

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 949 276**

(51) Int. Cl.:

**A61B 5/00** (2006.01)  
**A61B 5/026** (2006.01)  
**A61B 5/1455** (2006.01)  
**G01N 21/49** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2014 PCT/EP2014/051661**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114814**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2014 E 14701757 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 2948042**

---

(54) Título: **Evaluación de la insuficiencia circulatoria**

(30) Prioridad:

**28.01.2013 GB 201301490  
17.07.2013 GB 201312796**

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

**27.09.2023**

(73) Titular/es:

**OSLO UNIVERSITETSSYKEHUS HF (100.0%)  
Postboks 4950 Nydalen  
0424 Oslo, NO**

(72) Inventor/es:

**KVERNEBO, KNUT**

(74) Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 949 276 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

## Evaluación de la insuficiencia circulatoria

- 5 La presente invención se refiere al análisis de la microcirculación de un sujeto y, en particular, a métodos y aparatos para dicho análisis y al uso de los datos obtenidos de este modo. Por ejemplo, los datos obtenidos por medio de la presente invención pueden usarse para evaluar el pronóstico de sujetos que presentan síntomas de insuficiencia circulatoria y para evaluar los efectos del tratamiento de la insuficiencia circulatoria en un paciente. Los métodos de la invención también pueden proporcionar una advertencia temprana de problemas circulatorios antes de un diagnóstico clínico de los mismos.

10 La insuficiencia circulatoria se puede definir como la incapacidad del sistema cardiovascular para suministrar cantidades suficientes de oxígeno para satisfacer las demandas metabólicas de las células del cuerpo. En medicina clínica, desafortunadamente, no existe un estándar de oro para monitorizar la oxigenación de los tejidos. (Arnaldo Dubín. Rev Bras Ter Intensiva. 2011; 23(3):249-251)

15 Dado que la circulación de la sangre se refiere a su flujo continuo desde el lado izquierdo del corazón, a través de arterias ramificadas, para alcanzar y atravesar los vasos microscópicos en todas las partes del cuerpo, regresando a través de las venas al lado derecho del corazón, para fluir a través de los pulmones y de vuelta al lado izquierdo del corazón, los procesos patológicos en el corazón, los pulmones y los vasos de transporte, así como en la microcirculación, pueden causar insuficiencia circulatoria. Estas condiciones pueden desarrollarse de forma aguda o con el tiempo. La falta de suministro de oxígeno puede provocar una disfunción celular o la muerte, y puede provocar una insuficiencia orgánica y la muerte de un individuo. La insuficiencia circulatoria puede ser local o sistémica. La falla generalizada (es decir, sistémica) y clínicamente evidente, es decir, el choque, puede ser central (por ejemplo, causada por insuficiencia cardíaca o hipervolemia) o periférica (por ejemplo, falla distributiva causada por sepsis).

20 Las consecuencias económicas de la insuficiencia circulatoria son grandes pero difíciles de calcular. Sería de gran beneficio si los recursos disponibles pudieran asignarse a los pacientes con la mejor probabilidad general de supervivencia.

25 30 Por ejemplo, la insuficiencia cardíaca aguda compromete la hemodinámica central y, en consecuencia, la perfusión microvascular en todo el cuerpo. La tasa de mortalidad varía del 50 al 80 por ciento. La oxigenación por membrana extracorpórea venoarterial (va-ECMO) se puede utilizar como un puente hacia la recuperación o hacia otra terapia de destino. Sin embargo, solo sobrevive aproximadamente un tercio de los pacientes adultos tratados con ECMO por choque cardiogénico. El tratamiento con ECMO requiere recursos y la suposición subyacente a su uso, que las soluciones tecnológicas mejoradas y la hemodinámica central- es decir, la presión arterial y el gasto cardíaco mejorados- se traducen en una mejor supervivencia, puede no ser completamente válida. La mortalidad en los pacientes con ECMO se debe con mayor frecuencia a sepsis, insuficiencia multiorgánica o complicaciones hemorrágicas.

35 40 45 Además de la insuficiencia circulatoria sistémica que puede poner en peligro la vida, puede haber una insuficiencia circulatoria localizada (que en sí misma puede poner en peligro la vida, por ejemplo, si el órgano afectado es esencial o si la región afectada puede necrosarse y provocar sepsis), tal como la eritromelalgia. No se ha establecido ningún parámetro o conjunto de parámetros fiable y aceptado para evaluar la microcirculación y tomar decisiones clínicas sobre los datos generados.

50 55 60 El examen clínico de la circulación arterial y venosa puede brindar información valiosa, pero las conclusiones a menudo se extrapolan erróneamente para que sean válidas para las conclusiones de la función microvascular. Se utiliza una gran cantidad de tecnologías, como análisis de gases en sangre y evaluación de productos metabólicos en muestras de sangre, mediciones de presión y gasto cardíaco, así como técnicas de formación de imágenes, para diagnosticar y guiar el tratamiento de la insuficiencia circulatoria. Estas técnicas recopilan datos que evalúan la función del corazón, las venas y las arterias, así como un índice promedio de la función metabólica del cuerpo. Sin embargo, el mismo problema se aplica a estas mediciones que a las evaluaciones clínicas: los valores medidos dentro del espectro de línea base pueden coexistir con fallas circulatorias sistémicas o locales críticas.

65 70 Por lo tanto, el desafío es mejorar las tecnologías para medir parámetros microvasculares reproducibles y relevantes que puedan usarse para evaluar el suministro de oxígeno a las células, porque si este suministro falla, las células no funcionarán y finalmente morirán.

75 80 Existe una miríada de diferentes parámetros y técnicas de medición para diagnosticar y evaluar la insuficiencia circulatoria, como se mencionó anteriormente. Estos pueden incluir análisis de sangre, por ejemplo, para determinar el equilibrio ácido-base en sangre arterial o los niveles de lactato en suero. Se puede medir la circulación arterial y venosa: aquí las técnicas incluyen formación de imágenes usando medios de contraste (evaluaciones de angiografía, venografía y resonancia magnética (MR)); mediciones de ultrasonido Doppler de las velocidades del flujo sanguíneo; y mediciones de presión arterial invasivas y no invasivas.

La perfusión tisular se puede evaluar, por ejemplo, mediante lavado de isótopos, ultrasonido Doppler o láser Doppler (LD). Hay diversos parámetros metabólicos que también se pueden medir, tal como la saturación de oxígeno en el músculo o el cerebro mediante espectroscopía de infrarrojo cercano o la difusión transcutánea de oxígeno o CO<sub>2</sub>.

5 Las técnicas microscópicas para ver la microcirculación incluyen formación de imágenes espectrales de polarización ortogonal (OPS), formación de imágenes de campo oscuro de corriente lateral (SDF) y videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM). OPS y SDF tienen una utilidad limitada, ya que no se pueden utilizar para generar imágenes de calidad de la piel de un adulto, solo de la lengua y posiblemente de la conjuntiva. CAVM permite el examen en tiempo real de microvasos para poder estudiar su morfología, estructura capilar y patrones de flujo.

10 De entre este conjunto de posibles parámetros y técnicas de medición, Dubin (*supra*) concluye que un enfoque adecuado puede ser utilizar (i) formación de imágenes SDF sublinguales, (ii) músculo ΔStO<sub>2</sub> (la pendiente de la recuperación de la saturación de oxígeno muscular después de una prueba de oclusión) y capriometría tisular.

15 Wester et al. en Clín. Fisiol. Funct. Imaging (2011) 31, págs. 151-158 utilizan una combinación de CAVM y LD en su evaluación de la microcirculación en la sepsis porcina y también informaron el valor de analizar las hemorragias pericapilares.

20 Klijn et al. in Clin. Chest Med. (2008) 29, págs. 643-654 se enfoca en OPS y SDF en su discusión de estudios de enfermedades críticas de la microcirculación.

Awan et al. en Microvascular Research (2011) 81, pp 245-251 describen el uso de la espectroscopía de reflectancia difusa (DRS), que permite medir la saturación de oxígeno de los eritrocitos ubicados en microvasos.

25 Freddy et al. en Pediatric Research (2010) 68 (suppl 1), pp.167, describe la monitorización de la perfusión microvascular de la piel de los pacientes mediante videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM), monitorización de perfusión con láser Doppler (LDPM) y espectroscopía de reflectancia difusa (DRS).

30 El campo no carece de parámetros o herramientas para investigar la falla circulatoria, pero carece de una prueba o marco confiable para evaluar la falla circulatoria sistémica o localizada, preferiblemente una que sea apropiada para muchos grupos de pacientes y escenarios clínicos. No existe un estándar aceptado y los datos pueden entrar en conflicto.

35 Los presentes inventores han desarrollado un método para analizar y evaluar el fallo circulatorio o posible fallo circulatorio que se basa en seis parámetros clave. Estos parámetros, tomados en conjunto, son sorprendentemente efectivos para predecir el resultado clínico, en particular para determinar si un sujeto tiene insuficiencia circulatoria y si, en casos graves, sus posibilidades de supervivencia son buenas o no. También es útil para evaluar la insuficiencia circulatoria localizada.

40 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o controlar la insuficiencia circulatoria en un sujeto, como se define en la reivindicación 1.

45 La "insuficiencia circulatoria" no implica una insuficiencia total, sino el suministro insuficiente de oxígeno y nutrientes a los órganos y células del cuerpo, generalmente a pesar de la saturación total de oxígeno de los eritrocitos en las arterias. La insuficiencia circulatoria se puede definir como la incapacidad del sistema cardiovascular para suministrar suficiente oxígeno para satisfacer las demandas metabólicas de las células del cuerpo.

La "microvasculatura" o "microcirculación" incluye los capilares, metarteriolas, sinusoides y vénulas.

50 El fallo circulatorio puede ser sistémico o localizado y la invención es particularmente adecuada y útil para identificar el fallo circulatorio sistémico. La falla localizada significa que no afecta a todas (o sustancialmente a todas) las células del cuerpo. Los ejemplos de falla localizada o falla potencial incluyen isquemia de extremidades, eritromelalgia, heridas, síndrome de Reynaud, psoriasis, inflamación alérgica de la retina, falla asociada con trasplante de órganos (no el corazón). La falla sistémica puede deberse, *entre otros*, a sepsis, paludismo, choque cardiogénico o sangrado postraumático (hipovolemia). La diabetes mellitus de larga duración también puede ir acompañada de insuficiencia circulatoria sistémica.

60 La evaluación de la microcirculación incluye el análisis de la morfología y fisiología microvascular, en particular para evaluar la capacidad de la microcirculación para suministrar oxígeno y/o nutrición a las células circundantes. Por lo tanto, la invención se basa en la hipótesis de que la morfología y fisiología microvascular patológica se correlaciona con un mal pronóstico y específicamente con insuficiencia circulatoria, particularmente con insuficiencia circulatoria que amenaza la vida. Por lo tanto, los resultados de estos exámenes microvasculares pueden usarse para mejorar la selección del tratamiento apropiado y/o para guiar o monitorizar la terapia. Usando análisis de tendencias de evaluaciones repetidas tomadas antes y después del inicio de un tratamiento específico para la falla circulatoria identificada, se pueden identificar los respondedores al tratamiento y en los que no responden se puede detener el

tratamiento. De esta forma se podrán identificar sujetos que se benefician de ECLS (soporte vital extracorpóreo (esto incluye ECMO).

5 Por lo tanto, la presente invención también puede proporcionar "criterios de suspensión" para cuándo retirar un determinado tratamiento, en particular un tratamiento de soporte vital.

10 El examen de la microcirculación solo necesita relacionarse con áreas localizadas del sujeto ya que, en el caso de un sujeto con falla de circulación sistémica, se considera que el estado local de la microcirculación proporciona una buena indicación de la microcirculación sistémica. Sin embargo, las evaluaciones pueden hacerse en relación con múltiples áreas.

15 La evaluación de la microcirculación también puede comprender el análisis de la patología pericapilar, tal como determinar si son visibles hemorragias pericapilares y/o halos oscuros.

20 La invención se realiza analizando la microcirculación de la piel. Sin embargo, también se pueden obtener datos de la microcirculación de cualquier lecho microvascular accesible, por ejemplo, sublingual o de la microcirculación en la conjuntiva. La piel no incluye el pliegue ungual.

25 En ciertas realizaciones, el cuerpo o una región del mismo ha experimentado hipoxia y el método de la invención sirve para investigar si la hipoxia causada por un período de falla circulatoria ha resultado en un daño irreversible, por ejemplo, en el caso de isquemia de extremidades. Diferentes tejidos pueden hacer frente a diferentes períodos de hipoxia, siendo los nervios los más sensibles. Aunque el daño a los nervios puede ser el factor limitante, de acuerdo con la presente invención no es necesario monitorizar los nervios, el análisis de la microvasculatura, por ejemplo, de la piel, puede dar resultados clínicos relevantes, por ejemplo, información pronóstica, incluso si la reperfusión de una extremidad dañada ha tenido éxito.

30 La evaluación visual de la microcirculación comprende el uso de un microscopio para proporcionar imágenes, y preferiblemente el uso de un videomicroscopio, y/o el uso de imágenes (fijas y/o en movimiento) obtenidas por (vídeo)microscopía. El microscopio es preferiblemente digital y preferiblemente es videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM).

35 El microscopio utiliza luz no polarizada. La luz blanca del microscopio, tal como la producida por una fuente de luz de microscopio convencional.

40 Las películas y los fotogramas individuales (imágenes) se pueden analizar fuera de línea, si es necesario, de forma remota desde el paciente. (Aquí, "fuera de línea" significa que el microscopio no está en contacto o conectado al sujeto, por ejemplo, después de completar la recopilación de imágenes). Así, en ciertas realizaciones, los métodos de la invención comprenden evaluar la microcirculación del sujeto a través del análisis de imágenes de (vídeo)-microscopía del mismo.

45 La presente invención también proporciona un método para identificar o monitorizar la insuficiencia circulatoria en un sujeto, método que comprende evaluar la microcirculación del sujeto visualmente mediante el análisis de imágenes del mismo obtenidas usando un microscopio (parámetros (a)-(d) como se describe en el presente documento) y mediante el análisis de espectros obtenidos por DRS realizados en los microvasos del sujeto. Los espectros DRS proporcionan información sobre la cantidad de oxi- y desoxi-hemoglobina en los microvasos. Esta información se puede utilizar para estimar la saturación de oxígeno de los eritrocitos dentro de los microvasos.

50 Las imágenes se obtienen preferiblemente aplicando el videomicroscopio suavemente a la superficie de la piel (u otro tejido como la lengua o la conjuntiva del ojo), preferiblemente usando aceite de inmersión, y las imágenes se transmiten a un ordenador para su almacenamiento, es decir, preferiblemente se emplea videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM).

55 Los métodos de la invención pueden proporcionar una indicación temprana de insuficiencia circulatoria. Alternativamente, para los sujetos que se cree que tienen algún grado de insuficiencia circulatoria, las técnicas se pueden utilizar para el pronóstico.

Por lo tanto, visto desde otro aspecto, la invención proporciona un método para hacer un pronóstico para un sujeto con insuficiencia circulatoria, como se define en la reivindicación 4.

60 Cuando los resultados de las investigaciones indiquen una alteración grave en la microcirculación (es decir, una gran desviación de una microcirculación sana), el sujeto puede recibir todas las intervenciones posibles como parte de la terapia de cuidados intensivos. La respuesta de atención se selecciona para que coincida con el pronóstico proporcionado por el método de la invención.

65 La morfología microvascular patológica y/o la perfusión se correlacionan con un mal pronóstico, empeorando el pronóstico a medida que aumenta el grado de patología. Si se desea, el grado de patología puede cuantificarse por

comparación con la microcirculación de sujetos sanos y determinando el grado de desviación. Asimismo, se puede identificar el fallo circulatorio, y establecer su gravedad, mediante la observación de una microcirculación patológica y el grado de desviación de una microcirculación sana.

5 El análisis de imágenes obtenidas por microscopía puede comprender seleccionar una o más imágenes con base en criterios predeterminados (por ejemplo, para asegurar una calidad adecuada) y, opcionalmente, aplicar una cuadrícula para facilitar el análisis.

10 Como se indicó anteriormente, los resultados del análisis pueden cuantificarse por comparación con valores de línea base basados en valores obtenidos de los exámenes correspondientes de sujetos sanos, siendo una desviación significativa de esos valores indicativa de insuficiencia circulatoria. Esos valores de línea base pueden generarse como se describe en los Ejemplos del presente documento. Preferiblemente, los resultados de las pruebas se pueden comparar con una base de datos de valores de línea base o con valores de umbral obtenidos de una base de datos. Dicha base de datos puede incluir valores de línea base saludables y valores de sujetos que se ha determinado que tienen o han tenido insuficiencia circulatoria.

15 Se puede identificar la insuficiencia circulatoria o dar un mal pronóstico incluso si solo 1 o 2 de los parámetros (a)-(f) están fuera de los valores de línea base. En general, cuantos más parámetros queden fuera de los valores de línea base saludables, peor será el pronóstico o más grave será la insuficiencia circulatoria o más largo será el período de hipoxia.

20 Cuando haya hemorragias pericapilares y/o halos oscuros, se puede calcular el número por unidad de área y/o la proporción de capilares afectados.

25 FCD puede, al menos en relación con las mediciones basadas en la piel, definirse como el número de bucles capilares visibles por unidad de área, por ejemplo, por milímetro cuadrado, o si los capilares están organizados paralelos a la superficie del tejido, el número de capilares que cruzan una cuadrícula de líneas por línea mm. Por ejemplo, es probable que los sujetos con una FCD inferior a 8 cruces/línea mm en una cuadrícula de líneas tengan insuficiencia circulatoria cuando las mediciones se realizan en áreas donde los microvasos son paralelos a la superficie del tejido.

30 Valores superiores a 9 cruces/mm indican un buen pronóstico.

35 Si las evaluaciones se realizan en piel donde solo se ven asas papilares nutricionales, el pronóstico es grave (se indica insuficiencia circulatoria) con menos de 55 (peor con menos de 50) bucles visibles/mm<sup>3</sup>, y valores superiores a aproximadamente 60 (por ejemplo, 58-75) bucles/mm<sup>3</sup> indican un buen pronóstico. Estos valores se aplican a todas las edades y entornos clínicos y se refieren al número de bucles vistos desde la superficie de la piel, donde los bucles son perpendiculares a la superficie de la piel.

La densidad capilar es "funcional" en el sentido de que se observa que los capilares medidos contienen eritrocitos.

40 FCD se proporciona preferiblemente como un valor medio, por ejemplo, con base en 4 a 20, más preferiblemente 5-10, lo más preferiblemente 7-10 mediciones repetidas. Así, de acuerdo con los métodos de la invención, se obtienen varias imágenes o secuencias de vídeo y se determina la FCD de cada una antes de calcular una media.

45 La heterogeneidad determinada de acuerdo con los parámetros (b), (d) y (f) es una indicación de la variación observada entre múltiples valores. En general, las variaciones más grandes son una mala señal. La heterogeneidad se encuentra preferiblemente determinando el coeficiente de varianza sobre una pluralidad de ubicaciones diferentes en la misma área (el coeficiente de varianza - CoV - es la desviación estándar dividida por la media). Estos se obtienen más convenientemente mediante el análisis de una pluralidad de imágenes de áreas de la piel seleccionadas al azar.

50 Es probable que los recién nacidos con un CoV para FCD superior a 0.35 tengan insuficiencia circulatoria, con valores saludables por debajo de 0.35. Para los pacientes adultos (por ejemplo, aquellos que se someten a terapia de cuidados intensivos o están siendo considerados para ella), aquellos con un CoV para FCD superior a 0.38 tienen un mal pronóstico o es probable que tengan insuficiencia circulatoria, con valores ideales dentro del intervalo de 0.15 a 0.3.

55 La heterogeneidad depende preferiblemente del análisis de al menos 4 imágenes, preferiblemente de 5 a 10 imágenes, por ejemplo, de 6 a 8 imágenes.

60 Line et al (1992) en Microvascular Research, 43, págs. 285-293 describe (en el contexto de las mediciones de flujometría LD) cómo se puede derivar el número de muestras necesario para proporcionar una media fiable y una puntuación de heterogeneidad.

