducir la exposición del dispositivo al recto;
la cubierta consta de una envoltura elástica configurada para reducir la exposición del dispositivo al recto;
25 la cubierta comprende una pieza rígida para resbalar sobre la punta;
la cubierta comprende una primera pieza rígida y una segunda pieza rígida para instalarse desde lados opuestos de la punta de tal manera que la primera pieza rígida se conecte a la segunda pieza rígida; y
la cubierta comprende una primera pieza rígida unida por una bisagra en el extremo de la punta a una segunda pieza rígida.

30 3. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto es un mamífero.

4. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto es un ser humano.

35 5. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el orificio corporal es el recto del sujeto.

6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la punta comprende una pluralidad de aberturas para pasar la sustancia desde la cámara interior.

40 7. El dispositivo de la reivindicación 6, en donde un eje de cada una de la pluralidad de aberturas forma un ángulo de aproximadamente 45° a aproximadamente 90° desde el eje del extremo proximal hasta el extremo distal del cuerpo alargado.

45 8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la punta tiene al menos uno de:

un termopar para monitorizar la temperatura;
un recubrimiento para reducir la fricción en la al menos inserción parcial en el orificio;
una longitud de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 10 cm;
un radio de aproximadamente 1 cm a aproximadamente 3 cm; y
50 una base con una forma cóncava que es la región cóncava para mejorar el sellado entre la punta y el orificio.

9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una bomba para impulsar la sustancia a través de la abertura cuando se activa el dispositivo.

55 10. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dispositivo está configurado para impulsar manualmente la sustancia a través de la abertura.

11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dispositivo está configurado para pasar la sustancia durante una duración de hasta aproximadamente 30 segundos.

60 12. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dispositivo comprende además un termopar para monitorizar la temperatura.

13. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cámara interior comprende un conjunto de puerto para recibir un cartucho, comprendiendo el cartucho:

un alojamiento que define un depósito que comprende la sustancia; y opcionalmente en donde el cartucho tiene un extremo delantero, el conjunto de puerto perfora el extremo delantero para establecer una comunicación de fluidos entre la cámara interior y el depósito cuando se da al menos uno de:

- 5 se inserta el cartucho en la cámara interior; y
 se activa el dispositivo.

14. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la frecuencia de la onda ultrasónica es de aproximadamente 15 kHz a aproximadamente 500 kHz.

- 10 15. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sustancia se administra a al menos uno de tratar y mitigar los síntomas de al menos uno de proctitis, enfermedad inflamatoria del intestino y síndrome de intestino irritable.

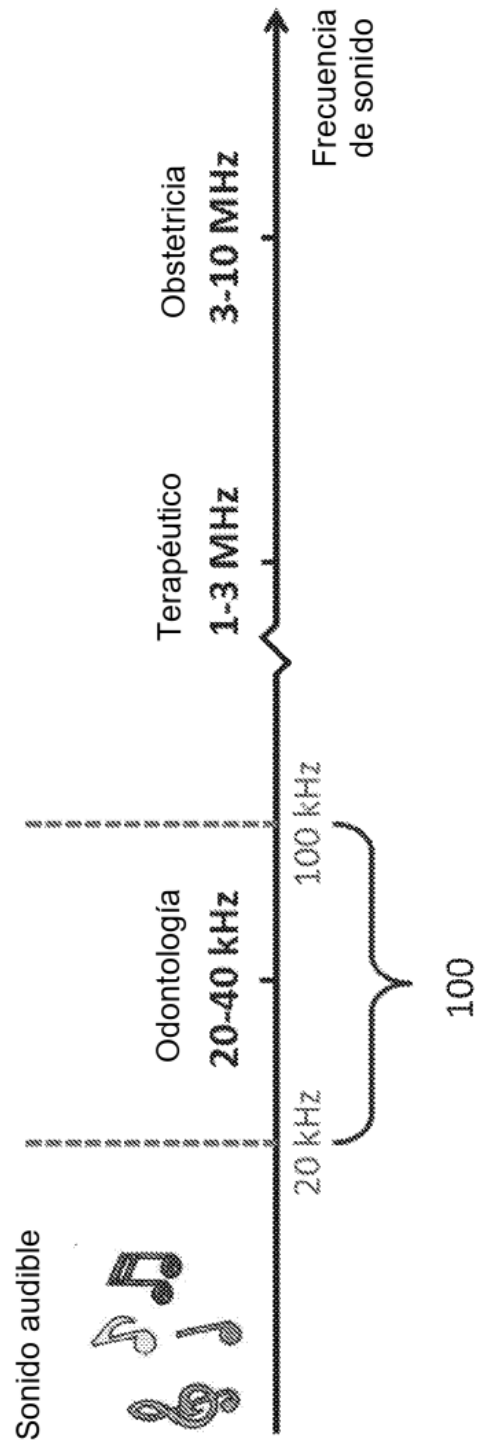


FIG. 1

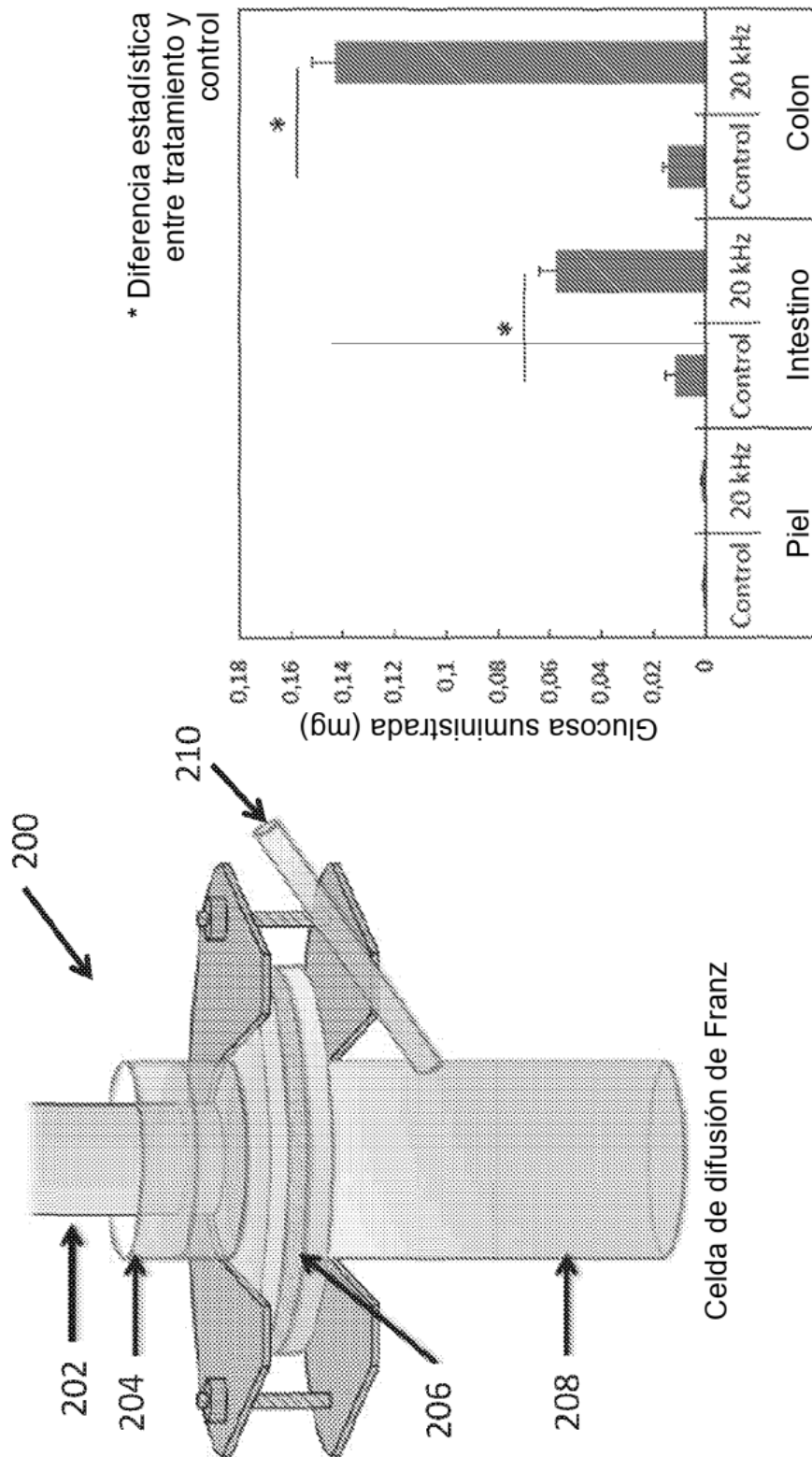


FIG. 2A

FIG. 2B

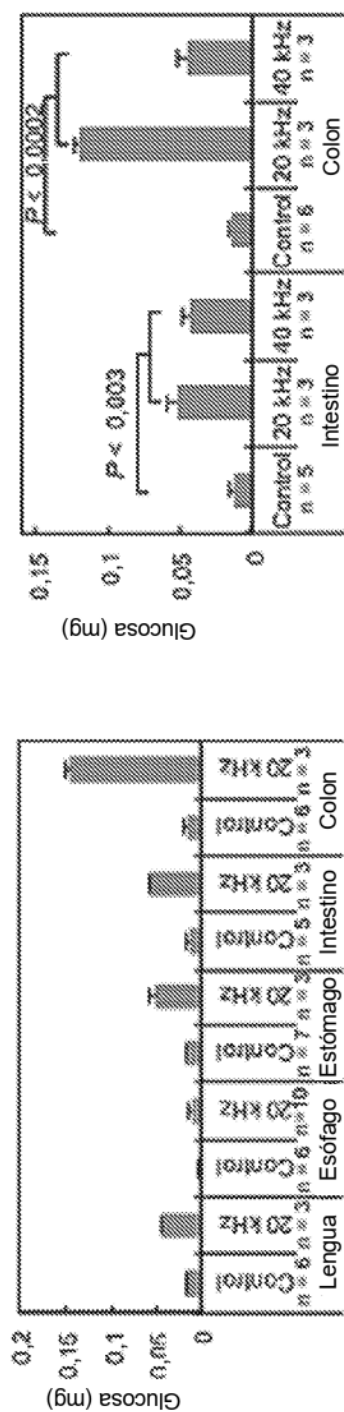


FIG. 3A

FIG. 3B

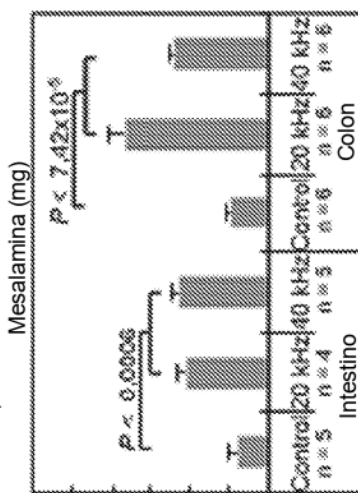
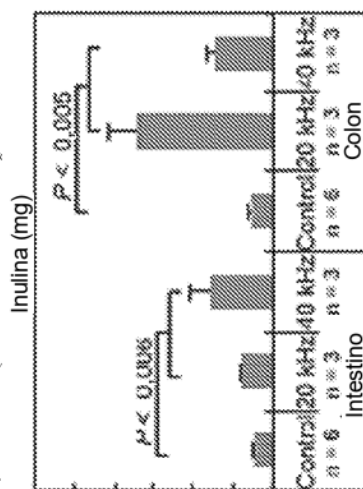


