

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 785**

51 Int. Cl.:

A61F 9/008

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2001** **E 10000476 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017** **EP 2210575**

54 Título: **Fotocoagulación selectiva**

30 Prioridad:

01.06.2000 US 209010 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.06.2017

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL 55
FRUIT STREET
BOSTON, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

LIN, CHARLES P.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 620 785 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

Fotocoagulación selectiva

Campo de la invención

- 5 La presente invención versa acerca de procedimientos y dispositivos *ex vivo* útiles en técnicas quirúrgicas con láser. Más en particular, la invención versa acerca de procedimientos *ex vivo* de determinación de puntos finales terapéuticos y de prevención de daños colaterales en técnicas quirúrgicas con láser.

Antecedentes

- 10 La cirugía láser se ha convertido en una técnica generalmente útil, que requiere unas técnicas y un equipo especializados. La cirugía láser está indicada en el tratamiento de muchas enfermedades oculares. Por ejemplo, se utilizan láseres para tratar complicaciones oculares de la diabetes. Para pacientes con glaucoma, los láseres ayudan a controlar la presión dentro del ojo cuando las medicaciones por sí solas no tienen éxito. Los láseres se utilizan para sellar agujeros en la retina, y evitar o tratar desprendimientos de retina. La degeneración macular es otra afección en la que los láseres a veces ayudan a evitar la pérdida de visión. La cirugía láser también se utiliza después de una cirugía de cataratas para mejorar la visión, si es necesario.
- 15 El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una capa unicelular situada en la parte trasera del ojo detrás de una capa neuroretinal sensible, con una gran densidad de pigmento que puede ser objetivo de la irradiación láser. La cirugía láser de la retina se puede clasificar en técnicas que dependen del daño térmico a la capa neuroretinal (tal como la soldadura de la retina), y las que, de forma deseable, no implican daño a la capa neuroretinal (tal como un tratamiento de fotocoagulación de retinopatía serosa central, de edema macular diabético, y de drusas).
- 20 La fotocoagulación convencional por láser de la retina se lleva a cabo con impulsos largos (del orden desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 500 ms) generados por un láser de onda continua, con la mayoría de la energía absorbida por el EPR. La difusión térmica durante la larga exposición al impulso láser tiene como resultado una zona relativamente grande de daño térmico, lo que provoca un daño irreversible inducido de forma térmica no solo de las células del EPR, sino también de los fotorreceptores y de los coriocapilares, lo que produce escotomas (puntos ciegos) en las áreas tratadas.
- 25 La fotocoagulación selectiva del EPR es un enfoque terapéutico desarrollado recientemente que utiliza impulsos cortos (microsegundo) de láser para, idealmente, hacer diana en las células del epitelio pigmentario de la retina mientras que no afecta a los fotorreceptores adyacentes en la retina, como se describe en la patente U.S. nº 5.302.259 otorgada a Birngruber, y en la patente U.S. nº 5.549.596 otorgada a Latina. Estos procedimientos de tratamiento no producen puntos ciegos, como lo hace la fotocoagulación convencional por láser. De hecho, este tratamiento no produce ningún cambio visible en el fondo durante el tratamiento. Sin embargo, los clínicos tienen que depender de la angiografía fluoresceínica postquirúrgica para determinar si se ha alcanzado el punto final del tratamiento, un tratamiento que requiere aproximadamente una hora y es incómodo para el paciente.
- 30 En la patente U.S. 4.758.081 se describen otros tratamientos con información de retorno midiendo la radiación no de Rayleigh producida por un objetivo.
- 35

Sumario

- 40 La invención está definida por las reivindicaciones y es consecuencia del descubrimiento de que se puede utilizar la detección de microburbujas en las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) formadas tras la absorción de radiación láser por impulsos por las células del EPR para inhibir o evitar el daño térmico y mecánico a las células próximas a las que están sometidas a un tratamiento por láser. Por lo tanto, la invención permite un control sustancialmente instantáneo sobre la dosimetría del láser para garantizar que la energía del láser alcanza el umbral requerido para matar (un punto final terapéutico) las células del EPR, pero evita la administración de energías láser suficientes como para dañar las células adyacentes, tal como fotorreceptores (control del daño colateral).
- 45 Según se utiliza en el presente documento, "microcavitación" hace referencia a la formación repentina y al colapso de microburbujas en un líquido, eventos que son provocados principalmente por la absorción de luz por los cromóforos en el líquido. Este término también se aplica a las burbujas formadas de forma transitoria por medio de un calentamiento local. El término no requiere necesariamente que existan cambios de presión.
- 50 A no ser que se definan, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que comprende habitualmente una persona con un nivel normal de dominio de la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica o en el ensayo de la presente invención se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, los procedimientos y los ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

La presente invención permite que se lleve a cabo una fotocoagulación selectiva sin la necesidad de una

determinación postquirúrgica inconveniente de un punto final terapéutico. La presente invención permite la fotocoagulación de las células del EPR sin complicaciones y la destrucción del tejido que puede producirse con la cirugía láser convencional de la retina. La presente invención proporciona un aparato que está adecuado específicamente a la determinación de un punto final terapéutico en tiempo real, y a la información de retorno en base a esta determinación para minimizar el daño colateral que puede surgir del daño mecánico y térmico asociado con las terapias de fotocoagulación.

Serán evidentes otras características y ventajas de la invención a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un esquema de un sistema representativo de cirugía láser conforme a una realización particular de la invención.

La Fig. 2 es un trazo osciloscópico de reflectividad con respecto al tiempo.

Descripción detallada

La presente invención está basada en la medición óptica del inicio de la cavitación inducida por láser y objeto de información de retorno a la fuente láser o al operador para controlar la energía láser suministrada en base a la medición. La absorción de la energía láser por los cromóforos (especialmente los melanosomas) en las células, o próxima a ellas, produce burbujas transitorias de microcavitación (vidas del orden de nanosegundos a microsegundos) con diámetros del orden de micrómetros. Las burbujas surgen dado que la excitación por láser de los cromóforos puede producir rápidamente un calentamiento local en el entorno inmediato de los cromóforos. Se ha observado que el calentamiento local puede ser lo suficientemente intenso como para vaporizar una capa delgada de líquido en contacto estrecho con los cromóforos. La detección de la presencia de microburbujas es una forma de determinar la cantidad de calentamiento provocado por la energía láser. La microcavitación provoca un cambio temporal y medible en la reflectividad de las células que están siendo irradiadas. Se utiliza este cambio para ajustar la energía de la fuente de láser y minimizar de ese modo el daño a las células próximas que no están expuestas, de forma deseable, a las mismas energías láser utilizadas para causar la fotocoagulación o las energías térmicas que pueden matar aquellas células próximas.

