

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 947**

51 Int. Cl.:

A61B 5/026 (2006.01)

A61B 5/1455 (2006.01)

A61B 5/02 (2006.01)

A61B 5/024 (2006.01)

A61B 5/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2012 E 12727444 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2713860**

54 Título: **Un procedimiento y un sistema para evaluar la función del endotelio vascular**

30 Prioridad:

31.05.2011 PL 39507411

31.05.2011 US 201161491543 P

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

03.12.2015

73 Titular/es:

ANGIONICA SP. Z O.O. (100.0%)

ul. Zeromskiego 116

90-924 Łódź, PL

72 Inventor/es:

GEBICKI, JERZY;

MARCINEK, ANDRZEJ y

CHLOPICKI, STEFAN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 552 947 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

Un procedimiento y un sistema para evaluar la función del endotelio vascular

El campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento no invasivo para evaluar la función del endotelio vascular y un sistema para realizar dicho procedimiento.

La técnica anterior

10 El endotelio vascular es una capa celular que reviste la parte interna de los vasos sanguíneos, que incluye arterias y venas. El endotelio está actualmente considerado como un órgano autocrino/paracrino/endocrino metabólicamente activo importante que regula la función cardiovascular y mantiene la homeostasia vascular: modulando el tono vascular; regulando el transporte de soluto en componentes celulares de la pared del vaso, el crecimiento celular local y la deposición de matriz extracelular; protegiendo el vaso de las consecuencias posiblemente perjudiciales de sustancias y células que circulan en la sangre; y regulando las respuestas hemostáticas, inflamatorias y reparadoras a lesión local. Una de las principales funciones del endotelio es producir o liberar sustancias, tales como óxido nítrico (NO), que controlan el comportamiento de los vasos sanguíneos tales como sus dimensiones, elasticidad, permeabilidad y reactividad, que incluyen la capacidad para estrecharse y dilatarse. Los mediadores derivados del endotelio regulan no solo la circulación sanguínea y la elasticidad, reactividad y estructura vasculares a la permeabilidad, sino también la respuesta inflamatoria local y sistémica además de la tromborresistencia de los vasos. Mediadores endoteliales vasoprotectores tales como óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), bradiquinina (Bk), activador tisular del plasminógeno (t-PA), trombomodulina (TM) o ADP-asa ejercen acción antitrombótica, antiinflamatoria y vasoprotectora.

15 Por otra parte, la excesiva producción por el endotelio de aniones superóxido (O²⁻), isoprostanos, angiotensina II (ang II), endotelina 1 (ET-1), inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1), factor tisular (TF), factor de von Willebrandt (vWF), quimiocinas (por ejemplo, proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1), citocinas (por ejemplo, IL-6) y la expresión incrementada de moléculas de adhesión (por ejemplo, selectina P, ICAM-1) promueven la inflamación y trombosis de la pared vascular que con el tiempo puede conducir al desarrollo de lesión aterosclerótica. Por consiguiente, el endotelio sano es esencial para el funcionamiento sin alterar del sistema cardiovascular, mientras que la disfunción endotelial conduce a sus diversas patologías. En particular, la disfunción endotelial es esencial para la aterogénesis, está presente en las etapas más tempranas (por ejemplo, precediendo a evidencia angiográfica o ultrasónica de placa obstructiva), así como en etapas posteriores de enfermedad arterial, que contribuyen a secuelas clínicas relacionadas con el daño de tejido (por ejemplo, isquemia, infarto y fallo orgánico).

25 La disfunción endotelial en los términos más generales se refiere a una alteración de la capacidad de la capa de células endoteliales para producir una respuesta vasodilatadora apropiada a estímulos. Muchos estudios proporcionaron pruebas de que la disfunción endotelial (evaluada basándose en la alteración de la vasodilatación dependiente de NO) puede considerarse un factor de pronóstico para el desarrollo de acontecimientos cardiovasculares adversos. De hecho, el riesgo relativo de desenlaces adversos se eleva aproximadamente 10 veces cuando hay evidencia de disfunción endotelial coronaria o periférica.

40 Diversas afecciones, que incluyen hipercolesterolemia, hipertensión sistémica, fumar, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar, deficiencia de estrógenos, hiperhomocisteinemia y el propio proceso de envejecimiento, se han asociado a la función alterada (disfunción) de endotelio. Como resultado, la pared del vaso en estas afecciones puede promover la inflamación, oxidación de lipoproteínas, proliferación de músculo liso, deposición o lisis de matriz extracelular, acumulación de material rico en lípidos, activación de plaquetas y formación de trombos. Todas estas consecuencias de disfunción endotelial pueden contribuir al desarrollo y expresión clínica de aterosclerosis. Las posibles consecuencias de la disfunción endotelial incluyen adicionalmente constricción coronaria o dilatación inadecuada durante tensión física o mental, produciendo isquemia miocárdica; rotura de placas y trombosis, causando angina inestable o infarto de miocardio; y lesión por reperfusión después de trombólisis.

45 Se han desarrollado varios procedimientos y aparatos para la evaluación no invasiva de la salud del endotelio vascular *in vivo*.

En particular, se conocen procedimientos que se basan en monitorizar las afecciones fisiológicas o características de las arterias en la extremidad del paciente después de hiperemia reactiva.

50 La hiperemia reactiva es un fenómeno fisiológico que se produce en un paciente después del bloqueo (u oclusión) de una arteria importante. Tal bloqueo u oclusión de la arteria en la extremidad, tal como la arteria braquial, normalmente se hace inflando un manguito de tensión arterial ligeramente por encima de la presión sistólica durante un período de aproximadamente 5 minutos. La anoxia o hipoxia grave en la extremidad aguas abajo de la arteria ocluida es

normalmente un resultado de tal bloqueo. La liberación repentina del bloqueo hace que las células endoteliales reaccionen generando NO y dilatando. El fenómeno de hiperemia reactiva dura hasta 10 minutos antes de regresar a los valores de volumen de sangre anteriores a la prueba. La circulación sanguínea es una característica de la arteria y sometida a hiperemia reactiva la circulación sanguínea a través de una arteria, vena o extremidad es significativamente mayor en comparación con la circulación sanguínea normal.