FIG. 3C

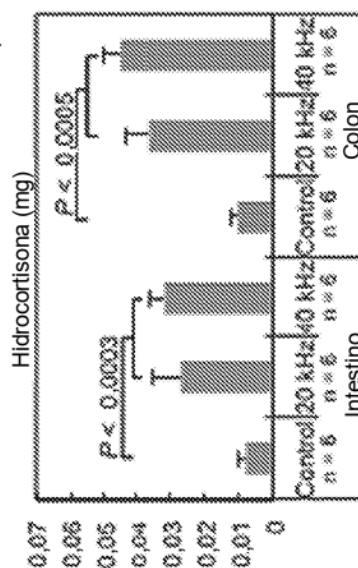


FIG. 3D

FIG. 3E

* Diferencia estadística entre
tratamiento y control

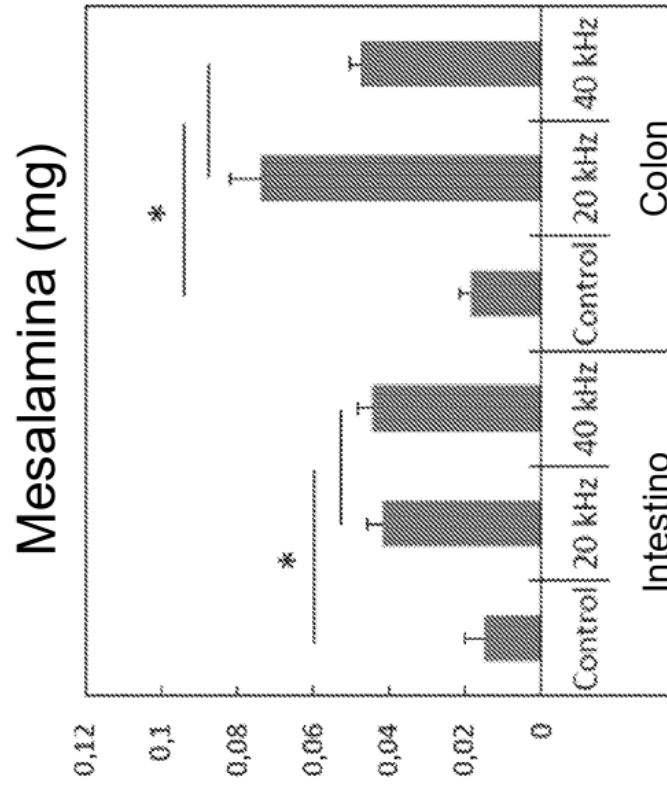


FIG. 4B

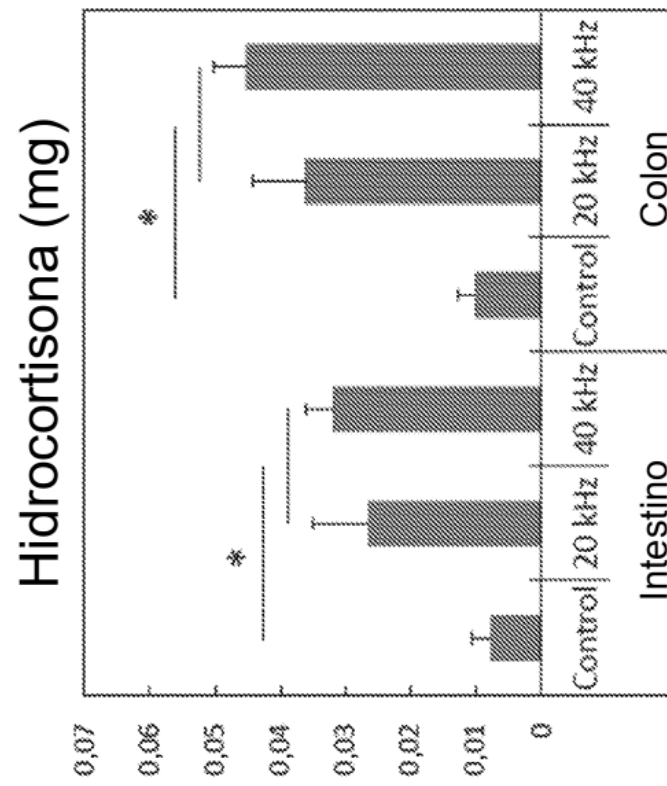


FIG. 4A

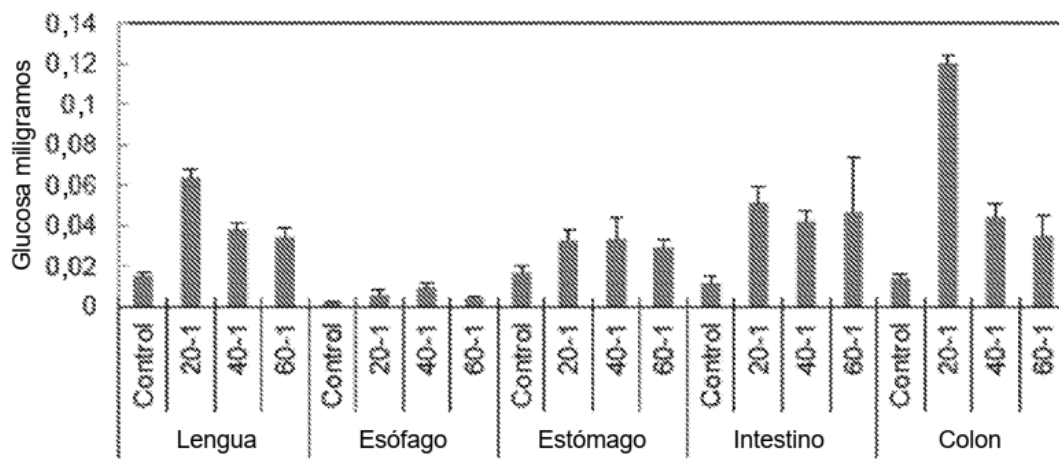


FIG. 5A

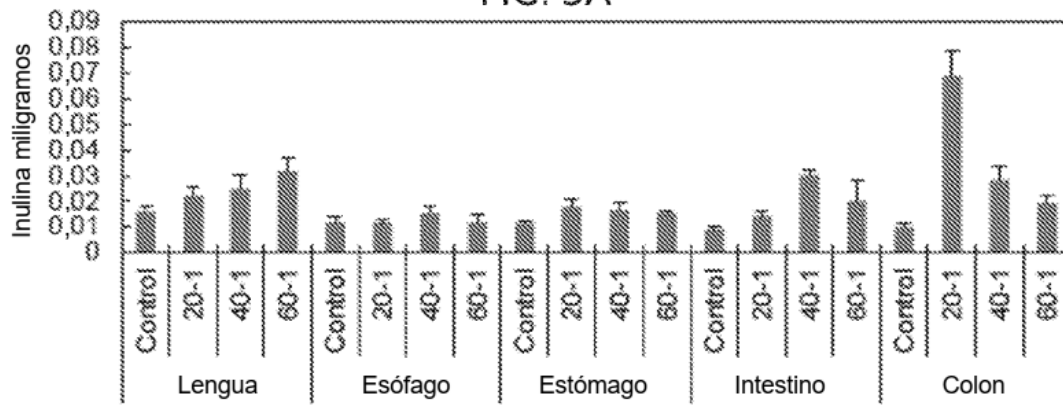


FIG. 5B

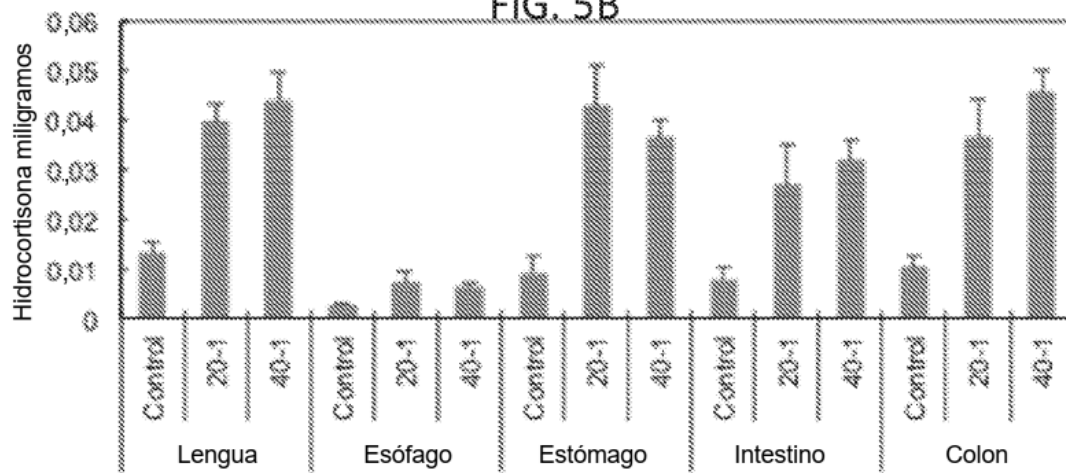


FIG. 5C

* Diferencia estadística entre
tratamiento y control

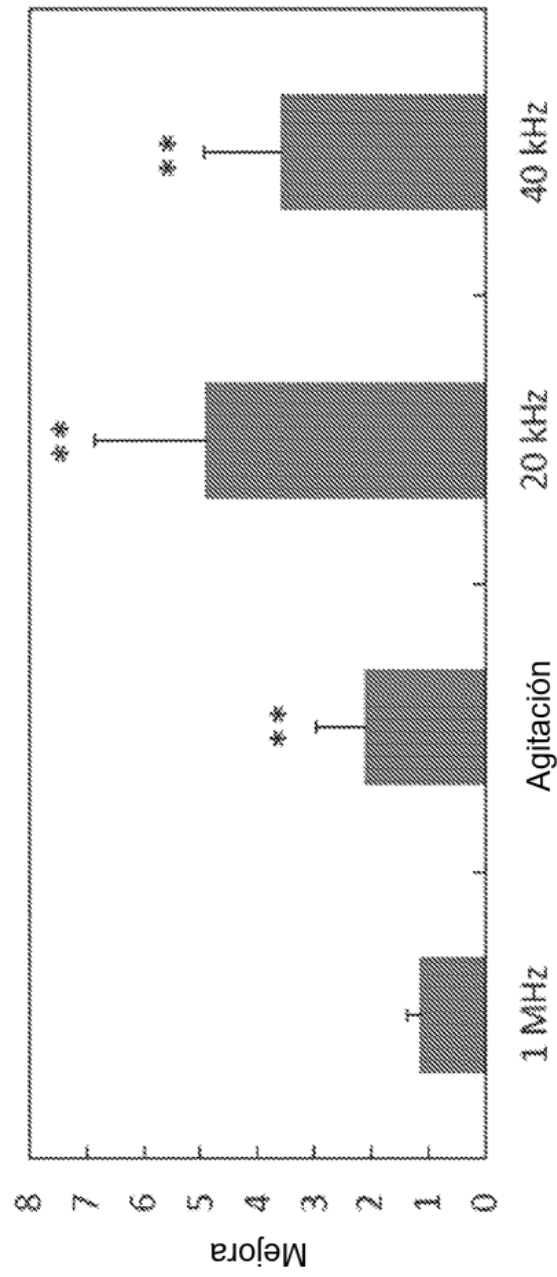


FIG. 6

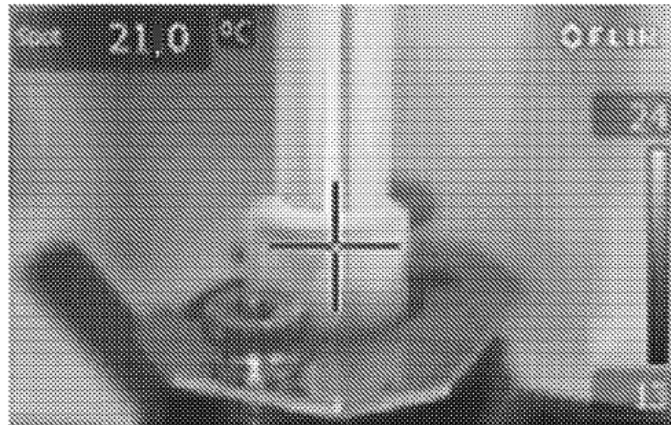


FIG. 7A

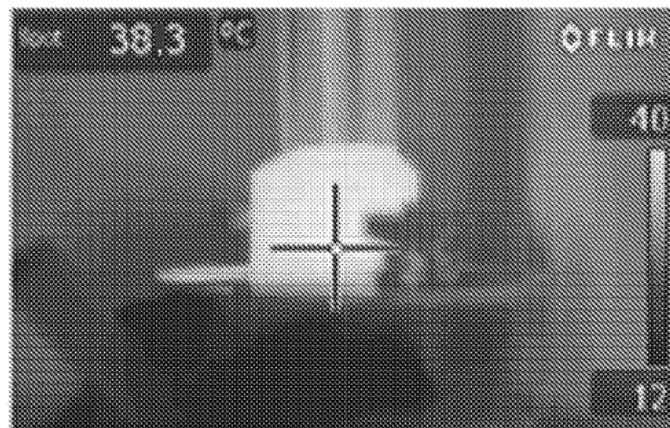


FIG. 7B

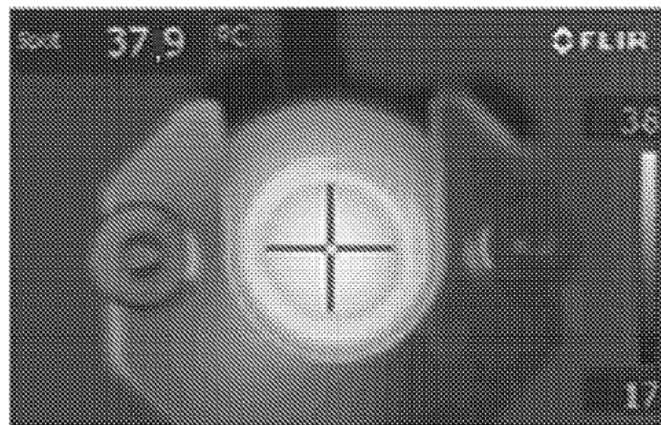


FIG. 7C

* Diferencia estadística entre
tratamiento y control

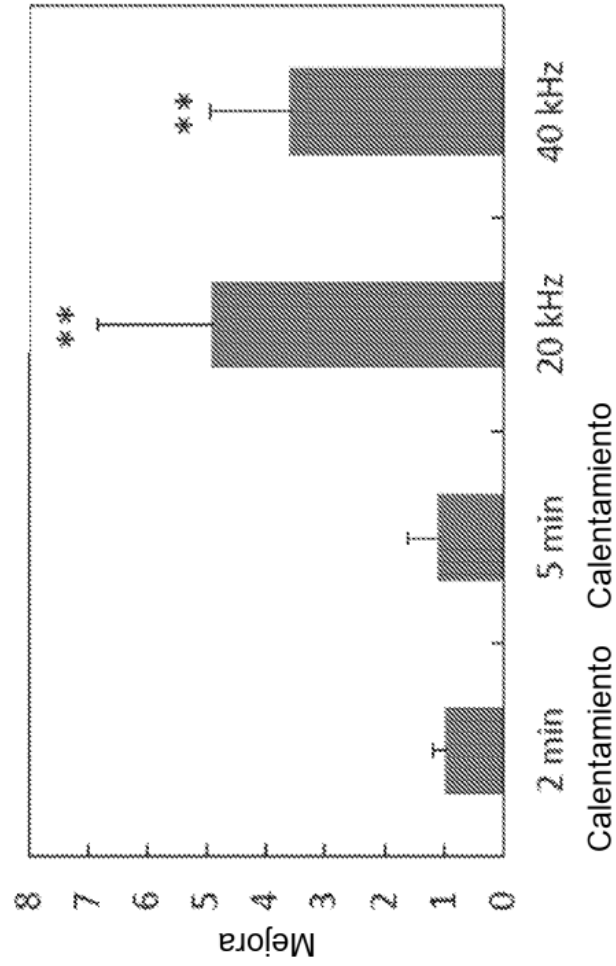


FIG. 8

* Diferencia estadística entre
tratamiento y control

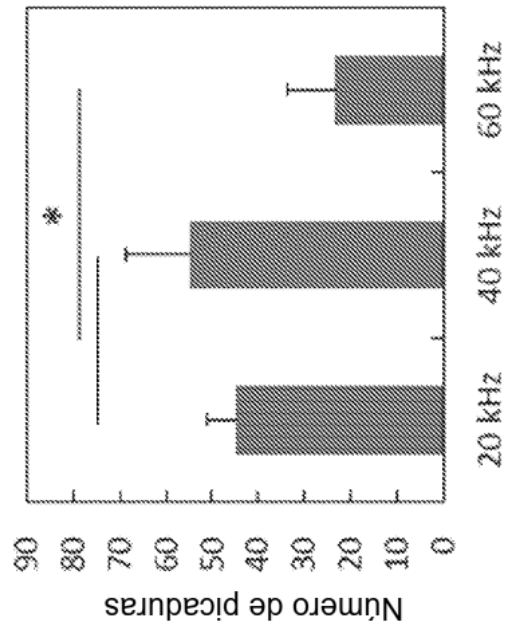


FIG. 9A

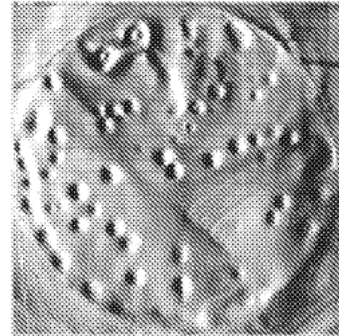


FIG. 9B (20 kHz)

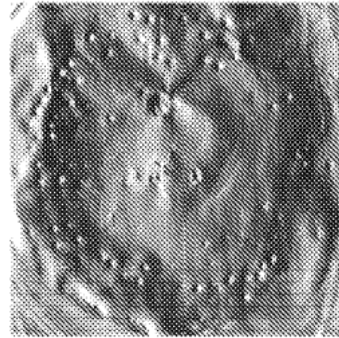


FIG. 9C (40 kHz)

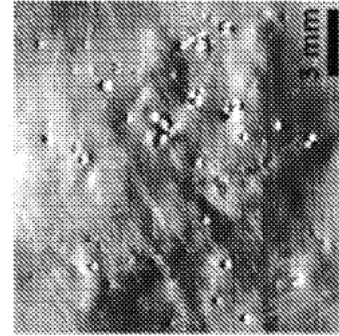


FIG. 9D (60 kHz)