La fotocoagulación selectiva del EPR con la información de retorno de la presente invención proporciona resultados terapéuticos útiles. Aunque no se está limitado por ninguna teoría en particular de funcionamiento, se cree que la muerte selectiva de células enfermas del EPR puede estimular que las células colindantes del EPR proliferen y formen una nueva capa celular del EPR que sea debidamente funcional para sustituir las muertas por la fotocoagulación selectiva. Por lo tanto, la fotocoagulación selectiva del EPR puede servir como un procedimiento de tratamiento para enfermedades que se cree que están asociadas con el EPR, tal como retinopatía serosa central, edema macular diabético y drusas.

Con referencia a la Fig. 1, se muestra un sistema representativo de cirugía láser. La fuente 10 de láser de tratamiento envía un haz 12 de láser de tratamiento a un divisor 14 de haz dicróico. El divisor 14 de haz dicróico está adaptado para permitir la transmitancia del haz 12 de tratamiento. El haz 12 de tratamiento está enfocado por medio de la lente 22 de enfoque para que incida en el espejo 24 que dirige el haz 12 de tratamiento a través de la lente 26 de contacto al ojo 28. Se puede utilizar un explorador 64 por barrido para barrer de forma controlada la radiación electromagnética en las células del ojo 28. La posición del explorador 64 por barrido es variable, y se proporciona un ejemplo ilustrativo de una posición en la Fig. 1. Un láser opcional 30 de sonda produce un haz 32 de sonda, que está dirigido al divisor 34 de haz de polarización, dirigiendo el haz 32 de sonda hacia la placa 36 de cuarto de onda. El haz 32 de sonda incide en el divisor 14 de haz dicróico, que está adaptado para reflejar el haz 32 de sonda a lo largo de sustancialmente el mismo recorrido que el haz 12 de tratamiento. Se refleja el haz 32 de sonda de nuevo a lo largo del mismo recorrido y una fracción del haz 32 de sonda pasa a través del filtro 34 de polarización, a través de la lente 38 de enfoque, y al detector 40. El láser y el haz de sonda son opcionales. El interior del ojo 28 está iluminado por medio de una lámpara 42 de ranura. El detector 40 envía una señal 44 de detección al discriminador 46 para la determinación de la presencia del pico 48 de la señal. La determinación de la presencia del pico 48 de la señal lleva a que se envíe la señal 50 al convertidor 52 que bien envía la señal 54 a la fuente 10 de láser inmediatamente, o bien almacena el valor actual de energía láser de tratamiento y conforme a valor multiplicador introducido en el convertidor, envía la señal 54 a la fuente 10 de láser cuando la energía láser de tratamiento alcanza un valor igual al valor actual de energía láser de tratamiento más alguna fracción de ese valor, determinado por el valor multiplicador. La señal 54 puede ser una señal de fin de rampa, o puede ser una señal para introducir en el controlador 62, para modular la radiación electromagnética.

En algunas realizaciones, se puede introducir el interferómetro 60 entre el ojo 28 y el detector 40. En dichas realizaciones, el haz 32 de sonda (de forma alternativa, el haz 12 de láser de tratamiento) está dividido, de forma que una primera porción del haz incide en el ojo 28, y una segunda porción del haz incide en el interferómetro 60. La posición del interferómetro 60 es variable, y en la Fig. 1 se muestra un ejemplo ilustrativo de una posición. El detector 40 opera para detectar una interferencia entre estas porciones del haz, por ejemplo, interferencias de frecuencia o de intensidad.

Fuente de láser de tratamiento

La fuente de láser de tratamiento proporciona un haz de tratamiento que tiene las siguientes características. Se escoge la longitud de onda de la luz (es decir, la energía de la luz) del haz de tratamiento para que sea absorbida de forma selectiva por el tejido objetivo. La longitud de onda de la fuente de luz se encuentra, de forma deseable, en el espectro de absorción del cromóforo presente en la célula o en el grupo de células, o próximo al mismo, que va a ser tratado. Por ejemplo, se puede utilizar un láser de tratamiento que produce luz visible en la práctica de la invención. Generalmente, la luz visible es luz que tiene una longitud de onda desde aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 800 nm. Para las células del epitelio pigmentario de la retina, las longitudes de onda preferentes para el haz de tratamiento varían desde aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 600 nm, por ejemplo, desde aproximadamente 450 nm hasta aproximadamente 550 nm.

Para otros procedimientos médicos que pueden beneficiarse de la fotocoagulación selectiva, tal como un tratamiento de tejido neural por medio de cirugía láser, se pueden utilizar otros láseres. Por ejemplo, si se suministra material cromofórico como negro de lámpara, u otro material absorbente de luz láser en, o limitado, a la superficie de células tumorales u otras células que deben ser muertas, la longitud de onda del láser podría ser una fuente de luz de mayor longitud de onda adaptada al material cromofórico. Se puede suministrar el cromóforo para ser absorbido en una célula, o puede estar limitado a la superficie de la célula, por ejemplo, por medio de anticuerpos o por medio de enlaces covalentes o iónicos. Los cromóforos que pueden ser utilizados en la práctica de la invención pueden ser cualesquiera que produzcan suficiente calor tras una irradiación de láser como para crear microburbujas, por ejemplo, melanina, negro de humo, oro, óxido de hierro y otros cromóforos de fototerapia láser conocidos por los expertos en la técnica.

Se puede absorber directamente la luz de longitud de onda significativamente más corta que la luz visible por medio de una amplia variedad de proteínas, nucleótidos, y muchos otros materiales celulares que tienden a ser distribuidos por todas las células en general. Por lo tanto, un haz de tratamiento de una longitud de onda mucho más corta que 400 nm, por ejemplo, inferior a 360 nm, no tiende a afectar de forma selectiva a las células que contienen cromóforos de la luz visible, y por lo tanto se deberían evitar. Además, los cromóforos del EPR no absorben con particular intensidad un haz de tratamiento de longitud de onda significativamente más larga que la luz visible, y por lo tanto penetra más profundamente en la coroides, creando de eficazmente un reservorio de calor más grueso bajo los fotorreceptores. Este reservorio de calor más grueso tarda más en enfriarse (dado que el tiempo de enfriamiento aumenta según el cuadrado del grosor de la capa), y libera más energía al tejido adyacente. Por lo tanto, es más probable que los fotorreceptores sean dañados con un haz de tratamiento con una longitud de onda cercana a la radiación infrarroja, incluso si se acorta la duración del impulso.

Se puede utilizar un láser que produce luz por impulsos en los nuevos procedimientos. Por ejemplo, son deseables los impulsos de anchuras de impulso inferiores a aproximadamente 10 microsegundos (μ s), por ejemplo menos de aproximadamente 5 μ s, 1 μ s, 100 nanosegundos (ns), 1 ns o 100 picosegundos (ps). La anchura del impulso (es decir, la duración del impulso) de láser está escogida para ser lo suficientemente corta que se minimice la conducción térmica alejándose del tejido absorbente hacia el tejido circundante.