Actualmente el procedimiento más popular es la dilatación mediada por flujo (DMF), una técnica no invasiva basada en monitorizar el diámetro de las arterias después de hiperemia reactiva con ultrasonidos bidimensionales y ultrasonido de Doppler. Sus resultados se correlacionan bien con la prueba endotelial coronaria invasiva así como con la presencia y gravedad de aterosclerosis coronaria. Esta técnica se describe por ejemplo en una revisión por S. Patel. y D. S. Celermajer, Pharmacological Reports 2006, 58, supl. 3-7. Sin embargo, este procedimiento es bastante caro, requiere equipo sofisticado y cirujanos altamente especializados, es altamente dependiente del cirujano y es poco reproducible debido a la variabilidad de las mediciones y a la mala resolución con respecto al tamaño arterial. Por tanto, su uso está limitado y el procedimiento no es aplicable de una manera más general.

Con el fin de evaluación de la función endotelial vascular también se han usado cambios de otros parámetros físicos en respuesta a hiperemia reactiva, tales como la temperatura de la piel de la punta de los dedos (documento WO2005118516; N. Ahmadi et al. Int. J. Cardiovasc. Imaging (2009) 25:725-738), tensión arterial en un dedo (amplitud de la onda de pulso) usando pletismografía (documentos EP1360929, EP1992282, WO00/57776, EP2110074) y tono arterial periférico (documentos WO2000/074551, WO2002/034105). La técnica no invasiva para la detección de disfunción endotelial basada en monitorizar los cambios relacionados con la circulación sanguínea en el nivel de una sustancia presente en una extremidad después de hiperemia reactiva se desvela en el documento WO03/051193. El procedimiento implica bloquear la circulación sanguínea en la extremidad para estimular la función endotelial y luego liberar el bloqueo de la circulación sanguínea para observar, medir y registrar dichos cambios en función del tiempo, siendo dichos cambios indicativos de la disfunción endotelial. Dicha sustancia puede ser una sustancia trazadora inyectada en una vena, tal como un emisor de radiación o un agente de contraste y el acceso de dicho trazador en la extremidad se detecta y mide, por ejemplo, por medio de detección de rayos gamma. Debe realizarse la medición del trazador en un par de dos extremidades lateralmente opuestas y compararse la presencia del trazador entre ambas extremidades. Alternativamente, una característica física de la extremidad, tal como la temperatura o color, o una propiedad de un producto metabólico u otro producto bioquímico que circula en la extremidad tras la liberación del bloqueo de la circulación sanguínea, tal como O₂, CO₂ o hemoglobina reducida, se mide por una técnica adecuada. Como técnicas adecuadas se han sugerido emisiones de gas a través de la superficie de la piel dentro de una célula dispuesta sobre la superficie de la piel, técnicas ópticas, tales como analizadores espectrales o detectores ópticos de transmisión/difusión, tales como el análisis hiperespectral de reflectancia en el visible y técnicas de EPR/RMN. Puede detectarse bien la tasa de aparición de una sustancia agotada o bien la desaparición (agotamiento) de un producto acumulado. Una tasa de cambio del parámetro medido poco después de la liberación de la oclusión o bloqueo se sugiere como un factor principal en determinar la disfunción endotelial. En el caso del uso de un trazador, se mide la tasa para tanto la extremidad bloqueada como la extremidad de control contra-lateral.

Se ha establecido que la disfunción endotelial es un acontecimiento temprano y factor de riesgo importante para aterosclerosis y un indicador importante para un profesional médico, permitiendo el diagnóstico temprano del riesgo de enfermedad cardiovascular.

La prueba de la función endotelial es por tanto una alternativa altamente deseable para un enfoque de diagnóstico basado en realizar un conjunto de diversas pruebas bioquímicas, especialmente en individuos aparentemente sanos, es decir, individuos que no muestran ningún signo de enfermedad cardiovascular.

Se necesita un procedimiento de prueba que permita evaluar la función y detectar cualesquiera disfunciones en una etapa temprana de la alteración con el fin de identificar pacientes para intervención profiláctica o terapéutica para mejorar la disfunción y/o para pruebas de diagnóstico mucho más detalladas y complicadas.

Existe la necesidad para proporcionar una prueba no invasiva para evaluar la función endotelial que sea fiable, fácil de llevar a cabo y barata y así aplicable para pruebas en grandes poblaciones de pacientes, por ejemplo para fines de cribado.

También existe la necesidad de una prueba simple, rápida y barata que permita monitorizar y controlar la respuesta de un paciente a un tratamiento médico de enfermedad cardiovascular.

Sumario de la invención

Una prueba tal se proporciona por la presente invención, que se refiere a un procedimiento y un sistema según se define por las reivindicaciones 1 y 9 para la evaluación no invasiva y simple de la función del endotelio vascular monitorizando la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH emitida de células de tejido de la piel sobre una extremidad superior tras la iluminación con luz UV y cambios de dicha intensidad de dicha señal de fluorescencia como una función del tiempo en

respuesta a bloquear y liberar la circulación sanguínea en la extremidad superior para producir hiperemia reactiva.

La presente invención proporciona también un sistema para evaluar la función del endotelio vascular en un sujeto humano usando dicho procedimiento.

La invención se describirá a continuación en más detalle con referencia a las figuras adjuntas del dibujo.

5 Descripción de dibujos

La Fig. 1 muestra el curso a modo de ejemplo de la intensidad registrada de la señal de fluorescencia de NADH frente al tiempo con parámetros característicos de la curva y

las Fig. 2 a 7 muestran los registros de las curvas de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH en los sujetos probados.

10 Descripción detallada de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere al procedimiento de determinación de parámetros para la evaluación de la función del endotelio vascular en un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento:

15 (a) medir y registrar en función del tiempo la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH emitida de células de tejido de la piel en una localización seleccionada sobre una extremidad superior de dicho sujeto para obtener un nivel de referencia

(b) bloquear la circulación sanguínea a la extremidad superior aguas arriba de la localización seleccionada, mientras que se continúa midiendo y registrando dicha intensidad a medida que aumenta en función del tiempo;

(c) liberar el bloqueo de la circulación sanguínea mientras que se continúa midiendo y registrando dicha intensidad a medida que cambia en función del tiempo hasta que se obtiene un estado estacionario; y

20 (d) determinar parámetros indicativos de la función endotelial a partir del curso de cambios de dicha intensidad.