65 La velocidad del flujo capilar sanguíneo (CFV) puede medirse para cada uno de una pluralidad de microvasos. Es suficiente que la velocidad se estime con base en una serie de categorías. Por ejemplo, puede haber cinco categorías, que pueden evaluarse visualmente: 0 = sin flujo; 1 = flujo lento (movimiento celular muy lento, a veces flujo hacia atrás); 2 = flujo bajo continuo (células que se mueven continuamente hacia adelante, en su mayoría lentamente); 3 = alto flujo continuo (células que se mueven continuamente hacia adelante, en su mayoría rápidamente); 4 = flujo rápido

(células que se mueven rápidamente a lo largo de toda la secuencia de la película). El flujo rápido se refiere a una velocidad de flujo significativamente más alta de lo normal que da como resultado una mala perfusión ya que el oxígeno transportado por los eritrocitos en dichos microvasos no permanece el tiempo suficiente en el microvaso para entregarse al tejido. Dichos microvasos actuarán como una derivación arteriovenosa fisiológica.

- 5 Preferiblemente, se determina una velocidad categórica de flujo media. La velocidad categórica de flujo media (MFCV) puede determinarse para los capilares en un conjunto dado de imágenes, mediante la siguiente fórmula: Velocidad categórica de flujo media = {Fr (1) × 1} + {Fr (2) × 2} + {Fr (3) × 3} + {Fr (4) × 4}, donde Fr representa la fracción de capilares dentro de cada flujo categoría. Tal cálculo es descrito por Wester et al., *supra*.
- 10 Como alternativa al valor de MFCV, la velocidad del flujo capilar puede evaluarse en términos del número o proporción de capilares clasificados como 0 o 1 o 0 o 4 (signo negativo cuando la proporción es alta) o el número o proporción clasificados como 2 o 3 (positivo cuando es alto).
- 15 Una distribución óptima de las velocidades del flujo capilar y una baja variación de las velocidades del flujo entre los capilares (ambos en comparación con los controles sanos) generalmente se correlacionan con una buena función circulatoria. Idealmente debería haber 20-30% en la categoría 2 y 70-80% en la categoría 3, y 95% en las categorías 2 y 3 combinadas. El mejor pronóstico surge cuando las cifras se aproximan al 25% en la categoría 2 y al 75% en la categoría 3. (ver controles en la Figura 8). Los capilares con velocidades de flujo en el grupo 0 (= sin flujo) y el grupo 4 (= flujo rápido) indican insuficiencia circulatoria grave y un pronóstico grave. Preferiblemente, los métodos y evaluaciones de la invención comprenden una evaluación de la proporción de microvasos muestreados que caen en cada categoría de flujo.
- 20 En neonatos la falla circulatoria está indicada cuando hay menos del 20% en la categoría 2 y menos del 70% en la categoría 3, con porcentajes más bajos, mayor variación de flujo entre capilares y la presencia de capilares con velocidades categoría 0 y categoría 4 que indican una falla más severa.
- 25 CFV o velocidad categórica de flujo media (MFCV) se proporciona preferiblemente como un valor medio, por ejemplo, basado en el análisis de patrones de flujo en hasta 40-60 microvasos, más preferiblemente de 3-5, o posiblemente 3-8 grabaciones de video en una pluralidad de diferentes lugares. Así, de acuerdo con los métodos de la invención, se obtienen varias secuencias de vídeo y se determina la CFV o MFCV de cada una antes de calcular una media.
- 30 La heterogeneidad de la CFV o MFCV se evalúa utilizando el mismo enfoque que para la heterogeneidad de FCD.
- 35 El análisis de las imágenes puede automatizarse, por lo que cada imagen se explora para identificar las características mencionadas anteriormente, por ejemplo, usando técnicas de reconocimiento convencionales. Entonces se pueden calcular los valores/números de las características respectivas por unidad de área. En el caso de CAVM, dicho procesamiento puede ser realizado por el mismo ordenador en la que se cargaron las imágenes, o pueden transmitirse a un ordenador para su procesamiento.
- 40 Preferiblemente, todos los parámetros (a) a (d) se evalúan usando el mismo instrumento. Si bien OPS o SDF pueden ser adecuados en algunas realizaciones, no de acuerdo con la invención, particularmente cuando se desea evaluar la microcirculación de la piel, se usa un microscopio de luz blanca, preferiblemente CAVM.
- 45 La espectroscopia de reflectancia difusa (DRS) se emplea para proporcionar una medida de la saturación de oxígeno de los eritrocitos en la microcirculación. Los valores de saturación similares a los de los sujetos de control sanos indican que no hay insuficiencia circulatoria y/o un buen pronóstico. La saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares ( $SmvO_2$ ) se mide y preferiblemente se obtiene un valor medio. La técnica se describe en Awan, *supra*.
- 50 En realizaciones preferidas, también se determina la extracción de oxígeno por parte de los microvasos; esto se calcula de la siguiente manera:
- saturación arterial de oxígeno ( $SaO_2$ ) -  $SmvO_2$
- 55 La saturación de oxígeno arterial se mide adecuadamente mediante oximetría de pulso.
- 60 Un % de saturación de oxígeno ( $SmvO_2$ ) de menos del 70% en la piel de un sujeto es indicativo de insuficiencia circulatoria o de mal pronóstico;  $SmvO_2$  que es inferior al 75% sugiere que puede haber insuficiencia circulatoria y justificaría un mayor control y una mayor intervención. Un valor  $SmvO_2$  medio se puede obtener con base en 4 a 20, más generalmente 5-10 o 7-10 lecturas.
- 65 Los métodos de la invención también comprenden una evaluación de la heterogeneidad de  $SmvO_2$  y, en su caso, la heterogeneidad de la extracción de oxígeno. La heterogeneidad de  $SmvO_2$  se encuentra preferentemente determinando el coeficiente de varianza de  $SmvO_2$  sobre una pluralidad de ubicaciones diferentes, es decir, heterogeneidad espacial. Es probable que los pacientes con un CoV superior al 20 % tengan problemas circulatorios, con valores saludables dentro del intervalo de 9 a 18 %, con base en alrededor 10 evaluaciones DRS repetidas en la

misma área de la piel. Dado que cada uno de los volúmenes de medición tiene un volumen de fracciones de 1 mm<sup>3</sup>, colocar la sonda sobre la piel, retirar la sonda y volver a colocar la sonda sobre la piel para una segunda evaluación en la misma zona, es suficiente para obtener datos de diferentes volúmenes de medición.

- 5 El resultado del análisis anterior puede comprender una medida separada para cada una de las características (a) a (f) que se determinaron. Estos pueden visualizarse en un monitor asociado con el ordenador, enviarse a una impresora, etc. Alternativamente, los resultados pueden combinarse para proporcionar una o más puntuaciones indicativas de la patología de la microcirculación. Por ejemplo, puede determinarse y visualizarse una suma ponderada o un promedio 10 de las características individuales como se mencionó anteriormente. Se puede usar un algoritmo para dar un único valor de salida con base en una ponderación aplicada a cada parámetro que puede variar según el entorno clínico y las características del paciente.

La invención también puede comprender el uso de mediciones de perfusión con láser Doppler, además de las otras mediciones discutidas anteriormente, en particular si el sujeto es un recién nacido. Laser Doppler (LD), cuantifica la perfusión en términos de flujo de células sanguíneas (principalmente eritrocitos, glóbulos rojos): Flujo = número de células sanguíneas x velocidad media en un pequeño volumen de medición (en el intervalo de 1 mm<sup>3</sup>); Los valores más bajos de flujo de láser Doppler (LD) en la piel pueden o no corresponder a un mal pronóstico y pueden ser indicativos de insuficiencia circulatoria y/o respiratoria en adultos. Sorprendentemente, se encontró que al evaluar a los recién nacidos utilizando técnicas de LD, se podía obtener información de diagnóstico y pronóstico más confiable 20 que en adultos. Sin pretender limitar la teoría, se postula que esto se debe al epitelio más delgado de los recién nacidos y a la diferenciación incompleta de la arquitectura vascular en capas distintas, de modo que la señal de LD puede correlacionarse mejor con la capacidad nutritiva de la perfusión que en piel adulta.

25 Visto desde otro aspecto más, se proporciona un método para proporcionar información clínicamente relevante sobre un sujeto con o que se sospecha que tiene insuficiencia circulatoria que comprende evaluar la microcirculación del sujeto, con respecto a los siguientes parámetros:

- (a) densidad capilar funcional (FCD);
  - (b) heterogeneidad de la FCD;
  - 30 (c) velocidad de flujo capilar;
  - (d) heterogeneidad de la velocidad del flujo capilar;
  - (e) saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares (SmvO<sub>2</sub>); y
  - (f) heterogeneidad de SmvO<sub>2</sub>;
- 35 en donde los parámetros (a) a (d) se evalúan visualmente por microscopía y los parámetros (e) y (f) se evalúan por espectroscopía de reflectancia difusa (DRS).

Todas las valoraciones por microscopía y DRS no de acuerdo con la invención se realizan en tiempo real, es decir, 40 con el paciente presente. Los métodos de la invención se realizan sobre los datos obtenidos del paciente y el paciente no está todavía bajo control ni se requiere que esté presente para que tenga lugar el análisis. Esto se aplica a todos los métodos de la invención.

45 La invención se extiende a la obtención de información que puede ser útil al monitorizar el efecto del tratamiento de apoyo para el sujeto. Por ejemplo, puede usarse para evaluar los efectos sobre el suministro de oxígeno a las células de una intervención terapéutica en un paciente específico. El tratamiento de apoyo puede comprender tratamiento con fármacos vasoactivos o inotrópicos, hemoderivados y sustitución de volumen, e incluso tratamiento de soporte vital extracorpóreo (ECLS), por ejemplo, oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO). En neonatos se pueden administrar tensioactivos y broncodilatadores y realizar terapia de reemplazo de oxígeno.

50 Por lo tanto, un método para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica en un sujeto con o que se sospecha que tiene insuficiencia circulatoria que comprende evaluar la microcirculación del sujeto visualmente por microscopía y por espectroscopía de reflectancia difusa (DRS) para determinar la saturación de oxígeno de los eritrocitos dentro de los microvasos, se proporciona como se describe anteriormente. Por lo general, la evaluación requerirá una evaluación antes y después (opcionalmente también durante) la intervención y la comparación de los resultados 55 obtenidos entre sí y/o con valores de línea base. La eficacia de la intervención generalmente se correlacionará positivamente con su capacidad para dar como resultado una microcirculación normal o tender hacia ella. Mediante evaluaciones repetidas de acuerdo con la invención, por ejemplo, antes y después del inicio de la terapia dirigida a mejorar la insuficiencia circulatoria o respiratoria, se puede evaluar el efecto de la terapia específica en el paciente.

60 Hoy en día, la base científica para la selección de la terapia se basa en la comprensión del mecanismo de la enfermedad (patogénesis), así como en los resultados de los estudios basados en la evidencia. Para probar estadísticamente que la Terapia A es más efectiva que la Terapia B en un estudio doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo en una cohorte de pacientes, solo una minoría de los pacientes tratados con la Terapia A pueden tener un mejor resultado en comparación con los pacientes tratados con la Terapia B. Pero la Terapia A puede 65 no tener ningún valor para la mayoría de los pacientes de la cohorte, o incluso ser dañina para algunos pacientes. La presente invención se puede usar para identificar qué pacientes muestran un suministro mejorado de oxígeno a las

células del cuerpo después del inicio de la terapia (mediante análisis de tendencias de mediciones repetidas antes y después del inicio de la terapia). Asimismo, será posible identificar pacientes donde la Terapia A es dañina y donde la Terapia B es beneficiosa. La presente invención proporciona el diseño de un óptimo *trato individualizado*. Como resultado de esta evaluación de la eficacia del tratamiento, es decir, el progreso realizado por el paciente, el médico puede decidir continuar, suspender o modificar la intervención (por ejemplo, ECMO).

Todos los métodos de la invención pueden repetirse ventajosamente con una o más horas o con uno o más días de diferencia durante varias horas, días o semanas. Por ejemplo, un sujeto individual puede evaluarse más de 3, 5, 10 o 20 veces y realizarse un análisis de tendencia para refinar el diagnóstico, el pronóstico o, en particular, evaluar la eficacia del tratamiento.

Los métodos de la invención descritos en el presente documento; los métodos para identificar o monitorizar la insuficiencia circulatoria, los métodos para hacer un pronóstico y proporcionar información clínicamente relevante comprenden pasos de evaluación en los que se utilizan un microscopio y un espectrómetro para analizar la microcirculación del sujeto, por ejemplo, aplicando luz y una sonda a la piel del sujeto. Como resultado de estas evaluaciones, utilizando una comparación con los valores de línea base, se obtiene información sobre la insuficiencia circulatoria y el resultado clínico probable. Tal información puede dar o puede contribuir a un diagnóstico o pronóstico para el sujeto. Como consecuencia, se puede dar un paso terapéutico, en particular para suspender, continuar o modificar una intervención o régimen terapéutico, por ejemplo, un tratamiento de soporte vital tal como ECMO. La obtención de información, la realización de un diagnóstico o pronóstico y un paso terapéutico consecuente son pasos que constituyen realizaciones adicionales de los métodos de la divulgación.

Así, por ejemplo, en un aspecto adicional que no está de acuerdo con la invención, se proporciona un método para identificar o monitorizar la falla circulatoria en un sujeto, método que comprende evaluar la microcirculación del sujeto con respecto a los siguientes parámetros:

- (a) densidad capilar funcional (FCD);
- (b) heterogeneidad de la FCD;
- (c) velocidad de flujo capilar;
- (d) heterogeneidad de la velocidad del flujo capilar;
- (e) saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares ( $\text{SmvO}_2$ ); y
- (f) heterogeneidad de  $\text{SmvO}_2$ ;

en el que los parámetros (a) a (d) se evalúan visualmente por microscopía y los parámetros (e) y (f) se evalúan por espectroscopía de reflectancia difusa (DRS);

y en el que posterior a dicha evaluación se toma un paso terapéutico, en particular para cesar, continuar o alterar una intervención o régimen terapéutico que el sujeto está recibiendo.

El paciente puede ser un animal no humano o un ser humano, pero preferiblemente es un ser humano.

El presente inventor ha demostrado sorprendentemente que la microscopía y la DRS juntas pueden usarse para generar datos significativos sobre la salud de los recién nacidos a través del análisis de su microcirculación. No se esperaba que los recién nacidos, cuya piel no está completamente desarrollada, mostraran tales similitudes en su microcirculación con los adultos y que se pudiera obtener información reproducible y confiable sobre la microvasculatura/microcirculación del recién nacido utilizando técnicas no invasivas compatibles con el cuidado de personas vulnerables y posiblemente bebés muy enfermos. Tal información permite conclusiones de diagnóstico y pronóstico, en particular con respecto a la insuficiencia circulatoria o respiratoria.

El inventor ha reconocido que el estado de la microcirculación de un neonato proporciona información valiosa cuando se busca optimizar la terapia para neonatos enfermos y/o prematuros. Cuando los signos de insuficiencia circulatoria se reconocen clínicamente ahora, la insuficiencia ya se ha hecho grave. Cuando la circulación comienza a ser insuficiente, el cuerpo tiene mecanismos reguladores que dan prioridad a algunos tejidos y células sobre otros, por ejemplo, la circulación cerebral y cardíaca (coronaria) tiene prioridad sobre las células de la piel y la perfusión termorreguladora de la piel. La presente invención puede observar la calidad de la perfusión de las células de la piel. Con el aumento de la insuficiencia, más células se verán afectadas y provocarán una insuficiencia orgánica, hasta que el suministro insuficiente de oxígeno a órganos vitales como el cerebro y el corazón provoque la muerte. En este continuo de insuficiencia circulatoria, desde la afectación de algunas células de la piel hasta la afectación de órganos vitales con resultado de muerte, una pregunta clave es en qué grado de gravedad reconoce el médico responsable el problema de la insuficiencia. Se cree que la identificación/diagnóstico de insuficiencia circulatoria con la presente invención se puede realizar en una etapa más temprana que en la actualidad y que este aumento de la sensibilidad y el reconocimiento más temprano de la insuficiencia circulatoria darán lugar a intervenciones terapéuticas más tempranas y a un mejor resultado clínico que el que se logra hoy.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar la insuficiencia circulatoria o respiratoria en un recién nacido, método que comprende evaluar visualmente la microcirculación del

recién nacido mediante microscopía y mediante espectroscopia de reflectancia difusa (DRS) para determinar la saturación de oxígeno de los eritrocitos dentro del microvasos.

"Insuficiencia respiratoria" no implica un fallo total sino una captación insuficiente de oxígeno.

- 5 Cualquier condición que cause fallas respiratorias o circulatorias puede resultar en un desarrollo retardado, enfermedad, disfunción orgánica permanente o incluso la muerte de un recién nacido. Muchas condiciones y complicaciones que pueden conducir a fallas respiratorias o circulatorias están asociadas con la transición de la vida intrauterina a la extrauterina, en particular los cambios que ocurren en la transición de la circulación fetal a la neonatal,
- 10 todos estos pueden exacerbarse en los bebés prematuros. Las condiciones que pueden causar fallas respiratorias o circulatorias incluyen síndrome de dificultad respiratoria (RDS), hipertensión pulmonar persistente (PPHN), anemia, hipovolemia, condiciones infecciosas (sepsis), así como malformaciones congénitas en los sistemas respiratorio o circulatorio.
- 15 La invención es particularmente aplicable a los recién nacidos prematuros, es decir, nacidos con menos de 37 semanas de embarazo (a partir del primer día de la última menstruación), más particularmente a los recién nacidos con menos de 32 semanas de embarazo. Particularmente en estos grupos de pacientes, puede ser deseable realizar el método de evaluación descrito en el presente documento incluso cuando no hay síntomas que sugieran insuficiencia circulatoria o respiratoria. En tales circunstancias, las puntuaciones obtenidas por las presentes evaluaciones pueden dar una advertencia temprana de insuficiencia circulatoria y/o respiratoria, ya que la calidad de la microcirculación se revela por debajo de los niveles saludables. Por lo tanto, dichas indicaciones tempranas también constituyen "insuficiencia circulatoria o respiratoria" como se define en el presente documento.
- 20 La invención también se extiende a un aparato para llevar a cabo los métodos discutidos en el presente documento. Por lo tanto, visto desde otro aspecto, se proporciona un aparato para evaluar la microcirculación de un sujeto como se define en la reivindicación 7.
- 25 El software para el análisis de los fotogramas/películas recopilados y las curvas del espectrómetro se puede instalar en el mismo ordenador, pero el análisis también se puede realizar en un ordenador separado después de que los archivos recopilados se hayan transferido a este otro ordenador. El primer ordenador (ordenador receptor) puede tener instalado software para análisis en tiempo real, tanto para archivos DRS como para archivos CAVM. Preferiblemente, el análisis fuera de línea se realiza en otro ordenador (ordenador de procesamiento), al igual que en un laboratorio bioquímico profesional que recibe muestras de sangre de un médico de cabecera (médico general).
- 30 35 Por lo general, el análisis de las imágenes y los datos implicará algún procesamiento informático y algún análisis por parte de personas con experiencia en la interpretación de las imágenes/datos.
- 40 El microscopio se usa preferiblemente para obtener las imágenes de la piel u otra parte del cuerpo de un paciente, y luego se retira de allí antes de los pasos de procesamiento. Asimismo, una sonda unida al espectrómetro se usa preferiblemente en el cuerpo y luego se retira antes de los pasos de procesamiento. De hecho, otro aspecto de la invención se refiere al aparato para procesar datos adquiridos previamente. Por lo tanto, visto desde otro aspecto adicional, se proporciona un aparato para evaluar la microcirculación de un sujeto que comprende un ordenador dispuesto para recibir imágenes de la microcirculación de un recién nacido obtenidas usando un microscopio y datos relacionados con SmvO<sub>2</sub> de un espectrómetro y procesar las imágenes y los datos para identificar y/o determinar las características/parámetros asociados con la patología, donde las imágenes y los datos se relacionan con los siguientes parámetros:
- 45 (a) densidad capilar funcional (FCD);  
 (b) heterogeneidad de la FCD;  
 50 (c) velocidad de flujo capilar;  
 (d) heterogeneidad de la velocidad del flujo capilar;  
 (e) saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares (SmvO<sub>2</sub>); y  
 (f) heterogeneidad de SmvO<sub>2</sub>.
- 55 60 65 El aparato comprende además preferiblemente un medio para generar valores correspondientes a las características/parámetros y/o un valor basado en ellos en combinación, tal como una suma ponderada o un promedio. Dicho valor puede considerarse como una puntuación de patología microvascular. Se puede usar un algoritmo para procesar los datos sin procesar de modo que a cada uno de los parámetros definidos en el presente documento se le asigne una ponderación, las ponderaciones se pueden optimizar para diferentes cohortes de pacientes, por ejemplo, para prematuros o recién nacidos a término. El valor de salida del algoritmo que normalmente corresponde a una suma o promedio ponderado.
- La invención también se extiende al software, ya sea en forma tangible en un soporte de datos o descargable a través de una red, que comprende instrucciones para hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de procesamiento y/o salida mencionados anteriormente, como se define en la reivindicación 10.