De forma alternativa, se puede utilizar un láser que produce luz continua. En tales realizaciones, se puede "segmentar" la luz continua, por ejemplo, por medio de un modulador optoacústico, que produce luz por impulsos. Tal segmentador puede estar colocado inmediatamente delante de la fuente de láser, de forma que produzca la misma luz "segmentada" tanto en fracciones pasantes como reflejadas del haz.

En algunas realizaciones, la energía del láser se suministra a áreas particulares del tejido, incluso hasta el límite de las células individuales, como un tren de impulsos cortos. Cada impulso en el tren no contiene suficiente energía para provocar una disrupción mecánica, pero el efecto de todos los impulsos cortos crea de forma acumulativa un daño térmico selectivo en el EPR. Dichos trenes se caracterizan, en parte, por una tasa de repetición. En procedimientos particulares de tratamiento del tejido dentro del ojo, la tasa de repetición es deseablemente lo suficientemente grande como para que se suministre el tren de impulsos al tejido en menos de aproximadamente 1 segundo, de forma que se puedan minimizar los efectos del movimiento del ojo. Por otra parte, de forma deseable, la tasa de repetición no es tan elevada como para que sea sustancialmente equivalente a la excitación de onda continua, que puede producir efectos de calentamiento en el tejido grueso. La tasa de repetición varía desde aproximadamente 10 Hz hasta aproximadamente 5000 Hz, por ejemplo, desde aproximadamente 50 Hz hasta aproximadamente 2000 Hz, o desde aproximadamente 100 Hz hasta aproximadamente 1000 Hz.

En la fotocoagulación tradicional, con anchuras de impulsos desde aproximadamente 50 a 500 ms, la interacción de láser-tejido está bien descrita por procedimientos térmicos; la absorción de energía luminica por el EPR está acompañada de una difusión térmica alejada de la capa absorbente hacia el tejido adyacente, produciendo una zona de daño térmico que es visible bajo exploración oftalmoscópica como una lesión coagulada en la retina. Este procedimiento térmico se sigue utilizando para anchuras de impulso de hasta el intervalo inferior al milisegundo. Por otra parte, para anchuras más cortas de impulsos (ns y ps), muy poca difusión térmica puede tener lugar en la escala de tiempo del impulso de láser. La energía del láser está depositada de forma selectiva en los gránulos de melanina en el EPR, lo que crea una situación en la que la distribución de temperatura en la célula es muy desigual.

Se crean puntos calientes diferenciados en la célula, en los gránulos que absorben energía, mientras que el resto de la célula experimenta poco calentamiento. La difusión térmica crea un equilibrio de temperatura en la escala de tiempo de microsegundos después del impulso de láser (para un melanosoma de aproximadamente 1 μm , la relajación térmica tiene lugar en aproximadamente 1 μs). La temperatura media de toda la célula después de la relajación térmica es mucho menor que los picos iniciales de temperatura creados tras la excitación. Solo se observa la muerte del EPR cuando la fluencia del láser supera un umbral para iniciar una formación de burbujas de cavitación microscópica dentro de las células del EPR. No parece que el calentamiento transitorio por sí solo por debajo de la formación de burbujas dé lugar a una muerte de células.

Las microburbujas se originan en la vaporización explosiva de una capa delgada (inferior a aproximadamente 0,1 μm) de fluido que rodea las partículas calentadas individuales. Se observa el crecimiento explosivo de las microburbujas en menos de un nanosegundo después de que se hayan irradiado las partículas con un impulso de láser de 30 picosegundos, pero las burbujas no son estables. Después de una expansión inicial hasta un diámetro máximo de unos pocos micrómetros, las burbujas se colapsan con una vida de aproximadamente 0,1 a 1 microsegundo, dependiendo de la vida de la fluencia. Para fluencias de hasta unas pocas veces el umbral de microcavitación, las burbujas coalescentes se pueden formar a partir de burbujas individuales, y pueden colapsarse completamente en la célula, es decir, no se explota la célula por medio de la microexplosión. La célula retiene su forma con poco cambio aparente en morfología. La microcavitación inducida por láser se describe en general en Kelly et al., "Microcavitation and cell injury in RPE cells following short-pulsed laser irradiation", Proc. SPIE 2975 (1997), y en Lin et al., "Selective Cell Killing by Microparticle Absorption of Pulsed Laser Radiation", IEEE J. Sel. Topics Quantum Elect., Vol. 5, nº 4, julio/agosto de 1999, pp. 963-8.

A fluencias del láser de aproximadamente cinco veces el umbral de cavitación, las células irradiadas experimentan una expansión notable que no revienta las células, sino que las dilata severamente. A fluencias más bajas, las burbujas son más pequeñas, y la morfología de las células cambia muy poco después del colapso de las burbujas. Los melanosomas individuales también experimentan una cavitación de forma similar. Después del colapso de las burbujas, los melanosomas pueden permanecer intactos.

Se puede producir un tren de impulsos con respecto a áreas particulares de tejido al utilizar un láser de onda continua y barriendo rápidamente el haz sobre el área de tejido, de forma que se expone cada célula del EPR de forma efectiva únicamente a un impulso corto, tal como un impulso de un microsegundo. Los impulsos únicos pueden producir una perturbación mecánica no deseada de las células o del tejido que están siendo tratados. Se puede obtener la anchura del impulso y la tasa de repetición deseados al establecer de forma apropiada la velocidad de barrido (píxeles/segundo) y el intervalo de barrido. Los intervalos de barrido pueden ser cualquier dimensión inferior a aproximadamente 1000 $\mu\text{m} \times$ aproximadamente 1000 μm , por ejemplo aproximadamente 300 $\mu\text{m} \times$ aproximadamente 300 μm . Los campos de barrido no necesitan ser cuadrados, pero pueden ser rectangulares, o cualquier forma conveniente para barrer. Las líneas del barrido no necesitan ser contiguas. Las líneas del barrido separadas pueden minimizar adicionalmente la acumulación térmica en el tejido grueso. Las dimensiones exactas dependerán de la óptica particular utilizada en el equipo quirúrgico, como podrán reconocer y optimizar los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, se barre el haz de láser por medio de un deflector optoacústico, que puede desviar un láser de onda continua. El láser de onda continua puede permanecer "activado" esencialmente el 100% del tiempo. Se puede definir la metodología de barrido por medio de parámetros de velocidad del barrido y del ángulo de barrido. La velocidad útil de barrido puede variar desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 μs por píxel, por ejemplo, desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 7 μs por píxel, o desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 μs por píxel. El ángulo de barrido puede variar desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 5 grados, por ejemplo, desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2 grados.