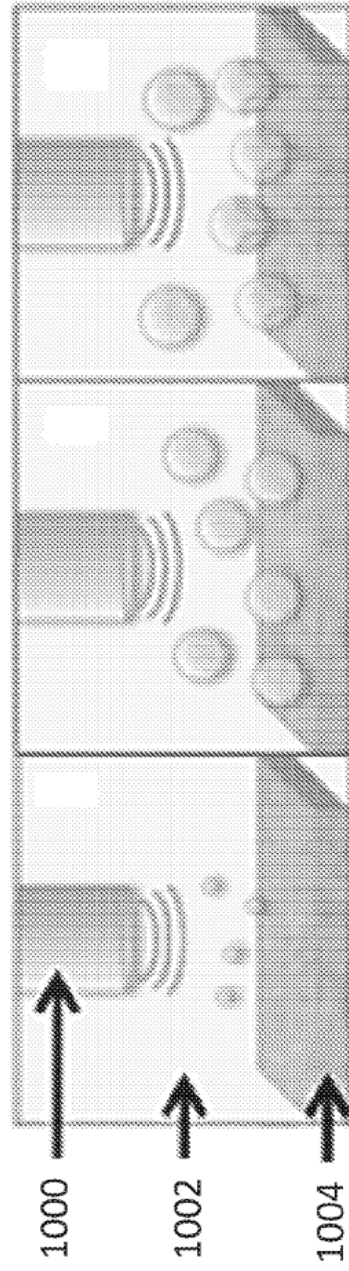


FIG. 10A

FIG. 10B

FIG. 10C

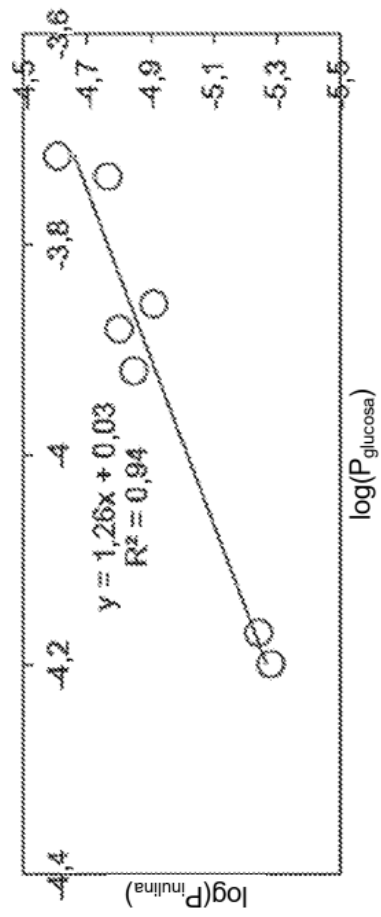


FIG. 11A

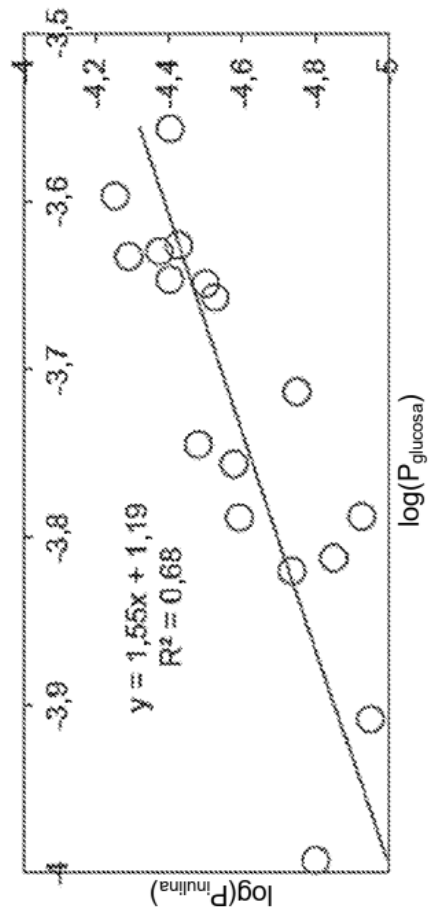


FIG. 11B

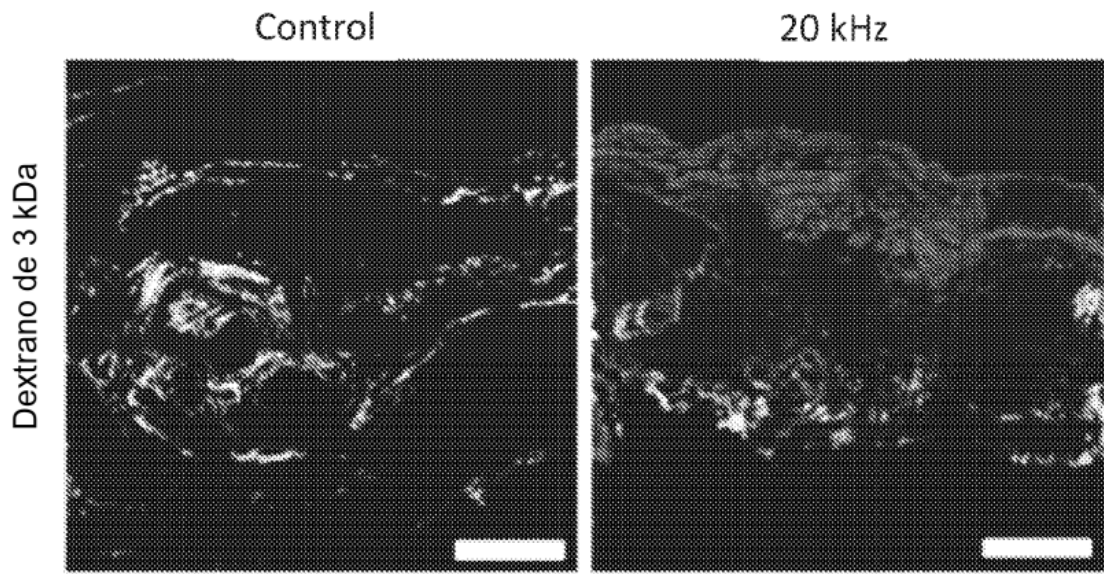


FIG. 12A

FIG. 12B

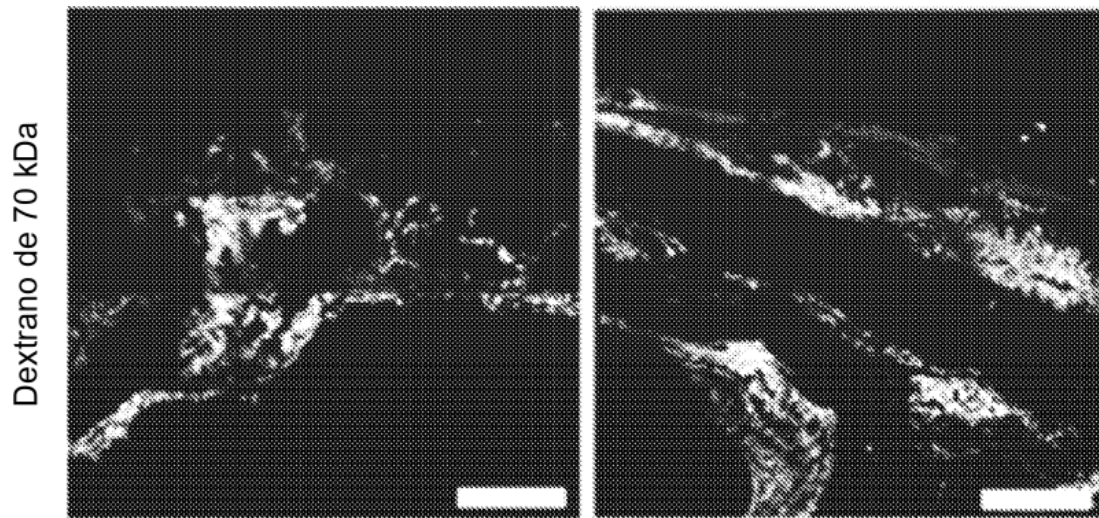


FIG. 12C

FIG. 12D

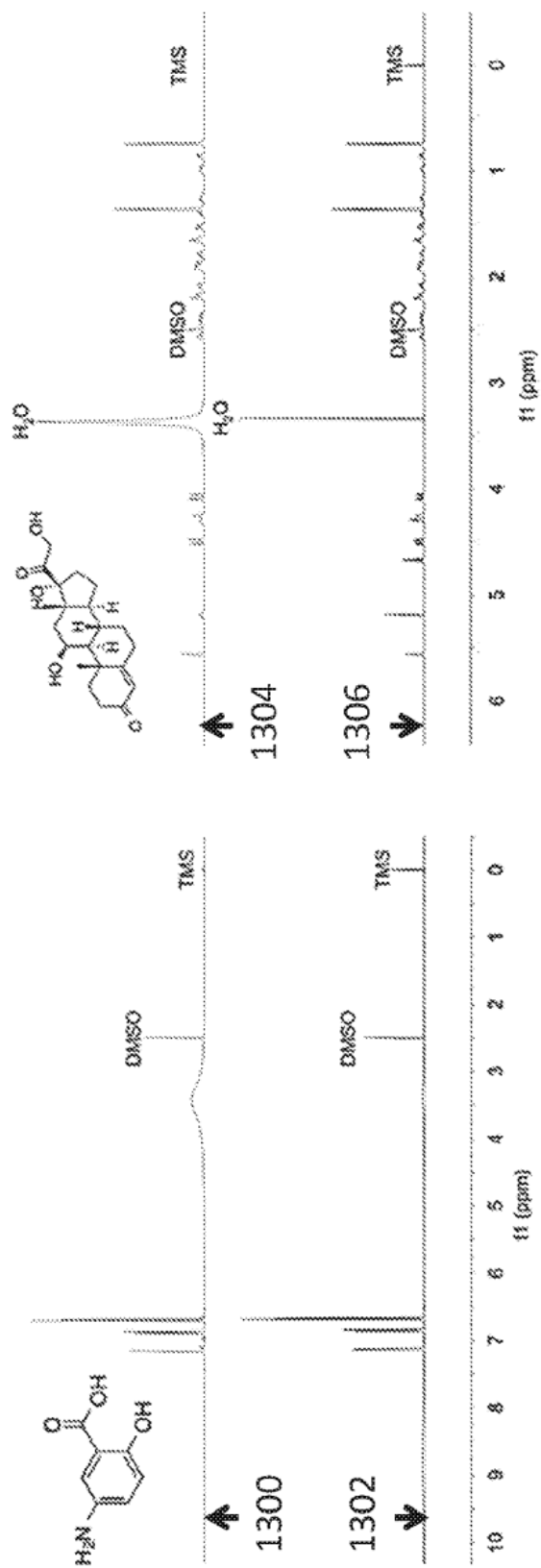


FIG. 13B

Actividad de insulina evaluada por HPLC

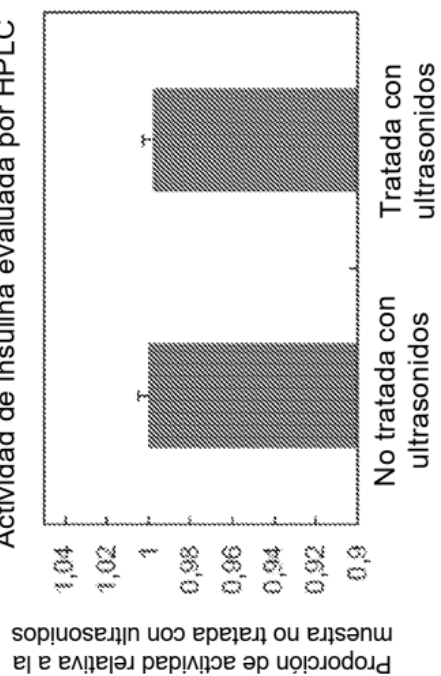


FIG. 13C

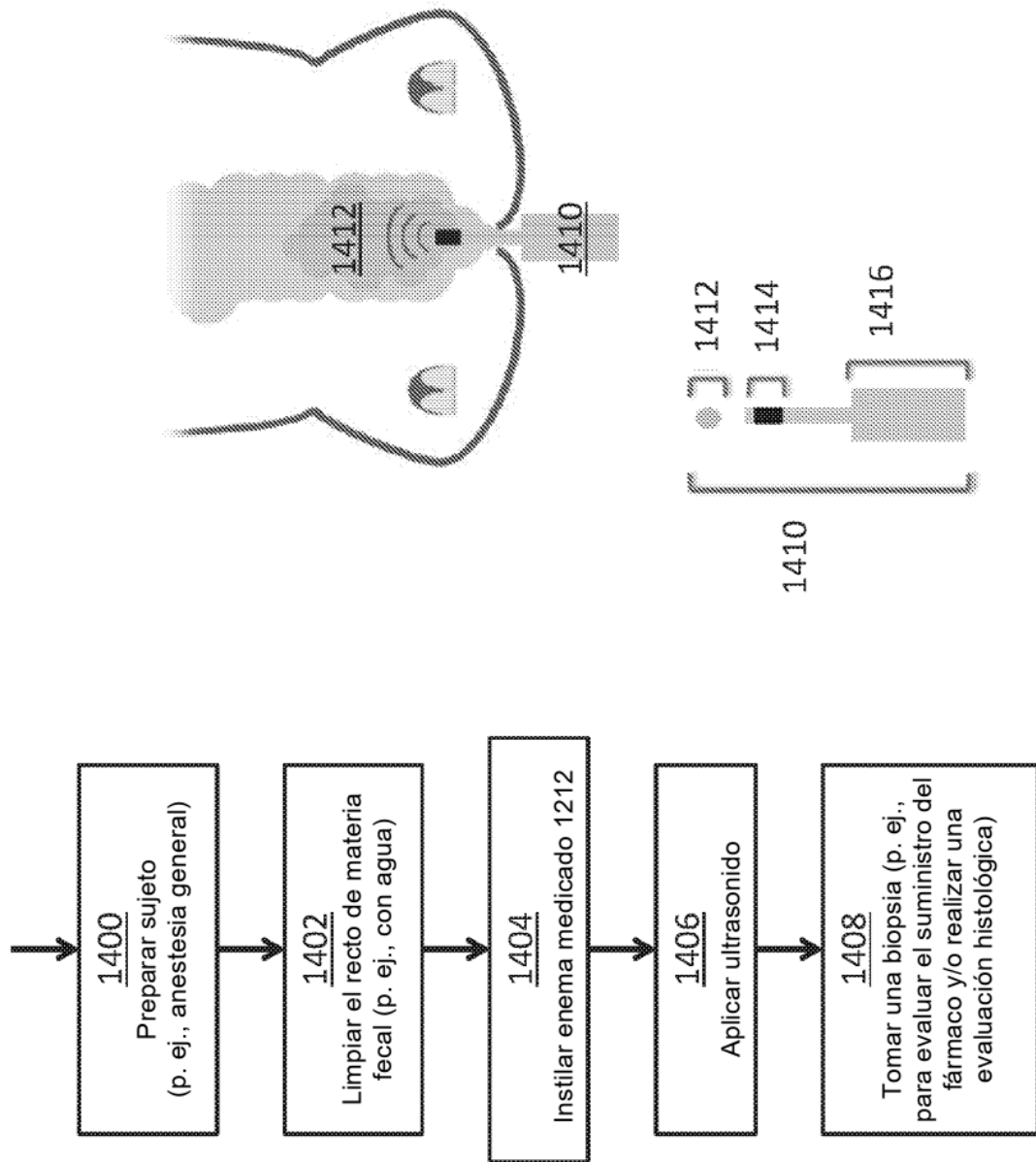


FIG. 14B

FIG. 14A

Vista macroscópica
en colon

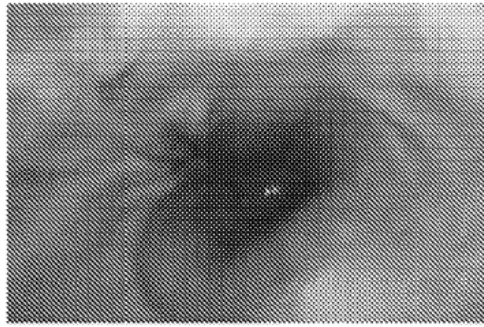


FIG. 15A

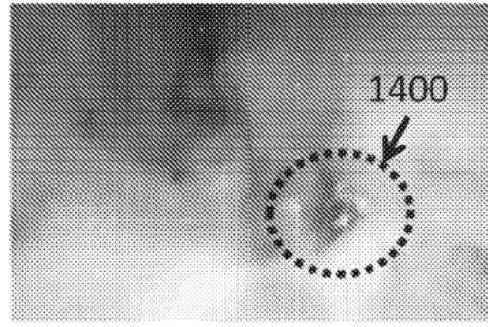
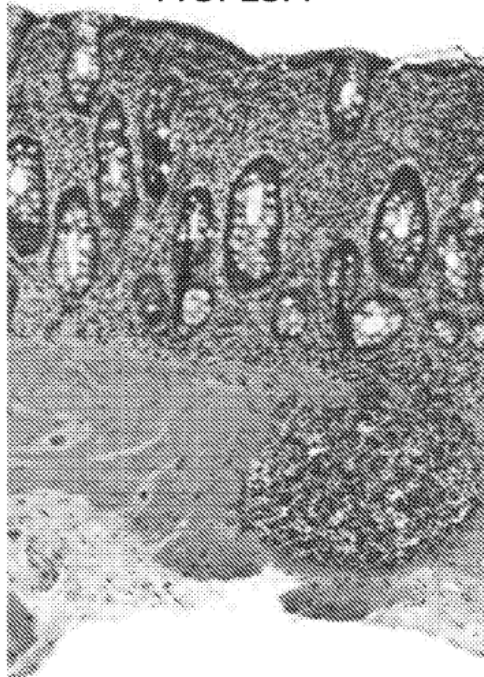


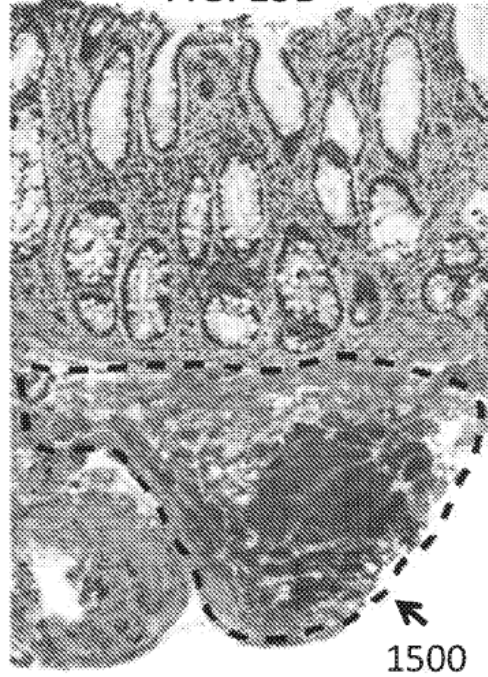
FIG. 15B

Histología
(tinción H&E)



Control

FIG. 15C



Tratado

FIG. 15D

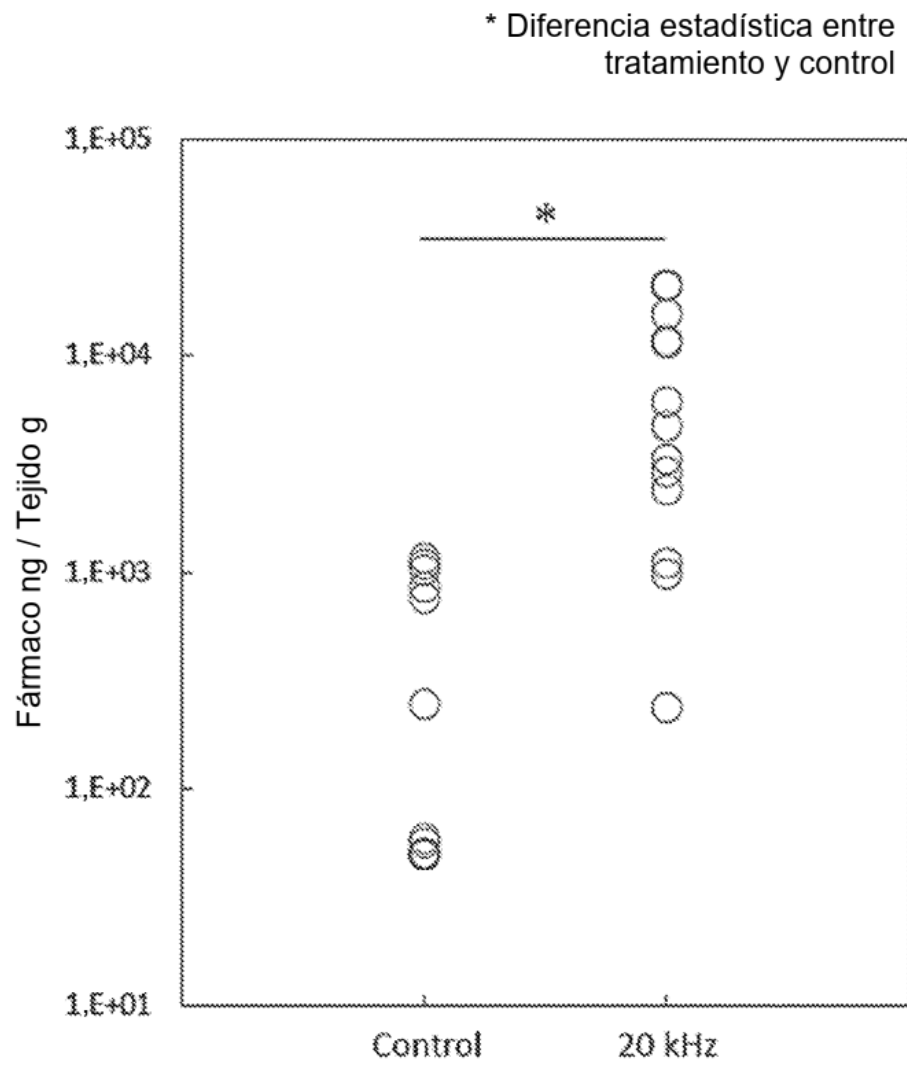


FIG. 16

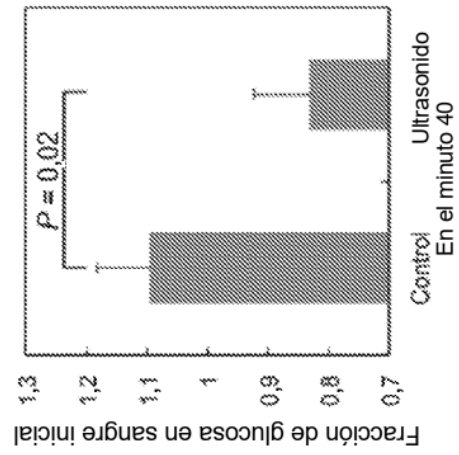
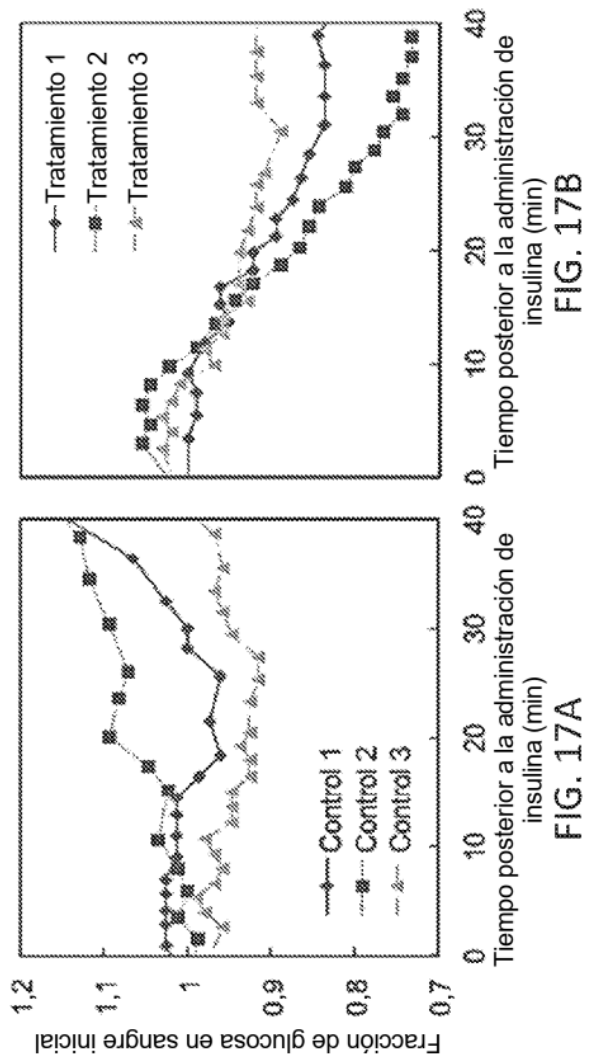