Se mide y registra la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH emitida de células de tejido de la piel en una localización seleccionada sobre la extremidad superior, tal como sobre el antebrazo, la mano o un dedo. En una realización preferida, la localización seleccionada es el antebrazo o la mano, tal como el lado dorsal o palmar de la mano (reverso de la palma o interior de la palma).

25 Se apreciará por un experto que la señal de fluorescencia de NADH se emite por NADH celular tras la iluminación con y absorción de luz UV por el tejido.

También se apreciará por un experto que la señal de fluorescencia de NADH se medirá en la localización aguas abajo del bloqueo de la circulación sanguínea en la extremidad. En otras palabras, la circulación sanguínea se bloqueará y se liberará aguas arriba del sitio de medición y monitorización de la fluorescencia de NADH.

30 La longitud de onda de la luz de excitación estará en el intervalo de UV absorbido por NADH, es decir, 300 a 400, preferentemente 315 a 400, más preferentemente 340-360 nm, lo más preferentemente 350 ± 5 nm.

La longitud de onda de la luz de fluorescencia estará en el intervalo emitido por NADH después de la absorción de luz de excitación, es decir, 420 a 480 nm, preferentemente 450-470 nm, lo más preferentemente 460 ± 5 nm.

35 Por tanto, el procedimiento de la invención comprende iluminación de una localización seleccionada sobre la extremidad superior del sujeto, tal como sobre un antebrazo, la mano o un dedo, preferentemente el antebrazo o la mano, con luz UV y medición y registro continuos de la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH emitida y sus cambios en función del tiempo en una pluralidad de puntos en el tiempo antes, durante y después de bloquear la circulación sanguínea y luego liberar el bloqueo de la circulación sanguínea aguas arriba de dicha localización seleccionada para producir hiperemia reactiva. Luego, los parámetros o datos indicativos de la función endotelial se determinan a partir de dichos cambios.

40 La monitorización de la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH en el procedimiento de la invención normalmente se realiza del siguiente modo.

En la etapa (a), la medición y registro de dicha intensidad de la señal de fluorescencia de NADH se realiza durante un primer periodo de tiempo antes de bloquear la circulación sanguínea para obtener un nivel de referencia.

45 Dicha medición y registro en dicho primer periodo de tiempo en la etapa (a) dura lo suficiente para registrar un nivel de referencia estacionario del nivel de intensidad de fluorescencia.

Usualmente, es suficiente registrar un nivel de referencia durante un periodo de hasta 1 a 2 minutos, normalmente durante aproximadamente 2 minutos. Se apreciará por un experto que dependiendo de las circunstancias puede requerirse más tiempo para obtener un nivel de referencia estacionario, tal como hasta 3 minutos, hasta 4 minutos o hasta 5 minutos.

5 Luego, después de obtener un nivel de referencia, en la etapa (b) la circulación sanguínea en la extremidad superior se bloquea, como se describe anteriormente, mientras que la medición y el registro de la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH se continúa durante un segundo periodo de tiempo, segundo periodo durante el cual la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH aumenta para alcanzar su nivel máximo. En algunos sujetos, tras alcanzarse el nivel máximo la intensidad puede estabilizarse adicionalmente en este nivel durante un cierto tiempo. Usualmente, este segundo periodo de tiempo en la etapa (b) dura hasta 5 minutos, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 minutos.

10 Posteriormente, en la etapa (c) se libera el bloqueo de la circulación sanguínea y la medición y el registro se continúan durante un tercer periodo de tiempo tras liberarse el bloqueo de la circulación sanguínea, tercer periodo durante el cual la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH disminuye desde su nivel máximo alcanzado en la etapa (b) hasta alcanzar el nivel mínimo y aumenta desde dicho nivel mínimo de nuevo hasta que se obtiene un nuevo nivel estacionario de dicho nivel de fluorescencia. Este nuevo nivel estacionario se corresponde esencialmente con el nivel de referencia inicial determinado en la etapa (a) antes del bloqueo de la circulación sanguínea. Usualmente, este tercer periodo de tiempo dura hasta 15 minutos, tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 minutos, preferentemente 2 a 7 minutos.

15 Así, el periodo de tiempo completo de medición y registro normalmente es hasta 25 minutos, normalmente hasta 20 minutos.

20 El procedimiento de la invención requiere bloquear la circulación sanguínea en la extremidad superior por medio de oclusión de una arteria, tal como la arteria braquial. Se apreciará que para el fin de la presente memoria descriptiva el término "bloqueo" se refiere al bloqueo mecánico aplicado externamente a la extremidad de un sujeto y tiene el mismo significado que el término "oclusión" y ambos términos pueden usarse indistintamente entre sí.

25 Se entenderá que liberando el bloqueo de la circulación sanguínea se restaura la circulación sanguínea en la vasculatura de la extremidad superior. Así, los términos "liberar la circulación sanguínea" y "liberar el bloqueo de la circulación sanguínea" tienen el mismo significado y se refieren a la restauración de la circulación sanguínea después de la oclusión de una arteria por medio de liberación del medio mecánico que bloquea el flujo.

En el procedimiento de la invención, dichos bloqueo y liberación del bloqueo de la circulación sanguínea pueden obtenerse ventajosamente apretando y liberando, respectivamente, un medio de restricción alrededor de dicha extremidad superior.

30 Preferentemente, tales apriete y liberación se realizan alrededor de la arteria braquial en la extremidad superior (brazo).

Dicho medio de restricción puede ser cualquier medio capaz de apriete alrededor de la extremidad, tal como un aro o banda de apriete.

Preferentemente, sin embargo, dicho medio de restricción es un medio de restricción inflable, lo más preferentemente un manguito de presión inflable, tal como un manguito de esfigmomanómetro.

35 Preferentemente, dicho manguito de presión inflable, tal como un manguito de esfigmomanómetro, se infla a presión por encima de la presión sistólica del sujeto que se somete a examen, tal como 50 mm por encima de la presión sistólica.

En una realización del procedimiento de la invención la liberación del medio de apriete alrededor de la extremidad se hará rápidamente (velozmente) y preferentemente se hará automáticamente.

En una realización la medición se realizará sobre un antebrazo o un lado dorsal o palmar de una mano del sujeto.

40 Otro objetivo de la presente invención es un sistema para realizar la evaluación de la función del endotelio vascular en un sujeto humano según el procedimiento de la invención según se define anteriormente.