El barrido se puede llevar a cabo por medio de un número de distintos dispositivos de barrido, tal como deflectores optoacústicos bidimensionales (2D-AOD), escáneres galvanométricos, polígonos giratorios, y escáneres de resonancia. En algunas realizaciones, los deflectores optoacústicos son útiles, debido a su velocidad, linealidad por todo el barrido e intervalos variables de barrido, lo que da lugar a una recogida más eficaz de datos de lo que se puede con algunos otros dispositivos de barrido. Además, debido a que el barrido con 2D-AOD utiliza ondas de sonido en un cristal, no hay piezas móviles. Los exploradores por barrido AOD están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Brimrose Corp. Los exploradores por barrido adecuados incluyen dos cristales AO ortogonales para barrer el haz óptico en las direcciones x e y. El barrido se puede llevar a cabo hasta 1,6 grados en cada eje, equivalente a un barrido de 480 μm por 480 μm en el fondo ocular si no se utiliza ninguna lente de contacto.

Las fluencias del láser deseables para la fotocoagulación selectiva dependen de la detección de microcavitación, de la anchura particular del impulso para láseres por impulsos o haces segmentados, de la longitud de onda de la luz láser empleada, del tipo de célula irradiada, y de la concentración de cromóforo irradiado. Por ejemplo, para el tratamiento de las células de EPR utilizando anchuras de impulso de 8 ns de luz de 532 nm, las fluencias del láser de tratamiento que son deseables varían desde aproximadamente 0,08 hasta aproximadamente 0,16 J/cm². Para el tratamiento de las células del EPR utilizando anchuras de impulso de 3 μs de luz de 532 nm, las fluencias del láser de tratamiento que son deseables varían desde aproximadamente 0,22 hasta aproximadamente 0,44 J/cm².

Los láseres particulares de tratamiento que pueden ser utilizados en la práctica de la invención incluyen láseres de onda continua, incluyendo láseres de gas tal como láseres de ión de argón, de ión de kriptón ajustados para producir luz visible, al igual que los láseres de estado sólido que producen luz visible, tal como láseres Nd-YAG. También se puede utilizar una variedad de láseres bombeados de excímero o de tinte bombeado por láser YAG para producir fácilmente una excitación visible por impulsos. En algunas realizaciones, la fuente de láser de tratamiento utilizada es un láser Nd-YAG que operan a 532 nm.

Sonda/detección

Como se muestra en la Fig. 1, la invención también puede utilizar una fuente de sondeo que proporciona un haz de sonda. La longitud de onda del haz de sonda puede variar, pero se debería reconocer que en general, se considera deseable filtrar el haz de láser de tratamiento generalmente intenso, de forma que no sature el detector, y los medios de filtro no son generalmente extremadamente selectivos, de forma que la información espectral en el entorno inmediato de la longitud de onda del haz de tratamiento puede no estar disponible para ser monitorizada. Por lo tanto, puede ser preferible utilizar una fuente de sondeo que pueda iluminar en regiones espectrales algo alejadas de la longitud de onda de la fuente de tratamiento, por ejemplo, alejadas al menos aproximadamente 3 nm, 5 nm o 7 nm.

La detección de burbujas formadas con un haz de láser de excitación de barrido se puede llevar a cabo con un haz de sonda barrido junto con el haz de excitación. De forma alternativa, se puede dejar estacionario el haz de sonda en algún punto en el campo del barrido, por ejemplo cerca del centro del campo de barrido. En tal configuración, el haz de sonda estacionario solo detectará una burbuja cuando el haz de excitación imparta suficiente energía al punto cubierto por el haz de sonda para producir una burbuja, dando lugar a una señal dependiente del tiempo sincronizada con el barrido. De forma alternativa, se puede utilizar una retrodispersión del propio haz de excitación para monitorizar la formación de burbujas. En tal configuración, se detecta la intensidad de retrodispersión por medio de un detector y se compara con una intensidad de referencia generada en el propio haz de excitación. Por debajo del umbral de formación de burbujas, la señal de retrodispersión será proporcional a la intensidad de referencia, con algo de variación según el haz barre el área de tratamiento. Por encima del umbral de formación de burbujas, se mejorará la señal de retrodispersión y mostrará mucha mayor fluctuación debido a la expansión y al colapso de las burbujas. El aumento en la fluctuación de luz se puede utilizar como una señal de identificación del inicio de la formación de burbujas.

La intensidad del haz de sonda debe ser la suficiente como para permitir la monitorización de los eventos transitorios en la célula o en el tejido de interés. Las propiedades ópticas de la muestra pueden dictar las consideraciones de intensidad para la fuente de sondeo. Por otra parte, la intensidad no debería ser tan grande como para provocar independientemente un calentamiento en la célula o en el tejido. El ajuste de la intensidad de la fuente de sondeo para cumplir con estos criterios se encuentra dentro de las capacidades de una persona con un nivel normal de dominio de la técnica.

Las propiedades particulares de absorbancia y de reflectancia pueden dictar la geometría de la sonda y de los instrumentos de detección. Se puede utilizar cualquier geometría que permita la detección de la luz dispersa. En realizaciones particulares, se puede utilizar la fuente de sondeo en una geometría de paso por la muestra o de reflexión (retrodispersión). Para aplicaciones *in vivo*, el paso por la muestra no será posible generalmente. En general, las geometrías de retrodispersión son más útiles para un tratamiento *in vivo*. En algunas realizaciones, la geometría es una detección de retrodispersión de un haz óptico de sonda. Por ejemplo, se puede enfocar un láser de helio y neón (HeNe) en un punto de diámetro de 10 μm en el tejido que va a ser tratado. Se debería ajustar la potencia del láser de sondeo para evitar el calentamiento del tejido por medio del haz de sondeo, y puede ser desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1 mW, por ejemplo, desde aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 1 mW, o desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1 mW.

El haz de sonda puede ser una onda continua o por impulsos. Si el haz de sonda es por impulsos, y el haz de tratamiento está barrido, el haz de sonda está sincronizado deseablemente con el haz de tratamiento para mejorar la calidad de la señal.

La detección de una sonda óptica se puede llevar a cabo por medio de fotodiodos, tubos fotomultiplicadores (PMT) y otros dispositivos similares y asociados conocidos en la técnica. Las diversas ventajas y capacidades de los sistemas de detección óptica se tratado en numerosas referencias conocidas por los expertos en la técnica. Para los presentes propósitos, las capacidades importantes de un sistema de detección óptica son la velocidad y la sensibilidad. En realizaciones particulares, se puede utilizar un fotodiodo de tipo Zener, con una apertura confocal colocado delante de la abertura. Se pueden emplear filtros pasabanda para eliminar sustancialmente que la señal alcance el detector y sobrecargue o dañe posiblemente el detector.

Se introduce la salida del detector en un dispositivo de monitorización, tal como un osciloscopio, un monitor de tipo rayos catódicos, una unidad grabadora, u otro dispositivo de monitorización. En realizaciones particulares, se introduce la salida del detector en un osciloscopio digital, que está activado de forma síncrona por la fuente de láser que produce el haz de excitación.