La invención se extiende además al uso de dicho aparato y/o dicho software para evaluar la microcirculación del sujeto e identificar fallas circulatorias, proporcionar un pronóstico y/o monitorizar la eficacia de un régimen de tratamiento o intervención con base en esa medición/aquellas mediciones.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método implementado por ordenador para identificar o monitorizar la falla circulatoria en un sujeto, cuyo método comprende evaluar la microcirculación del sujeto con respecto a los siguientes parámetros:
- 10 (a) densidad capilar funcional (FCD);  
 (b) heterogeneidad de la FCD;  
 (c) velocidad de flujo capilar (FCV);  
 (d) heterogeneidad de FCV;  
 (e) saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares ( $\text{SmvO}_2$ ); y  
 (f) heterogeneidad de  $\text{SmvO}_2$ ;
- 15 en donde los parámetros (a) a (d) se evalúan visualmente por microscopía y los parámetros (e) y (f) se evalúan por espectroscopía de reflectancia difusa (DRS).

Ahora se describirá una realización de la invención, solo a modo de ejemplo, con línea base a los dibujos adjuntos:

- 20 La Figura 1 es una ilustración esquemática de un aparato para evaluar la microcirculación de un recién nacido mediante microscopía;
- 25 La Figura 2 es una ilustración esquemática de un aparato para evaluar la microcirculación de un neonato mediante DRS;
- 30 Las Figuras 3 (a) y (b) son diagramas de Bland-Altman que muestran la fiabilidad entre observadores (a) e intraobservador (b) de las mediciones de densidad capilar funcional;
- 35 Las Figuras 4 (a) y (b) son gráficos que muestran las categorías de flujo capilar en el tórax (a) y la cabeza (b).
- Con línea base a la Figura 1, se muestra una parte del cuerpo 1 de un paciente, un cabezal 2 de videomicroscopio portátil, un controlador 3 de videomicroscopio, un ordenador 4, un teclado 5 y una unidad 6 de visualización.
- El cabezal 2 de microscopio se muestra en contacto con el cuerpo 1 del paciente como sería al adquirir imágenes del mismo bajo el control del controlador 3 de microscopio. Una vez obtenidas las imágenes, se retira el cabezal 2 de microscopio del cuerpo 1 del paciente.
- 40 Las imágenes se pasan a través del controlador 3 de microscopio al ordenador 4 para su procesamiento. Esto implica el análisis de las imágenes para identificar y medir/cuantificar lo siguiente: -
- (a) opcionalmente hemorragias pericapilares y/o halos oscuros (número por unidad de área);  
 (b) densidad capilar funcional (FCD) (número por unidad de área);  
 (c) heterogeneidad de la FCD (coeficiente de variación);  
 (d) CFV o MFCV;  
 (e) heterogeneidad de CFV.
- 45 En una variante de la realización, estas características se muestran en una pantalla para su identificación/análisis por parte de un operador humano que luego realiza las entradas apropiadas de valores representativos a través del teclado 5. En otra variante, el software de reconocimiento de imágenes identifica los capilares (y los sangrados y halos asociados) y la velocidad del flujo sanguíneo en ellos y asigna valores automáticamente.
- 50 A continuación, el ordenador calcula una suma ponderada de estos valores y la envía a la pantalla 6, junto con los valores en los que se basa. Esta puntuación, junto con las puntuaciones de  $\text{SmvO}_2$  es indicativo del grado de patología de la microcirculación del neonato.
- 55 Con línea base a la Figura 2, se muestra una parte del cuerpo 1 del paciente 1, una fuente 7 de luz, una sonda 8, un espectrómetro 9, un ordenador 4, un teclado 5 y una unidad 6 de visualización.
- La sonda 8 se muestra en contacto con el cuerpo 1 del paciente como sería cuando está emitiendo luz recibida por una fibra óptica desde la fuente 7 de luz y recibiendo luz reflejada por el cuerpo, siendo transmitida esta luz reflejada por una fibra óptica al espectrómetro 9. Una vez que la luz reflejada ha sido procesada por el espectrómetro 9, la sonda 8 se retira del cuerpo 1 del paciente.
- 60 Los datos del espectrómetro 9 se pasan al ordenador 4 para su registro y procesamiento. El espectrómetro 9 genera datos en forma de espectros de reflectancia, el ordenador 4 realiza la descomposición de los espectros para estimar  $\text{SmvO}_2$  y la heterogeneidad de  $\text{SmvO}_2$ . A continuación, el ordenador calcula una suma ponderada de estos valores y la envía a la pantalla 6, junto con los valores en los que se basa. Esta puntuación, junto con la puntuación basada en el análisis visual, es indicativa del grado de patología de la microcirculación del recién nacido.

En una realización, el espectrómetro 9 y el controlador 3 de microscopio están conectados al mismo ordenador 4. El ordenador 4 puede analizar los fotogramas/películas recogidos y los espectros. En otra realización, los fotogramas/películas y los espectros pueden transferirse a otro ordenador para su análisis y los ordenadores 4 actúan solo para recibir los datos del controlador 3 de microscopio y el espectrómetro 9.

Se ha llevado a cabo un estudio clínico basado en una realización adicional, que además comprende el uso de mediciones de perfusión con láser Doppler de neonatos y se analiza en el Ejemplo 2.

10 El presente inventor fue el primero en apreciar la utilidad pronóstica del análisis de la microcirculación de los pacientes de la UCI. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para hacer un pronóstico para un paciente con insuficiencia circulatoria que se está considerando para terapia de cuidados intensivos o que se somete a ella, que comprende evaluar el estado de la microcirculación del paciente.

15 Este aspecto de la invención es particularmente aplicable a pacientes con insuficiencia circulatoria sistémica, por ejemplo, después de una insuficiencia cardíaca aguda, hipovolemia o sepsis, y el tratamiento de apoyo puede comprender un tratamiento de soporte vital extracorpóreo (ECLS), por ejemplo, oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO). La invención se extiende a la monitorización del efecto del tratamiento de soporte para dicho paciente por los mismos medios.

20 Los exámenes de acuerdo con la invención se pueden usar para hacer un pronóstico y, por lo tanto, mejorar la selección de pacientes para tratamientos de soporte vital tales como ECMO/ECLS y/o para guiar dicha terapia, así como para proporcionar una indicación del efecto de la terapia de soporte adicional y el beneficio en la continuación del tratamiento, es decir, para proporcionar criterios de finalización para el tratamiento de soporte vital.

25 Ahora se describirá una realización de este aspecto de la invención, solo a modo de ejemplo, con línea base a los dibujos adicionales adjuntos:

30 La Figura 5 es una descripción general de ocho pacientes con ECMO;  
 Las Figuras 6 (a) y (b) son imágenes de microscopio que muestran hemorragias pericapilares y halos oscuros, respectivamente;  
 La Figura 7 (a) y (b) son gráficos que muestran la densidad capilar funcional para tres grupos de pacientes ECMO y controles sanos; y  
 La Figura 8 es un histograma que muestra las proporciones de capilares en diversas categorías de flujo sanguíneo para tres grupos de pacientes ECMO.

35 Con línea base a la Figura 1, se muestra una parte del cuerpo 1 del paciente 1, un cabezal 2 de videomicroscopio portátil, un controlador 3 de videomicroscopio, un ordenador 4, un teclado 5 y una unidad 6 de visualización.

40 El cabezal 2 de microscopio se muestra en contacto con el cuerpo 1 del paciente como sería al adquirir imágenes del mismo bajo el control del controlador 3 de microscopio. Una vez obtenidas las imágenes, se retira el cabezal 2 de microscopio del cuerpo 1 del paciente.

45 Las imágenes se pasan a través del controlador 3 de microscopio al ordenador 4 para su procesamiento. Esto implica el análisis de las imágenes para identificar y medir/cuantificar lo siguiente: -

50 (a) hemorragias pericapilares y/o halos oscuros (número por unidad de área);  
 (b) densidad capilar funcional (FCD) (número por unidad de área);  
 (c) heterogeneidad de la FCD (coeficiente de variación);  
 (d) perfiles de velocidad categóricos de flujo capilar  
 (e) velocidad categórica de flujo promedio (es decir, velocidad de flujo en los capilares).

55 En una variante de la realización, estas características se muestran en una pantalla para su identificación/análisis por parte de un operador humano que luego realiza las entradas apropiadas de valores representativos a través del teclado 5. En otra variante, el software de reconocimiento de imágenes identifica los capilares (y los sangrados y halos asociados) y la velocidad del flujo sanguíneo en los mismos y asigna valores automáticamente.

60 A continuación, el ordenador calcula una suma ponderada de estos valores y la envía a la pantalla 6, junto con los valores en los que se basa. Esta puntuación es indicativa del grado de patología de la microcirculación.

65 La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes Ejemplos en los que:

Las Figuras 9(a) y (b) son gráficos que muestran (a) la saturación de oxígeno como un valor porcentual medio a lo largo del tiempo medido por DRS y descrito en el Ejemplo 5; y (b) el CoV de los valores de saturación de oxígeno presentados en (a).

## Ejemplo 1

## 1. Pacientes y métodos

## 5 1.1 Pacientes

Durante un período de dos años, los pacientes tratados con ECMO por choque cardiogénico en una unidad quirúrgica cardíaca de tamaño medio (aproximadamente 550 operaciones a corazón abierto por año) fueron candidatos para la inclusión. Se incluyeron ocho pacientes consecutivos (E1-E8), dos mujeres y seis hombres; mediana de edad de 59 años (intervalo 27-78). Ningún paciente se excluyó del estudio. Cuatro pacientes (E4 - E7) se encontraban en estado de choque cardiogénico antes de llegar a quirófano: uno secundario a embolismo pulmonar masivo con compresión cardiaca mecánica en curso (E4), uno con infarto de miocardio (MI) masivo (E5), uno con MI y complicación a intervención coronaria percutánea (PCI) (E6) y finalmente uno con endocarditis (E7). Los cuatro pacientes restantes sufrieron choque cardiogénico post cardiotomía. Ocho estudiantes masculinos sanos y no fumadores (21-29 años) sirvieron como controles.

## 1.2 Oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO)

Se realizó canalización arterial en la ingle en siete pacientes, en dos de ellos mediante injerto terminolateral de Dacron. Un paciente tuvo canulación arterial a través de la arteria subclavia derecha. Siete pacientes tuvieron drenaje venoso por la vena femoral y uno por la aurícula derecha. El circuito ECMO constaba de una bomba centrífuga (Medtronics Incorporated, Minneapolis, Minnesota, EE. UU.), un oxigenador de membrana recubierto de heparina y tubos (Maquet Cardiovascular 72145 Hirrlingen, Alemania). Después de establecer ECMO, todos los pacientes se trataron inicialmente con un flujo de al menos 4.0 l/min. La terapia de mantenimiento en ECMO se guio por un protocolo estándar para la unidad [38]. El destete de ECMO fue guiado por ECCO Doppler transesofágico además de parámetros clínicos.

## 1.3 Técnicas microvasculares

La microcirculación de la piel se evaluó con mediciones microscópicas de video en ocho pacientes y mediciones con láser Doppler en seis.

## 1.3.1. Videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM)

Esta técnica involucra un videomicroscopio portátil aplicado suavemente sobre la superficie de la región de interés (ROI). Se utiliza aceite de inmersión. Las imágenes o secuencias de películas se proyectan y almacenan en un ordenador. Para el primer paciente, E1, se utilizó un microscopio menos avanzado, con un CCD de 1.3 megapíxeles (ProScan, Bodelin technologies, OR, EE. UU.), con un aumento de 200 veces. Con este microscopio se pudo evaluar la patología pericapilar, la densidad capilar funcional (FCD) y la heterogeneidad, pero no los patrones de flujo capilar. Los pacientes restantes (E2-E8) se examinaron con otro microscopio (Microvision 2100, Finlay Microvision Co. Ltd., Warwickshire, Reino Unido) con mayor resolución y una lupa de 500 veces. Se utilizó un convertidor de analógico a digital (Canopus, Kobe, Japón) para proyectar y almacenar las secuencias de la película en un Mac Book pro, utilizando el software iMovie (ambos Apple, Cupertino, EE. UU.).

Para estudiar la patología pericapilar, calcular la densidad capilar funcional (FCD), la heterogeneidad de la FCD y los patrones de flujo microvascular en una ROI, se utilizaron las primeras cinco secuencias de película capturadas con calidad adecuada. Se elaboró una cuadrícula con cuatro rectángulos de igual tamaño para facilitar el análisis visual. Para la creación de las cuadrillas se utilizó el software Xscope (Iconfactory, Greensboro, Carolina del Norte, EE. UU.). La calidad adecuada de la película se definió como capilares enfocados en los cuatro cuadrantes del cuadro y una duración de la secuencia de al menos diez segundos. FCD se definió como el número medio de capilares visibles por milímetro cuadrado. La heterogeneidad de FCD se expresó como el coeficiente de variación ( $\text{CoV} = \text{DE}/\text{media}$ ) de la densidad de capilares en cada uno de los cuatro rectángulos en las cinco secuencias de películas ( $n=20$ ).

Para el análisis de la velocidad del flujo, cada capilar de las cinco secuencias de película se puntuó visualmente en uno de cinco grupos, desde "sin flujo" (Categoría 0) hasta "flujo rápido" (Categoría 4), y se expresó en fracciones ( $\text{Fr} = \text{número de capilares en cada categoría}/\text{número total de capilares}$ ). Con base en las fracciones de capilares en cada categoría de flujo, la velocidad de categoría de flujo media se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Velocidad categórica de flujo media} = \{\text{Fr (1)} \times 1\} + \{\text{Fr (2)} \times 2\} + \{\text{Fr (3)} \times 3\} + \{\text{Fr (4)} \times 4\}.$$

## 60 1.3.2 Mediciones de perfusión con láser Doppler (LDPM)

LDPM es una técnica para la cuantificación de la perfusión microvascular. El resultado de la técnica se da en una escala de flujo semicuantitativa, definida como el producto del número de células sanguíneas en movimiento y su velocidad media en el volumen medido ( $<1 \text{ mm}^3$ ).

Se utilizó un monitor de flujo sanguíneo Moor (MBF 3D) para mediciones de perfusión con Moorsoft (ambos instrumentos Moor, Axminster, Devon, Reino Unido) para registro y análisis. El flujo en una ROI se proporcionó como el valor medio de siete mediciones consecutivas de una duración de diez segundos.

5 1.2.4. Procedimiento de medición

La Figura 6 muestra la microcirculación de la piel en fosa tabatière en dos pacientes ECMO. A la izquierda (a) se observan varios sangrados pericapilares y apenas hay capilares en forma de punto (Paciente E1, Proscan (x 200)). A la derecha (b) se ven halos oscuros circulares que rodean los capilares sin flujo o con un flujo extremadamente lento (Paciente E2 Microvision 2100 (x500)).

Los primeros exámenes microvasculares se realizaron lo antes posible, generalmente dentro de las 24 horas posteriores al establecimiento de ECMO. La segunda medición se realizó el día 3 cuando fue posible. E4 se examinó dos veces con un intervalo de solo dos horas antes de que se apagara el ECMO debido a la interrupción del flujo sanguíneo cerebral. Cuatro supervivientes (Grupo 2) se controlaron entre 18 y 65 días después de la desconexión de ECMO. E3 se examinó siete veces. La piel en el dorso de la mano, entre el primer y segundo metacarpo (fosa tabatière) fue examinada por CAVM en todos los pacientes. A partir del paciente 3 también se valoró la perfusión cutánea de la cara medial del pie derecho, situándose la ROI a un tercio de la distancia sobre una línea imaginaria desde el maléolo medial hasta la cabeza del primer metatarso. En el paciente con hemorragias pericapilares (E1), también se examinaron áreas adicionales de la piel, tal como sobre el brazo, el muslo, el tórax y la cara. Seis pacientes fueron medidos por LDPM. El paciente E1 solo se midió en fosa tabatière. Del paciente 4 en adelante también se midió LDPM en el pie. Las mediciones de CAVM y Laser Doppler se realizaron en ambas ubicaciones en todos los controles. En el momento de las mediciones microvasculares, se anotaron los parámetros hemodinámicos centrales correspondientes, los resultados de los análisis de sangre y los parámetros clínicos.

25 1.5 Consideraciones éticas

La decisión de establecer ECMO fue tomada por el cirujano responsable únicamente por razones clínicas. Todas las mediciones microvasculares fueron no invasivas y se realizaron solo después de la aprobación del cirujano y el anestesiólogo responsables. Ningún resultado de hallazgos microvasculares influyó en la terapia de mantenimiento en ECMO. Dado que los pacientes en ECMO no podían dar un consentimiento informado, los familiares, cuando estaban disponibles, dieron su consentimiento para las evaluaciones microvasculares. Los sobrevivientes a largo plazo (n=3) dieron su consentimiento para las mediciones de seguimiento y la publicación de sus datos. El comité de ética regional ha aprobado la publicación de los datos de los ocho pacientes.

35 1.6 Estadísticas

Los datos se presentan como medias con intervalo. El coeficiente de variación (CoV) se utilizó como parámetro de heterogeneidad de la densidad capilar funcional. Para comparar los resultados entre los grupos de resultados, se utilizó la prueba t independiente.

## 2. Resultados

### 2.1 Información clínica y resultado

45 En las tablas 1, 2 (véase el Anexo al final de este ejemplo) y la Figura 5 se proporciona una descripción general de la información clínica de los pacientes individuales, los datos de laboratorio y los exámenes realizados. La Figura 5 es una descripción general de los ocho pacientes con ECMO, desde el inicio del tratamiento con ECMO hasta la muerte o la última medición de control. Los períodos de medición están marcados de acuerdo con la técnica de medición.

50 Los pacientes se agruparon de acuerdo con el resultado clínico en dos grupos: pacientes que fallecieron con ECMO (Grupo 1) y pacientes que sobrevivieron a ECMO (Grupo 2). La edad media para el grupo 1 fue de 44 años, para el grupo 2 fue de 58 años. Ambos sexos estuvieron presentes en cada grupo. En el grupo 2, un paciente tuvo una recuperación de la función cardíaca y una función cerebral mantenida, pero murió por complicaciones hemorrágicas en la unidad de cuidados intensivos.

55 De los cuatro pacientes restantes del grupo 2, un paciente (E3) fue trasladado a otro hospital donde falleció por fallo multiorgánico el día 51 tras instaurarse ECMO. Los tres restantes todavía estaban vivos y fuera de las instituciones dos años después del tratamiento ECMO.

60 2.2 Mediciones clínicas

65 El conteo de glóbulos blancos, durante las primeras mediciones microvasculares, fue menor entre los sobrevivientes en comparación con los no sobrevivientes, tabla 2.

2.3 Mediciones microvasculares

2.3.1. Videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM)

2.3.1.1 Patología pericapilar:

E1 tenía numerosos sangrados pericapilares en varias localizaciones de la piel (fosa tabatière, cara palmar del antebrazo, pierna y cara) en ambos exámenes, figura 3 (a). Ningún otro paciente tuvo hemorragias pericapilares visibles. Los pacientes E2 y E4 tenían halos oscuros circulares a una distancia de  $12 \pm 1$  micrómetros alrededor de algunos capilares de la piel (65% en E2 y 14% en E4), véase la figura 3 (b).

2.3.1.2 Densidad capilar funcional (FCD):

La Figura 4 muestra la densidad capilar funcional (en capilares/mm<sup>2</sup>) para tres grupos de pacientes ECMO y ocho controles sanos (b) y coeficiente de variación de la densidad capilar funcional para los mismos pacientes (a). Para los pacientes medidos más de una vez, se dan las mediciones primera, segunda y de seguimiento. Las mediciones de seguimiento se realizaron 18-65 días después de que el paciente fuera desconectado con éxito de ECMO (n=4).

Los tres pacientes que fallecieron con ECMO tenían una FCD significativamente menor en fosa Tabatière en comparación con los pacientes que sobrevivieron a ECMO ( $p = 0.002$ ), figura 4 (b). No se observaron diferencias en FCD entre los pacientes del grupo 2 y los controles ( $p=0.24$ ).