FIG. 17C

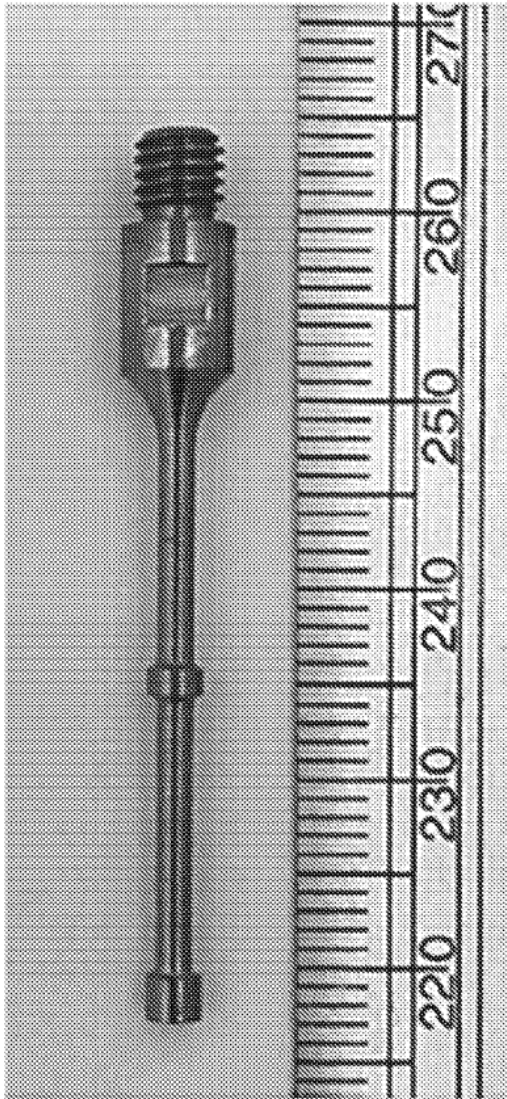


FIG. 18A

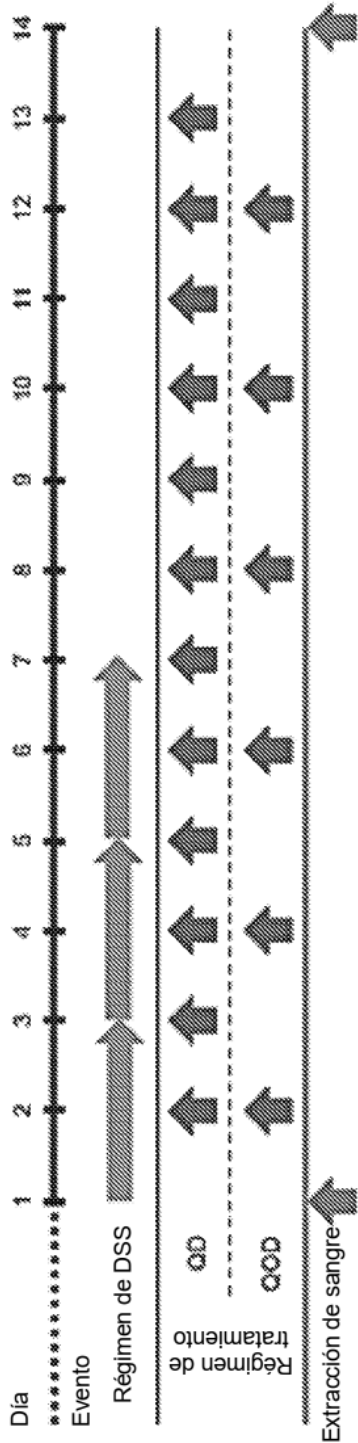


FIG. 18B

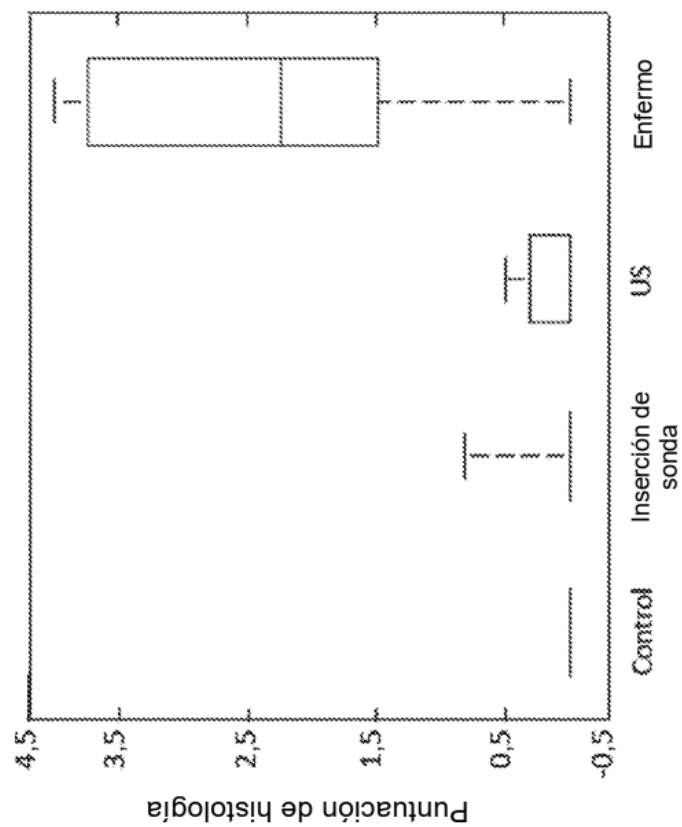


FIG. 19B

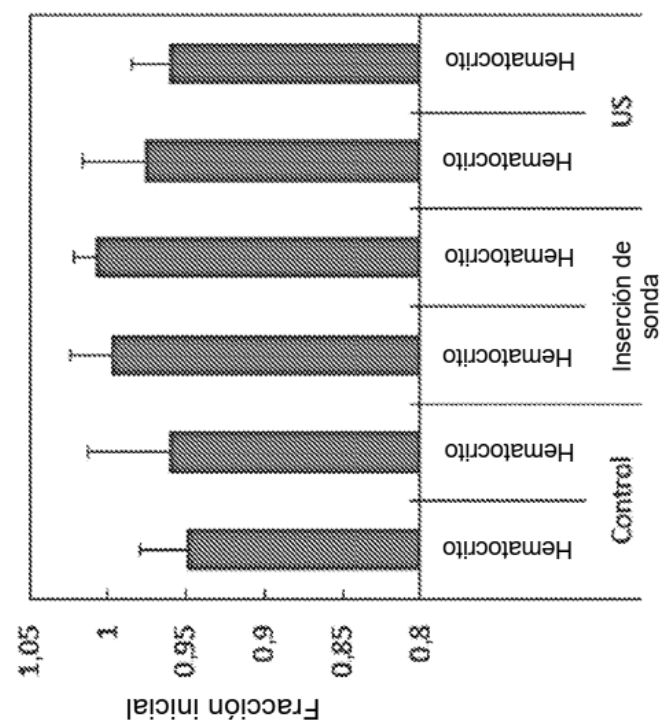


FIG. 19A

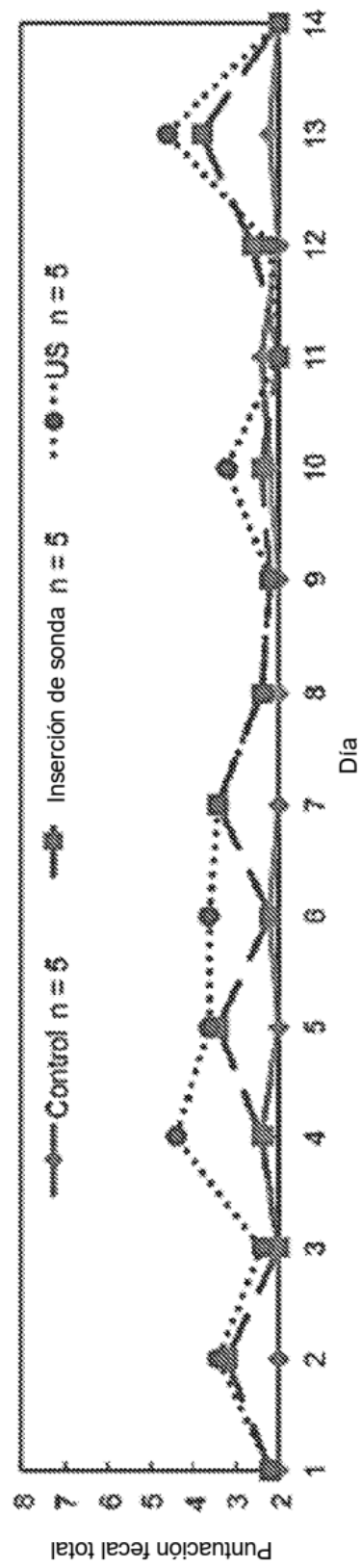
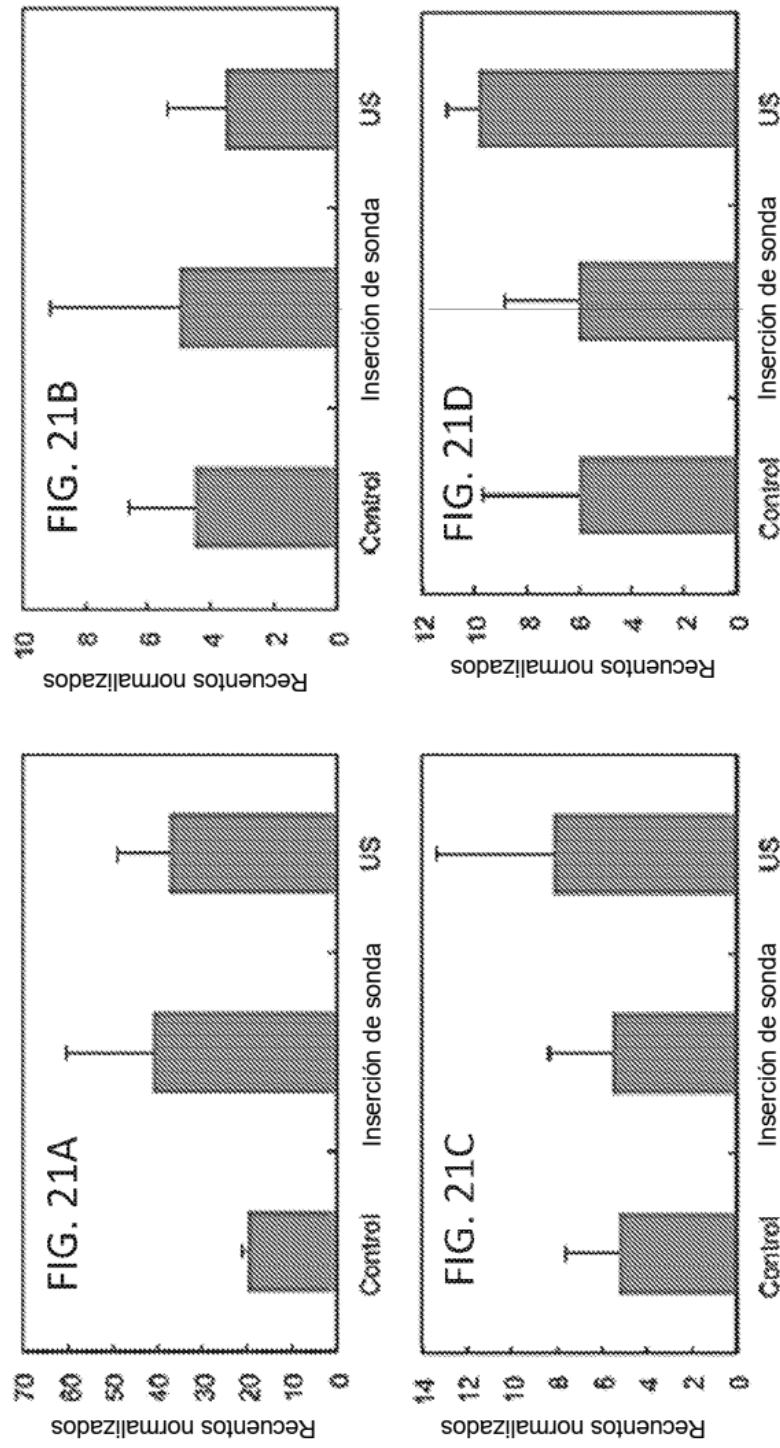
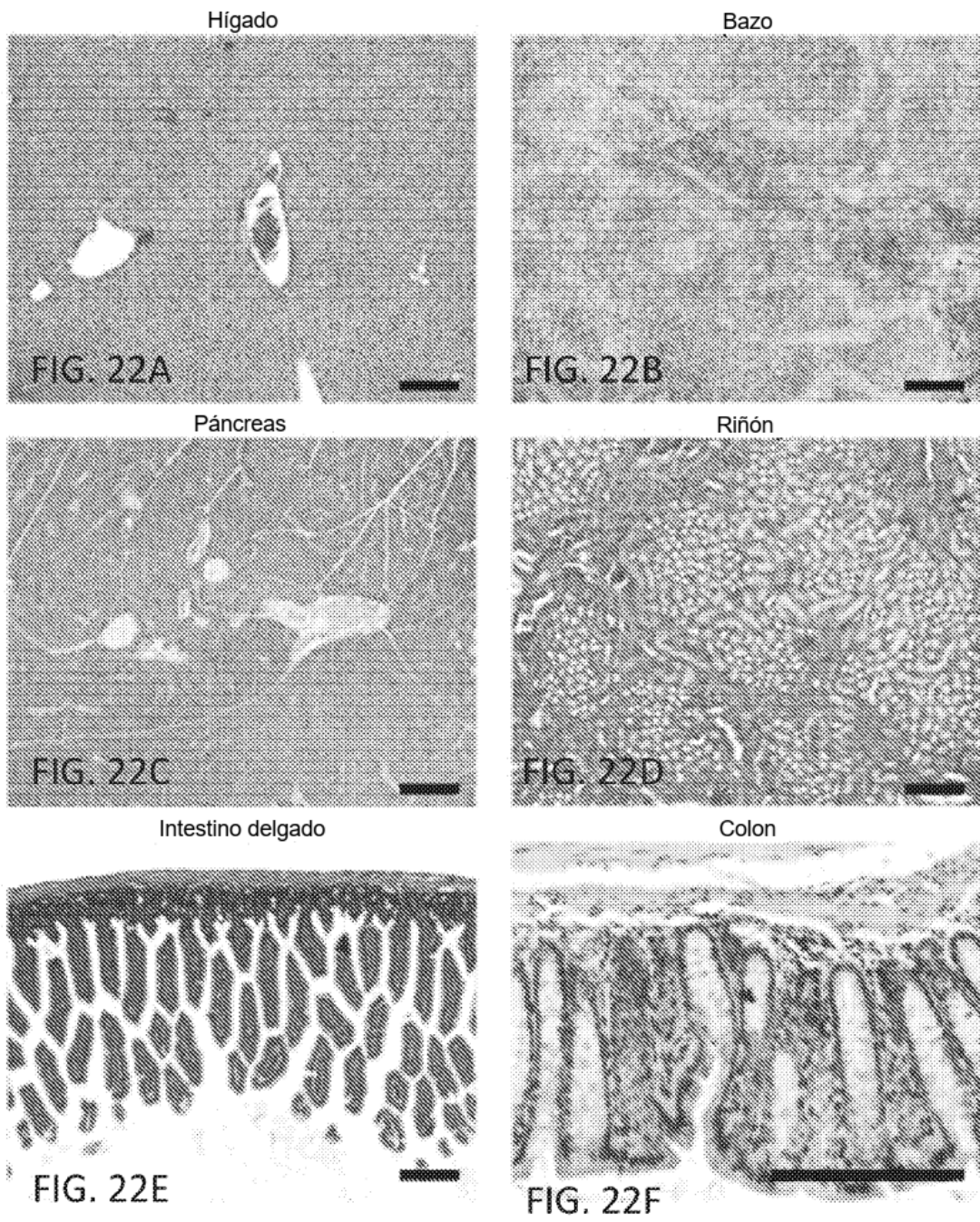