45 El sistema de la invención comprende un medio para iluminar una piel de la extremidad superior de dicho sujeto con la luz de excitación en el intervalo de 300 a 400 nm, un medio para detectar y medir la intensidad de señal de fluorescencia de dicha piel, un medio para medir y registrar cambios de intensidad de dicha señal de fluorescencia en función del tiempo, así como medio de restricción para bloquear y liberar la circulación sanguínea en la extremidad superior de dicho sujeto.

Técnicas de obtención, detección, medición y registro de la señal de fluorescencia de NADH de células de tejido (fluorimetría de NADH) se conocen bien en la técnica y puede usarse cualquier aparato o sistema de fluorímetro convencional para realizar el procedimiento de la invención.

Dichos medios para iluminar, detectar, medir, registrar y representar como se mencionan anteriormente pueden integrarse

en un fluorímetro tal.

Generalmente, el aparato o sistema de fluorímetro debe estar al menos equipado con:

- una fuente de luz de excitación capaz de emitir luz UV en el intervalo absorbido por NADH, es decir, en el intervalo de longitud de onda de 300 a 400 nm;
- 5 - una sonda para colocarse en la localización seleccionada próxima a la piel del sujeto, con una guía de luz capaz de conducir la señal de la luz de excitación de la fuente de luz a la localización seleccionada;
- un colector de fluorescencia para recibir una fluorescencia emitida de dicho tejido;
- un detector de señal de fluorescencia al menos en el intervalo emitido por NADH, es decir, en el intervalo de longitud de onda de 400 a 600 nm;
- 10 - una unidad de procesamiento de señales; y
- una unidad de registro/representación para registrar una curva de fluorescencia.

Generalmente, hay una gran flexibilidad en la configuración del aparato, a condición de que estén incluidos todos los elementos esenciales enumerados anteriormente.

- 15 Pueden usarse fuentes convencionales de luz de excitación conocidas en la técnica, que incluyen lámpara espectral filtrada tal como lámpara de mercurio o de xenón, diodo emisor de luz LED, diodo láser o láser pulsado. Una fuente ventajosa es el diodo emisor de luz LED.

Puede usarse cualquier guía de luz convencional para conducir la luz de excitación y para recogerla, tal como fibras ópticas, opcionalmente en una carcasa flexible.

- 20 La sonda con la guía de luz se colocará próxima a la piel, bien en contacto directo con la piel o bien en estrecha proximidad con la piel.

En una realización, la medición se realizará sobre un antebrazo o el lado palmar de una mano y la guía de luz se conducirá al soporte para colocar la mano o a la banda fijada sobre la mano.

En otra realización, la medición se realizará sobre el lado dorsal de una mano colocada sobre un soporte, tal como un trípode y una guía de luz rígida se fijará sobre la mano.

- 25 En otra realización, la medición se realizará sobre un dedo, por medio de una copa, un aro o un manguito en el extremo de la guía de luz, apretándose dicha copa, aro o manguito alrededor del dedo dependiendo del tamaño del último.

En otra realización más la medición se realizará en una manera de múltiples puntos. Por ejemplo, varias guías de luz pueden conducirse a la banda montada alrededor de un antebrazo o un dedo.

- 30 Pueden usarse detectores convencionales, tales como detector de fotodiodos, detector de fotodiodos rápidos, tubo fotomultiplicador, etc.

Pueden usarse unidades que registran unidades de procesamiento de señales típicas conocidas en la técnica para representar la curva de intensidad de la fluorescencia de NADH.

- 35 Se sabe que la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), encontrada en todas las células existentes y que desempeña una función esencial en el metabolismo como co-enzima en reacciones rédox, en su forma reducida es decir NADH, absorbe luz UV en casi el área entera del espectro de UVA en el intervalo de 300 a 400 nm y en respuesta a iluminación con luz UV emite luz de fluorescencia en el intervalo de 400 a 600 nm, con un pico a aproximadamente 480 nm. La intensidad de la fluorescencia de NADH es proporcional a la concentración de NADH mitocondrial. Este fenómeno es la base de la técnica de diagnóstico de la función mitocondrial (es decir producción de energía) y vitalidad de tejidos u órganos *in vivo* por medición en tiempo real y monitorización de la fluorescencia mitocondrial de NADH, en combinación
- 40 con el examen de otros parámetros adicionales, dependiendo del órgano monitorizado seleccionado. Cuando la monitorización de la función mitocondrial se realiza en un órgano perfundido con sangre *in vivo*, la señal de fluorescencia de NADH está afectada por cambios del volumen de sangre tisulares. Estos artefactos hemodinámicos tienen que eliminarse de la señal de fluorescencia medida usando la señal de reflectancia del tejido iluminado, que depende de los cambios en el volumen de sangre y algoritmos adecuados. El procedimiento y un dispositivo-fluorímetro/reflectómetro para tal monitorización se describen por ejemplo en el documento WO/2002/024048 y en A. Mayevsky et al., J. of Biomedical Optics 9(5), 1028-1045 (2004).
- 45

Sin la intención de estar limitados por consideraciones teóricas, se cree que en el procedimiento de la invención, en

ausencia de influencia de factores físicos, la intensidad de la fluorescencia de NADH emitida *in vivo* de células de tejido de la piel es proporcional a la concentración de NADH mitocondrial (la forma reducida). Cualquier cambio en el estado redox del sistema NAD^+/NADH causado por el cambio del suministro de oxígeno se reflejará en la intensidad de la fluorescencia emitida.

- 5 La disminución en el suministro de oxígeno con la sangre al tejido debido al bloqueo de la circulación sanguínea en la vasculatura por oclusión de la arteria desplaza el equilibrio redox hacia un estado más reducido, produciendo esto el aumento del nivel medido de intensidad de la fluorescencia de NADH hasta el nuevo equilibrio por encima del nivel de referencia inicial. La liberación del bloqueo del flujo produce rápido aumento en el suministro de oxígeno con sangre a las células y un desplazamiento del equilibrio redox hacia un estado menos reducido, disminuyendo así el nivel medido de
10 intensidad de la fluorescencia de NADH. La fluorescencia de NADH puede disminuir inicialmente por debajo del nivel de referencia y luego aumentar de nuevo para alcanzar el equilibrio y volver a un estado estacionario correspondiente esencialmente al nivel de referencia inicial de fluorescencia.