A partir del paciente E3, también se realizaron mediciones en la cara medial del pie (n=6). En esta localización los pacientes tenían una FCD de 66.2 (intervalo 55.6 - 75.8) capilares/mm<sup>2</sup>, similar a la FCD media de la mano en pacientes supervivientes a ECMO (70.8 capilares/mm<sup>2</sup>) y controles (65.5 capilares/mm<sup>2</sup>), así como en el pie de controles (66.2 capilares/mm<sup>2</sup>). Dado que solo un paciente en el grupo 1 (E4) se midió en el pie, no se realizó ningún análisis adicional de los datos de esta ubicación. Aun así, E4 tuvo la FCD más baja y el CoV de FCD más alto de los pacientes medidos en esta ubicación.

Las segundas mediciones de FCD en fosa tabatière dieron valores similares a las primeras mediciones.

Las mediciones finales de seguimiento de cuatro (el paciente E5 ya había fallecido) del grupo 2 se realizaron 18-65 días después de la desconexión gradual de ECMO, figuras 5 y 7. Un paciente mostró una FCD reducida en la evaluación final (E3, véase más adelante), mientras que el resto de los supervivientes tenían una FCD media de 65.5 (intervalo 56.9 - 76.5) en la evaluación final, valores en el mismo intervalo que su primera medición y en los controles en esta ubicación.

2.3.1.3 Heterogeneidad de FCD:

Los pacientes que fallecieron con ECMO (grupo 1) tuvieron un CoV significativamente mayor de los capilares de la piel en comparación con los pacientes del grupo 2 ( $p < 0.005$ ), figura 7 (a). No se observaron diferencias entre este último grupo y los controles ( $p=0.74$ ).

2.3.1.4 Patrones de flujo capilar:

La velocidad categórica de flujo media durante las primeras mediciones en fosa tabatière no mostró diferencias entre los pacientes que sobrevivieron a ECMO, 2.67 (intervalo 2.53 - 2.87) y los controles con 2.76 (intervalo 2.65-2.88) ( $p = 0.17$ ). Los dos pacientes que fallecieron con ECMO tenían velocidades de flujo medias de 0.5 y 1.76, significativamente más bajas que los pacientes que sobrevivieron a ECMO ( $p = 0.007$ ). En uno de estos pacientes con halos oscuros pericapilares (E2), apenas se detectó movimiento de eritrocitos en los capilares en ninguna de las secuencias de la película, aunque el circuito ECMO dio un rendimiento de 4.5 litro/min.

Todos los capilares en controles sanos tenían patrones de flujo 2 o 3, fig. 8. Los pacientes del grupo 2 tenían una distribución de categorías de flujo similar a la de los controles. En los dos pacientes del grupo 1 donde se realizaron valoraciones de flujo capilar (E2, E4); los capilares tenían un espectro ensanchado y desplazado a la izquierda. La categoría de flujo 0 (sin flujo) y 1 (flujo lento) apenas se observó en los pacientes que sobrevivieron a ECMO y nunca se observó en los controles.

E3 tuvo una estadía prolongada y complicada en la UCI con infecciones pulmonares, episodios de sepsis e insuficiencia renal progresiva después del tratamiento con ECMO. El paciente falleció 51 días después de instaurado ECMO por falla multiorgánica. Las evaluaciones microscópicas finales del paciente el día 44 mostraron que la FCD se redujo en 30 %, el CoV aumentó en 64 % y la velocidad categórica de flujo media se redujo a 1.75, una reducción del 34 %, en comparación con las mediciones iniciales. En una ocasión se examinó al paciente durante un episodio de sepsis por gramnegativos (día 24); en ese momento, la FCD se redujo notablemente a 49 capilares/mm<sup>2</sup> (-29 %), el CoV fue de 0.17 (-23 %) y el 22 % de los capilares de la piel tenían un flujo rápido (categoría 4). No se observaron capilares en esta categoría de flujo en ningún otro paciente en ningún momento.

### 2.3.2 Mediciones de perfusión con láser Doppler (LDPM)

Los controles tenían un valor de flujo medio de 48 Au (intervalo 22-96) en la fosa Tabatière, mientras que los valores correspondientes en el lado medial del pie eran 31.5 (intervalo 17.4-60.1). El coeficiente de variación medio fue 0.20 (intervalo 0.13-0.35) en fosa Tabatière y de 0.25 (intervalo 0.12-0.34) en la cara medial del pie.

Los conjuntos de datos de láser Doppler para pacientes están incompletos. Los pacientes que fallecieron en ECMO (E1 y E4) tenían valores de flujo más bajos en ambas localizaciones y en ambas ocasiones de medición que cualquiera de los pacientes supervivientes o controles (tab. 3), pero las diferencias no alcanzaron significancia, probablemente debido al pequeño número y la gran variabilidad. El coeficiente de variación para el flujo en fosa Tabatière fue significativamente mayor en los sobrevivientes en comparación con los controles en la primera medición ( $p=0.03$ ), pero no para la segunda y tercera medición en las mismas ubicaciones ( $p= 0.17$  y  $0.74$  respectivamente). En el lado medial del pie, el coeficiente de variación no mostró cambios significativos entre supervivientes y controles ( $p= 0.22$ ,  $0.44$  y  $0.82$  respectivamente).

## 3. Discusión

El estudio se llevó a cabo en una unidad de cirugía cardíaca de tamaño medio, con aproximadamente 550 operaciones a corazón abierto al año. Tanto la incidencia de pacientes con necesidad de ECMO (0.6%) como la supervivencia de los pacientes tratados con ECMO (28%) son comparables con los datos de la literatura. Excepto por el recuento de glóbulos blancos, ningún parámetro clínico mostró diferencias significativas entre los sobrevivientes y los no sobrevivientes. Se observaron cambios significativos para todos los parámetros de CAVM. La anatomía microvascular de la piel es compleja, con capilares subpapilares que sirven principalmente para la nutrición de la proliferación epitelial y el plexo vascular más profundo sirve principalmente para la regulación de la temperatura corporal. En la piel adulta, solo se ven los capilares subpapilares en la mayoría de los lugares con el equipo de microscopía utilizado en este estudio. Las técnicas de Láser Doppler miden la perfusión del plexo tanto superficial como más profundo.

### 3.1 Observaciones realizadas con Videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM).

#### 3.1.1 Densidad capilar funcional y heterogeneidad de la distribución capilar:

En 1920, el fisiólogo danés August Krogh recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina. Uno de sus principales logros fue la identificación del "cilindro de Krogh", postulando que todas las células deben ubicarse dentro de un radio crítico de un capilar perfundido para sobrevivir. Las células fuera de este radio experimentarían una oxigenación insuficiente independientemente del caudal y la saturación de oxígeno de los eritrocitos en el capilar más cercano. Una distribución desigual de los capilares perfundidos puede dar una baja tensión de oxígeno a algunas células a pesar de una  $SaO_2$  normal.

Los pacientes que fallecieron con ECMO habían reducido FCD y aumentado el CoV de FCD en comparación con los pacientes que sobrevivieron a ECMO y los controles sanos. Los pacientes que sobrevivieron a ECMO tenían FCD y CoV estables dentro de los niveles de línea base para los controles (figura 7). La excepción fue el paciente E3, que tuvo un curso post ECMO complicado con varios episodios sépticos. Las últimas evaluaciones, siete días antes de su muerte por falla multiorgánica, mostraron valores comparables a los pacientes que fallecieron con ECMO (véase la figura 7).

En 1922, Freedlander utilizó un microscopio para mostrar una disminución de la densidad capilar en la piel de pacientes sépticos. Estudios posteriores confirmaron los hallazgos de Freedlanders y demostraron una mayor heterogeneidad de FCD en diferentes tejidos y especies de mamíferos con enfermedades sistémicas. En pacientes con choque séptico y cardiogénico, una FCD severamente reducida persistente durante 24 horas en el área sublingual se asocia con una mayor mortalidad. La FCD reducida en la mucosa rectal se asocia con un mal pronóstico en pacientes con paludismo grave.

#### 3.1.2 Patrones de flujo capilar:

La Figura 7 muestra la distribución de los capilares en cada una de las cinco categorías de flujo para pacientes que mueren en (grupo 1) y pacientes que se retiraron con éxito de ECMO (grupo 2) en comparación con ocho controles sanos. Las categorías de flujo se definieron como: 0 = sin caudal; 1 = flujo lento (movimiento celular muy lento, a veces flujo hacia atrás); 2 = flujo bajo continuo (células que se mueven continuamente hacia adelante, en su mayoría lentamente); 3 = alto flujo continuo (células que se mueven continuamente hacia adelante, en su mayoría rápido); 4 = flujo rápido (células que se mueven rápidamente a lo largo de toda la secuencia de la película).

En los dos pacientes del grupo 1, en los que se había analizado el flujo capilar, se observó un número importante de capilares "sin flujo" o "flujo lento". Estas categorías apenas se observaron en los controles o supervivientes. Los pacientes del grupo 2 tenían un patrón de flujo capilar similar al de los controles. Se ha descrito un mayor número de capilares sin flujo en diferentes enfermedades y se ha demostrado una correlación positiva entre capilares sin flujo y alta mortalidad. Todos los capilares del paciente E2 tenían categoría de flujo 0 o 1, el cincuenta por ciento en cada

categoría. Curiosamente, el paciente en ese momento tenía marcadores bioquímicos que indicaban coagulación intravascular diseminada (DIC).

### 3.1.3 Halos oscuros circulares

- 5 Se encontraron halos oscuros en dos de los pacientes que fallecieron en ECMO (E2 y E4), con los bordes del halo a  $12 \pm 1$  micrómetros de los capilares. En E2 estaban presentes numerosos halos, prominentemente alrededor de los capilares sin "flujo". E4 tenía menos halos y también se observaron alrededor de los capilares perfundidos. La causa de estos halos es incierta, pero una posibilidad es que representen proteínas precipitadas o productos de degradación de eritrocitos que se escapan de los capilares lesionados. Otra posibilidad es que estén causados por edema pericapilar.

### 3.1.4 Hemorragias pericapilares

- 15 Se han descrito hemorragias capilares en pacientes con enfermedad de von Willebrand, en pacientes con isquemia crítica de las extremidades inferiores, en pacientes con trastornos del tejido conectivo y en pacientes con anticoagulantes. Se han informado hemorragias pericapilares en la lengua de cerdos sépticos cuatro horas después de la inyección del antígeno de N. meningitidis. Se encontraron hemorragias pericapilares en varias localizaciones de la piel del paciente E1 (fallecido en ECMO). Este paciente sufría de lupus eritematoso sistémico. No se había tratado con anticoagulantes. No se detectaron sangrados macroscópicos. La fuga capilar de eritrocitos es el resultado de un daño grave en la pared capilar y se esperaría un aumento de la fuga de líquido y edema. El paciente E1 ganó 30 kilos de peso corporal durante las primeras 24 horas en ECMO, y ganó otros 12 kilos entre la primera y la segunda medición.

### 3.2 Mediciones de perfusión con láser Doppler

- 25 La mayor parte de la perfusión de la piel tiene lugar en los plexos termorreguladores más profundos, donde la perfusión está regulada principalmente por la actividad simpática. Dado que la perfusión en estos plexos cumple principalmente una función termorreguladora, la nutrición de la piel no puede evaluarse mediante la técnica LDPM. Aunque los dos pacientes que fallecieron con ECMO (E1 y E4) tuvieron los valores de perfusión más bajos de todos en ambas ubicaciones y períodos de medición, no se demostraron diferencias significativas debido a los pequeños números y la gran variación de datos.

### 3.3 Limitaciones

- 35 El número de pacientes incluidos es pequeño y representa un grupo heterogéneo con insuficiencia cardíaca aguda, mientras que los datos de línea base se recopilaron de estudiantes masculinos jóvenes sanos. Dado que las velocidades de los eritrocitos capilares en sujetos sanos no dependen de la edad, se asume que se puede utilizar el grupo de control de jóvenes estudiantes.

### 40 3.4 Posibles implicaciones de los hallazgos

- 45 En EE. UU., 40 % de los gastos de Medicare ocurrieron en el último mes de vida y los gastos de hospitalización representaron más del 70 % de los costes totales de los difuntos. Esto indica un mayor uso de las instalaciones de cuidados intensivos de alta tecnología cuando se acerca el final de la vida de los pacientes, sin lograr una gran mejora en la esperanza de vida. ECMO y otros dispositivos de asistencia a la circulación son costosos en uso. Faltan los criterios generalmente aceptados para la selección de pacientes para dicho tratamiento. Los dispositivos de asistencia mejoran la hemodinámica central, pero a menudo sin mejorar la esperanza de vida. Por lo tanto, existe una gran necesidad de técnicas de diagnóstico que puedan usarse para seleccionar pacientes para costosas técnicas de soporte vital extracorpóreo, para estimar el pronóstico temprano después de establecer dicho tratamiento y para evaluar los efectos del tratamiento de apoyo durante el uso de un dispositivo de asistencia.

50 Parece aceptada la idea de que el examen microscópico de la microcirculación sublingual puede servir como indicador pronóstico de pacientes críticos con sepsis o choque cardiogénico. En un estudio de 68 pacientes con choque cardiogénico, la densidad capilar funcional sublingual reducida se asoció con el desarrollo de insuficiencia orgánica.

55 Un informe de caso de un paciente en ECMO examinado sublingualmente por un método microscópico (OPS) mostró que la velocidad del flujo capilar variaba con la variación del flujo de ECMO. Los cambios fueron más prominentes en los capilares más pequeños. Los pequeños capilares sublinguales corresponden al tamaño de los capilares papilares cutáneos nutritivos examinados en el estudio.

60 El estudio indica que las técnicas para las evaluaciones de la microcirculación de la piel al lado de la cama pueden convertirse en valiosas herramientas clínicas para mejorar el manejo de los pacientes con dispositivos de asistencia.

## 4. Conclusión

Los exámenes microvasculares de los capilares nutritivos de la piel en pacientes con ECMO muestran una patología estructural y funcional importante en pacientes que mueren con ECMO, mientras que los pacientes que sobreviven a ECMO tienen resultados similares a los controles sanos. El hallazgo de una morfología y función microcirculatoria de la piel intacta en los sobrevivientes poco después del establecimiento de ECMO parece ser un hallazgo sólido y clínicamente útil que implica un buen pronóstico. Los sangrados pericapilares o halos oscuros, los microtrombos/capilares sin flujo, la baja velocidad del flujo capilar y la baja densidad funcional de los capilares se asocian con un mal pronóstico.

5

## Anexo - Tablas

10

Tabla 1. Información clínica y resultado para todos los pacientes del estudio.

Paciente	Género	Factores riesgo	de tipo de cirugía	Indicación para ECMO	Duración ECMO	Resultado
E1	Masculino	Rechazo crónico del injerto renal por SLE	Estenosis aórtica y mitral. AVR y MVR	Choque postcardiotomía	11 días	Muerte en ECMO
E2	Masculino	NYHA III EF: 15-20%	Disección aórtica tipo A. Injerto aórtico	Choque postcardiotomía	2.5 días	Muerte en ECMO
E3	Masculino	AMI previo y embolismo pulmonar. Rehacer	Disección aórtica tipo A. Injerto aórtico	Choque postcardiotomía	4 días	Muerte 51 días después de la operación
E4	Femenino	Mutación Leyden Anticonceptivos orales	Choque por embolismo pulmonar masivo	Choque cardiogénico	5 horas	Muerte en ECMO
E5	Masculino	Choque cardiogénico preoperatorio con reciente AMI	Insuficiencia mitral y CAD MVR + CABG	Choque postcardiotomía	3 días	Muerte horas 8 post ECMO
E6	Masculino	EF reducida Fumador empedernido	Choque cardiogénico después de PCI CABG fallida	Choque postcardiotomía	7 días	Sobreviviente a largo plazo
E7	Femenino	Accidente cerebrovascular previo. Rehacer después de AVR 3 años antes	Endocarditis mitral. Cardiotomía y eliminación de depósitos	Choque postcardiotomía	4 días	Sobreviviente a largo plazo
E8	Masculino	DM tipo II Accidente cerebrovascular Hipertensión pulmonar	Disección aórtica tipo A. Injerto aórtico	Choque postcardiotomía.	4 días	Sobreviviente a largo plazo

Tabla 2: Datos clínicos y de laboratorio en los pacientes ECMO en el momento de la primera medición microvascular.

	Grupo 1 (N=3)	Grupo 2 (N=5)	
Hemoglobina (g/dl)	9.3 (7.8-10)	10.1 (9.5-11.2)	NS
Transfusiones de eritrocitos (no. de unidades)	21 (10.0-37)	16.4 (10.0-20)	NS
Frecuencia cardíaca (latidos/minuto)	74 (68-80)	82 (55-107)	NS
MAP (mm Hg)	53 (45-63)	53 (45-60)	NS
CVP (mmHg)	19 (13.0-28)	10 (8-18)	NS
ECMO (en litros/minuto)	3.5 (3-4)	4.1 (3.5-4.5)	NS
¿Bomba de balón intraaórtico?	2 de 3	4 de 5	NS
¿Medicamentos vasoactivos?	3 de 3	3 de 5	NS
FiO <sub>2</sub>	0.68 (0.45-1.00)	0.60 (0.5-0.7)	NS
SAO <sub>2</sub> (en porcentaje)	86 (61-99)	98 (98-99)	NS
SvO <sub>2</sub> (en porcentaje)	70 (70 y 70)	65.4 (55-72)	NS
Lactato (mmol/l)	5.5 (1.2-12.5)	3 (1.3-3.6)	NS
pH	7.34 (7.23-7.41)	7.42 (7.36-7.45)	NS
pCO <sub>2</sub> (en kPa)	5.0 (4.7-5.4)	4.8 (4.4-5.5)	NS
Exceso de base	-4.3 (-12.2 - (+0.3))	-0.6 (-3-(3.5))	NS
Temperatura (en °C)	36.8 (36.5-37)	37.1 (36.9-37.5)	NS
CRP (mg/l)	77.3 (22.0-140.0)	86.5 (22.0-173)	NS
WBC (10 <sup>9</sup> células/litro)	14 (12.0-16.0)	7.2 (5.0-12.5)	P=0.02
Gasto urinario (ml/hora)	3 (0-10)	48 (0-100)	NS
Diálisis (número de pacientes)	2 de 3	1 de 5	NS
Balance positivo acumulado de líquidos (en litros)	21 (8-30)	16.6 (10-26)	NS

## Ejemplo 2

- 5      1. Material y métodos
- 1.1. Población de estudio
- 10     Durante un período de seis meses, veinticinco recién nacidos a término sanos de raza caucásica con madres sanas se inscribieron dentro de las primeras veinticuatro horas después del parto (Tabla 3).

Tabla 3: Datos demográficos de la población de estudio (n=25)

Valores	Media (intervalo)
Edad gestacional (semanas)	40.3 (38.3-42.6)
Longitud al nacer (cm)	50.0 (48.0-56.0)
Circunferencia de la cabeza (cm)	35.0 (32.0-38.0)
Peso al nacer (gramos)	3425 (2946-4536)
Puntuaciones de Apgar a 1minuto	9 (7-10)
Puntuación de Apgar a 5 min	9 (8-10)
Género masculino (%)	48
Edad de la primera medición (horas)	15 (4-23)
Edad de la madre (años)	31.8 (20.0-40.0)

## 1.2. Técnicas microvasculares

### 1.2.1. Videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM)

5 Los estudios in vivo de la morfología y fisiología microvascular se realizaron mediante el uso de un videomicroscopio digital portátil (Optilia, D1, Sundbyberg, Suecia) con una ampliación de 250 x, una resolución de 640 x 480 píxeles y una velocidad de fotogramas de 15 fotogramas por segundo. Las secuencias de películas se proyectaron y almacenaron en un ordenador (Mac OS X, QuickTime Player). Se tomaron de cinco a siete secuencias de película de cada área de la piel los primeros tres días de vida. Se utilizó un fotograma de alta calidad de cada secuencia de película para el análisis de la densidad capilar y la heterogeneidad de la distribución de los capilares dentro de la región de interés (ROI). Los fotogramas se analizaron fuera de línea de forma cuantitativa donde se dibujaron tres líneas horizontales equidistantes y tres verticales equidistantes. Para la creación de las cuadrillas se utilizó el software Xscope (Iconfactory, Greensboro, Carolina del Norte, EE. UU.). La densidad capilar funcional (FCD) se calculó como el número de microvasos que cruzan una cuadrícula de líneas/mm línea (c/mm) (De Backer y col., Am. J Respir Crit Care Med, 2002, 166(1) págs. 98-104).