FIG. 20





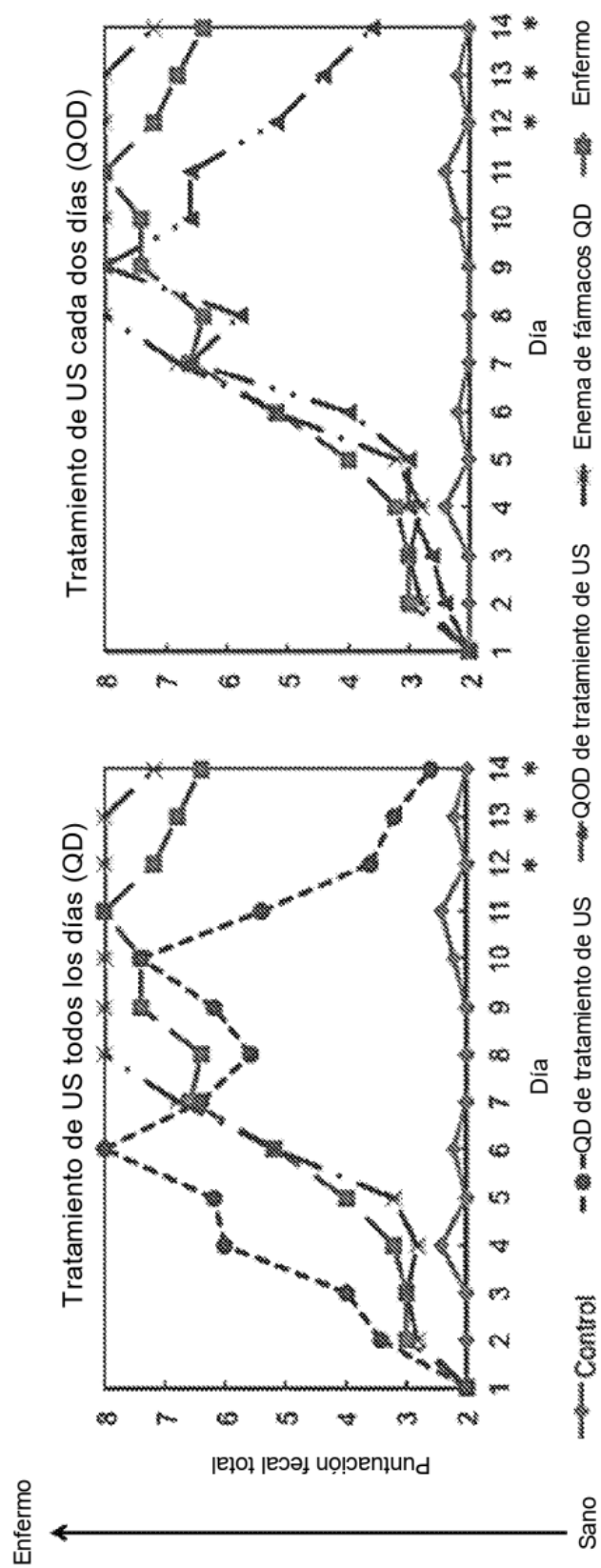


FIG. 23A

FIG. 23B

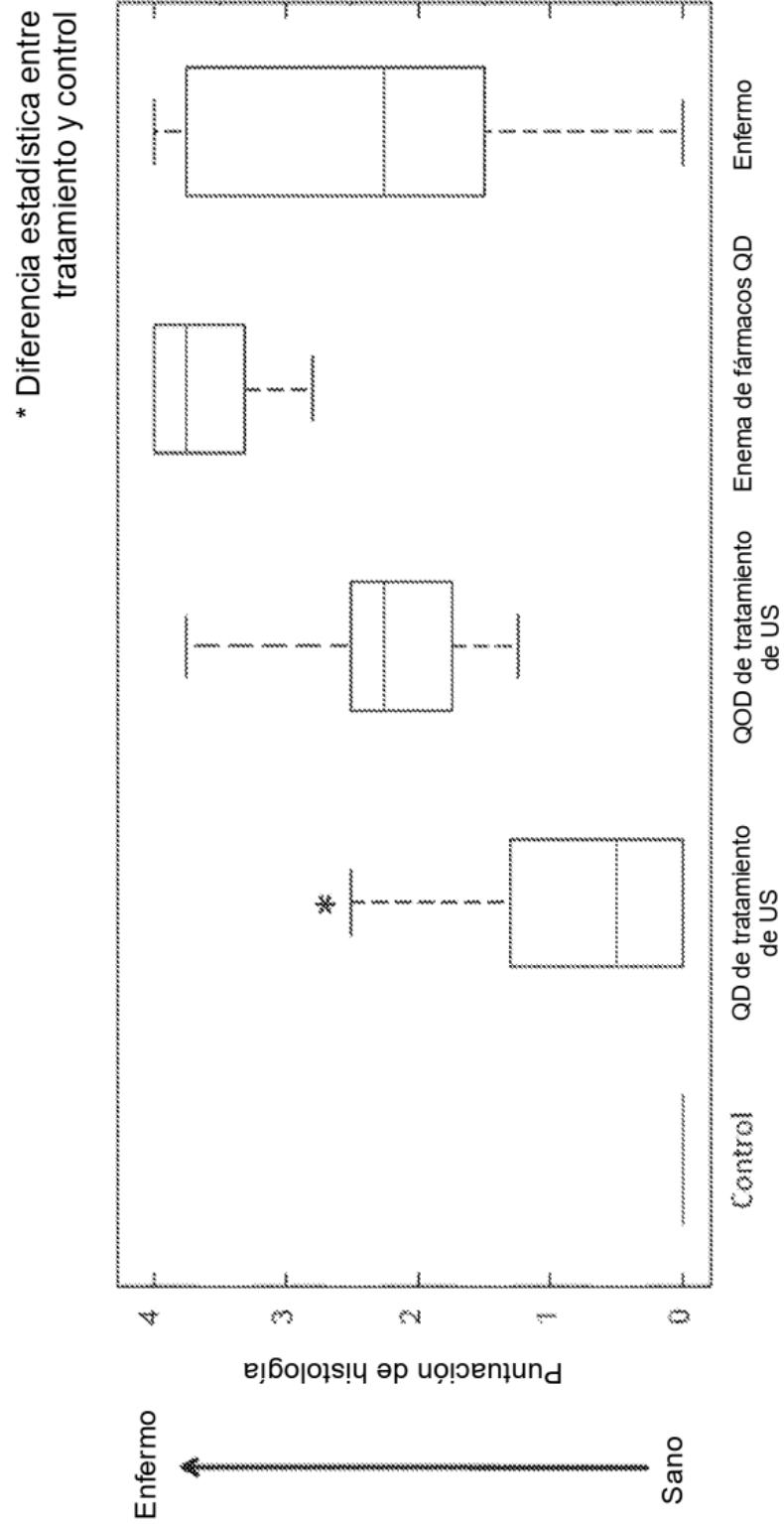
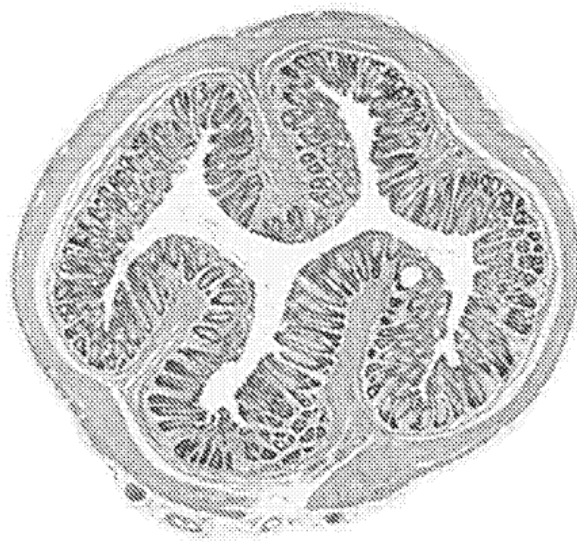


FIG. 24



Tejido sano (Puntuación 0)

FIG. 25A

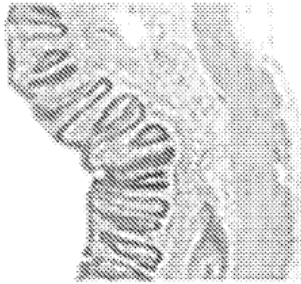


FIG. 25B

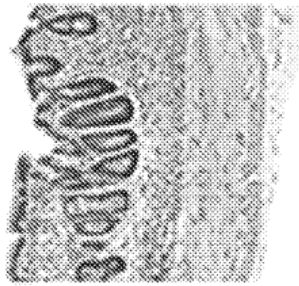
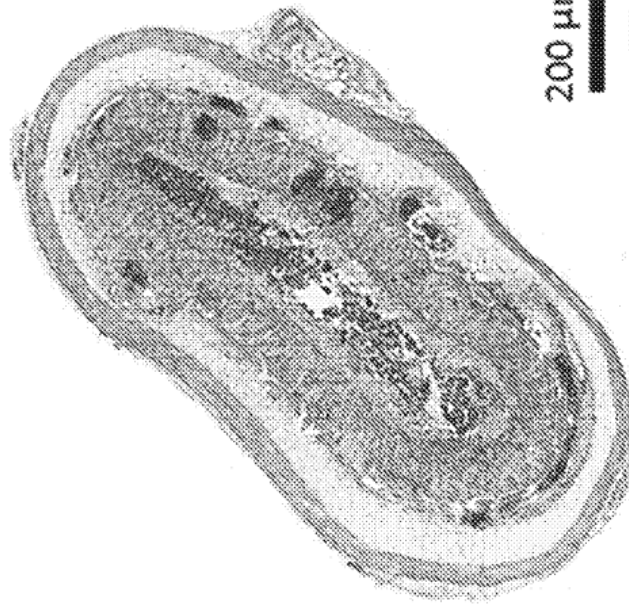


FIG. 25C



FIG. 25D



200 μ m

Enfermo (Puntuación 4)

FIG. 25E

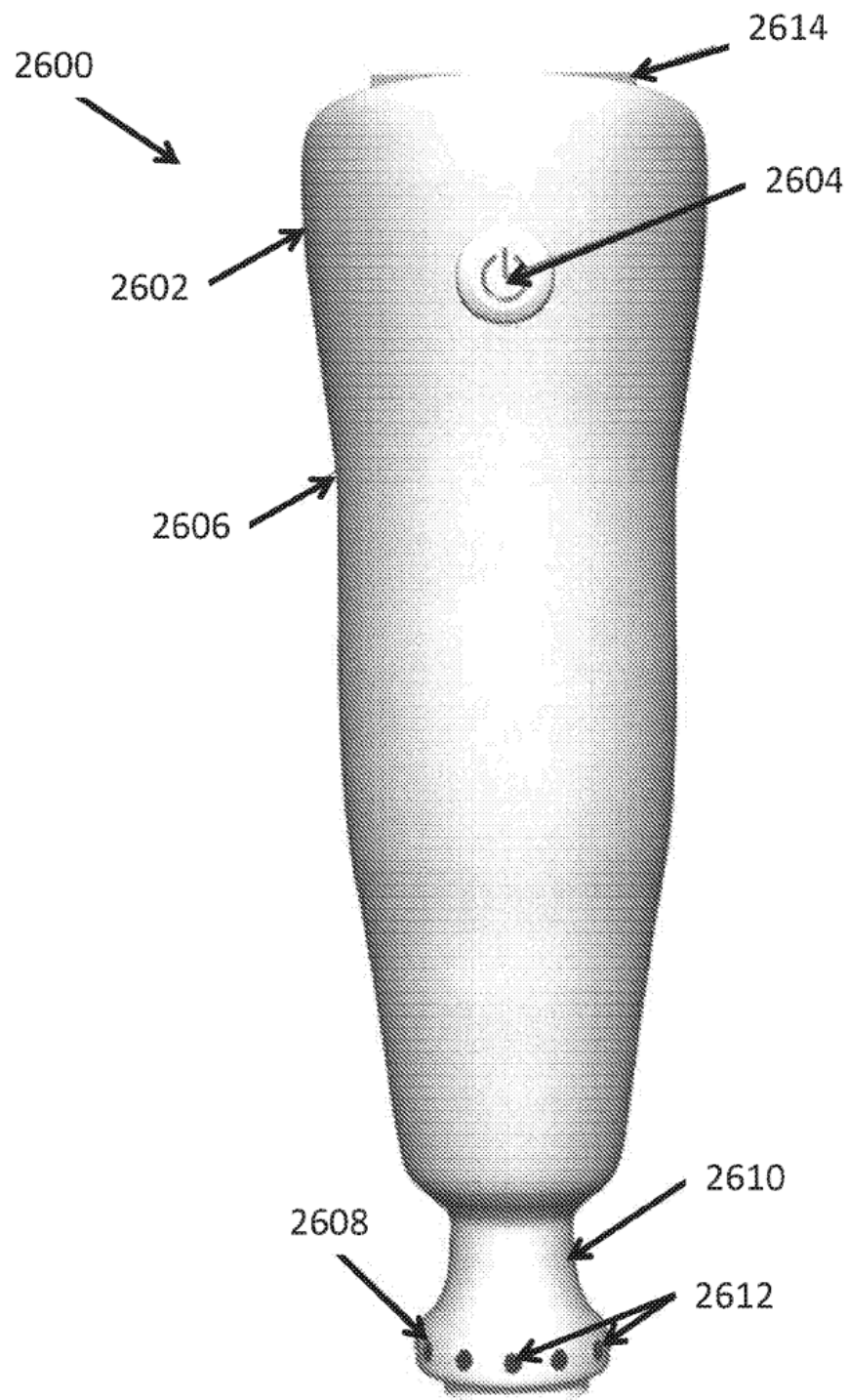
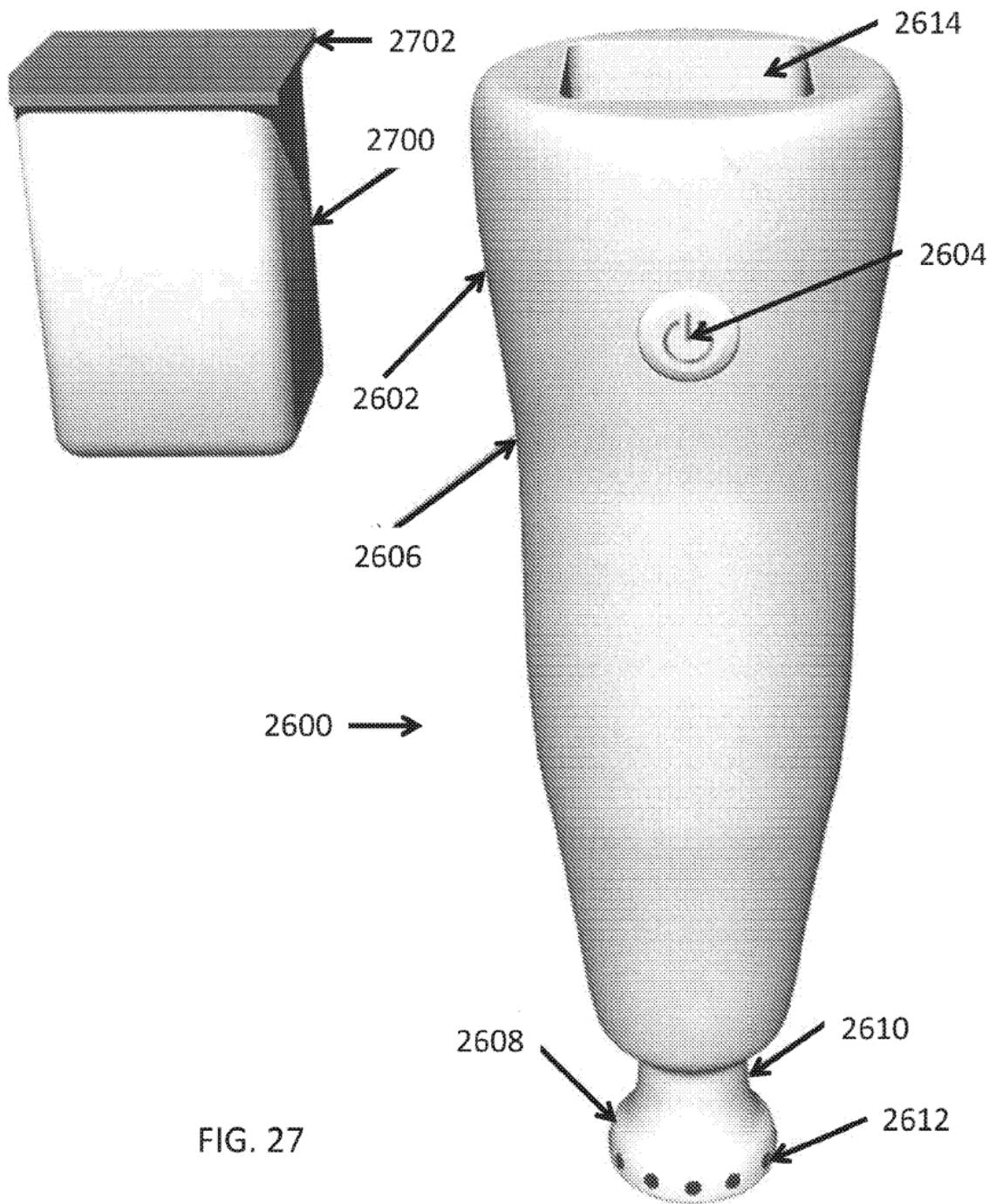
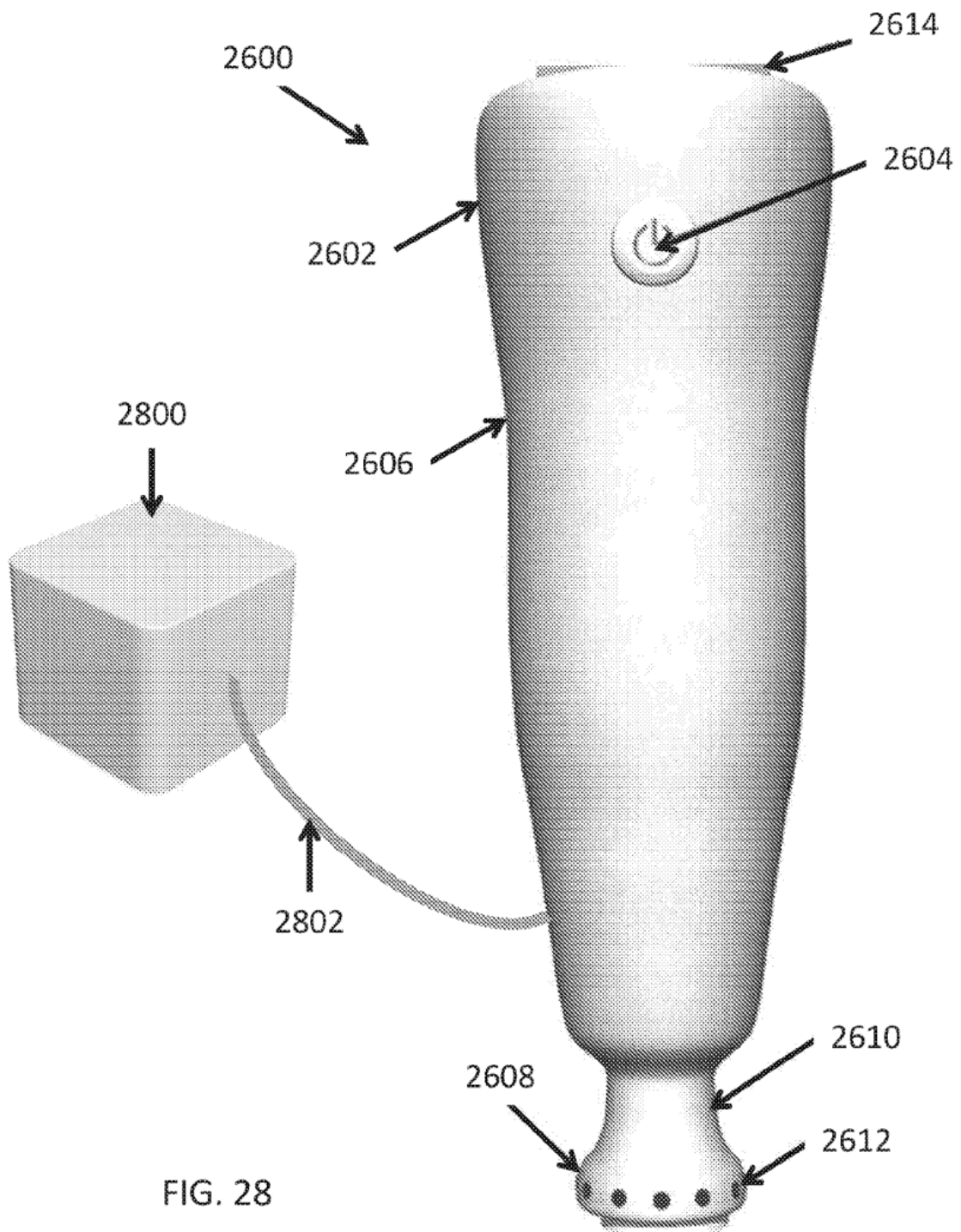
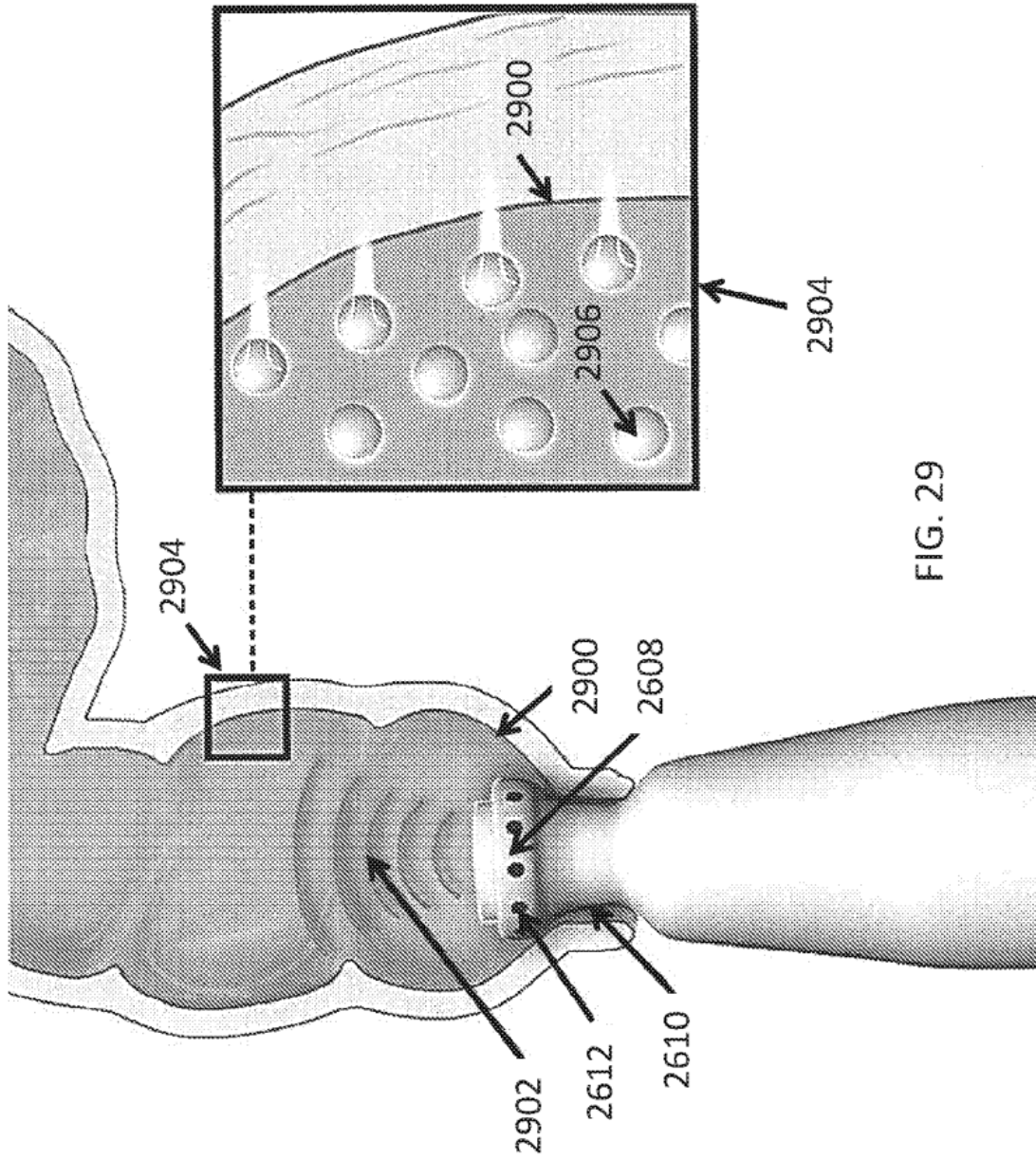