15 En el procedimiento de la invención, la intensidad inicial de la fluorescencia en el estado estacionario (nivel de referencia) varía de un individuo a otro y puede depender hasta un cierto grado de factores tales como el ajuste del sistema de medición (especialmente una sonda) a la extremidad, el estado y color de la piel, etc. y es una referencia para observaciones adicionales en la misma persona. Pueden usarse diferencias en la fluorescencia del nivel de referencia para la calibración del procedimiento para la comparación de los resultados obtenidos para diferentes pacientes.

20 Como la intensidad del nivel de referencia de la señal de fluorescencia se mide en unidades relativas, relacionadas con el aparato, que pueden depender de factores tales como por ejemplo la intensidad de la luz de excitación, la eficiencia de una guía de luz, la geometría de la medición, es comparable para el mismo aparato y pacientes diferentes. Pueden usarse diferencias en la fluorescencia del nivel de referencia para la calibración de mediciones para diferentes aparatos o tras la modificación técnica del sistema.

25 El regreso del nivel de fluorescencia al estado estacionario que se corresponde esencialmente con el nivel de referencia inicial observado durante la prueba según el procedimiento de la invención no solo se debe al regreso de procesos metabólicos celulares al equilibrio inicial, ya que tal equilibrio de procesos metabólicos se alcanza en un tiempo mucho más corto inferior a un minuto. Inesperada y sorprendentemente, el periodo de tiempo del proceso observado en el procedimiento de la invención es más largo y depende principalmente de cambios físicos conectados con el aumento de la circulación sanguínea y después restauración del equilibrio original.

30 El periodo de tiempo y la tasa de retorno del nivel de fluorescencia después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c) al estado estacionario que se corresponde esencialmente con el nivel de referencia inicial de la etapa (a) son medidas de la respuesta del sistema vascular y de la capacidad del endotelio de realizar su función de constricción y dilatación y permiten evaluar el funcionamiento del endotelio.

35 La semivida del aumento de la intensidad de nivel de señal de fluorescencia después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c) desde su nivel mínimo hasta el estado estacionario muestra la cinética del proceso del retorno al estado estacionario y es una medida adicional de la función endotelial.

Por tanto, los siguientes parámetros de la curva intensidad frente al tiempo, como se muestran en la Fig. 1, son indicadores del funcionamiento del endotelio vascular, es decir su tendencia a limitarse y dilatarse apropiadamente en respuesta a diversos estímulos:

- 40 - la diferencia ΔI entre el nivel máximo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH tras el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (b) y el nivel mínimo de intensidad de la fluorescencia de NADH después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c);
- la diferencia ΔI_1 entre la intensidad del nivel de referencia de la señal de fluorescencia de NADH en la etapa a) antes de bloquear la circulación sanguínea y el nivel máximo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH en la etapa (b) tras dicho bloqueo;
- 45 - la diferencia ΔI_2 entre el nivel mínimo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH y su nivel en el estado estacionario después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c);
- el periodo de tiempo (t_g) desde la liberación del bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c) hasta el retorno de la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH al nivel estacionario en la etapa (c), que se corresponde esencialmente con el nivel de referencia de la etapa (a) antes de bloquear la circulación sanguínea;
- 50 - la semivida ($t_{1/2}$) requerida para aumentar la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH desde su valor mínimo después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c) la mitad de la diferencia (ΔI_2) según se define anteriormente, es decir la diferencia entre el nivel mínimo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH y su nivel en el estado estacionario después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c).

La invención se describirá en más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

5 Se midieron la fluorescencia de NADH de células de la piel de la mano de un sujeto humano y los cambios de intensidad de esta fluorescencia que acompañan a la oclusión de la arteria braquial y liberación de la circulación sanguínea. No se examinó la salud del sujeto.

La medición se realizó usando el espectrofotómetro de fluorescencia Carry Eclipse equipado con una lámpara de destellos de xenón, un sistema de fibra óptica con una sonda adecuada para medir la emisión de la superficie de un sólido y un detector de PMT.

10 La longitud de onda de la luz de excitación era 350 nm y la longitud de onda de la señal de emisión monitorizada era 460 nm.

La intensidad de una señal de fluorescencia del lado dorsal de la palma del sujeto entre el pulgar y el dedo índice (dedo "señalador") se registró durante 2 minutos (primer periodo de tiempo), tiempo durante el cual se alcanzó un estado estacionario que se corresponde con el nivel de referencia inicial.

15 Después de 2 minutos la circulación sanguínea en la arteria braquial de la misma mano se bloqueó inflando y apretando el manguito de esfigmomanómetro inflable alrededor del brazo del sujeto por encima de la presión sistólica durante un segundo periodo de tiempo -periodo de oclusión.

La medición de la intensidad de la señal de fluorescencia se continuó durante otro periodo de 4 minutos (segundo periodo de tiempo -periodo de oclusión), durante el cual el aumento de la señal de fluorescencia se observó a partir del punto en el tiempo de apretar el manguito.

20 Después de 4 minutos el manguito de esfigmomanómetro se liberó rápidamente desinflando y la medición de la intensidad de la señal de fluorescencia se continuó durante otro periodo de 14 minutos (tercer periodo de tiempo). La rápida disminución de la señal de fluorescencia al nivel mínimo se observó primero tras la liberación del manguito, seguida del aumento gradual de la señal hasta el estado estacionario que se corresponde esencialmente con el nivel del nivel de referencia inicial registrado en el primer periodo.

25 La Fig. 1 muestra el curso de la curva de intensidad de la señal de fluorescencia registrado durante la medición descrita anteriormente y la determinación de parámetros de la curva característicos para la función del endotelio vascular.

Se midieron los valores de los parámetros ΔI , ΔI_1 y ΔI_2 según se definen anteriormente.

Además, se determinaron el periodo de tiempo t_g y la semivida $t_{1/2}$ según se definen anteriormente a partir de la representación de la curva.

30 Del mismo modo que se ha descrito anteriormente, se realizaron mediciones para:

- un no fumador, de 27 años de edad, con el registro de la curva de fluorescencia mostrada en la Fig. 2;
- un no fumador, de 71 años de edad, con el registro de la curva de fluorescencia mostrada en la Fig. 3;
- un no fumador, de 32 años de edad, con el registro de la curva de fluorescencia mostrada en la Fig. 4;
- un fumador, de 26 años de edad, con el registro de la señal de fluorescencia mostrada en la Fig. 5;
- 35 - un no fumador, de 28 años de edad, con el registro de la señal de fluorescencia mostrada en la Fig. 6; y
- un fumador, de 53 años de edad, con el registro de la señal de fluorescencia mostrada en la Fig. 7.