10 Para los análisis de confiabilidad entre observadores de las evaluaciones de FCD, se compararon los resultados de dos investigadores independientes (SF, TW) que evaluaron ciegamente películas de buena calidad juzgadas visualmente de ocho bebés. Para el examen de la confiabilidad intraobservador, un investigador (SF) realizó los 20 mismos análisis dos veces con varios meses de diferencia.

25 Se analizaron patrones de flujo capilar individuales en ocho bebés con secuencias de películas validadas como particularmente buenas. Se seleccionaron las cinco mejores secuencias de diez segundos sin artefactos de movimiento o con movimientos limitados. Un investigador experimentado realizó los análisis (TW). La velocidad del flujo en los capilares individuales se puntuó en una escala semicuantitativa de cinco categorías (Tabla 4).

Tabla 4: Categorías de flujo con descripción del flujo en cada categoría.

Categoría de flujo	Descripción del flujo
0-Sin flujo	Eritrocitos visibles, sin movimiento.
1-Flujo lento	Movimiento celular lento, a veces flujo hacia atrás
2-Flujo bajo continuo	Movimiento continuo hacia adelante, mayormente lento
3-Flujo alto continuo	Movimiento hacia adelante continuo, en su mayoría rápido
4-Flujo rápido	Células que se mueven rápidamente a lo largo de toda la secuencia de la película.

30 Los datos se expresaron como la fracción de capilares (Fr) en una categoría de flujo particular (número de capilares en esta categoría/número total de capilares contados). La velocidad categórica del flujo capilar medio (MFCV) se calculó de acuerdo con la fórmula: Fr (1) × 1 + Fr (2) × 2 + Fr (3) × 3 + Fr (4) × 4 (Wester et al. Clin Physiol Funct Imaging 31, 2011, pp 151-8).

### 1.2.2. Mediciones de perfusión con láser Doppler (LDPM)

35 La perfusión microvascular se evaluó con un monitor de flujo sanguíneo Moor (MBF 3D) con Moorsoft (ambos instrumentos Moor, Axminster, Devon, Reino Unido) para registros y análisis. La salida se dio en una escala semicuantitativa de flujo (unidad arbitraria, AU) definida como el producto del número de células sanguíneas en movimiento y su velocidad media en el volumen medido (aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>). De cada ROI se tomaron siete 40 secuencias de diez segundos sin artefactos de movimiento o con movimientos limitados.

### 1.2.3. Espectroscopia de reflectancia difusa (DRS)

45 Para la medición de la saturación de oxígeno microvascular, una configuración que consta de un espectrómetro que opera en la región de longitud de onda visible (S2000, Avantes, Países Bajos) y una fuente de luz halógena de tungsteno (AvaLight-HAL, Países Bajos) que tiene un intervalo espectral efectivo de 450 a 800 nm. Se utilizó como línea base una teja de politetrafluoretileno (WS-2, Avantes, Países Bajos) encerrada en una carcasa de plástico negro. Se utilizó una sonda de fibra óptica hecha a la medida para las mediciones con una composición de fibra de tres fibras de iluminación adyacentes (diámetro de fibra 400 µm) y una fibra receptora (diámetro de fibra 400 µm), lo 50 que resultó en una distancia de emisión-recepción para la sonda de aproximadamente 800 µm (Meglinsky et al. Con Biol Eng Comput, 2001. 39(1): págs. 44-50). Se recogieron doce espectros de cada ROI en 20 recién nacidos.

Los análisis de los espectros se realizaron adaptando un modelo de tejido basado en una aproximación de difusión (Farrell y otros, Med Phys, 1992. 19(4): págs. 879-88; Jacques, IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering, 1989.

36(12): págs. 1155-1161). El modelo incluía los cromóforos melanina, derivados de hemoglobina, agua y un factor de dispersión de Mie y Rayleigh. La descomposición de la firma espectral se realizó mediante un ajuste de mínimos cuadrados del modelo a los espectros medidos. A continuación, se utilizó la descomposición de los espectros de luz reflejada para estimar el contenido aparente de oxi- y desoxi-hemoglobina. La saturación de oxígeno microvascular se comparó con la saturación de oxígeno arterial para estimar la extracción de oxígeno.

5           1.2.4. Oximetría de pulso

10          La saturación arterial de oxígeno se midió con un oxímetro de pulso (Masimo Set, Rad-5v, Irvine, EE. UU.) con la sonda ubicada en la mano derecha.

15          1.2.5. Mediciones de la temperatura de la piel

15          La temperatura de la piel se midió utilizando un escáner de temperatura de superficie (Omega Medical, Modelo no. STS-101-C, EE. UU.) conectado a la ROI justo antes de las mediciones con las técnicas microvasculares. La temperatura axilar se tomó con un termómetro ordinario (Digitemp, Microlife Asia, Mt1671, Taiwán).

20          1.2.6. Mediciones de bilirrubina

20          Se utilizó un bilímetro transcutáneo (Dräger, JM 103, Dräger medical, Lübeck, Hecho en Japón) para estimar los valores de bilirrubina, un factor en el algoritmo de análisis DRS.

25          1.3. Procedimiento de medición

25          Para que los registros fueran posibles, era importante tener un bebé tranquilo y satisfecho. Las grabaciones se realizaron en una habitación con temperatura estable alrededor de 21°C y luz tenue. El bebé estaba acostado en su cama. CAVM, LDF y DRS se registraron todos en el día postnatal uno, dos y tres. Los dos mismos investigadores realizaron todas las mediciones (SF, EH). Se definieron dos regiones de la piel (ROI): La piel en el centro del lado dorsal de la mano izquierda (H) y la piel en el pecho en la línea media entre el yugulum y mamilla izquierda (C). Durante los exámenes, la secuencia de registros siempre fue CAVM, seguida de mediciones LDF y finalmente DRS. Primero se examinó el pecho. Se registraron la saturación de oxígeno y la temperatura de la piel antes de aplicar cada nueva técnica. Finalmente se midió la temperatura axilar y la bilirrubina transcutánea. Se usó aceite de bebé (Natusan) como aceite de inmersión para el videomicroscopio. Todo el equipo se aplicó suavemente sobre la superficie de la piel.

35          1.4. Ética

35          Se obtuvo el consentimiento de los padres por escrito. El estudio fue aprobado por el Regional Committee for Medical and Health Research Ethics, Sudeste de Noruega y por el Scientific Committee of the Hospital.

40          1.5. Estadísticas

40          Los datos demográficos se presentan como media con intervalo. Todas las demás variables se informan como media con desviación estándar (SD). Para las variables continuas, se realizó la prueba t pareada para comparar las medias. Se consideró significativo un valor de  $P \leq 0.05$ . Se utilizaron el coeficiente de correlación intraclass (ICC) y el gráfico de Bland-Altman para analizar la fiabilidad prueba-reprueba de las variables continuas. La heterogeneidad se expresó como coeficiente de variación ( $CoV = DE/media$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS para Windows (Statistical Package for the Social Sciences, versión 18.0 SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

45          2 Resultados

45          50       Fue posible obtener datos con las tres técnicas no invasivas de forma no traumática durante un período de tiempo de 30 a 45 minutos con los padres presentes en una habitación de paciente estándar. Se obtuvieron diecisiete conjuntos de datos completos con los tres métodos. No se realizaron exámenes espectroscópicos en los primeros cinco bebés debido a problemas técnicos al inicio del estudio. Tres bebés se perdieron para el seguimiento en el día dos y/o tres debido al alta temprana de la sala de maternidad.

55          2.1. Videomicroscopía asistida por ordenador

55          60       La densidad capilar funcional (FCD) fue significativamente mayor en la mano en comparación con el tórax durante los tres días (Tabla 5).

# ES 2 949 276 T3

Tabla 5: Densidad capilar funcional (cruces de capilares por mm de línea) (n = 25).

Día	1	2	3	valor p (día 1 versus día 3)
Pecho (C)	11.3 (1.5)	11.0 (1.7)	10.7 (1.6)	p=0.14
Mano (H)	13.2 (2.0)	13.2 (1.9)	12.4 (1.6)	p=0.05
valor p	p<0.001	p<0.001	p<0.001	
Datos dados como media (SD)				

Hubo una ligera tendencia hacia una reducción en el número de FCD tanto en el pecho como en la mano del día uno al tres. La heterogeneidad de FCD expresada como CoV de cinco mediciones repetidas fue del 11-13 %.

5      2.1.1. Confiabilidad prueba-reprueba de FCD

10     La fiabilidad intraobservador del investigador principal (SF) fue alta (ICC 0.72 (0.54-0.83)), aunque hubo una diferencia en las puntuaciones medias (11.5 frente a 10.7 c/mm, p<0.001). Cuando se comparó el segundo conjunto de valores de FCD de SF con los datos del investigador más experimentado (TW), las puntuaciones medias de FCD fueron similares (10.7 frente a 10.8 c/mm, p=0.70). La fiabilidad entre observadores también fue buena (ICC 0.54 (0.31-0.72)). Los gráficos de Bland-Altman, tanto para las pruebas interobservador como intraobservador, mostraron una mayor diferencia entre los dos conjuntos de datos con una densidad capilar cada vez mayor (Fig. 3a y b).

15     2.1.2. Patrones de flujo capilar

20     La categoría de flujo capilar dominante fue la categoría tres (flujo alto continuo), pero también estuvo representada la categoría de flujo dos (flujo bajo continuo) (Tabla 2, Fig. 4a y b). No se encontraron las categorías de flujo cero (sin flujo) y cuatro (flujo rápido). La velocidad categórica de flujo media (MFCV) fue similar tanto en el pecho como en la mano en los tres días, variando entre 2.57 (0.10) y 2.71 (0.11).

25     2.2. Mediciones de perfusión con láser Doppler

La perfusión del láser Doppler cutáneo fue significativamente mayor en el tórax que en la mano (Tabla 6).

25     Tabla 6: Perfusion con láser Doppler (AU) (n = 25).

Día	1	2	3	valor p (día 1 versus día 3)
Pecho (C)	109.1 (26.0)	101.4 (24.6)	100.8 (25.3)	p=0.62
Mano (H)	58.9 (17.5)	54.3 (15.8)	46.9 (14.8)	p=0.09
valor p	p<0.001	p<0.001	p<0.001	
Datos dados como media (SD)				

30     Hubo una tendencia no significativa hacia una reducción en la perfusión de Doppler láser de piel del día uno al tres, tanto en el tórax como en la mano. La heterogeneidad de la perfusión expresada como CoV en siete mediciones repetidas en tres días consecutivos fue del 24-32 %.

35     2.3. Espectroscopía de reflectancia difusa

La saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares ( $\text{SmvO}_2$ ) fue significativamente mayor en el pecho en comparación con la mano los tres días (Tabla 7) sin cambios con el tiempo.

35     Tabla 7: Saturación de oxígeno microvascular ( $\text{SmvO}_2$ ) (%) (n = 20)

Día	1	2	3	valor p (día 1 versus día 3)
Pecho (C)	88.1 (5.2)	87.8 (10.0)	86.7 (9.0)	P=0.07
Mano (H)	79.9 (15.2)	82.7 (11.8)	82.2 (12.1)	P=0.77
valor p	p<0.05	p<0.05	p<0.05	
Datos dados como media (SD)				

La heterogeneidad de doce mediciones DRS repetidas, expresada como CoV, fue 9-18 %.

Extracción de oxígeno definida como  $\text{SaO}_2$  menos  $\text{SmvO}_2$ , mostró una diferencia significativa entre el pecho y la mano con una mayor extracción de oxígeno en la mano en los tres días (media (DE)); Pecho día 1-3: 14.5 (1.6), 14.1 (3.1), 11.7 (2.7); Mano día 1-3: 23.5 (3.4), 20.2 (2.8), 24.3 (3.5), No hubo cambios con el tiempo.

5      2.4. Otros resultados

Como era de esperar, los niveles de bilirrubina aumentaron del día uno al tres. La temperatura, el pulso y la saturación arterial de oxígeno se mantuvieron estables los tres días, sin diferencias entre sexos (datos no mostrados).

10     3. Discusión

Fue posible obtener datos microvasculares cutáneos no invasivos reproducibles de forma no traumática en recién nacidos a término sanos utilizando videomicroscopía asistida por ordenador, mediciones de perfusión con láser Doppler y espectroscopía de reflectancia difusa.

15     3.1. El modelo

La adaptación cardiopulmonar en neonatos con cierre de las derivaciones fetales ocurre principalmente durante las primeras horas de vida, pero no se completa hasta días o meses después del nacimiento. Otras respuestas adaptativas, tal como la reducción del agua corporal total acompañada de una pérdida de peso del 4 al 7%, la hemólisis de los eritrocitos fetales y la producción de eritrocitos con hemoglobina adulta, se producen durante los primeros días o semanas. El hematocrito alcanza su punto máximo a las dos horas de edad y luego disminuye constantemente durante las próximas semanas. Nuestros neonatos fueron examinados el primer, segundo y tercer día de vida cuando ocurren muchos de estos procesos adaptativos que afectan la hemodinámica central y la hemorreología y, por lo tanto, la perfusión microvascular.

20     3.2. CAVM

30     3.2.1. Anatomía microvascular

Nuestros recién nacidos no estaban sedados y los movimientos espontáneos a veces reducían la calidad de las grabaciones. Se requería capacitación para grabar secuencias de películas de alta calidad. En la piel adulta, los microvasos se organizan en capilares nutritivos papilares superficiales que aseguran la necesidad metabólica para la proliferación epitelial, y un plexo horizontal profundo y uno superficial que sirve principalmente para la termorregulación corporal. En manos y pies adultos, las regiones con la estructura más diferenciada, los capilares nutritivos superficiales se ven como "puntos" o "formas de coma" en el microscopio. El epitelio del recién nacido es más delgado que en los adultos y la arquitectura vascular no está completamente diferenciada. Con el microscopio se observó una red desordenada con microvasos horizontales. Por lo tanto, las evaluaciones de la densidad capilar funcional se evaluaron como el número de microvasos que cruzan una cuadrícula de líneas por mm de línea (c/mm).

40     3.2.2. Densidad capilar funcional (FCD)

El oxígeno tiene una capacidad de difusión limitada en los tejidos biológicos, en contraste con la capacidad de difusión del  $\text{CO}_2$ . August Krogh, ganador del Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1920, postuló que todas las células deben ubicarse dentro de un cilindro crítico de un capilar perfundido para obtener suficiente suministro de oxígeno. Dentro de este cilindro, la disponibilidad de oxígeno cae exponencialmente al aumentar la distancia desde el centro del capilar. Las células fuera de estos cilindros experimentarán una falta de suministro de oxígeno independientemente de la saturación de oxígeno de los eritrocitos en el capilar más cercano. Esto significa que la FCD y la heterogeneidad de los microvasos deben estar dentro de límites definidos para garantizar la nutrición y la disponibilidad de oxígeno para todas las células de un tejido.

50     3.2.3. valores FCD

En el tórax, la FCD varió entre 10.7 y 11.3 c/mm, y en la mano entre 12.7 y 13.2 c/mm, siendo significativamente mayor en la mano que en el tórax en los tres días (Tabla 3). También hubo una clara tendencia hacia la reducción de la FCD del día uno al día tres para ambas ubicaciones.

55     3.2.4. Heterogeneidad de microvasos

60     Una distribución desigual de los capilares perfundidos puede dar una baja tensión de oxígeno a algunas células a pesar de una  $\text{SaO}_2$  normal. La heterogeneidad de FCD expresada como CoV en cinco mediciones repetidas fue 11-13 %. Adultos sanos medidos en fosa Tabatière (CoV: 15-30%) tenían valores en el mismo intervalo.

65     3.2.5. Patrones de flujo capilar

En nuestros recién nacidos sanos, las categorías de flujo de microvasos dominantes fueron la categoría de flujo tres (60-70%) y la categoría de flujo dos (25-35%) (tabla 2, fig. 4). No se observaron las categorías de flujo cero y cuatro. Las velocidades fueron similares en el pecho y la mano los tres días. Se han encontrado previamente categorías de flujo similares en la piel (Fossa Tabatière) de controles de adultos jóvenes sanos (75 % de los microvasos de la piel estaban en la categoría de flujo tres, 25 % en la categoría dos) utilizando el mismo equipo y los mismos examinadores.

La velocidad media categórica del flujo capilar (MFCV) fue similar en el tórax y la mano con poca variación en los días consecutivos (variando entre 2.57 y 2.71). MFCV en los recién nacidos también fue similar a lo que se encontró previamente en los adultos jóvenes sanos en la piel de Fossa Tabatière (2.56-2.88),

### 3.2.6. Reproducibilidad

Los análisis de reproducibilidad fueron realizados por un investigador experimentado (TW) y uno menos experimentado al inicio del estudio (SF). La variación entre observadores en FCD fue pequeña cuando se comparó el segundo conjunto de resultados de SF con los resultados de TW (Fig. 2a). La prueba de confiabilidad intraobservador de SF mostró una disminución estadísticamente significativa en los valores medios de FCD del primer al segundo análisis realizados con varios meses de diferencia, probablemente debido al efecto de la curva de aprendizaje (Fig. 2b), lo que indica la necesidad de un entrenamiento. programa de análisis de fotogramas y películas para obtener resultados reproducibles.

### 3.2.7. OPS/SDF frente a CAVM

La microscopía microvascular intravital humana se ha realizado durante muchos años. Durante más de 10 años se han utilizado OPS (formación de imágenes espectrales de polarización ortogonal) y SDF (formación de imágenes de campo oscuro de flujo lateral). Estos sistemas consisten en luz verde polarizada (longitud de onda 550 nm) y un sistema de filtración para visualizar la microcirculación. La luz es absorbida por la hemoglobina y, por lo tanto, los glóbulos rojos aparecen oscuros. Sin embargo, los sistemas solo se pueden usar en las membranas mucosas (la lengua) y en algunas áreas con piel delgada en recién nacidos humanos. Por el contrario, CAVM utiliza luz blanca, lo que da imágenes en colores y la posibilidad de examinar diferentes tipos de piel.

### 3.3. LDPM

El principio del láser Doppler para cuantificar la perfusión microvascular en volúmenes de tejido en el intervalo de 1 mm<sup>3</sup>, ha estado disponible comercialmente durante casi 40 años, pero la técnica apenas tiene aplicaciones de rutina en la medicina clínica. Esto se explica en parte por el hecho de que el método evalúa una combinación de capilares papilares superficiales, que sirven principalmente a la perfusión nutritiva, y plexos más profundos, que sirven principalmente a la función termorreguladora.

En este estudio, la perfusión en la piel del pecho fue significativamente mayor en comparación con la mano, lo que corresponde a una temperatura más alta en el pecho (+2.8 °C) (Tabla 4). La heterogeneidad de las mediciones repetidas expresadas como CoV fue del 24-32 %, considerablemente más alta que para los datos de CAVM y DRS.

### 3.4. DRS

#### 3.4.1. El método DRS

Se utilizó espectroscopia de reflectancia difusa para evaluar la saturación de oxígeno de los eritrocitos en la microcirculación (SmvO<sub>2</sub>). El volumen de medición de DRS depende del espectro de luz emitido, las propiedades ópticas del tejido y el diseño de la sonda de medición. Se estima que el equipo utilizado en este estudio tiene un volumen de medición de < 1 mm<sup>3</sup> correspondiente a una profundidad de medición de aproximadamente 0.8 mm en la piel (Meglinsky et al., supra).

#### 3.4.2. Resultados DRS

Saturación de oxígeno microvascular (SmvO<sub>2</sub>) representa el equilibrio entre el suministro y el consumo de oxígeno en el volumen de medición. El suministro depende nuevamente del producto de la perfusión y la saturación de oxígeno arterial, mientras que el consumo depende de la tasa metabólica del tejido. Desde SaO<sub>2</sub> en los recién nacidos estuvo cerca del 100%, el SmvO<sub>2</sub> los datos mostraron extracción entre 12 y 20%. En los recién nacidos, tanto la perfusión termorreguladora como la nutritiva tienen lugar en la DRS midiendo el volumen, en contraste con la piel adulta, donde solo se evalúa la perfusión nutritiva papilar. Partes de la perfusión en el volumen de medición en el recién nacido también pueden tener una función de transporte (la estructura horizontal en los recién nacidos en comparación con los bucles papilares verticales en la DRS que mide volúmenes de piel adulta).