FIG. 26







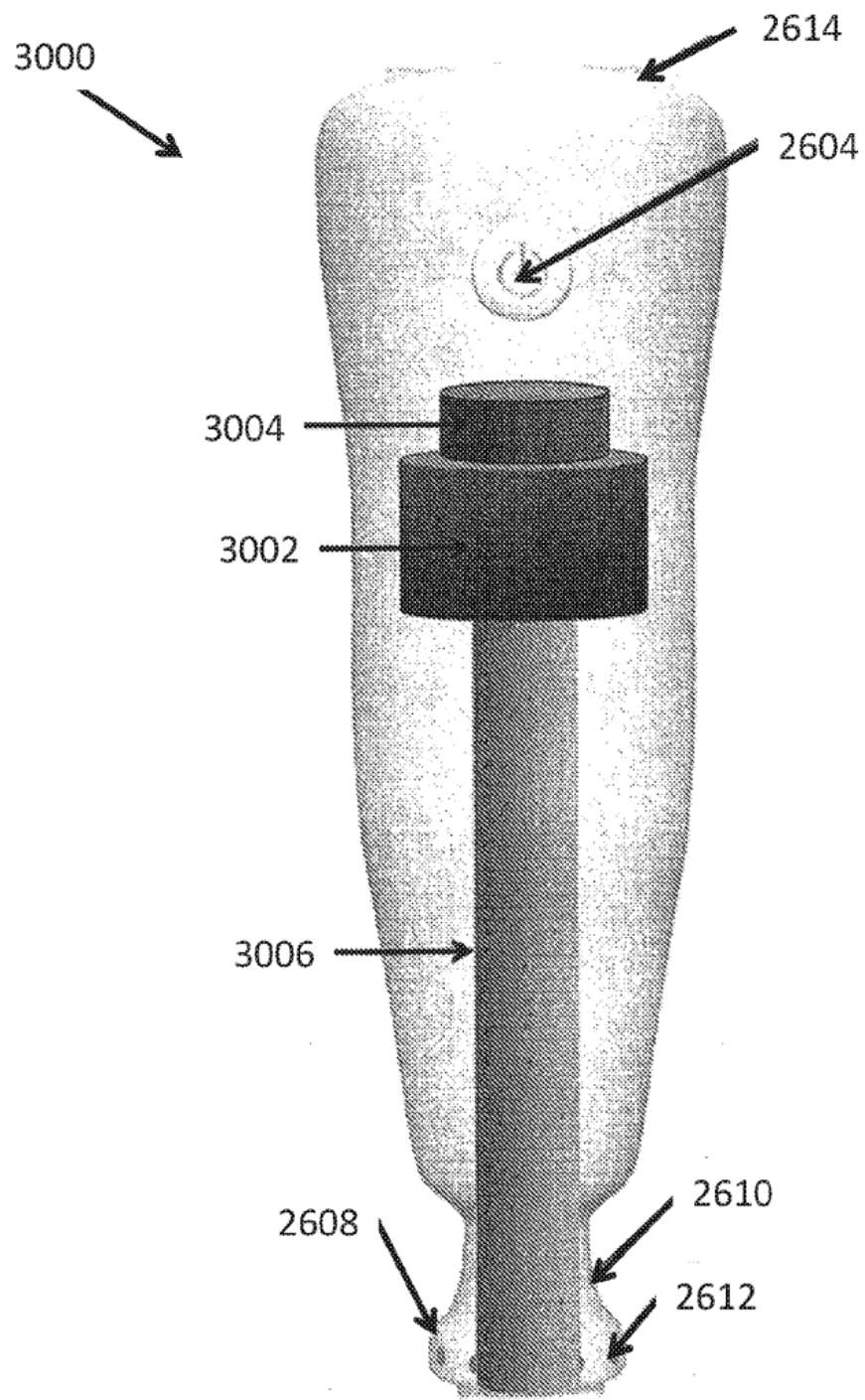


FIG. 30

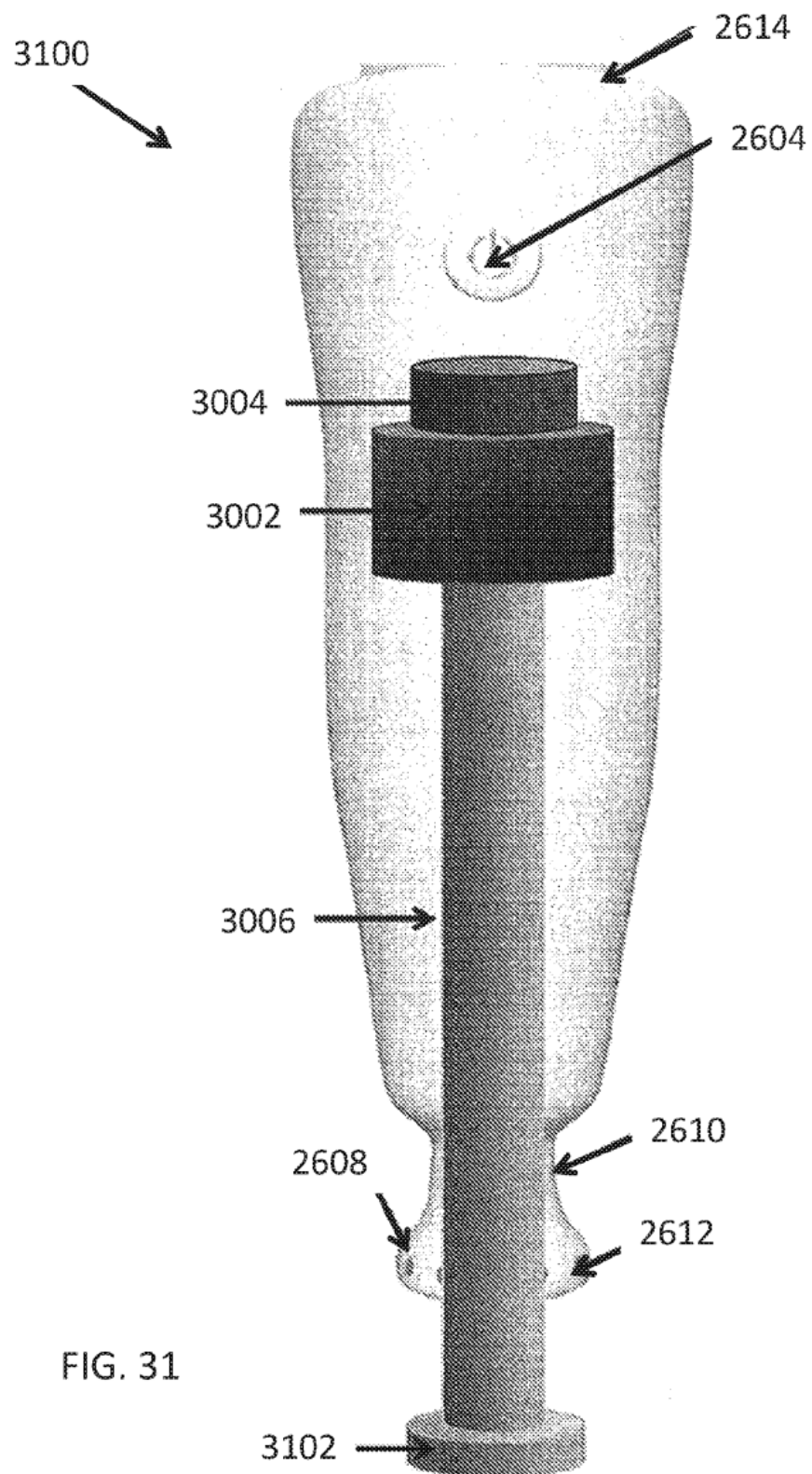
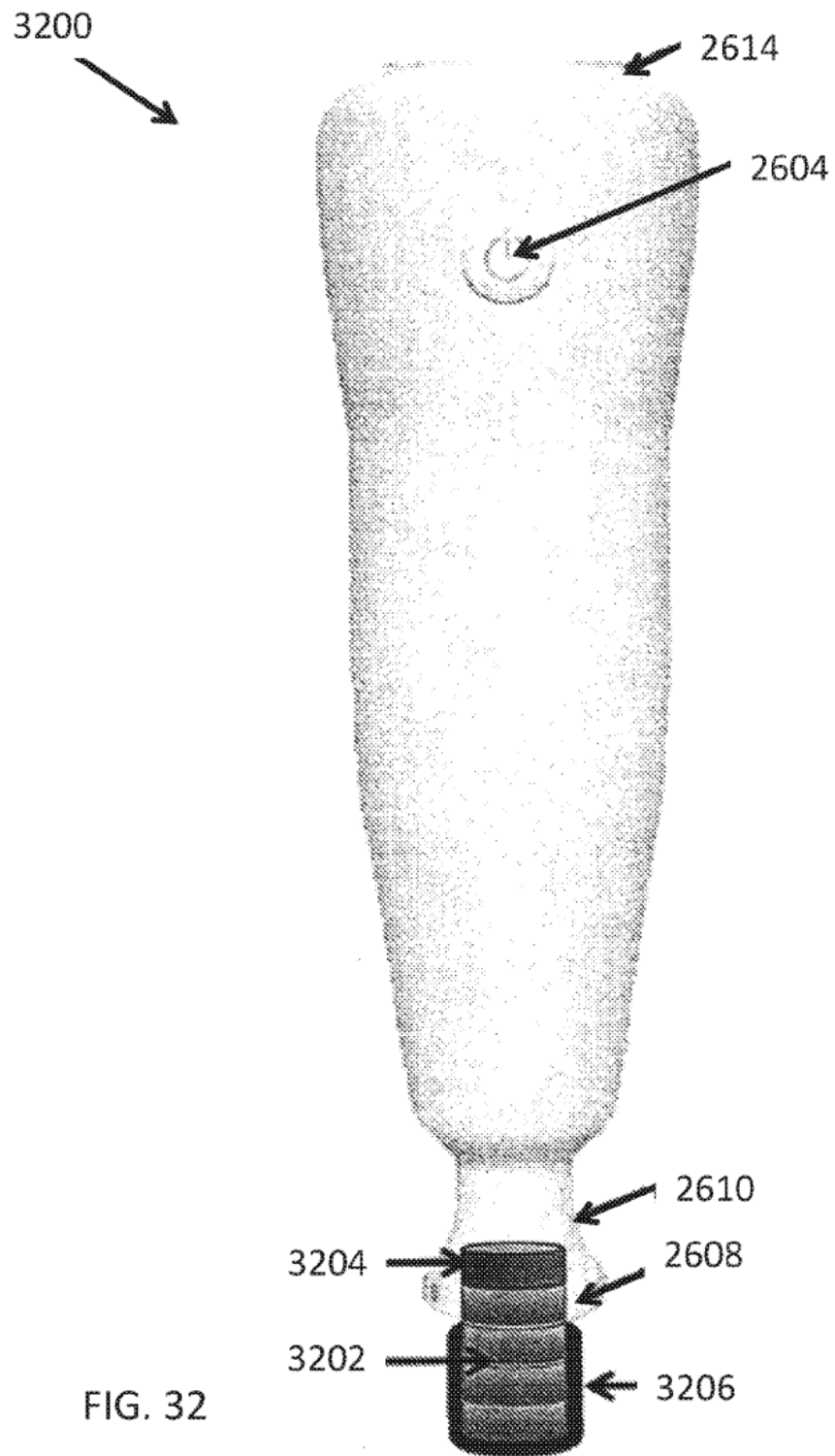
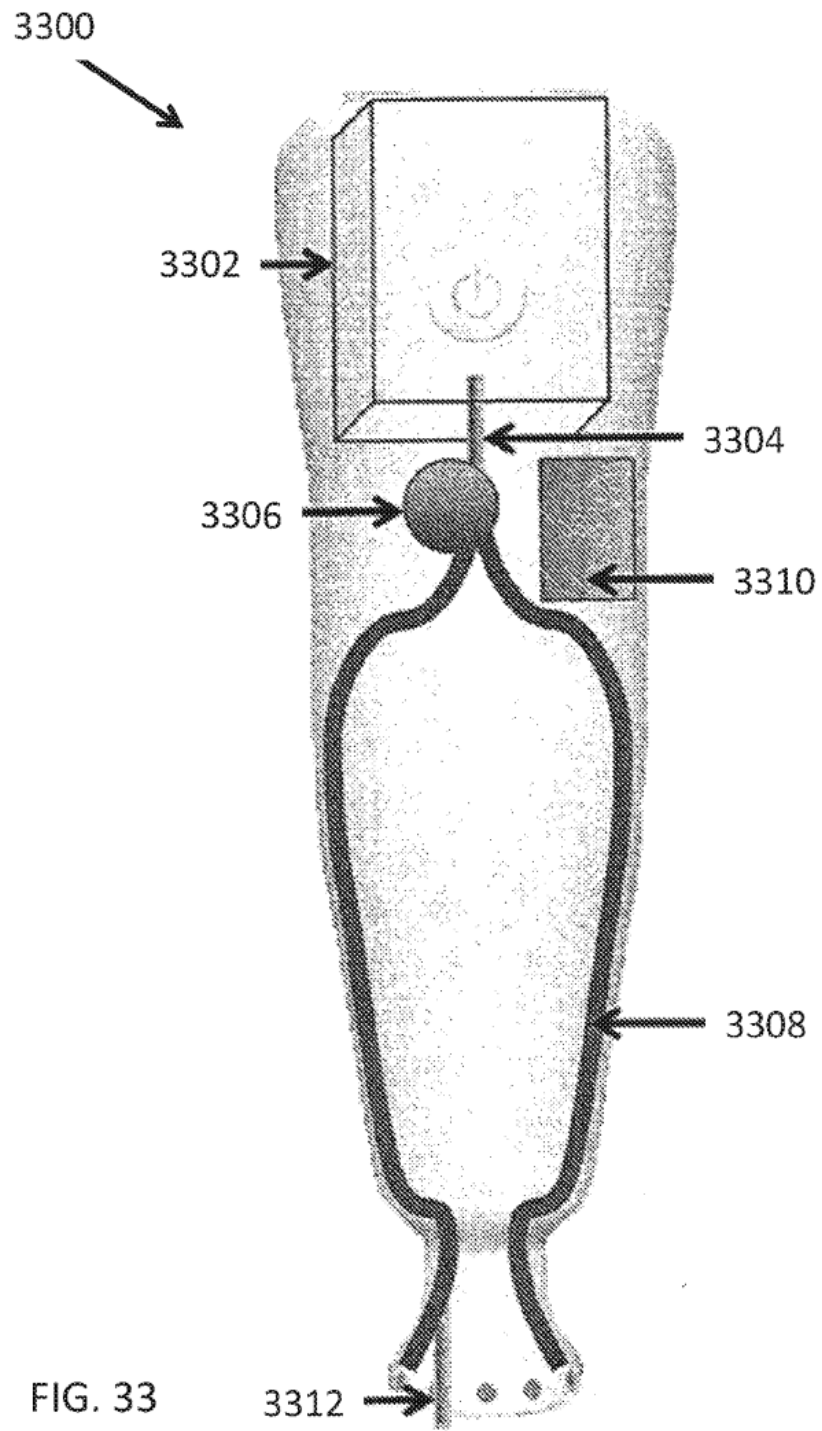