Procedimientos de tratamiento

La invención incluye procedimientos para tratar tejido mediante la muerte de células, de forma individual y en grupos. Estos procedimientos se llevan a cabo al administrar suficiente energía láser para fotocoagular las células en un tejido particular, o regiones de tejido, mientras que se evita dañar el tejido adyacente o colindante, o regiones de tejido. Estos procedimientos mejoran la formación de microburbujas en las células objetivo individuales o en los grupos de células objetivo, pero sin permitir una transferencia de calor suficiente como para provocar suficiente daño a las células próximas a las células objetivo. Se utiliza la formación de burbujas como un monitor del punto final del tratamiento. Aunque se produzca una formación de burbujas a una fluencia por encima del umbral para matar células del EPR, se puede seguir utilizando para marcar el punto final del tratamiento mientras que el grado de daño del tejido a esta fluencia esté bien limitado al EPR y salva los fotorreceptores.

Por ejemplo, los procedimientos para tratar células particulares en el tejido del EPR suponen ejercer un control sustancialmente preciso sobre la dosimetría del láser administrado. Dicho control se consigue por medio de un monitor de tiempo real que refleja el estado de las circunstancias en el tejido que está siendo tratado. El control está basado en el uso de una detección de microburbujas para determinar el punto final de la terapia con láser para las células objetivo, y para evitar dañar a las células próximas a las células objetivo.

Como una primera etapa para llevar a cabo el tratamiento terapéutico que implica el procedimiento inventivo, se identifican las células objetivo. Las células objetivo pueden ser cualquiera que pueda beneficiarse de un tratamiento de fotocoagulación selectiva. Las células objetivo deben poder absorber energía láser de forma selectiva, o ser tratadas para poder absorber energía láser de forma selectiva (por ejemplo, por la introducción de un cromóforo). Las células objetivo adecuadas para una fotocoagulación selectiva son aquellas células objetivo que se encuentran próximas a células que no deberían ser fotocoaguladas. Por ejemplo, las células del epitelio pigmentario de la retina, que están próximas a las células neuroretinal, son muy adecuadas para una fotocoagulación selectiva. Las células de un tumor cerebral, que están próximas a células que funcionan normalmente, también pueden ser utilizadas como células objetivo. Las células objetivo se preparan para su exposición a un haz de láser de tratamiento al colocar la óptica de enfoque, tal como una lente de contacto para el tratamiento de células del EPR. La aplicación de una lente de contacto para cirugía láser ocular es bien conocida para los expertos en la técnica. Se activa el tratamiento con láser para operar inicialmente a una intensidad baja de haz, por ejemplo, desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 80%, por ejemplo, desde aproximadamente el 25% hasta aproximadamente el 80%, o desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 75%, del umbral ED_{50} determinado para una anchura particular de impulso y un tipo de célula. Por ejemplo, para una fotocoagulación selectiva del EPR, se puede hacer funcionar inicialmente el láser a fluencias de haz desde aproximadamente 0,008 hasta aproximadamente 0,064 J/cm², para una anchura de impulso de 8 ns, o desde aproximadamente 0,022 hasta aproximadamente 0,176 J/cm² para un impulso de 3 μ s. La fluencia del haz de láser puede ser aumentada lentamente mientras que se monitorizan los parámetros del haz disperso de tratamiento, según se determina de una geometría de retrodispersión, por ejemplo. Un parámetro útil es la intensidad del haz de tratamiento disperso procedente de las células objetivo. Otros parámetros útiles pueden ser la polarización de la luz dispersa procedente de las células objetivo, o desviaciones Doppler de luz dispersa procedente de las células objetivo, que surgen debido a la expansión y a otros movimientos de las microburbujas.

La monitorización se debería llevar a cabo de forma que se determine si hay cualquier cambio, por ejemplo, un cambio positivo, en la reflectividad de las células objetivo. Según se utiliza en el presente contexto, un "cambio" hace referencia a una diferencia en la señal que se puede detectar por medio de un cambio sostenido en la pendiente en un gráfico de reflectancia de una célula objetivo con respecto al tiempo, por medio de un cambio sostenido en la señal de reflectancia relativa de la célula objetivo en comparación con una reflectancia del nivel de referencia, o por medio de la observación de un pico visualmente aparente en un gráfico de reflectancia de una célula objetivo con respecto al tiempo. En realizaciones ejemplares que monitorizan los cambios en un haz de barrido de tratamiento, la reflectancia de fondo puede fluctuar según pasa el haz de tratamiento sobre las superficies relativamente heterogéneas de las células objetivo, que pueden incluir estructuras tales como vasos sanguíneos, que pueden mostrar cambios en la reflectividad incluso en ausencia de formación de burbujas. Se espera que la formación de microburbujas sea discernible contra este fondo variable, de forma que los picos debidos a la formación de burbujas pueden ser algo más difíciles de detectar, pero no prohibitivamente difíciles. La detección de las microburbujas se correlaciona con la energía del haz de láser que se denomina ED_{50} , que es la dosis de láser necesaria para tener como resultado la muerte del 50% de las células objetivo.

Tras la detección de un cambio en la reflectividad, mediante medios digitales, analógicos o manuales, se puede modular inmediatamente o subsiguientemente la intensidad del haz de láser de tratamiento, es decir, al cesar el aumento de la energía del haz de láser de tratamiento. En algunas realizaciones, la detección de microburbujas significa una detención inmediatamente o sustancialmente inmediata en la rampa del aumento de la intensidad del haz. En algunas realizaciones, la detección de microburbujas hará que se observe la intensidad del haz, como un valor digital o analógico (como un valor umbral, que es ED_{50}) y se continuará la rampa de la intensidad del haz hasta que se alcance un valor de $ED_{50} + xED_{50}$, donde x es mayor que cero y menor que aproximadamente dos.

La formación de burbujas puede formarse cerca del final del impulso de láser, si se selecciona inicialmente la

energía de láser para que sea baja con respecto al umbral de formación de burbujas, y se aumenta gradualmente para alcanzar este umbral. Por lo tanto, la intensidad de la señal de retrodispersión debería mostrar un aumento repentino cerca del final del impulso de láser si se produce una burbuja. Al comparar la forma del impulso entrante con la forma del impulso disperso, se puede determinar el inicio de la formación de burbujas.

- 5 Hay asociadas enfermedades particulares en la retina con el epitelio pigmentario de la retina. El EPR tiene una función principal del intercambio de nutrientes a las células neuroretinales y otras y desde las mismas. Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, retinopatía serosa central, edema macular diabético y drusas. La invención proporciona un medio de tratamiento de tales enfermedades mediante la fotocoagulación selectiva del EPR.

Ejemplos

- 10 Los siguientes ejemplos ilustran ciertas propiedades y ventajas inherentes en algunas realizaciones particulares de la invención.