Mayor SmvO<sub>2</sub> en el tórax (86-88%) en comparación con la mano (76-80%) puede reflejar las diferencias en la arquitectura microvascular, pero también la menor perfusión en la mano como lo demuestra la LDPM. La menor

perfusión en la mano con una mayor extracción de oxígeno compensatoria también puede ser una forma de evitar la pérdida innecesaria de calor.

#### 4. Conclusión

Se cree que la microscopía y la espectroscopia, juntas, son las técnicas más útiles para evaluar la microcirculación de la piel en los recién nacidos. Ambos tienen volúmenes de medición de fracciones de  $1 \text{ mm}^3$  y una resolución correspondiente a microvasos individuales. Los pequeños volúmenes de medición brindan una alta resolución, pero al precio de una mayor variación en los valores medidos, es decir, una mayor dispersión en mediciones repetidas. Este problema se puede manejar usando la media de mediciones repetidas para expresar un valor promedio de un tejido, y la dispersión de mediciones repetidas se puede usar para describir la heterogeneidad de la microcirculación.

Todas las células dependen del suministro de nutrientes y oxígeno de la microcirculación, pero en la práctica clínica habitual no se realizan evaluaciones de la función microvascular. En este estudio se ha demostrado que es factible obtener información reproducible de la microvasculatura cutánea en recién nacidos. Las técnicas utilizadas en este estudio brindan información sobre la calidad del suministro de oxígeno para el proceso metabólico necesario para el crecimiento y desarrollo.

#### Ejemplo 3 - Eritromelalgia y microcirculación

La eritromelalgia (EM) es un síndrome clínico caracterizado por eritema, aumento de la temperatura de la piel y dolor quemante en las extremidades. El dolor se alivia con el enfriamiento y se agrava con el calentamiento. La EM se divide comúnmente en casos primarios y secundarios, dependiendo de si existe o no una enfermedad subyacente. Los síntomas varían desde molestias leves hasta extremidades que amenazan con hipoxia y amputación.

La patogenia de la EM es objeto de debate. El inventor y otros han propuesto una hipótesis de una vía final común de la patogénesis: mala distribución de la perfusión microvascular de la piel a través de derivaciones arteriovenosas microvasculares anatómicas o funcionales, con perfusión termorreguladora aumentada y una falta relativa de perfusión capilar nutritiva en la piel afectada. En consecuencia, el tejido se vuelve hipódico, lo que hace que las arteriolas de suministro se dilaten, lo que lleva a una situación paradójica con la coexistencia de hiperemia e hipoxia. Esta hipótesis da una explicación de por qué el enfriamiento reduce universalmente el dolor. El enfriamiento reduce el metabolismo y, por lo tanto, la hipoxia; la mejora de la oxigenación de los tejidos reduce la dilatación arteriolar y la hiperemia es menos pronunciada: se invierte el círculo vicioso.

El estudio descrito a continuación utiliza los 6 parámetros de la invención como se describe en el presente documento para investigar la eritromelalgia, un ejemplo de insuficiencia circulatoria localizada.

#### Material y métodos

##### 40 Material

El grupo ha reunido un grupo de 207 pacientes, el más grande visto por un solo grupo o institución en el mundo occidental.

##### 45 Métodos

###### Videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM).

Esta técnica involucra un videomicroscopio de mano que se aplica suavemente sobre la superficie de la región de interés. Las imágenes o secuencias de películas se proyectan y almacenan en un ordenador. Se utiliza un microscopio de vídeo digital (Optilia, D1, Sundbyberg, Suecia) con ampliación de 250x, resolución de 640x480 y velocidad de cuadro de 15 fps (cuadros por segundo). Se utiliza un conversor de analógico a digital (Canopus, Kobe, Japón) para proyectar y almacenar las secuencias de la película en un Mac Book pro, utilizando el software iMovie (todo Apple, Cupertino, EE. UU.).

De cada sitio se toman de cinco a siete registros. Se seleccionaron las cinco mejores secuencias de 10 segundos sin artefactos de movimiento o limitados. Estas secuencias están siendo analizadas de forma semicuantitativa; se dibujaron tres líneas horizontales equidistantes y tres verticales equidistantes. El software Xscope (Iconfactory, Greensboro, Carolina del Norte, EE. UU.) se utiliza para crear las cuadrículas. La densidad de vasos (FCD) se calcula como el número de vasos que cruzan estas líneas dividido por la longitud total de las líneas. En cada paciente se promedian los datos de los cinco mejores registros. La heterogeneidad de FCD se expresa como el coeficiente de variación ( $\text{CoV} = \text{DE}/\text{media}$ ) de la densidad de capilares en las cinco secuencias de películas.

El patrón de flujo de los glóbulos rojos en los capilares varía con el tiempo. Para el análisis, la velocidad de flujo de cada capilar de las cinco secuencias de películas se puntúa visualmente en uno de los cinco grupos, desde "sin flujo"

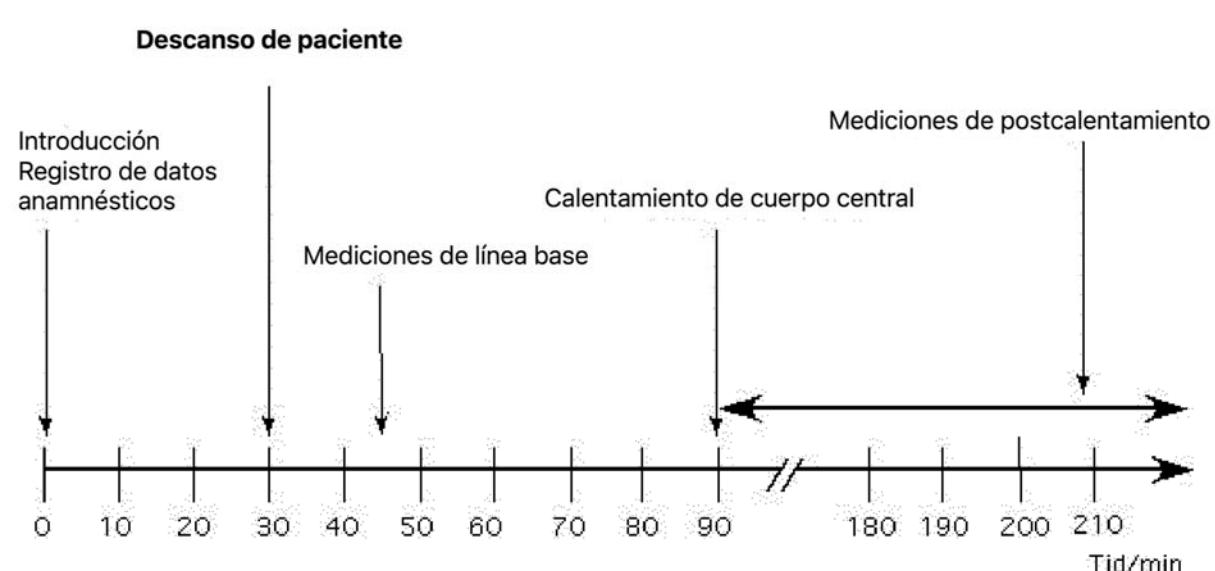
hasta "flujo rápido", y se expresa como velocidad de flujo media y fracción de capilares en cada categoría de flujo ( $n = 10$ ). La heterogeneidad de los valores de caudal medio se expresa como CoV (Wester et al., supra).

#### Espectroscopia de reflectancia difusa (DRS).

Se utiliza una configuración espectrométrica con un espectrómetro que opera en la región de longitud de onda visible (S2000, Avantes, los Países Bajos) y una fuente de luz halógena de tungsteno (AvaLight-HAL, los Países Bajos) que tiene un intervalo efectivo de 450 a 800 nm. Se utilizó como línea base una teja de polietrafluoretileno (WS-2, Avantes, Países Bajos) encerrada en una carcasa de plástico negro. Se utiliza una sonda de fibra óptica hecha a la medida para mediciones con una composición de fibra de tres fibras de iluminación adyacentes ( $\varnothing 400 \mu\text{m}$ ) y una fibra receptora ( $\varnothing 400 \mu\text{m}$ ) lo que resulta en una distancia de emisión-recepción para la sonda de aproximadamente 800  $\mu\text{m}$  (Meglinsky Yo et al. supra). Se toman doce registros de cada región. Los análisis espectrales se realizan adaptando un modelo de tejido basado en una aproximación de difusión (Farrell J, et al. supra). El modelo incluía los cromóforos melanina, derivados de la hemoglobina (Zijlstra WG, et al. Visible and Near Infrared Absorption Spectra of Human and Animal Haemoglobin: Determination and Application: Brill Academic Publishers; 2000), agua (Hale GM, et al. Appl Opt. 1973;12:555-63) y un factor de dispersión que representa los componentes de Mie y Rayleigh. La descomposición de la firma espectral se realiza mediante un ajuste de mínimos cuadrados del modelo a los espectros medidos. La descomposición de los espectros de luz reflejada se usa luego para estimar el contenido aparente de oxi y desoxihemoglobina.

#### Protocolo del paciente

Se aplicará el siguiente diagrama de flujo:



Se permiten medicamentos normales. El ácido acetílico salicílico se suspende una semana antes de los exámenes y el misoprostol se suspende óptimamente durante 4 semanas.

Se permitirá un máximo de 225 minutos para completar los exámenes.

1. Se da la bienvenida al paciente y se vuelven a comprobar los datos anamnéticos. Se evaluará la puntuación de gravedad durante la última semana y el último mes. El ciclo menstrual puede influir en la función vascular y, por lo tanto, se registra.

35 2. Se observará si las pacientes fértiles utilizan píldoras anticonceptivas orales.  
Se registra la temperatura exterior.

35 2. El sujeto descansa en posición supina durante 15 min en una habitación con una temperatura ambiente de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  protegido del estrés físico y psicológico. La extremidad de prueba se estabiliza con almohadas suaves para evitar artefactos de movimiento grueso.

3. Las evaluaciones clínicas se registran:

- Puntuación VAS (escala analógica visual)
- Color de piel/documentación fotográfica

4. Los parámetros de línea base se registran:

- La temperatura de la piel se mide en la pulpa del primer dedo del pie izquierdo.

5 - La DRS de línea base se registrará en la pulpa y entre el 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> dedo/dedo del pie. Se grabarán ocho secuencias de 10 segundos.

10 - La CAVM de línea base se registrará en la falange terminal del primer dedo del pie, justo proximal al lecho ungueal donde los bucles capilares son perpendiculares a la superficie de la piel. Un sitio alternativo es el arco del pie que contiene menos anastomosis AV. Se graban secuencias de película de aproximadamente 20 segundos y 8 fotogramas (para determinar la densidad capilar y la heterogeneidad).

15 5. El sujeto se calienta de acuerdo con el procedimiento de calentamiento del cuerpo central (Mork C et al. J Invest Dermatol. 2004 marzo;122(3):587-93)

15 6. Se repite el paso 4.

7. Se toman biopsias de piel con aguja del arco del pie y se almacenan en un congelador profundo.

20 8. Se recogerán muestras de sangre para exámenes hematológicos y pruebas genéticas.

20 Se cree que la derivación arteriovenosa microvascular en la piel afectada conduce a hipoxia tisular e hiperperfusión compensatoria secundaria.

#### Ejemplo 4

25 Evaluaciones microvasculares de la piel para proporcionar un pronóstico en un paciente con isquemia traumática de extremidades.

30 La isquemia traumática aguda de las extremidades es un desafío para los traumatólogos. ¿Se puede salvar la vida y función de la extremidad o el período de isquemia ha causado un daño tisular irreversible? Es posible que los cirujanos tengan que tomar decisiones rápidas sabiendo que las decisiones equivocadas pueden provocar la amputación de una extremidad salvable o el desarrollo de necrosis y sepsis en una extremidad no salvable en la que se intentó un procedimiento de rescate. En el peor de los casos, estos últimos pueden contribuir a un desenlace fatal en un paciente politraumatizado. Actualmente, los cirujanos carecen de predictores para el pronóstico de las extremidades. Por lo tanto, es de gran importancia una forma de controlar la circulación de una extremidad reperfundida.

35 Para monitorizar a estos pacientes, las pruebas/signos clínicos como el tiempo de llenado capilar, la temperatura de la piel y el color de la piel junto con las mediciones de la presión arterial se utilizan principalmente para evaluar la circulación de las extremidades afectadas. Los análisis de sangre como el lactato, el recuento de glóbulos blancos (WBC) de creatina quinasa (CK) y la proteína C reactiva también pueden ser útiles, pero ninguna de estas pruebas/signos es particularmente confiable para predecir el resultado en las extremidades reperfundidas.

#### Materiales y métodos:

##### 45 El paciente

50 Una paciente de 33 años estuvo involucrada en un accidente automovilístico de alta energía. En el lugar de la lesión podía mover los dedos del brazo lesionado y ha mantenido intacta la función sensorial. Tenía una conmoción cerebral moderada severa correspondiente a una escala de Coma de Glasgow de 12, sesenta minutos después de la lesión inicial. Llegó a nuestro hospital (un centro de trauma de nivel I), casi 120 minutos después del accidente y se examinó de acuerdo con las pautas para trauma avanzado y soporte vital (ATLS).

55 Al ingreso hospitalario, la extremidad superior izquierda estaba fría, pálida y sin pulso palpable. La radiografía mostró una fractura de la diáfisis del húmero, una fractura del codo con luxación, una fractura del cúbito proximal y una fractura del antebrazo distal. Además, la CT mostró una arteria subclavia izquierda ocluida. También se mostró una lesión en la aorta torácica descendente Aórtica, pero esta lesión no necesitaba reparación.

60 Se realizó un baipás axilo-braquial con vena autóloga y una embolectomía para reperfundir el brazo. El flujo arterial al brazo se restableció 250 minutos después de la lesión. Las fracturas se fijaron inicialmente con un fijador externo. Se realizó fasciotomía profiláctica en toda la longitud del miembro. En el quirófano se visualizaron los nervios cubital y mediano sin signos de lesión. Luego de la embolectomía y el procedimiento de by-pass, el flujo en la arteria braquial era de 180 mililitros por minuto, la mano izquierda estaba caliente y tenía un tiempo de llenado capilar de dos segundos.

### Mediciones microvasculares

Se utilizaron videomicroscopio asistido por ordenador (CAVM) y espectroscopía de reflectancia difusa (DRS). Los primeros exámenes microvasculares se realizaron pocas horas después de la cirugía de reperfusión el día del ingreso (día 0) y se repitieron los días 1, 2, 5 y 9. La piel del dorso de la mano, entre el primer y segundo metacarpo (fosa Tabatie're) fue examinada por CAVM y DRS. Y cada vez que se realizaron mediciones repetidas. Las medidas de la mano ilesa sirvieron como control. La demora de tiempo entre los exámenes de la misma modalidad de monitorización en las dos manos fue de solo unos minutos.

#### Videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM)

10 Se utilizó un microscopio digital portátil (Mediscope, OP-120 011), (Optilia Instruments AB Sollentuna, Suecia) con lente de aumento de 200x, una resolución de 640x480 y una velocidad de cuadro de 15 cuadros por segundo. El uso del microscopio y el análisis de parámetros se describe en otra parte.

15 Los parámetros CAVM de interés son la densidad capilar funcional (FCD), la heterogeneidad de la FCD, los patrones de flujo microvascular y la patología pericapilar. Las películas CAVM fueron analizadas a ciegas por un investigador experimentado y también por el software Java Cap (Eye catcher technologies, Linköping, Suecia). Se usó aceite de bebé (Natusan) como aceite de inmersión para el videomicroscopio. Todo el equipo se aplicó suavemente sobre la superficie de la piel.

#### 20 Espectroscopia de reflectancia difusa (DRS)

Para la medición de la saturación de oxígeno microvascular, se utilizó una configuración espectrométrica que consta de un espectrómetro que opera en la región de longitud de onda visible (S2000, Avantes, Países Bajos) y una fuente de luz halógena de tungsteno (AvaLight-HAL, Países Bajos). La configuración tiene un intervalo espectral efectivo de 25 450 a 800 nm. Se utilizó como línea base una teja de politetrafluoretileno (WS-2, Avantes, Países Bajos) encerrada en una carcasa de plástico negro. Se utilizó una sonda de fibra óptica hecha a la medida para las mediciones con una composición de fibra de tres fibras de iluminación adyacentes (diámetro de fibra 400 µm) y una fibra receptora (diámetro de fibra 400 µm), lo que resultó en una distancia de emisión-recepción para la sonda de aproximadamente 30 800 µm. Se ha estimado que el volumen de medición estimado del equipo está en el intervalo de 0.1 mm<sup>3</sup>. Se recogieron siete espectros de cada mano en cada medición.

Los análisis de los espectros se realizaron como se describe en el Ejemplo 3. La saturación de oxígeno microvascular se comparó con la saturación de oxígeno arterial para estimar la extracción de oxígeno.

#### 35 Presentación de datos

Los resultados de una mano se compararon con los resultados de la otra mano tomados el mismo día. Los resultados de una mano también se compararon con los resultados de la misma mano tomados otro día. Un grupo de ocho estudiantes varones sanos sirve como grupo de control.

#### 40 Resultados

##### Evolución clínica desde el ingreso hasta el día 13 (día de la amputación).

45 El paciente se trató en la unidad de cuidados intensivos. Excepto por las heridas en la frente y la rodilla, las únicas heridas que necesitaban cirugía estaban en el brazo izquierdo. Estuvo hemodinámicamente estable durante todo el curso, pero inicialmente recibió norepinefrina para mantener una presión arterial media por encima de 70 mm Hg. No padecía problemas de ventilación pulmonar. No desarrolló insuficiencia renal ni otras insuficiencias orgánicas. Se hicieron intentos para despertarla el día 3, pero debido a la confusión y la exageración, volvió a dormirse. El día 5 tuvo 50 un episodio de fiebre (temperatura máxima 39.2°C), pero sin otros signos de infección.

El día 9 presentó fiebre (temperatura máxima 39.5°C), taquicardia (125 latidos/minuto) y su recuento de glóbulos blancos aumentó a  $16.6 \times 10^9$  células/l. Sin embargo, la concentración de proteína C reactiva disminuyó y no se encontraron otros signos de infección. Las pruebas bacteriológicas de sangre y heridas tomadas ese día fueron todas negativas. Se stabilizó hasta el día 13 cuando se realizó una inspección planificada del injerto de piel dividida. Este procedimiento quirúrgico mostró músculos necróticos en el antebrazo y ausencia de pulso distal del codo. En este momento no había información verificada de movimientos voluntarios de la mano o los dedos. No se había evaluado la función sensorial. El paciente fue llevado de nuevo al quirófano para una amputación por encima del codo. Desde aquí hasta el alta 12 días después la paciente no desarrolló mayores complicaciones.

60 En el seguimiento tres meses después del alta hospitalaria, todas sus heridas habían cicatrizado. Tiene un brazo izquierdo con amputación a nivel 20 centímetros por debajo de la articulación acromio-clavicular.

##### Resultados de videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM)

65

5 *Densidad capilar funcional:* En la primera medición, solo unas pocas horas después del procedimiento de reperfusión, la densidad capilar funcional fue 33 por ciento menor en la mano izquierda en comparación con el lado opuesto. Al día siguiente, esta diferencia había aumentado al 42 por ciento. En el día cinco, no se observaron diferencias en FCD entre las dos manos, tampoco hubo diferencias en el día 9. Los valores de FCD de ambas manos después del quinto día estaban en el mismo intervalo que para los voluntarios sanos del Ejemplo 1.

10 *La heterogeneidad de la FCD:* El coeficiente de variación varió entre 0.20 y 0.36 en el brazo derecho y entre 0.15 y 0.35 en el lado izquierdo, para ambas manos el valor más alto fue al día siguiente del accidente y reperfusión.

15 *Patrón de flujo capilar:* Para todas las mediciones, excepto en el brazo izquierdo el día 9, una gran mayoría de los capilares se encontraban en las categorías 2 y 3 (flujo continuo). El patrón de flujo y el índice de flujo medio-categorial estaban en el mismo intervalo que nuestros controles sanos.

20 No se observó patología pericapilar ni halos oscuros en ninguna de las mediciones.

25 Todos los parámetros de CAVM se resumen en la siguiente tabla.

Tabla: Parámetros CAVM durante el período de observación. Para FCD, el valor medido de la mano derecha es 1, mientras que la mano izquierda es el cociente de FCD (izquierda)/FCD (derecha).