FIG. 31





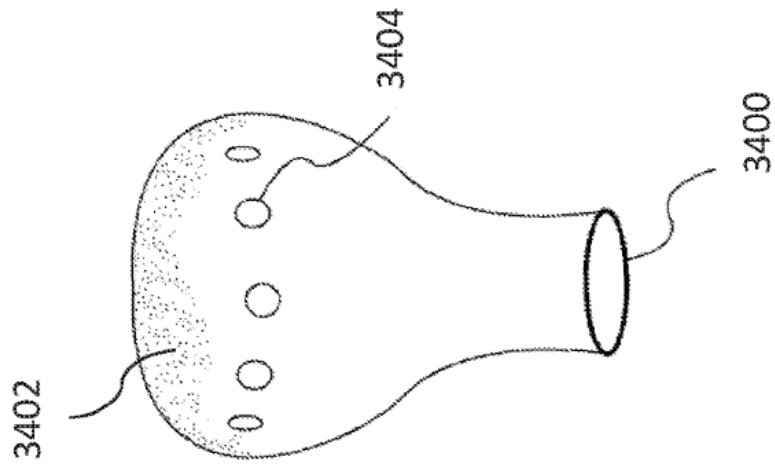


FIG. 34

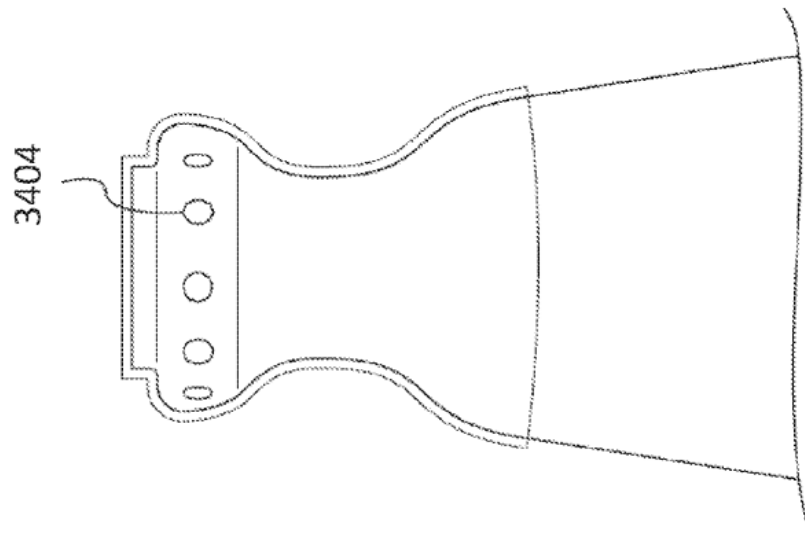


FIG. 35B

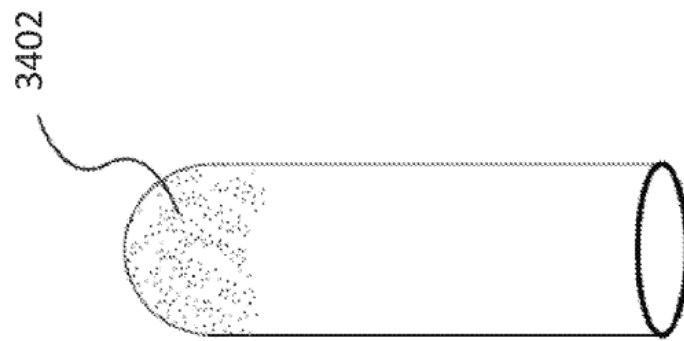
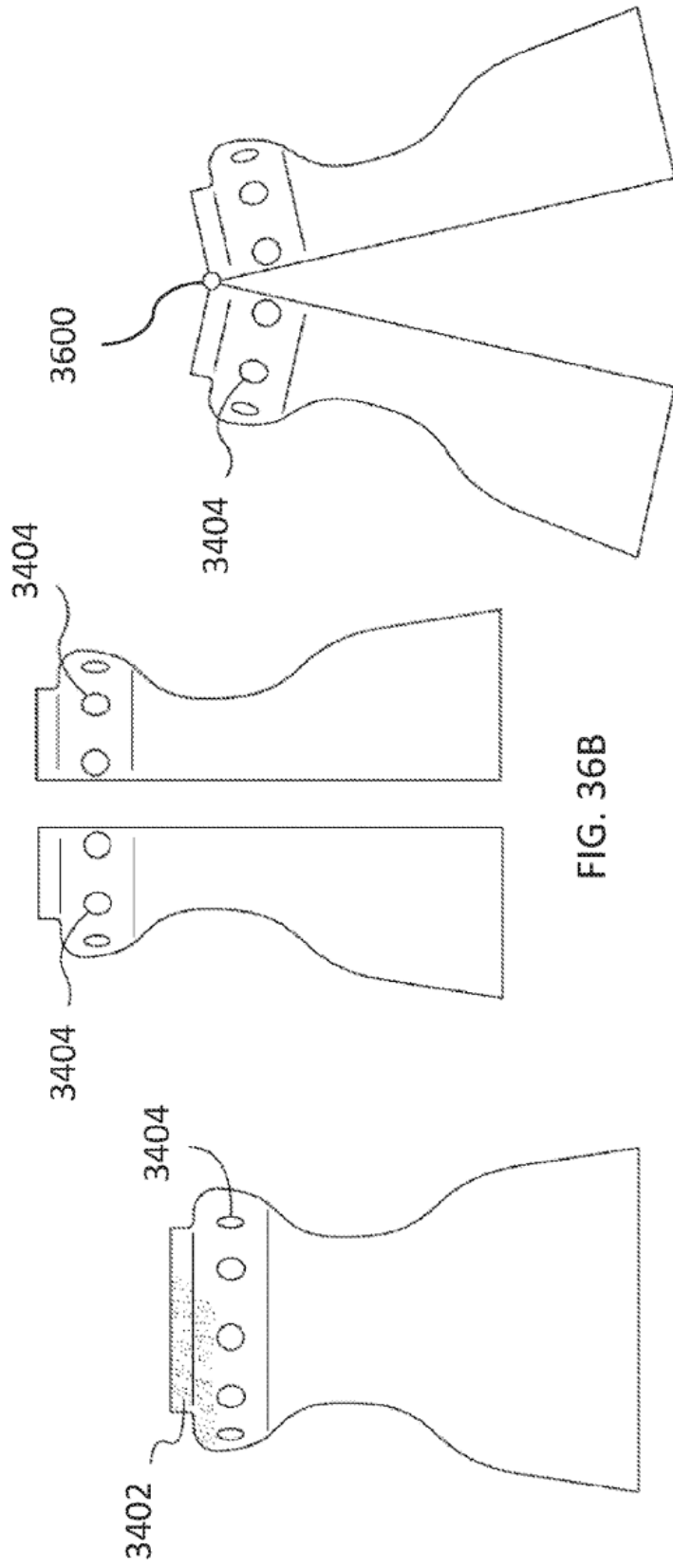