Como puede observarse, los registros de las curvas de intensidad se diferencian entre pacientes.

40 El registro de la curva para una persona de edad (Fig. 3), con una disminución muy pequeña después de la oclusión de la circulación sanguínea (diferencia entre el nivel de referencia y el valor de intensidad mínimo) y tasa de retorno muy lenta al estado estacionario después de la liberación de la oclusión, muestra mal funcionamiento del endotelio vascular.

Los registros para fumadores (Figs. 5 y 7), con pequeñas tasas de retorno al estado estacionario, muestran funcionamiento alterado del endotelio vascular.

45 Los registros de dos pacientes no fumadores mostrados en las Fig. 4 y 6 muestran diferencias en el funcionamiento del endotelio vascular, con mayor tasa de retorno para un paciente de la Fig. 5 que muestra mejor funcionamiento del endotelio vascular en comparación con el paciente de la Fig. 3, con tasa de retorno más pequeña.

Por tanto, el funcionamiento del endotelio vascular puede compararse entre paciente fumador y paciente no fumador de edad similar: el paciente fumador de 26 años de edad de la Fig. 5 muestra una tasa de retorno más pequeña al estado estacionario y así peor funcionamiento del endotelio vascular en comparación con el paciente no fumador de 28 años de edad de la Fig. 6.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento no invasivo para la determinación de parámetros para la evaluación de la función del endotelio vascular en un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) medir y registrar en función del tiempo la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH emitida de células de tejido de la piel en una localización seleccionada sobre una extremidad superior de dicho sujeto para obtener un nivel de referencia;
 - (b) bloquear la circulación sanguínea en una arteria a la extremidad superior aguas arriba de la localización seleccionada, mientras que se continúa midiendo y registrando dicha intensidad a medida que aumenta en función del tiempo;
 - (c) liberar el bloqueo de la circulación sanguínea mientras que se continúa midiendo y registrando dicha intensidad a medida que cambia en función del tiempo hasta que se obtiene un estado estacionario; y
 - (d) determinar parámetros indicativos de la función endotelial a partir del curso de cambios de dicha intensidad midiendo la diferencia ΔI entre el nivel máximo de la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH tras el bloqueo de la circulación sanguínea y el nivel mínimo de la intensidad de la fluorescencia de NADH después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c);
- 5 y en el que dicha señal de fluorescencia de NADH se emite tras la iluminación con y absorción de luz de excitación UV.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende determinar la diferencia ΔI_1 entre la intensidad del nivel de referencia de la señal de fluorescencia de NADH en la etapa (a) antes de bloquear la circulación sanguínea y el nivel máximo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH tras dicho bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (b).
- 20 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende determinar la diferencia ΔI_2 entre el nivel mínimo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH y el estado estacionario de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c).
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende determinar la semivida $t_{1/2}$ requerida para aumentar la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH desde su nivel mínimo después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c) por medio de la mitad de la diferencia ΔI_2 entre el nivel mínimo y el estado estacionario de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea.
- 25 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende determinar el tiempo t_g entre liberar el bloqueo de la circulación sanguínea y alcanzar el estado estacionario de la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH en la etapa (c).
- 30 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicho bloqueo y liberación de la circulación sanguínea se obtiene apretando y liberando, respectivamente, un medio de restricción alrededor de dicha extremidad superior.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicho medio de restricción es un medio de restricción inflable.
- 35 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que dicha fluorescencia de NADH se obtiene por iluminación de dicha extremidad superior con la luz de excitación en el intervalo de longitud de onda de 300 a 400 nm y dicha señal de fluorescencia de NADH se mide en el intervalo de longitud de onda de 420 a 480 nm.
9. Un sistema para la evaluación de la función del endotelio vascular en un sujeto humano, comprendiendo dicho sistema un medio para la iluminación de un tejido de piel de una extremidad superior de dicho sujeto con luz de excitación UV, un medio para medir la intensidad de señal de fluorescencia emitida de la piel tras la iluminación con y la absorción de luz de excitación UV, procesamiento y registro de cambios de dicha intensidad de la señal de fluorescencia con el tiempo y un medio de restricción para bloquear y liberar la circulación sanguínea en una arteria en la extremidad superior de dicho sujeto,
- 40 y caracterizado porque el sistema está configurado para realizar las siguientes etapas:
 - (a) medir y registrar en función del tiempo la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH emitida de células de tejido de la piel en una localización seleccionada sobre una extremidad superior de dicho sujeto para obtener un nivel de referencia;
 - (b) bloquear la circulación sanguínea en una arteria a la extremidad superior aguas arriba de la localización seleccionada,
- 45

mientras que se continúa midiendo y registrando dicha intensidad a medida que aumenta en función del tiempo;

(c) liberar el bloqueo de la circulación sanguínea mientras que se continúa midiendo y registrando dicha intensidad a medida que cambia en función del tiempo hasta que se obtiene un estado estacionario; y

5 (d) determinar parámetros indicativos de la función endotelial a partir del curso de cambios de dicha intensidad midiendo la diferencia ΔI entre el nivel máximo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH tras el bloqueo de la circulación sanguínea y el nivel mínimo de intensidad de la fluorescencia de NADH después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c).

10. El sistema de la reivindicación 9 en el que dicha luz de excitación tiene la longitud de onda en el intervalo de 300 a 400 nm y dicha fluorescencia de NADH se mide en el intervalo de longitud de onda de 420 a 480 nm.

10 11. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 en el que el medio de restricción es un medio de restricción inflable.

15 12. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en el que se determina la diferencia ΔI_1 entre la intensidad del nivel de referencia de la señal de fluorescencia de NADH en la etapa (a) antes de bloquear la circulación sanguínea y el nivel máximo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH tras dicho bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c).

13. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en el que se determina la diferencia ΔI_2 entre el nivel mínimo de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH y el estado estacionario de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c).