Día	Mano derecha			Mano izquierda		
	FCD	CoV de FCD	MCFV	FCD	CoV de FCD	MCFV
0	1	0.26	2.50	0.67	0.29	2.62*
1	1	0.35	2.86	0.58	0.36	2.58
5	1	0.21	2.90	1.05	0.20	2.71
9	1	0.22	2.73	0.96	0.15	3.64

Resultados de DRS: no se muestran

## 20 Discusión

25 En un brazo hay cinco tipos principales de tejidos: hueso, grasa, piel, músculo y tejido nervioso. La tolerancia a la hipoxia varía entre las células de diferentes tejidos y está relacionada con la variación de la tasa metabólica. Para que una extremidad sobreviva y funcione después de un trauma isquémico, tiene que sobrevivir un mínimo de células de todo tipo de tejidos.

30 En los casos de isquemia traumática, la decisión de amputar o intentar una cirugía de salvamento de la extremidad puede ser difícil y está relacionada con el tiempo que transcurre desde la isquemia hasta la reperfusión. Después de la cirugía reconstructiva, es difícil predecir el resultado funcional final relacionado con la supervivencia de las células en los diferentes tejidos, con base en el examen clínico o mediante evaluaciones mediante mediciones de la tensión de oxígeno transcutánea o evaluaciones de perfusión con láser Doppler.

35 En este paciente, la piel, los huesos y el tejido adiposo sobrevivieron, el tejido muscular se necrosó parcialmente, mientras que el tejido nervioso perdió toda función. Una amputación temprana habría sido más segura para el paciente y se habrían ahorrado recursos, incluyendo 12 horas de tiempo de operación después de la operación inicial (reconstrucción vascular y fijación externa).

40 Nuestros exámenes microvasculares de la piel pudieron cuantificar una insuficiencia circulatoria en el brazo lesionado después de la reconstrucción vascular, en comparación con los datos de línea base y los datos del brazo no lesionado. La sensibilidad diagnóstica de nuestro sistema es por tanto suficiente para descubrir un problema nutricional. Este caso indica que la insuficiencia circulatoria diagnosticada era demasiado grave para que sobreviviera el tejido nervioso (el tejido nervioso tiene las demandas metabólicas más altas y la tolerancia más baja a la hipoxia), la insuficiencia circulatoria estaba en un nivel crítico para la supervivencia del tejido muscular, pero estaba por debajo de un nivel crítico para la supervivencia de la piel. La innovación se puede utilizar para guiar la toma de decisiones clínicas sobre la difícil cuestión de realizar una amputación temprana o utilizar tiempo y recursos y agregar un riesgo de complicaciones potencialmente mortales (como sepsis), asociadas con reconstrucciones complicadas.

## 50 Ejemplo 5 - Estudio de caso y pronóstico de un paciente que recibe ECMO

Una mujer de 54 años recibió tratamiento de radiación contra el tórax a la edad de 16 años debido a una neoplasia maligna. Se trató con éxito, pero en los últimos años ha experimentado insuficiencia cardíaca crónica progresiva debido a complicaciones de la radiación anterior: Estenosis de la válvula aórtica, estenosis e insuficiencia de la válvula mitral, disfunción diastólica del ventrículo izquierdo de moderada a grave, además de función pulmonar

moderadamente reducida. Se operó con reemplazo protésico de las dos válvulas. Durante la operación primaria salió del baipás cardiopulmonar y se trasladó a la unidad de postoperatorio. En el postoperatorio fue tratada por función cardiaca insuficiente con inotrópicos y balón de aire intraaórtico, y con hemodiálisis secundaria a insuficiencia renal. En el día 2 del postoperatorio, la insuficiencia cardíaca se volvió crítica y se la conectó a un sistema ECMO.

5                   Después del establecimiento de ECMO, las evaluaciones clínicas, así como los parámetros de monitorización estándar (parámetros hemodinámicos centrales (presiones y gasto cardíaco), saturación de oxígeno arterial, lactato en sangre, equilibrio ácido-base y oxigenación cerebral evaluados con NIRS (espectroscopía de infrarrojo cercano) estaban dentro de los niveles de línea base, y se consideró candidata para trasplante cardíaco (HTx).

10                  Después del establecimiento de ECMO, y diariamente a partir de entonces, se examinó de acuerdo con la presente invención mediante la evaluación de los 6 parámetros microvasculares discutidos en el presente documento, es decir:

- 15                  (a) densidad capilar funcional (FCD);
- (b) heterogeneidad de la FCD;
- (c) velocidad de flujo capilar;
- (d) heterogeneidad de la velocidad del flujo capilar;
- (e) saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares ( $\text{SmvO}_2$ ); y
- (f) heterogeneidad de  $\text{SmvO}_2$ .

20                  Curso clínico: El paciente se trató con ECMO veno-arterial durante 10 días. El ECMO luego se convirtió en ECMO veno-venoso y el paciente murió durante este soporte circulatorio el día 11. Durante este curso tuvo múltiples revisiones quirúrgicas debido a una tendencia al sangrado, en parte relacionado con la anticoagulación necesaria para las dos válvulas cardíacas mecánicas, en parte por un síndrome multitransfusional con coagulopatía acompañante.

25                  Las técnicas de seguimiento estándar mostraron valores aceptables, y solo el día 10 fue dada de baja de la lista de trasplantes por falta de evolución clínica y desarrollo de extensas ulceraciones, necrosis cutánea, en glúteos y espalda. El día 10 se decidió conversión de ECMO veno-arterial a veno-venoso por falta de evolución clínica, y el día 11 se suspendió ECMO, mientras el corazón aún latía por progresión de la necrosis cutánea en la espalda y deterioro de lecturas hemodinámicas centrales y valores NIRS críticos que indican daño cerebral irreversible. El paciente falleció poco después.

30                  Los datos microvasculares se revisaron continuamente poco después de la recogida. Dos examinadores independientes y experimentados puntuaron los fotogramas y películas recopilados por CAVM de acuerdo con la impresión de FCD (parámetro (a)), heterogeneidad de FCD (parámetro (b)), CFV (parámetro (c)) y heterogeneidad de FCV (parámetro (d)), y se realizó un informe escrito. Para todas las películas y fotogramas en todos los exámenes hubo total acuerdo entre los dos examinadores en que todos los parámetros mostraron valores fuera de los valores de línea base, y se concluyó que existía una falla circulatoria severa en la perfusión nutritiva de la piel.

35                  Los datos de la DRS, parámetro (e) y (f), se muestran en la Figura 9(a) y (b).

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar o evaluar la insuficiencia circulatoria en un sujeto (1), cuyo método comprende evaluar la microcirculación del sujeto con respecto a los siguientes parámetros:

5 (a) densidad capilar funcional (FCD);

(b) heterogeneidad de la FCD;

(c) velocidad de flujo capilar;

(d) heterogeneidad de la velocidad del flujo capilar;

10 (e) saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares ( $\text{SmvO}_2$ ); y

(f) heterogeneidad de  $\text{SmvO}_2$ ;

en el que los parámetros (a) a (d) se evalúan mediante el análisis de las imágenes obtenidas con un microscopio (2,3), en el que el microscopio utiliza luz blanca no polarizada, y los parámetros (e) y (f) se evalúan mediante el análisis de los espectros obtenidos por espectroscopia de reflectancia difusa (DRS);

15 en el que el análisis se realiza en un ordenador (4) que comprende software para el análisis de dichas imágenes y espectros;

20 en el que el método comprende además comparar los resultados de la evaluación con valores de línea base para identificar o evaluar la falla circulatoria en dicho sujeto;

en el que se evalúa la microcirculación de la piel, en el que la piel no incluye el pliegue ungueal; y

en el que el método se realiza sobre datos obtenidos del paciente y el paciente no está presente durante el método.

25 2. El método de la reivindicación 1, en el que la microscopía es videomicroscopía asistida por ordenador (CAVM).

30 3. El método de la reivindicación 1, en el que el método se implementa por ordenador.

35 4. Un método para hacer un pronóstico para un sujeto con insuficiencia (1) circulatoria, comprendiendo el método evaluar la microcirculación del sujeto con respecto a los siguientes parámetros:

30 (a) densidad capilar funcional (FCD);

(b) heterogeneidad de la FCD;

(c) velocidad de flujo capilar;

(d) heterogeneidad de la velocidad del flujo capilar;

35 (e) saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares ( $\text{SmvO}_2$ ); y

(f) heterogeneidad de  $\text{SmvO}_2$ ;

40 en el que los parámetros (a) a (d) se evalúan visualmente mediante el análisis de imágenes de los mismos obtenidas usando un microscopio (2,3) en el que el microscopio usa luz blanca no polarizada, y los parámetros (e) y (f) se evalúan mediante el análisis de espectros obtenido por espectroscopía de reflectancia difusa (DRS);

45 en el que el análisis se realiza en un ordenador (4) que comprende software para el análisis de dichas imágenes y espectros;

en el que el método comprende además comparar los resultados de la evaluación con valores de línea base para hacer un pronóstico para dicho sujeto;

en el que se evalúa la microcirculación de la piel, en el que la piel no incluye el pliegue ungueal; y

en el que el método se realiza sobre datos obtenidos del paciente y el paciente no está presente durante el método.

50 5. El método de cualquier reivindicación anterior que comprende además la medición de la extracción de oxígeno por la microvasculatura y, opcionalmente, la heterogeneidad de dicha extracción.

55 6. El método de la reivindicación 5, en el que el método se emplea para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica en el sujeto (1).

60 7. Aparato para evaluar la microcirculación de un sujeto que comprende un ordenador (4); en el que el ordenador está dispuesto para recibir y procesar:

(i) imágenes de la microcirculación del sujeto (1) obtenidas utilizando un microscopio (2,3) utilizando luz blanca no polarizada para determinar los siguientes parámetros asociados con la patología:

65 (a) densidad capilar funcional (FCD);

(b) heterogeneidad de la FCD;

(c) velocidad de flujo capilar;

(d) heterogeneidad de la velocidad del flujo capilar; y

(ii) datos relativos a SmvO<sub>2</sub> de un espectrómetro (9) para determinar los siguientes parámetros asociados a la patología:

- 5 (e) saturación de oxígeno de los eritrocitos microvasculares (SmvO<sub>2</sub>); y  
(f) heterogeneidad de SmvO<sub>2</sub>;

en el que el ordenador está además dispuesto para comparar los resultados de la evaluación con valores de línea base; y

10 en el que las imágenes y los datos son de la microcirculación en la piel, en el que la piel no incluye el pliegue de la uña

8. El aparato de la reivindicación 7, que comprende además dicho microscopio (2, 3) y dicho espectrómetro (9).

15 9. El aparato como se reivindica en la reivindicación 7 u 8 que comprende además un medio para generar valores correspondientes a los parámetros y/o un valor con base en ellos en combinación, tal como una suma ponderada o un promedio.

20 10. Software que comprende instrucciones para hacer que un ordenador (4) lleve a cabo los pasos de procesamiento de imágenes y datos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

25 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto (1):

(i) está siendo considerado para terapia de cuidados intensivos o está en tratamiento, tal como oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) y/o tratamiento de soporte vital extracorpóreo (ECLS); o

25 (ii) sufre de preeclampsia; o

(iii) sufre de sepsis; o

(iv) padece insuficiencia cardíaca crónica o aguda; o

(v) tiene una herida crónica en la piel; o

(vi) se asfixie; o

30 (vii) tiene insuficiencia respiratoria aguda o crónica; o

(viii) tiene isquemia aguda o crónica de las extremidades;

(ix) haya tenido un trasplante de órgano;

(x) tiene eritromelalgia.

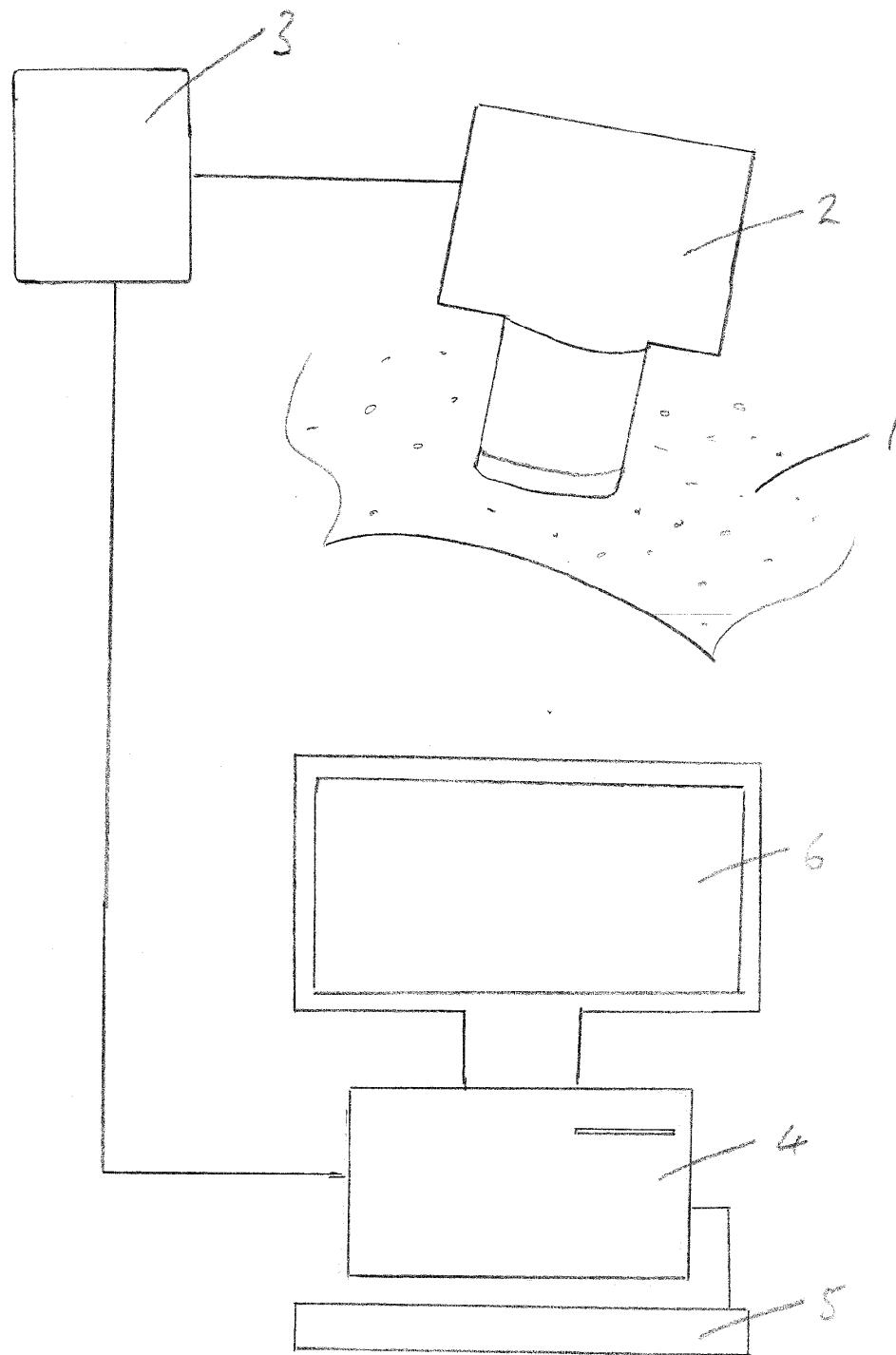
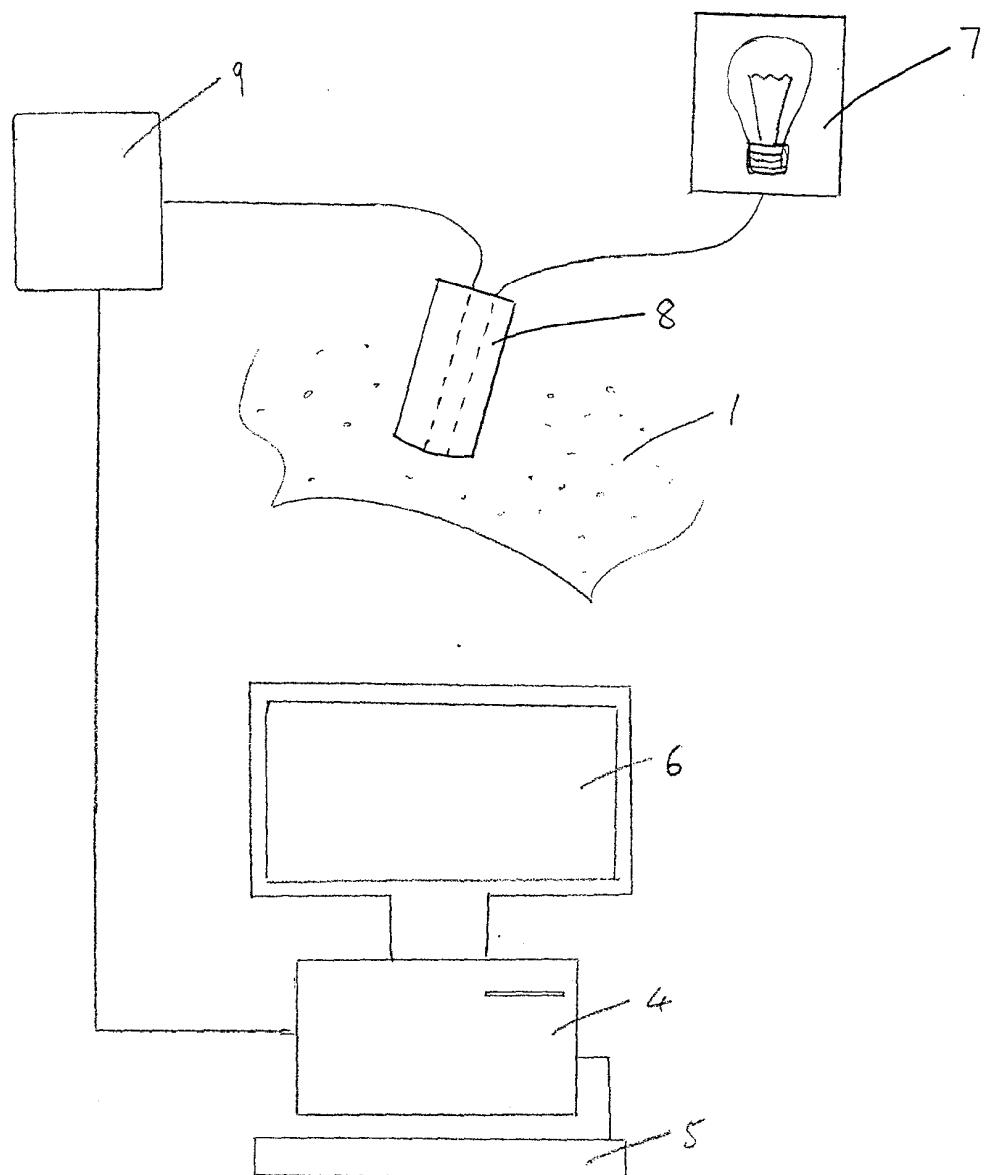