FIG. 35A



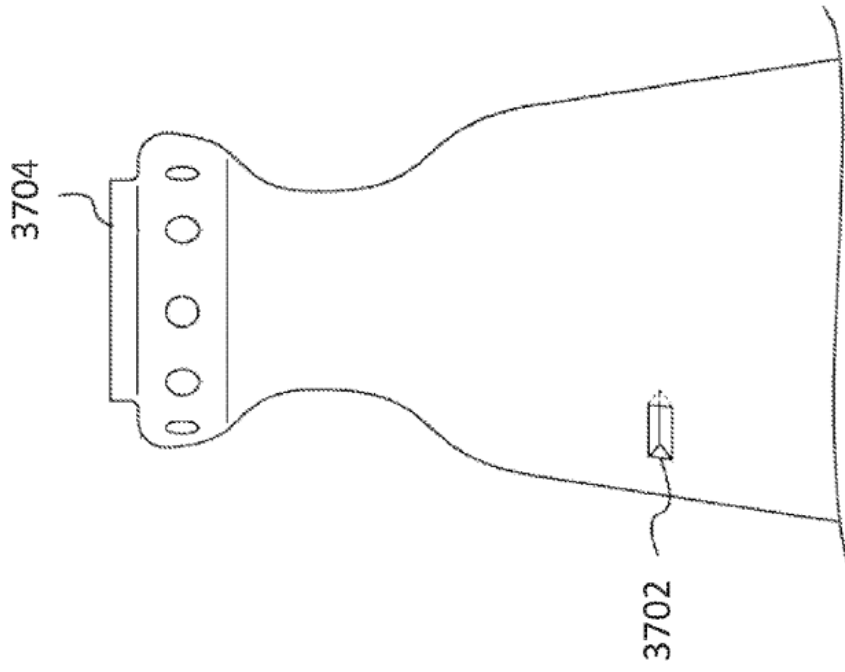


FIG. 37B

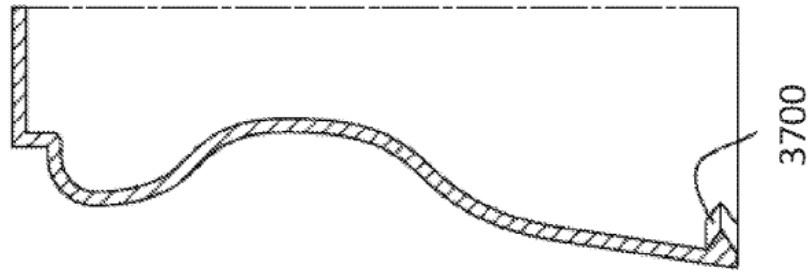


FIG. 37A

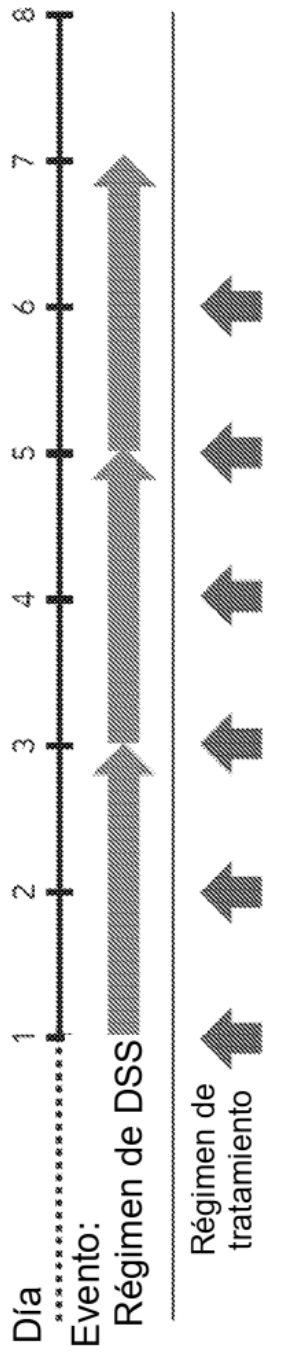


FIG. 38A

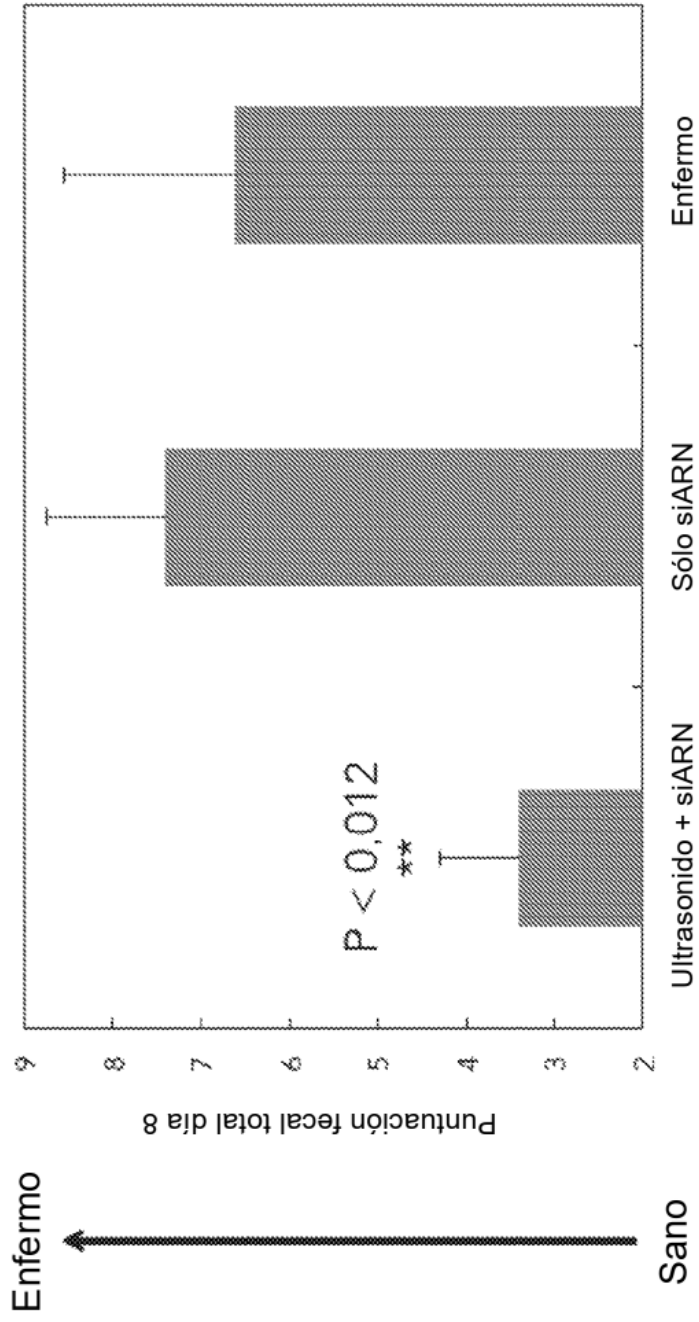


FIG. 38B

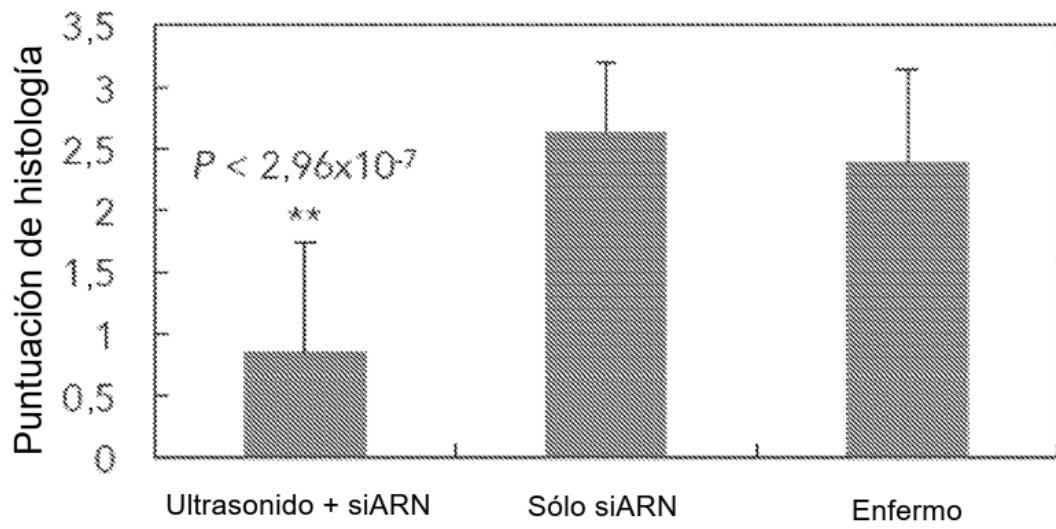


FIG. 39A

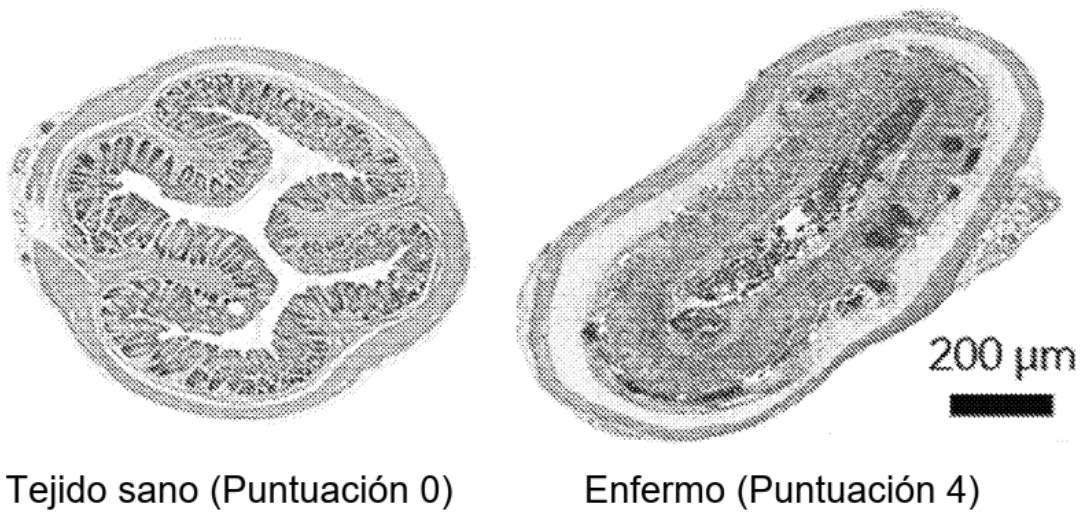


FIG. 39B

FIG. 39C

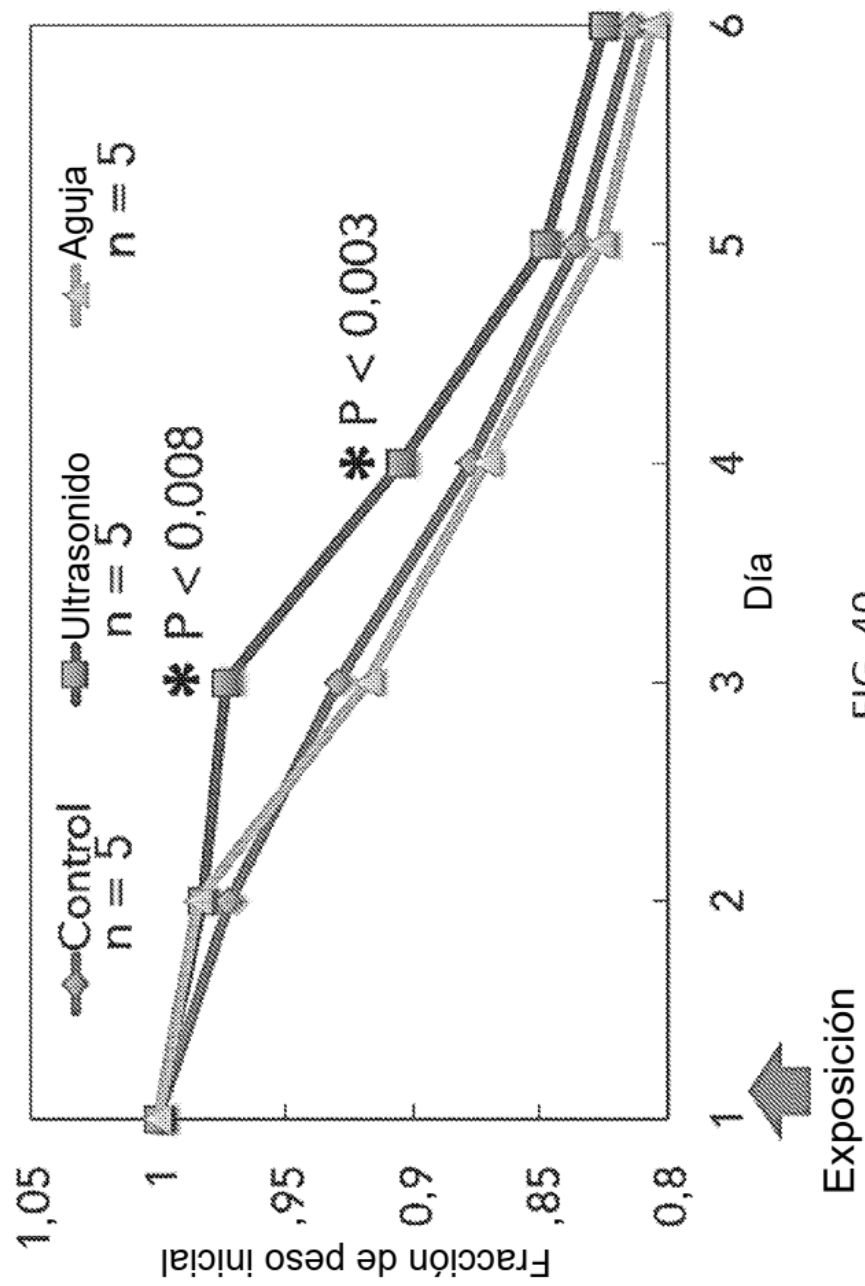


FIG. 40

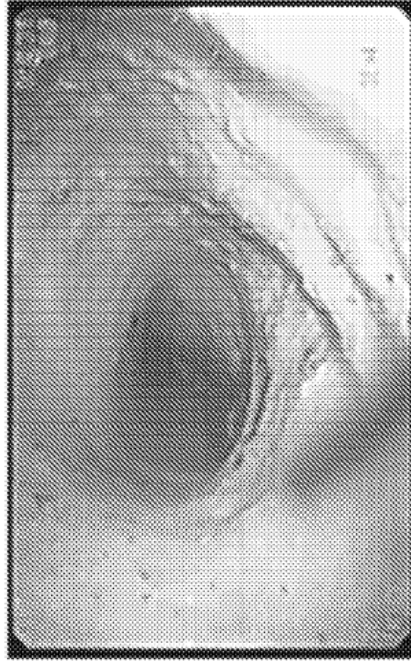


FIG. 41B



FIG. 41A

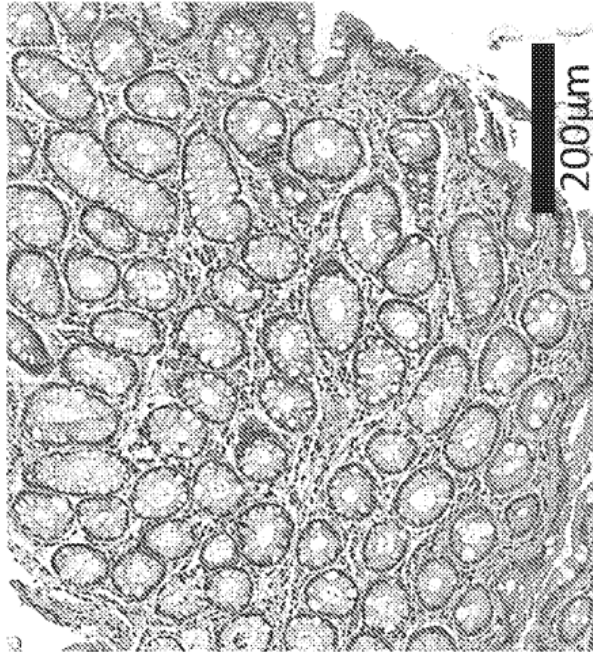


FIG. 42B

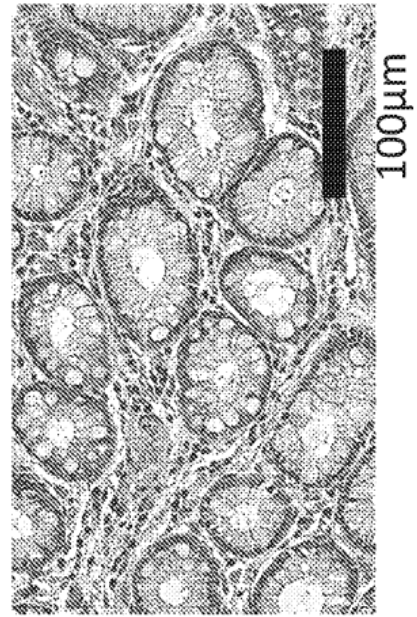


FIG. 42C

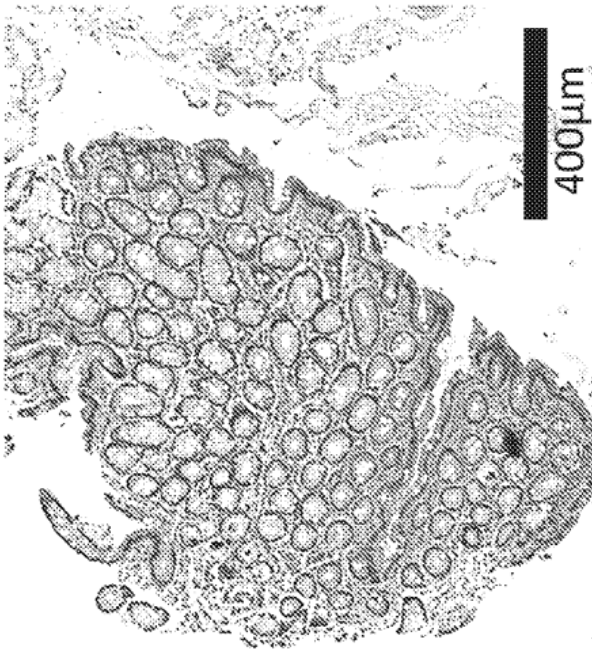


FIG. 42A

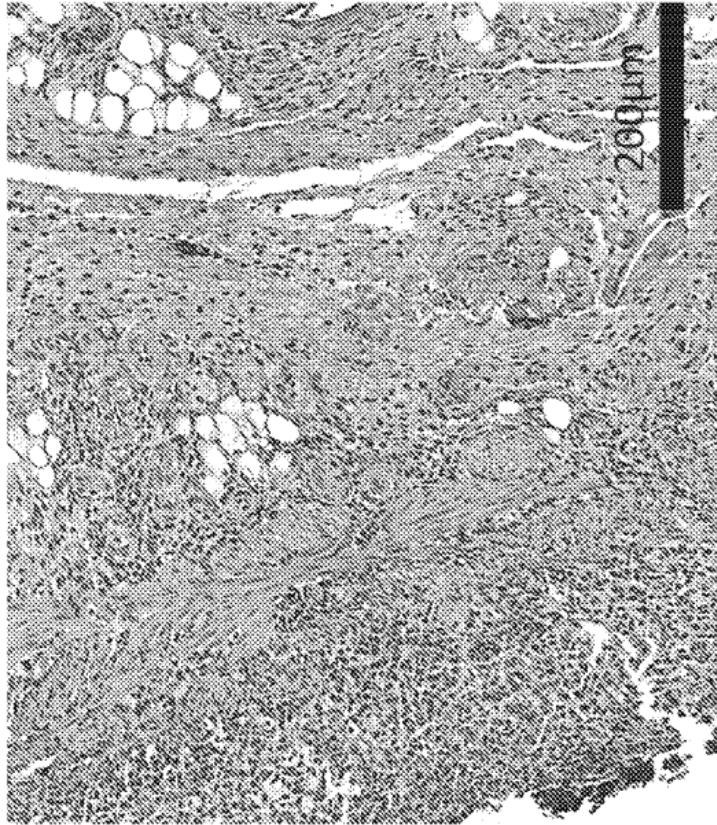


FIG. 43B

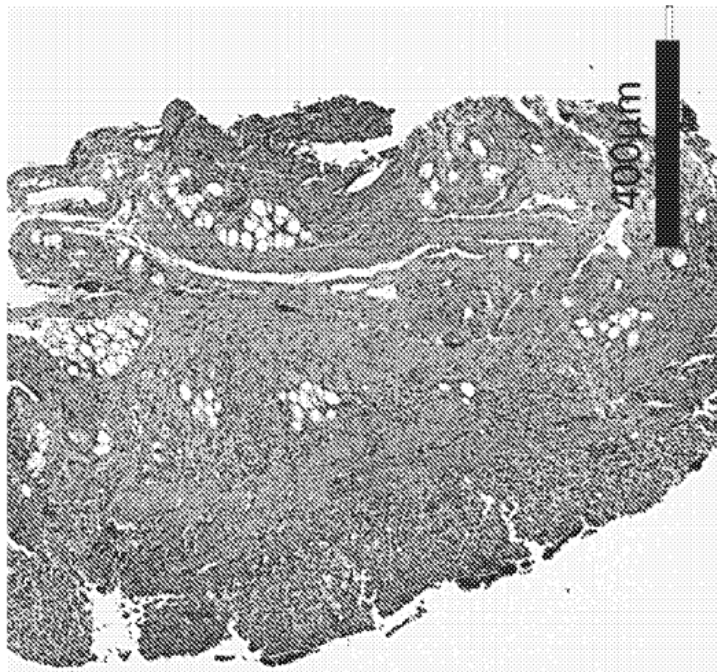


FIG. 43A

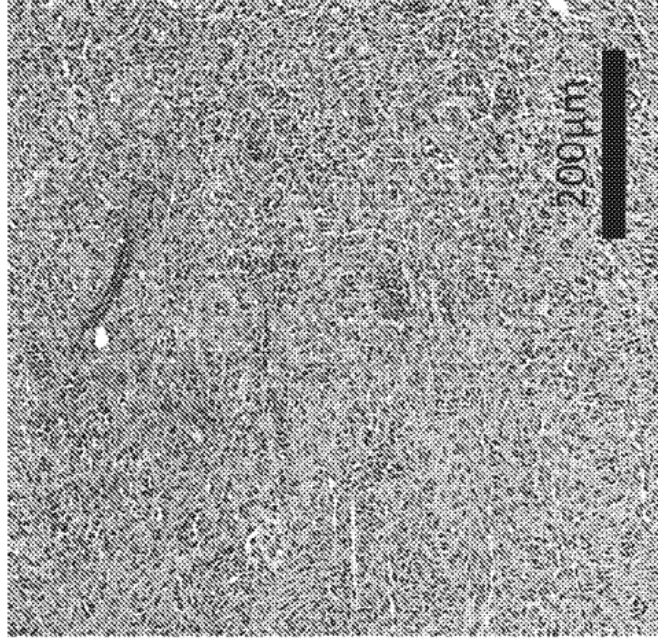


FIG. 44B

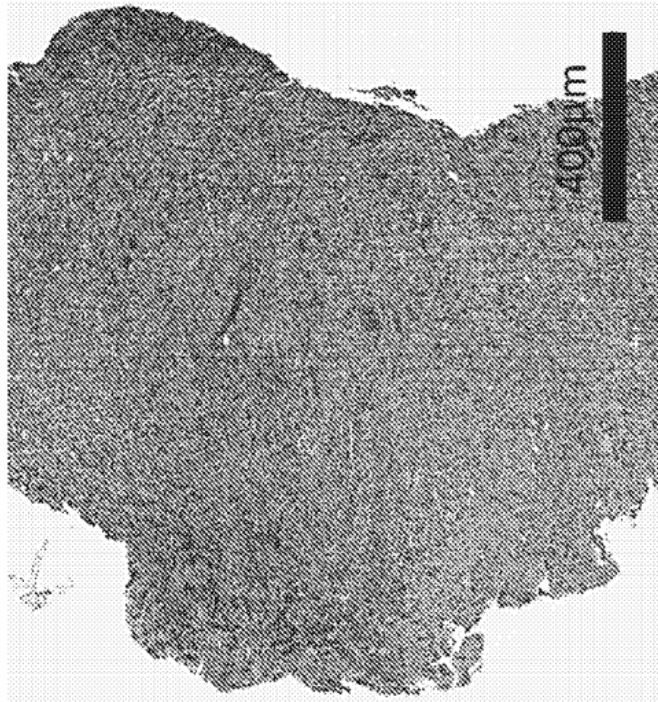


FIG. 44A

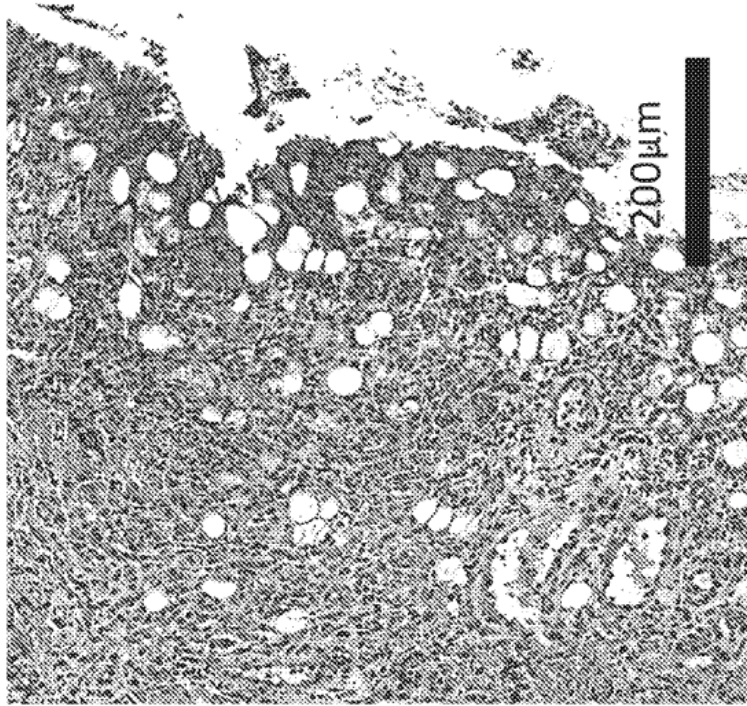


FIG. 45B

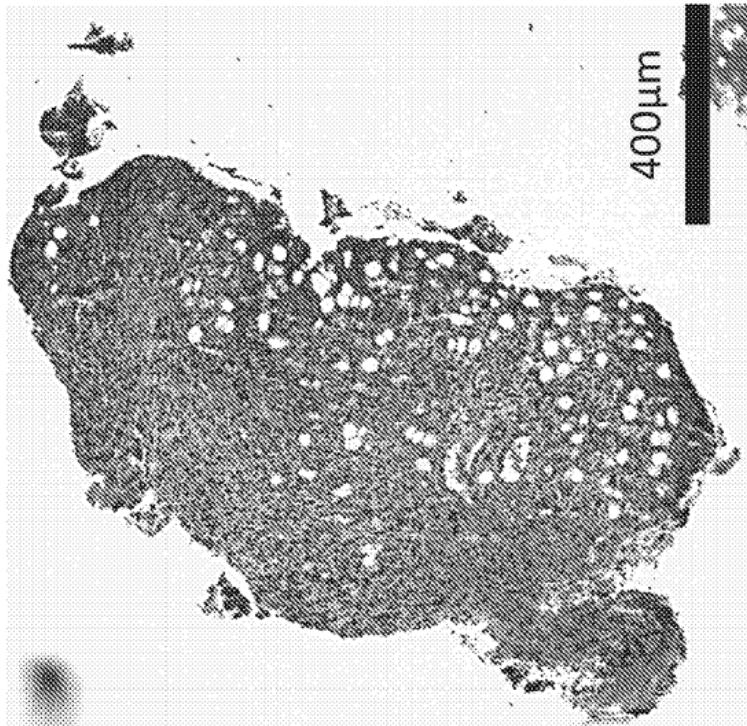


FIG. 45A

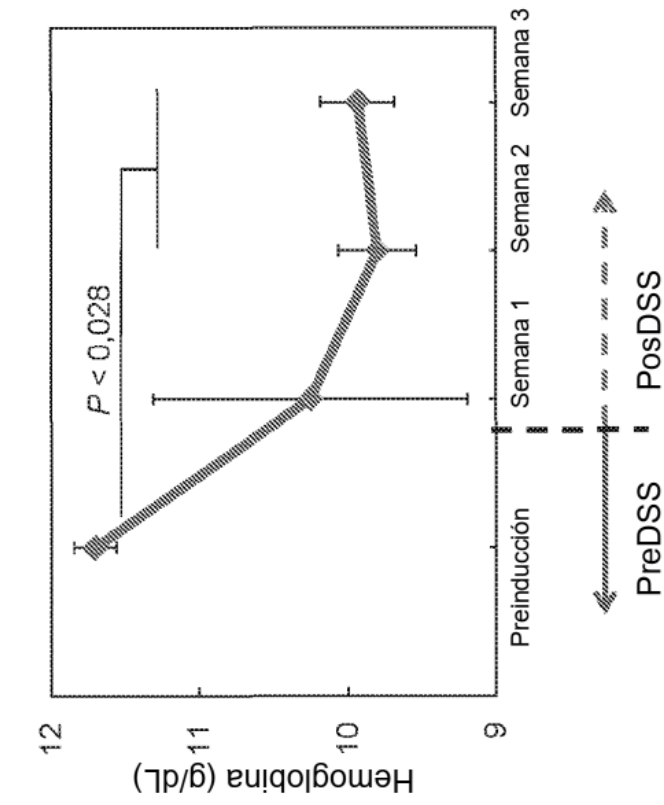


FIG. 46B

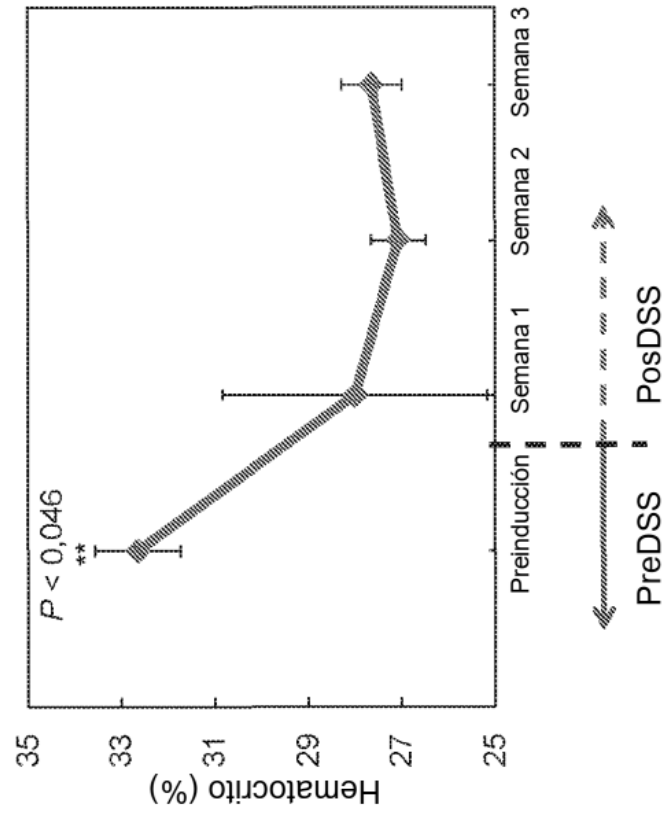


FIG. 46A