Ejemplo 1: Formación *ex vivo* de burbujas transitorias

- Se prepararon ojos de gorrinos de aproximadamente 20 mm de diámetro 0 a 4 horas después de la enucleación. Se diseccionan los ojos, y se extrae el vítreo. Se cortó una capa de 1 cm² de la región ecuatorial del ojo y se suspendió la muestra en una solución salina al 0,9%. Después de 20 minutos se podía separar fácilmente la retina. Se aplanó la muestra en los bordes utilizando un anillo plástico. Se cubrió el EPR con CalceinAM (Molecular Probes) diluido 1:1000 en PBS o en medio modificado de Dulbecco-Eagle (Gibco). Se aplicó un cubreobjetos encima. Después de 20 minutos, las células viables acumularon suficiente calceína fluorescente para ser distinguidas de las células muertas por medio de microscopía de fluorescencia. Se excitó la fluorescencia de calceína a 488 nm y se detectó desde 540 nm hasta 800 nm. Se tomó una imagen de fluorescencia antes de la irradiación y una segunda 15-30 minutos después de la misma. Se clasificaron las células que no fluorescían como muertas. Para experimentos de 12 ns, la temperatura de la muestra fue de 20°C. Para impulsos de 6 µs, se mantuvo la muestra a 35°C. Se calcularon los umbrales utilizando un programa informático para un análisis probit (Cain et al., "A Comparison of Various Probit Methods for Analyzing Yes/No Data on a Log Scale", US Air Force Armstrong Laboratory, AL/OE-TR-1996-0102, 1996) según Finney ("Probit Analysis", 3ª ed. Londres: Cambridge University Press; 1971).

- Se utilizó un objetivo de 20× (NA 0,42, distancia útil de 25 mm) para formar una imagen de las células en una cámara CCD. La resolución espacial de la configuración fue de aproximadamente 1 µm. Se utilizó un láser Nd:YAG (Continuum, SEO 1-2-3, λ = 532 nm, haz de 6 mm) del doble de la frecuencia, para una irradiación de 12 ns. Se forma una imagen de una sección de 200 µm del centro del haz en la muestra para dar una imagen superior plana de 20 µm de diámetro. Las variaciones de intensidad en la muestra debidas a puntos calientes en el haz fueron inferiores al 15%, como fue determinado por medio de un objetivo que fluorescía en el área de irradiación. Se segmentan impulsos de 6 µs de un láser Nd:YAG de frecuencia doble de onda continua (Verdi, Coherent, λ = 532 nm). El punto con forma gaussiana tenía FWHM de 16 µm en la muestra. Para sondear la formación de burbuja, se enfocó (7 × 10 µm FWHM) el haz colimado de un diodo láser (SF830S-18, Microlaser Systems, 830 nm, 1,5 × 2 mm de diámetro del haz) sobre la célula del EPR con una potencia máxima de 1 mW en la muestra. La potencia media de Nd:YAG fue de 75 mW. Se encendió el haz de sonda durante menos de 10 µs y se apagó (1% de potencia) 2-4 µs después del final del impulso. Se detectó luz en una geometría confocal y también ligeramente desplazada del eje óptico para reducir la reflectancia de fondo y la dispersión del sistema óptico y de las capas de tejido distintas del EPR. El detector utilizado fue un fotodiodo Zener (Hamamatsu C-5460), incluyendo un amplificador de alta velocidad con un ancho de banda de 10 MHz.

- Para impulsos de 12 ns, se tomaron 4 muestras de 4 ojos distintos, en los que se irradiaron un total de 117 puntos a distintas fluencias (40 controles únicamente con Nd:YAG, 77 incluyendo el haz de sonda). El umbral para la cavitación y la muerte celular fue el mismo, como se muestra en la Tabla 1. FLL hace referencia al nivel inferior del umbral de fluencia, FUL es el nivel superior del umbral de fluencia, y Fluencia es la media de estas dos determinaciones. El n° de células es el número de células expuestas a la irradiación.

Tabla 1. Umbrales de 12 nanosegundos para la cavitación y la muerte celular

	Fluencia (mJ/cm ²)	Fluencia FLL (mJ/cm ²)	Fluencia FUL (mJ/cm ²)	pendiente	n° de células
muerte celular	71	66	75	17	77
cavitación	71	67	75	16	77
control	71	66	81	14	40

La Fig. 2 es un trazo osciloscópico de una señal de reflectancia a 1,1 veces el umbral con una vida mínima de 200 ns. Se encendió el diodo láser a 0,2 μ s y se apagó a + 3,4 μ s para minimizar el calentamiento de la muestra. Se disparó el láser Nd:YAG a 1,2 μ s, lo que provocó un aumento detectable en la retrodispersión del haz de sonda en una única célula del EPR.

5 Ejemplo 2: Tratamiento *in vivo* de tejido del EPR

Se utilizaron un total de seis ojos de tres conejos grises chinchilla. Se anestesiaron los conejos con clorhidrato de quetamina (30 mg/kg) y clorhidrato de xilacina (6 mg/kg). Se dilataron los ojos con 1 gota de clorhidrato de ciclopentolato y 1 gota de clorhidrato de fenilefrina al 5%, luego se colocó una lente plano-cóncava Goldmann de -67 dioptrías sobre el ojo.

- 10 Para la irradiación láser, se utiliza la salida de un láser Nd:YAG del doble de la frecuencia, un conmutador Q con una longitud de onda de 532 nm. La anchura del impulso se controla al formar el impulso de alto voltaje aplicado a la célula de Pockel mientras que se monitoriza activamente la acumulación de energía intracavidad. Sin la información activa de retorno, la anchura nominal del impulso del conmutador Q de salida es normalmente de 250 ns con energías de impulso de varios mJ con una tasa de repetición de 500 Hz. Se proporciona un haz de sonda por medio de un láser de HeNe a 0,5 mW. Se detecta la sonda retrodispersa por medio de un fotodiodo Zener. Se introduce la salida del detector en un osciloscopio.

- 20 En una exploración con lámpara de ranura, se colocan cuatro lesiones marcadoras de 100 μ m fuera de las esquinas de un área de tratamiento designada de 300 μ m $\times$ 300 μ m, utilizando cada una una exposición continua al láser de 100 ms (aproximadamente 100 mW). Entonces, se enciende el haz de tratamiento, y se suministran 100 barridos sucesivos al área de tratamiento. Cada ojo recibe cuatro puntos de tratamiento tales con configuraciones de potencia del láser de 0,5, 1, 2 y 3 veces el umbral ED₅₀ como se ha determinado anteriormente. Todos los procedimientos de tratamiento con láser se registran con una cámara CCD y una videocámara. Se lleva a cabo la formación de imágenes del fondo y la angiografía de fluoresceína 1 hora después de la irradiación. Se detectan los cambios en la dispersión del haz de sonda y se muestran en el osciloscopio. La detección de microburbujas está acompañada de la estabilización de la fluencia del láser a 1,5 ED₅₀. Adicionalmente, se lleva a cabo el tratamiento a esta fluencia.