Fig. 1



**Fig. 2**

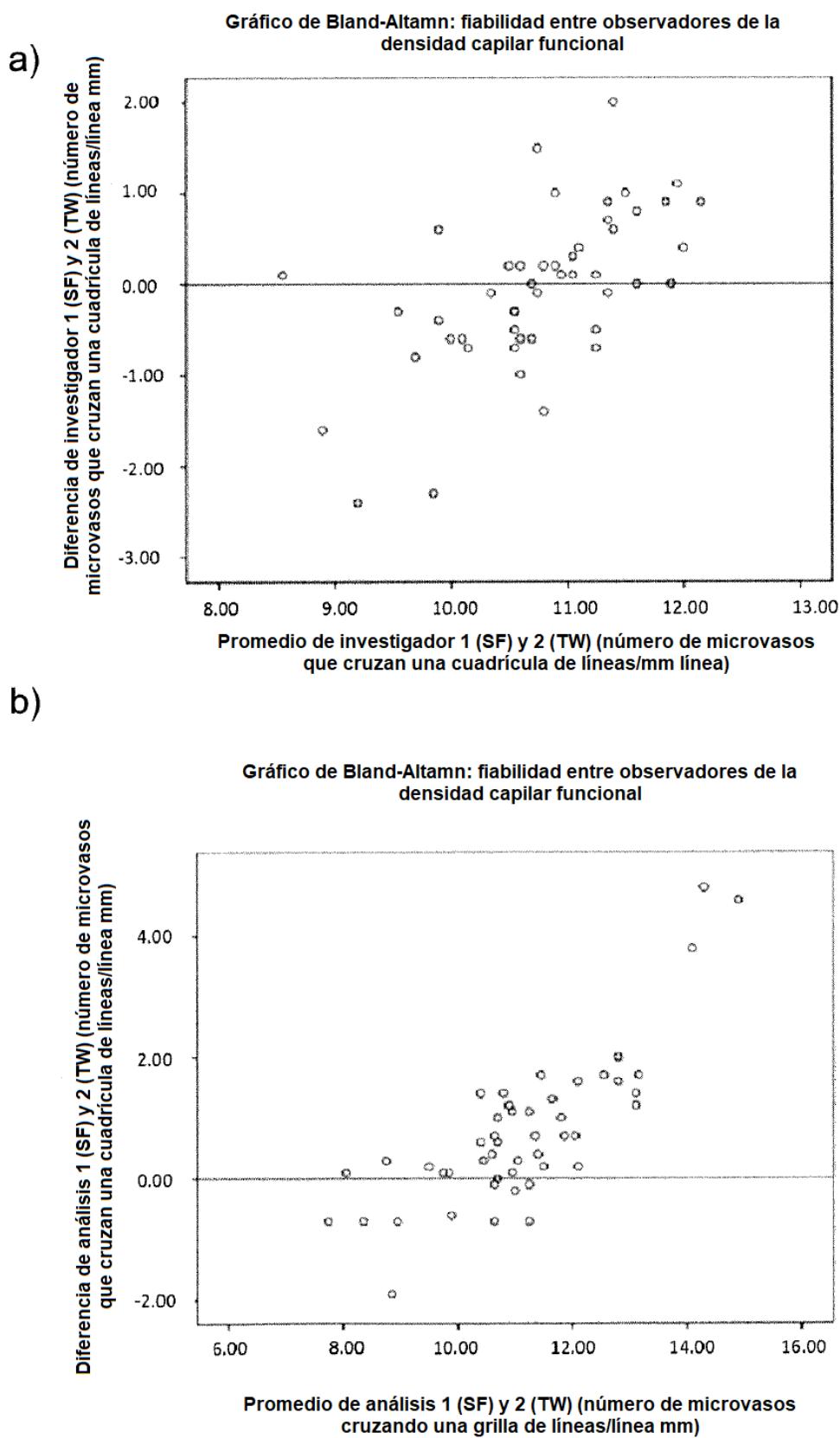
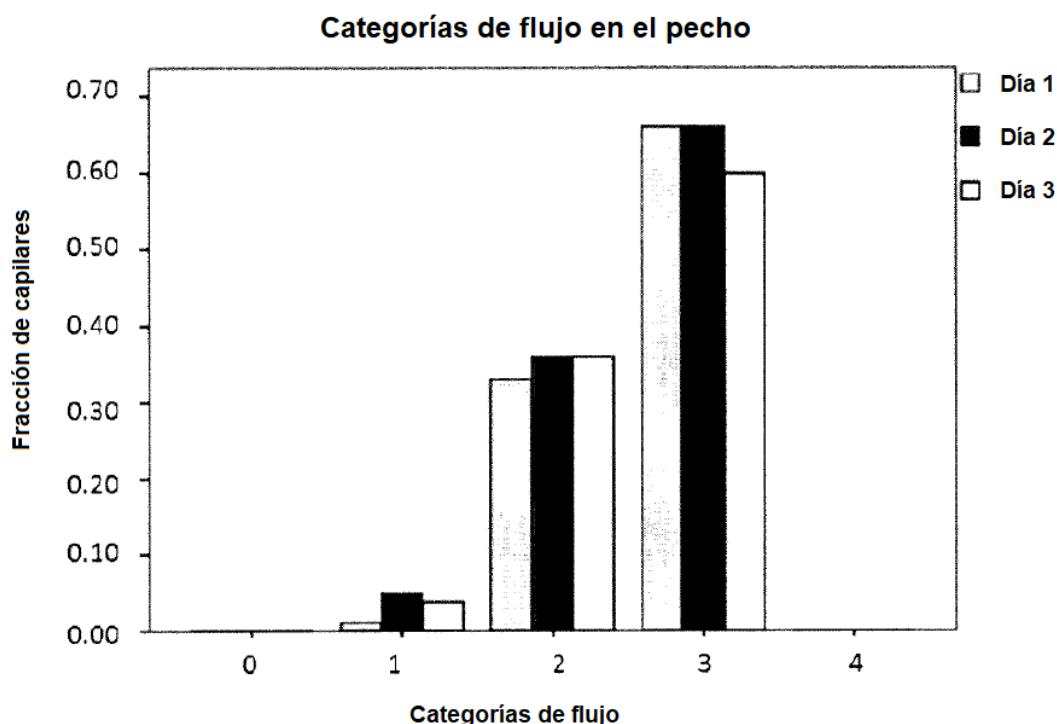


Fig. 3

a)



b)

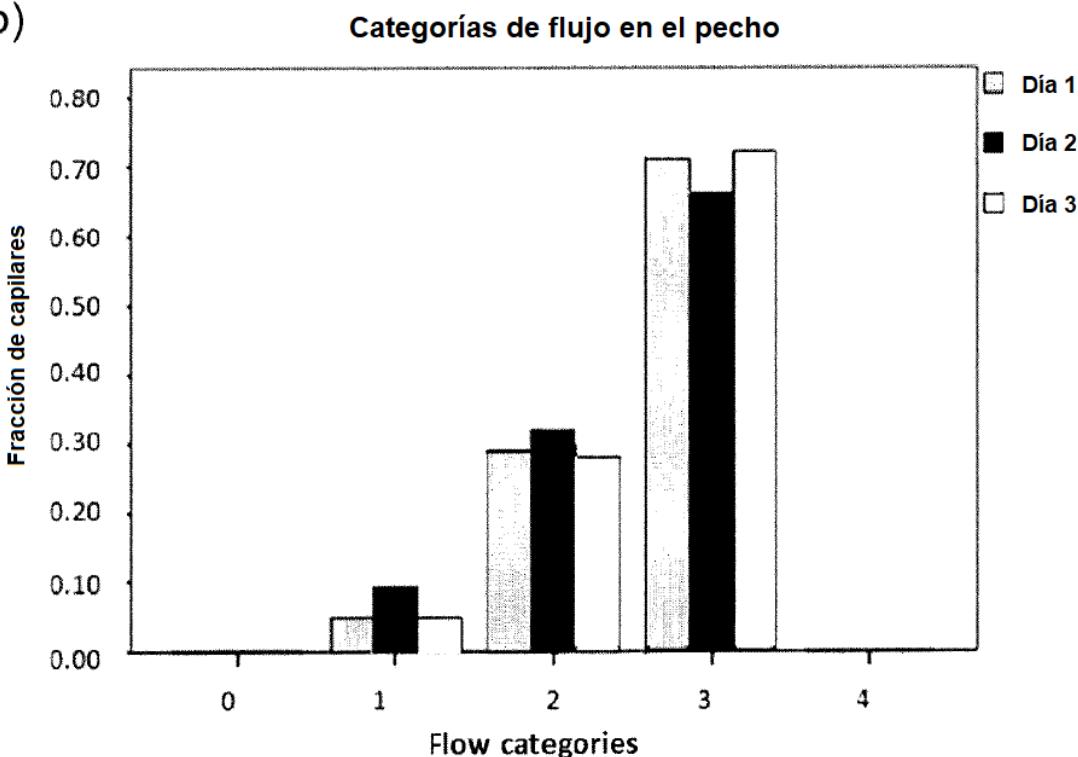


Fig. 4

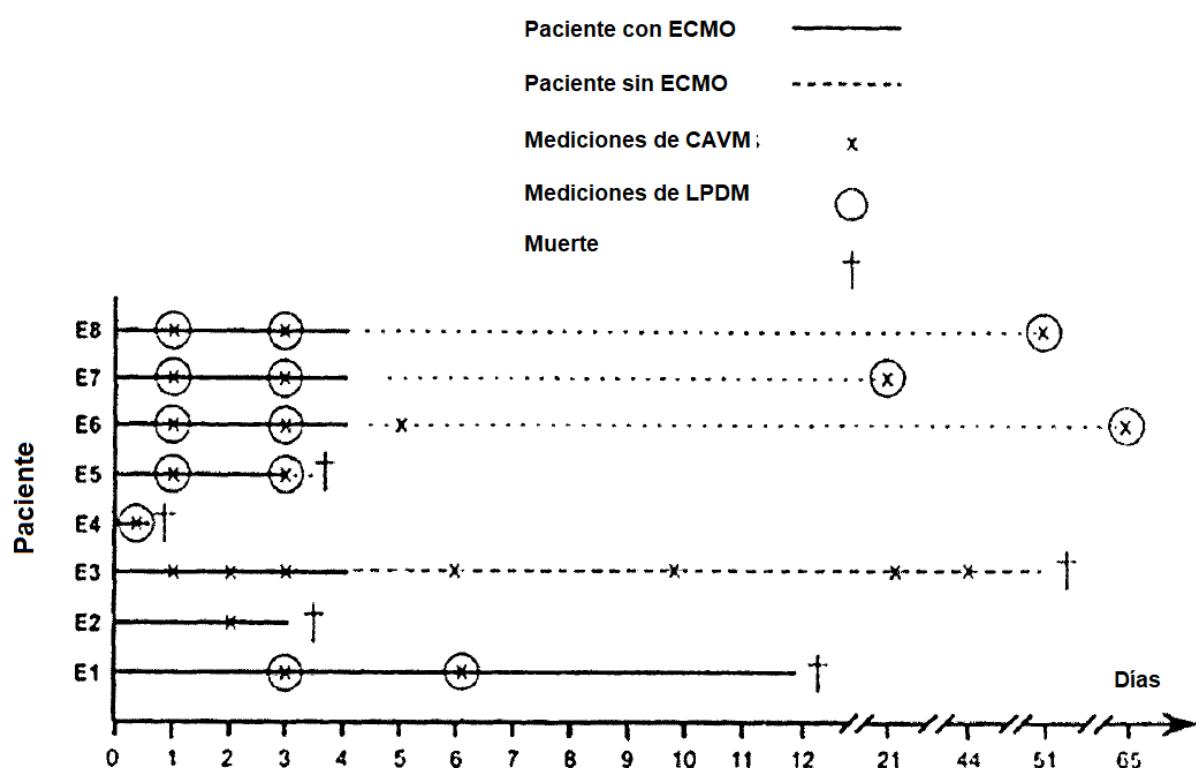


Fig. 5



Fig. 6

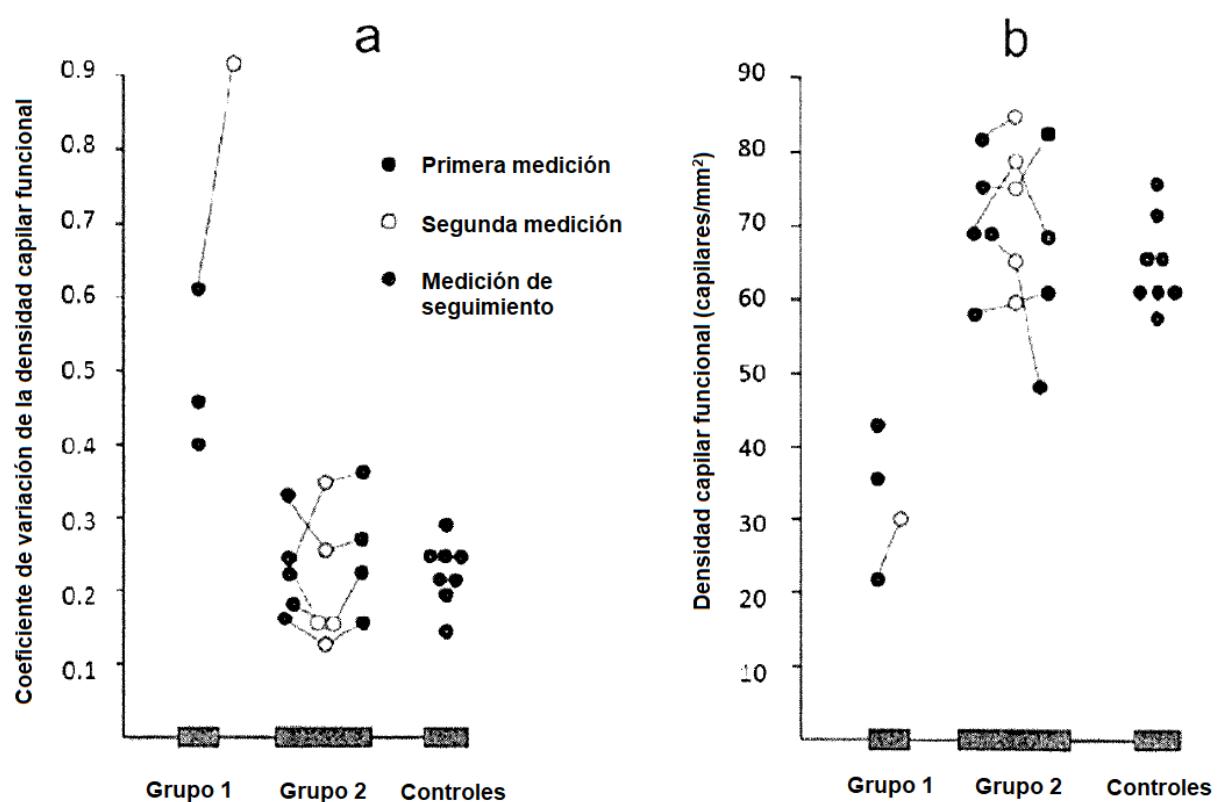


Fig. 7

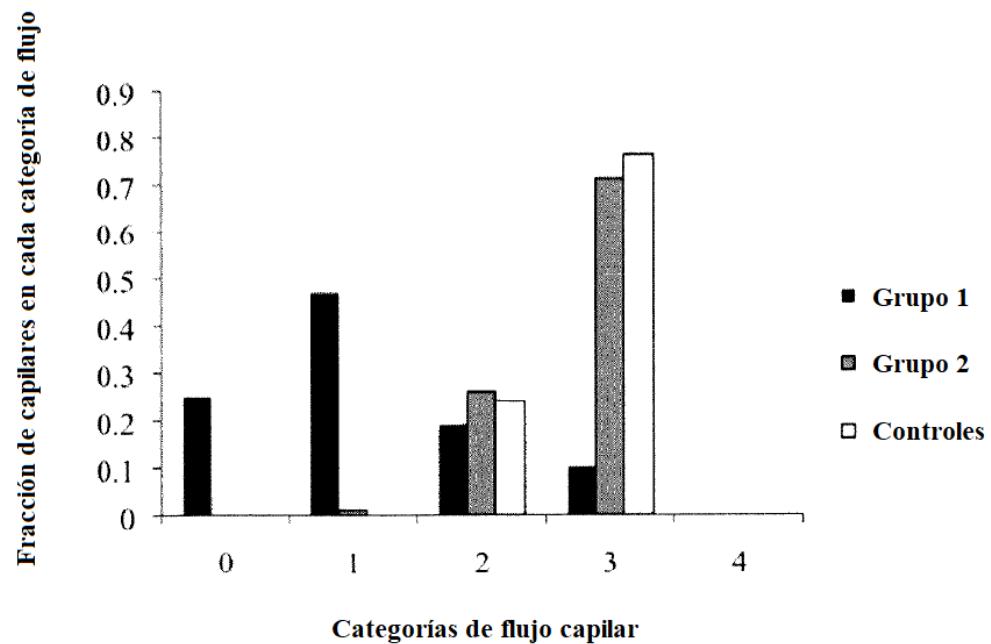


Fig. 8

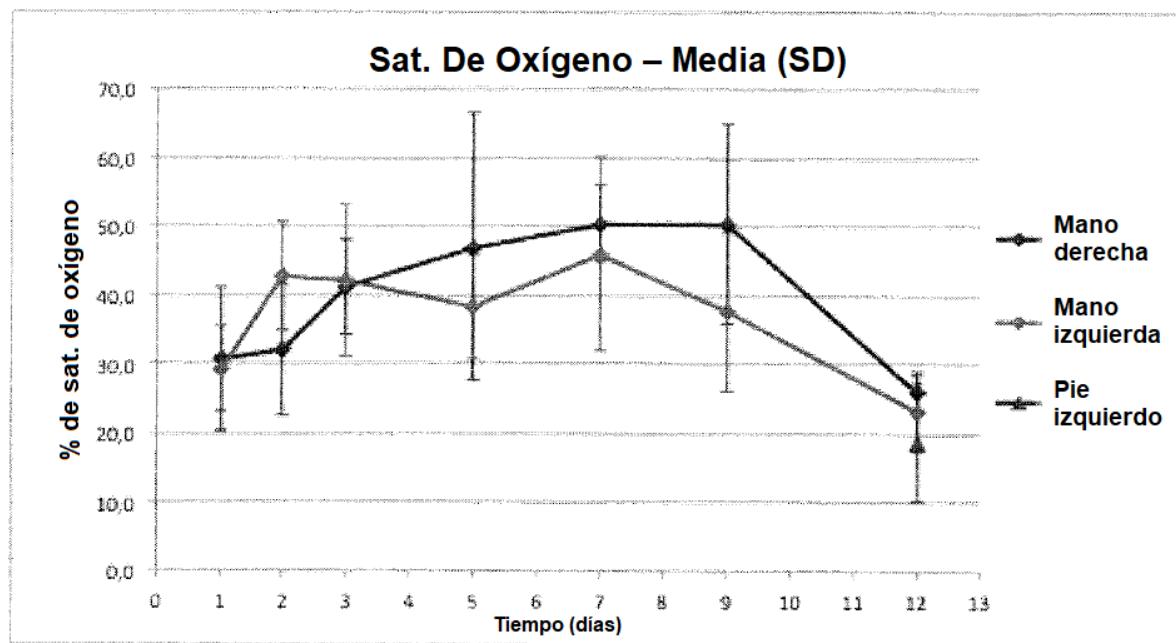


FIG. 9(a)

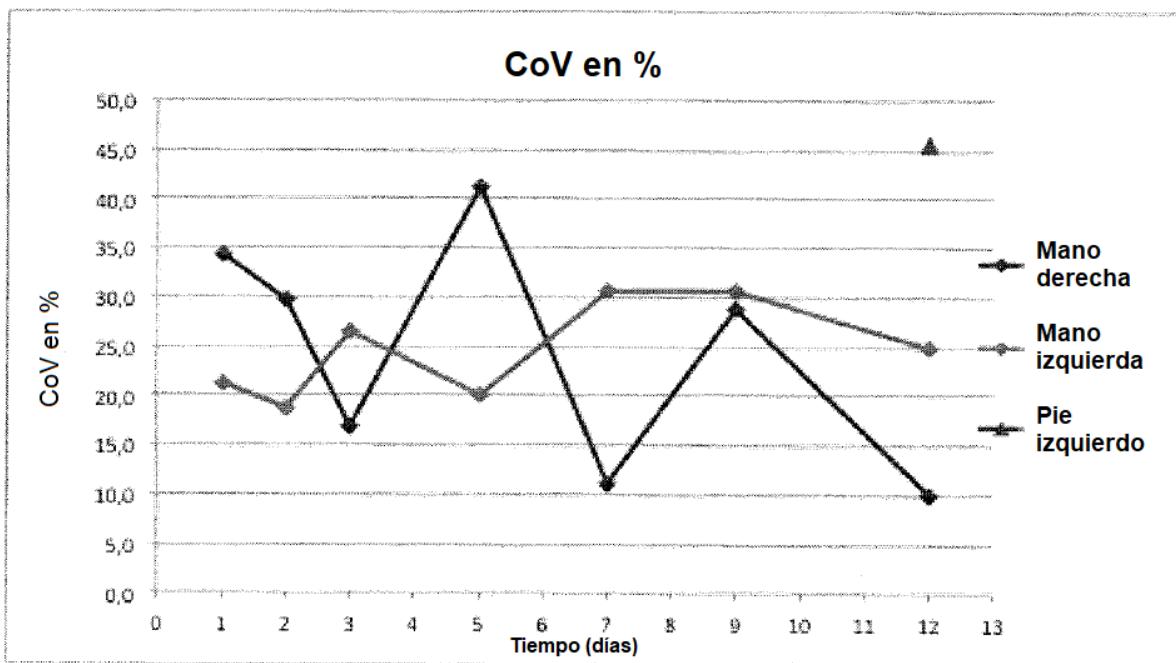


FIG. 9(b)