20 14. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 en el que se determina la semivida $t_{1/2}$ requerida para aumentar la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH desde su nivel mínimo después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea en la etapa (c) por medio de la mitad de la diferencia ΔI_2 entre el nivel mínimo y el estado estacionario de intensidad de la señal de fluorescencia de NADH después de liberar el bloqueo de la circulación sanguínea.

25 15. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14 en el que se determina el tiempo t_g entre liberar el bloqueo de la circulación sanguínea y alcanzar el estado estacionario de la intensidad de la señal de fluorescencia de NADH en la etapa (c).

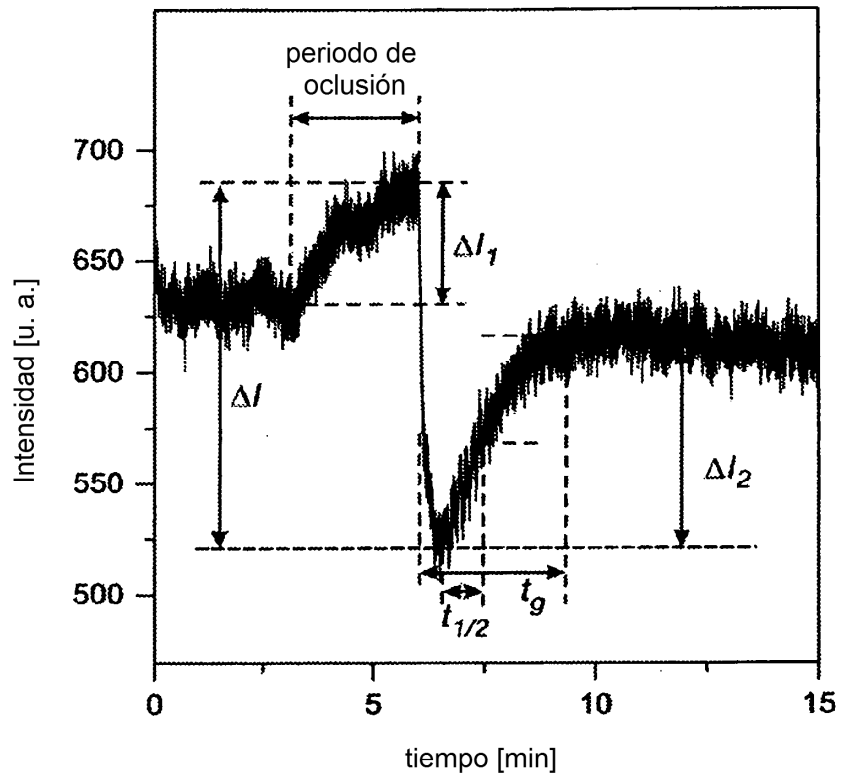


Fig. 1

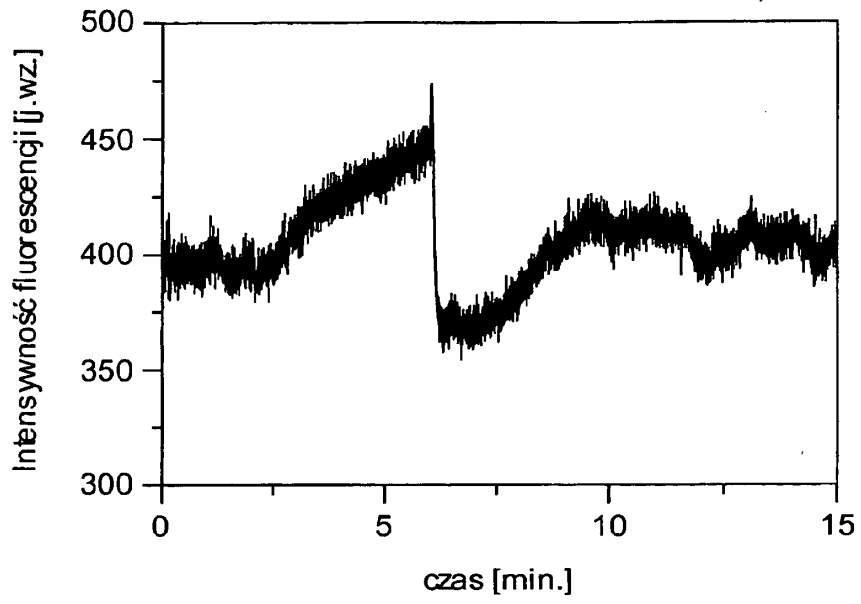


Fig. 2

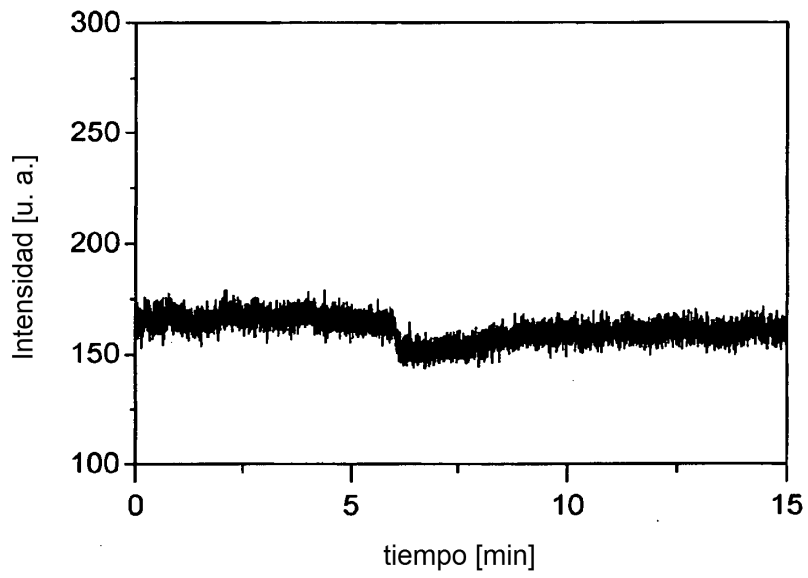


Fig. 3

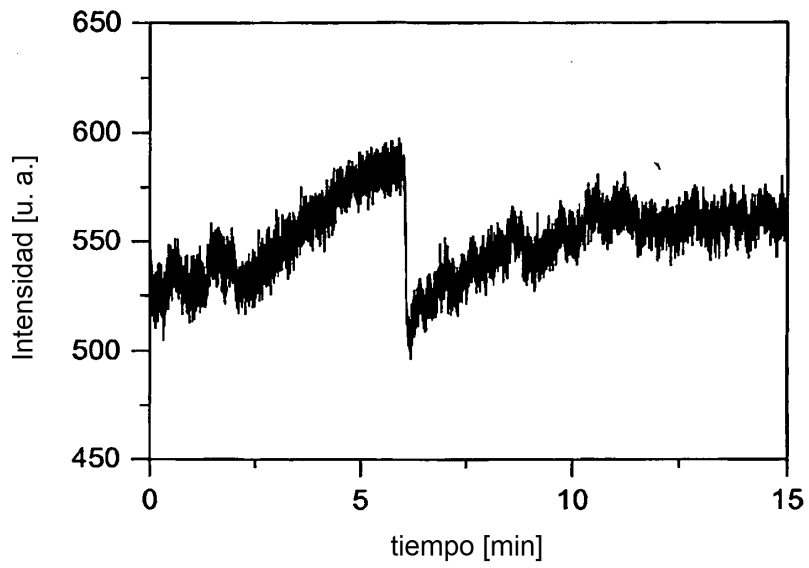


Fig. 4

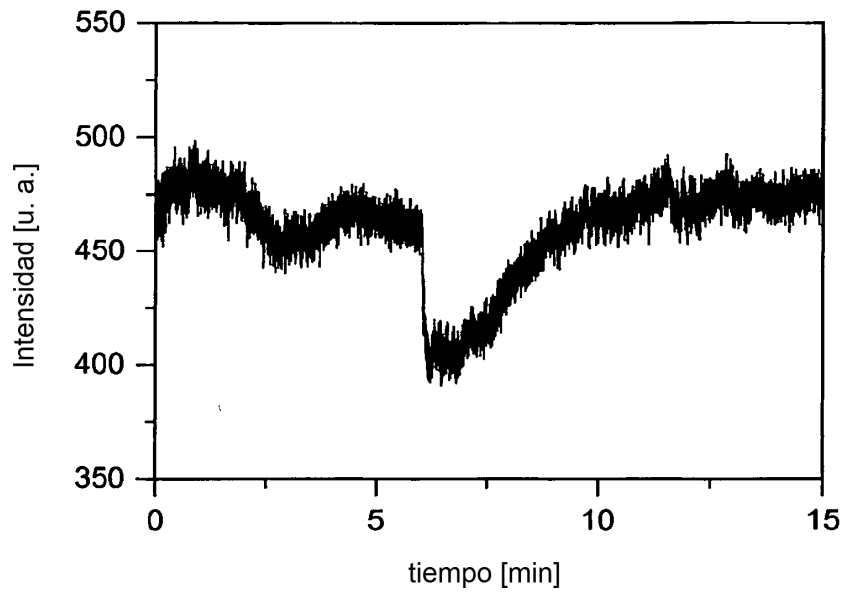


Fig. 5

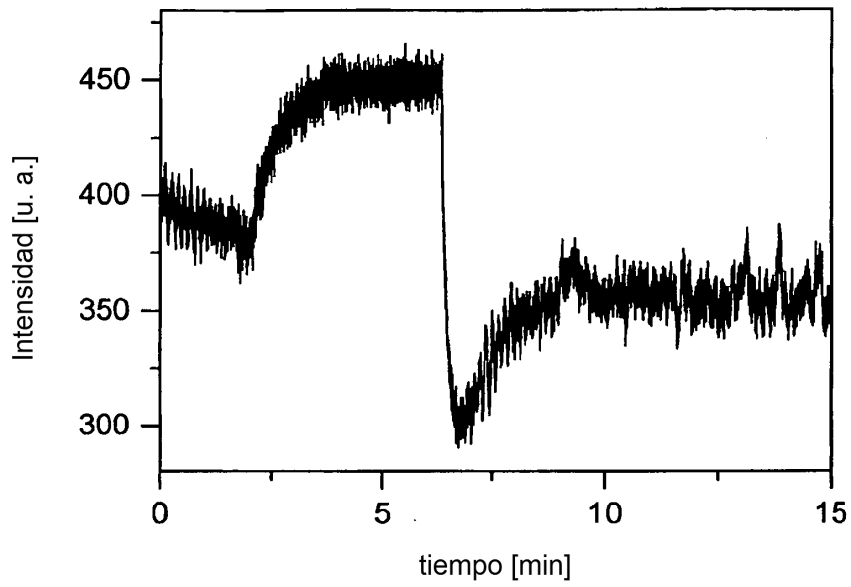


Fig. 6

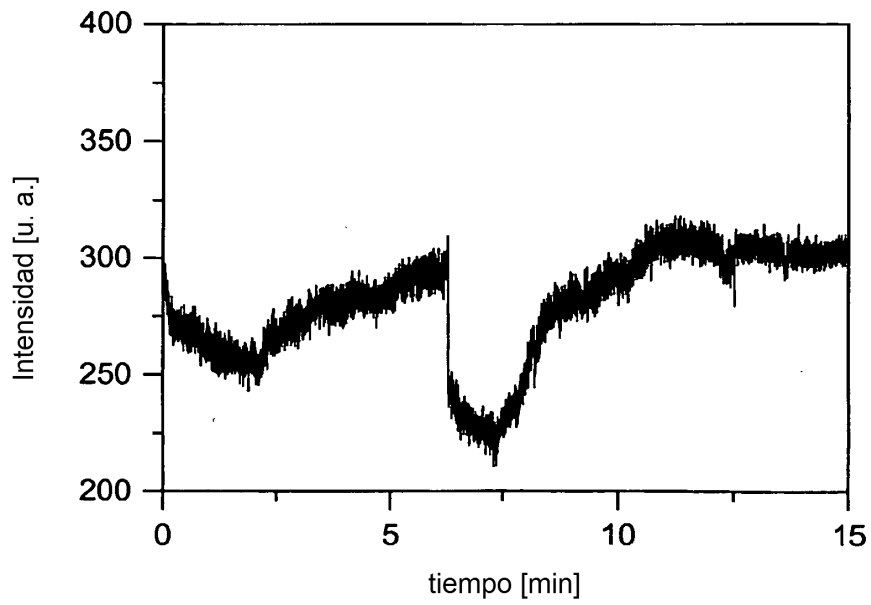


Fig. 7