- 30 Tras la finalización del tratamiento, se sacrificaron los animales con una inyección de pentobarbital. Se enuclean los ojos y son procesados para una exploración de microscopía óptica y electrónica. El tiempo total desde la exposición al láser hasta la enucleación es de aproximadamente 2 horas. Cada ojo enucleado está fijado en glutaraldehído al 2% tamponado en fosfato durante 24 horas. Se extraen los segmentos anteriores y el vítreo, y se posija la parte posterior del ojo en tetróxido de osmio al 2% tamponado en fosfato, se deshidratan y se incrustan en resina epoxi. Se tincionan con azul de toluidina las secciones gruesas (aproximadamente 1 μ m) para una microscopía óptica. Se tincionan con acetato de uranilo/acetato de plomo las secciones delgadas para una microscopía electrónica. Las áreas tratadas por el láser de barrido se comparan con las áreas de control y con las lesiones marcadoras (coaguladas con láser de onda continua) en busca de daños a los fotorreceptores, al EPR, a la membrana de Bruch, y al coriocapilar. Se lleva a cabo una comparación para verificar que las células del EPR están fotodañadas y los fotorreceptores, la membrana de Bruch, y el coriocapilar no están dañados y son viables.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para llevar a cabo una fotocoagulación selectiva de células, comprendiendo el aparato:
una fuente (10) de radiación electromagnética dispuesta para suministrar radiación (12) que tiene una intensidad creciente a las células;
5 un detector (40) dispuesto para recibir radiación electromagnética dispersa de las células cuando se irradian las células por medio de la radiación (12) procedente de la fuente (10), y para generar una señal (44) en función de la radiación electromagnética recibida; y
un discriminador (46) dispuesto para:
10 recibir la señal (44) generada por el detector (40);
determinar si se ha producido microcavitación en las células analizando la señal (44) para determinar si una porción de la misma es indicativa de microcavitación en las células evaluando si una porción de la señal (44) se corresponde con un cambio sostenido en reflectividad de las células en comparación con una señal de referencia;
15 identificar como un valor ED_{50} una intensidad de la radiación electromagnética (12) suministrada por la fuente (10) a la que se determinó que se producía la microcavitación; y
indicar a la fuente (10) que detenga un aumento en la intensidad de la radiación electromagnética (12) suministrada a las células cuando la intensidad de la radiación electromagnética (12) alcanza un valor de $ED_{50} + xED_{50}$, siendo x mayor que cero y menor que dos.
2. El aparato de la reivindicación 1, comprendiendo el aparato, además, un interferómetro (60).
- 20 3. El aparato de la reivindicación 1, en el que la fuente (10) de radiación electromagnética es una fuente de luz visible.
4. El aparato de la reivindicación 1, que comprende, además, un explorador (64) por barrido dispuesto para barrer de forma que se puede controlar el barrido de la radiación en las células.
- 25 5. El aparato de la reivindicación 1, que comprende, además, una fuente (30) de haz de sonda de radiación electromagnética dispuesta para suministrar un haz (32) de sonda a las células.
6. El aparato de la reivindicación 5, en el que el detector (40) está dispuesto para recibir una porción del haz (32) de sonda dispersa desde las células, y para generar la señal (44) en función de la porción dispersa del haz (32) de sonda.
7. El aparato de la reivindicación 1, en el que la fuente (10) de radiación electromagnética es un láser.
- 30 8. El aparato de la reivindicación 1, en el que la señal (44) se corresponde con una intensidad de radiación dispersa por burbujas de microcavitación en las células, o próxima a las mismas.
9. El aparato de la reivindicación 1, en el que la radiación (12) suministrada a las células comprende impulsos de radiación, teniendo cada impulso una duración menor de aproximadamente 5 microsegundos.
10. Un procedimiento *ex vivo* llevado a cabo con el aparato de la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:
35 exponer las células objetivo a la radiación electromagnética (12) que tiene una intensidad suficiente como para producir una microcavitación detectable en las células objetivo, o próxima a las mismas;
detectar la radiación dispersa desde una región en las células objetivo, o próxima a las mismas, y generar una señal (44) en función de la radiación detectada;
40 analizar la señal (44) para determinar si se produce microcavitación en la región;
identificar como un valor ED_{50} una intensidad de la radiación electromagnética suministrada por la fuente a la que se determinó que se producía una microcavitación; y
indicar a la fuente que detenga un aumento en la intensidad de la radiación electromagnética (12) suministrada a las células cuando la intensidad de la radiación electromagnética (12) alcanza un valor de $ED + xED_{50}$, siendo x mayor que cero y menor que dos.
45
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el análisis de la señal (44) para determinar si se produce microcavitación en la región comprende identificar un cambio en un parámetro de la radiación dispersa.
12. El procedimiento de la reivindicación 11,
en el que el parámetro es una intensidad de la radiación dispersa.
- 50 13. El procedimiento de la reivindicación 11,
en el que el cambio comprende un cambio en una pendiente de un gráfico de reflectancia celular en función del tiempo.

- 14. El procedimiento de la reivindicación 10,
en el que las células objetivo comprenden células del epitelio pigmentario de la retina.
- 15. El procedimiento de la reivindicación 10,
en el que la región próxima a las células objetivo comprende células neurorretinales.
- 5 16. El procedimiento de la reivindicación 14,
en el que la radiación (12) a la que están expuestas las células del epitelio pigmentario de la retina comprende una pluralidad de impulsos de radiación, teniendo cada impulso una duración de menos de aproximadamente 5 microsegundos.
- 10 17. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende, además, exponer las células objetivo a un haz (32) de sonda electromagnética, en el que la radiación detectada comprende una porción del haz de sonda dispersa desde una región en las células objetivo, o próxima a las mismas.
- 18. El procedimiento de la reivindicación 10,
en el que la radiación (12) comprende radiación de láser de onda continua.
- 15 19. El procedimiento de la reivindicación 18, que comprende, además, que la radiación (12) barra las células objetivo, para exponer a las células objetivo a la radiación durante 5 microsegundos o menos.
- 20. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un tratamiento de fotocoagulación selectiva de una enfermedad en la retina asociada con el epitelio pigmentario de la retina.
- 20 21. El aparato para el uso de la reivindicación 20,
en el que se selecciona la enfermedad del grupo que consiste en retinopatía serosa central, edema macular diabético y drusas.

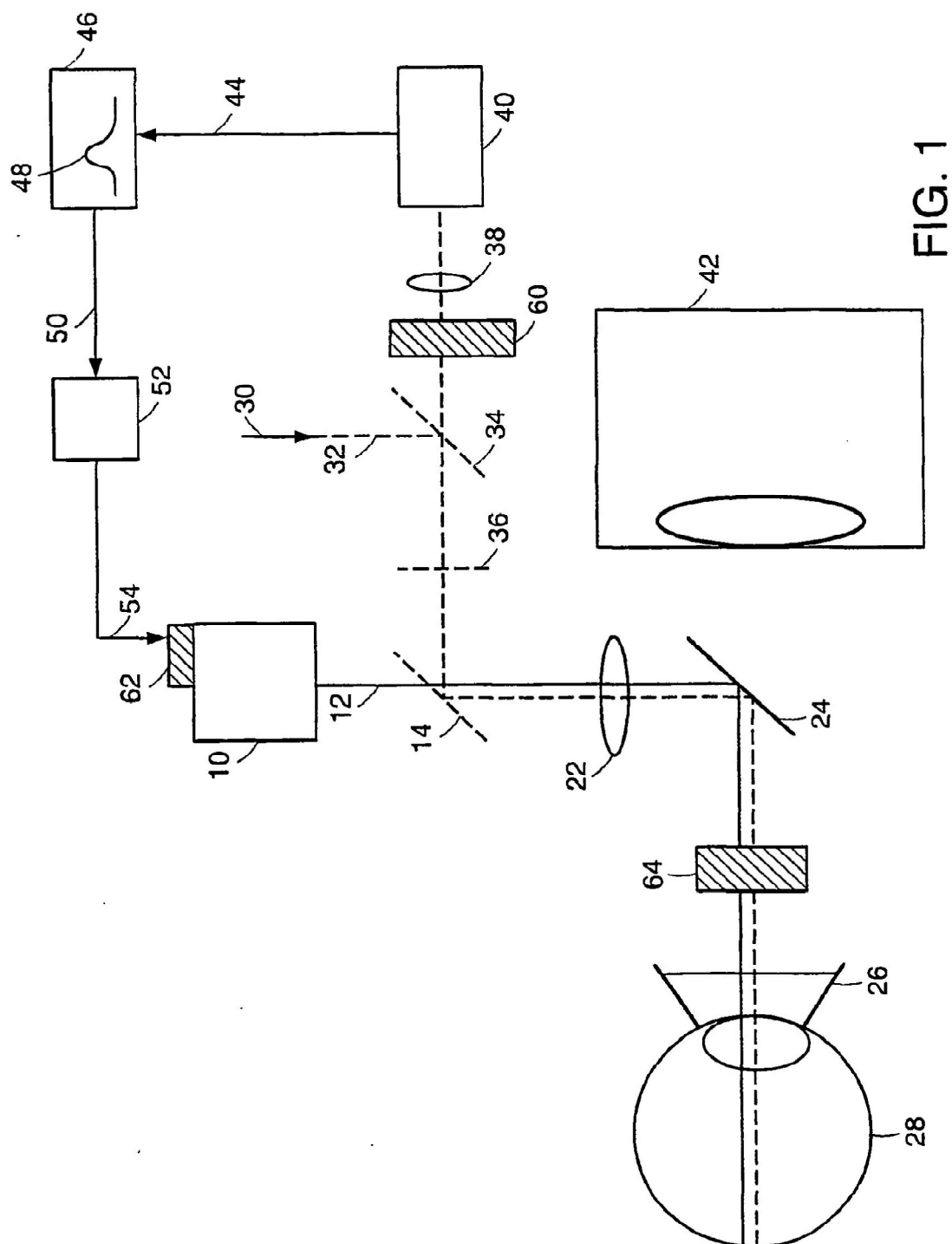


FIG. 1

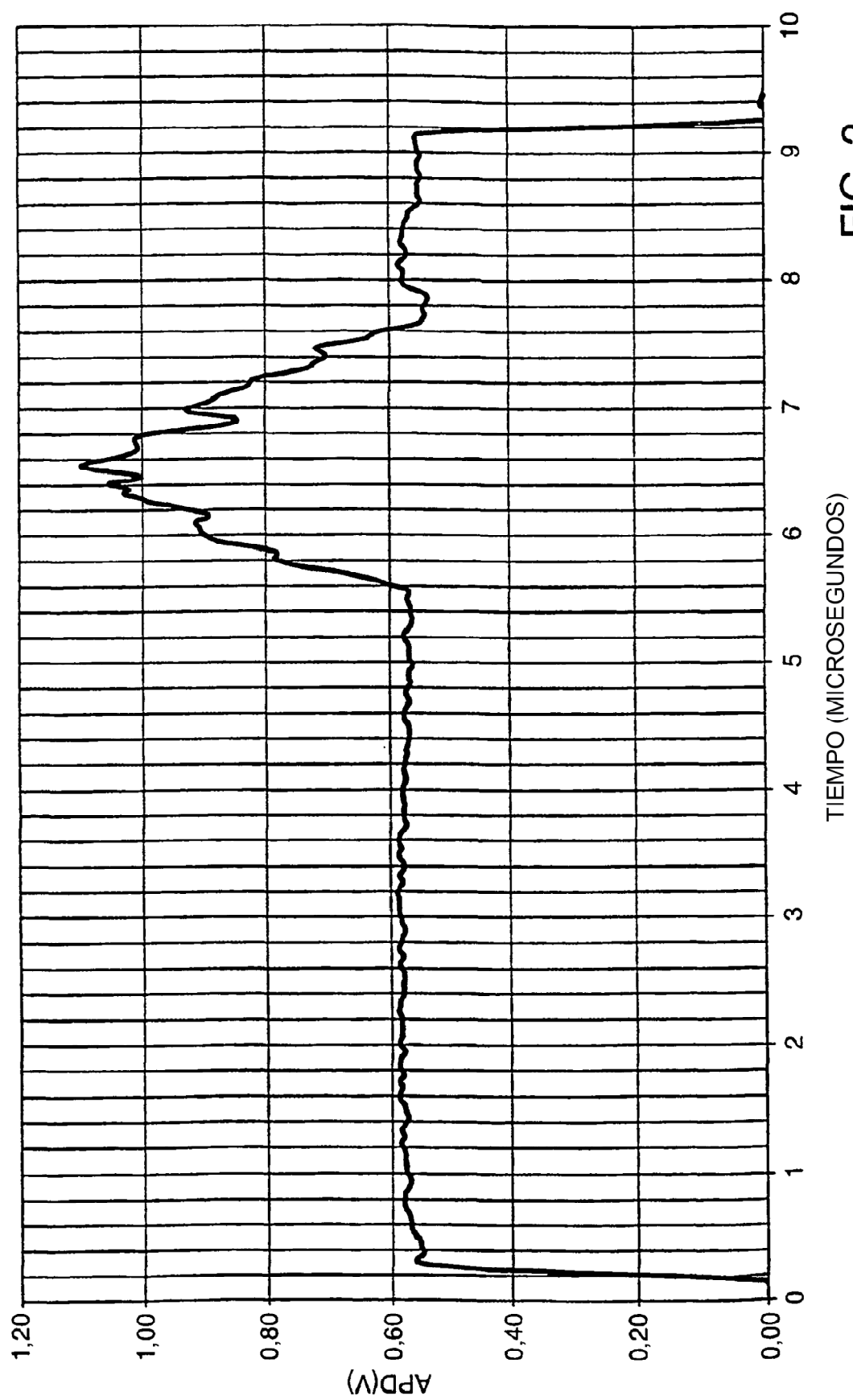


FIG. 2