

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 708**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2009** **E 18205726 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024** **EP 3501384**

54 Título: **Dispositivo y método para formación de imágenes y supervisión por fluorescencia**

30 Prioridad:

20.05.2008 US 5478008 P

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

27.11.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITY HEALTH NETWORK (100.0%)
101 College Street Suite 150
Toronto, Ontario M5G 1L7, CA

72 Inventor/es:

DACOSTA, RALPH SEBASTIAN;
WILSON, BRIAN C. y
ZHANG, KAI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 989 708 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método para formación de imágenes y supervisión por fluorescencia

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para formación de imágenes y supervisión por fluorescencia. En particular, el método puede ser adecuado para la supervisión de sustancias bioquímicas y/o biológicas y no biológicas, tales como en el cuidado de heridas, para aplicaciones tanto humanas como animales.

10 **Antecedentes**

El cuidado de heridas supone un desafío clínico importante. Las heridas cicatrizantes y las heridas crónicas no cicatrizantes están asociadas con una serie de cambios en los tejidos biológicos que incluyen inflamación, proliferación, remodelado de los tejidos conectivos y, una de las principales preocupaciones comunes, la infección bacteriana. Una proporción de las infecciones de heridas no son clínicamente evidentes y contribuyen a la creciente carga económica asociada con el cuidado de heridas, especialmente en poblaciones en proceso de envejecimiento. Actualmente, la evaluación de la herida por el criterio de referencia incluye una inspección visual directa del sitio de la herida con luz blanca combinada con la recogida indiscriminada de frotis bacterianos y biopsias de tejidos que dan como resultado resultados bacteriológicos tardíos, costosos y, a menudo, insensibles. Esto puede afectar el momento y la efectividad del tratamiento. La evaluación visual cualitativa y subjetiva solo proporciona una visión general del sitio de la herida, pero no proporciona información sobre los cambios biológicos y moleculares subyacentes que se producen a nivel tisular y celular. Un método relativamente simple y complementario que aproveche la información "biológica y molecular" para mejorar la identificación temprana de dicho cambio oculto es deseable en el tratamiento clínico de heridas. El reconocimiento temprano de las heridas de alto riesgo puede guiar la intervención terapéutica y proporcionar un seguimiento de la respuesta a lo largo del tiempo, lo que reduce considerablemente la morbilidad y la mortalidad debidas especialmente a las heridas crónicas.

La atención y el tratamiento de las heridas supone un desafío clínico importante que presenta una carga significativa y un desafío para la atención médica a nivel mundial [Bowler *et al.*, Clin Microbiol Rev. 2001, 14:244-269; Cutting *et al.*, Journal of Wound Care. 1994, 3:198-201; Dow *et al.*, Ostomy/Wound Management. 1999, 45:23-40]. Las heridas se clasifican generalmente como heridas sin pérdida de tejido (p. ej., en cirugía) y heridas con pérdida de tejido, tales como quemaduras, heridas causadas como resultado de traumatismos, abrasiones o como eventos secundarios en dolencias crónicas (p. ej., estasis venosa, úlceras diabéticas o llagas por presión y heridas iatrogénicas tales como sitios de donantes de injertos de piel y dermoabrasiones, senos pilonidales, heridas quirúrgicas que no cicatrizan y heridas de cavidad crónica). Las heridas también se clasifican según las capas involucradas, las heridas superficiales que afectan solo a la epidermis, las heridas de espesor parcial que afectan solo a la epidermis y a la dermis, y las heridas de espesor completo que afectan a la grasa subcutánea o al tejido más profundo. Aunque la restauración de la continuidad del tejido después de la lesión es un fenómeno natural, la infección, la calidad de la cicatrización, la velocidad de curación, la pérdida de líquidos y otras complicaciones que aumentan el tiempo de curación representan un desafío clínico importante. La mayoría de las heridas curan sin ninguna complicación. Sin embargo, las heridas crónicas que no cicatrizan y que conllevan progresivamente más pérdida de tejido suponen un gran desafío para los profesionales e investigadores del cuidado de heridas. A diferencia de las incisiones quirúrgicas donde hay relativamente poca pérdida de tejido y las heridas generalmente se curan sin complicaciones significativas, las heridas crónicas alteran el proceso normal de curación, que a menudo no es suficiente en sí mismo para efectuar la reparación. La curación tardía es generalmente un resultado de la fisiología de la herida comprometida [Winter (1962) Nature. 193: 293-294] y normalmente ocurre con estasis venosa y úlceras diabéticas, o presión local prolongada como en personas mayores inmunosuprimidas e inmovilizadas. Estas condiciones crónicas aumentan el costo de la atención y reducen la calidad de vida del paciente. A medida que estos grupos aumentan en número, aumentará la necesidad de productos avanzados para el cuidado de heridas.

Los métodos convencionales de evaluación clínica de las heridas agudas y crónicas siguen siendo subóptimos. Por lo general, se basan en un historial clínico completo del paciente, una evaluación clínica cualitativa y subjetiva con un dictamen visual simple con luz blanca ambiental y a simple vista, y algunas veces pueden implicar el uso de fotografías en color para captar la apariencia general de una herida con iluminación con luz blanca [Perednia (1991) J Am Acad Dermatol. 25: 89-108]. También es necesaria una reevaluación regular del progreso hacia la curación y la modificación apropiada de la intervención. La terminología de la evaluación de heridas no es uniforme, muchas preguntas que rodean la evaluación de heridas permanecen sin respuesta, aún no se ha llegado a un acuerdo sobre los parámetros clave de las heridas a medir en la práctica clínica, y la precisión y fiabilidad de las técnicas de evaluación de heridas disponibles varían. La evaluación visual con frecuencia se combina con muestreo y/o biopsias tisulares para cultivo bacteriológico para el diagnóstico. Los frotis bacterianos se recogen en el momento del examen de la herida y tienen la ventaja señalada de proporcionar una identificación de especies bacterianas/microbianas específicas [Bowler, 2001; Cutting, 1994; Dow, 1999; Dow G. en: Krasner *et al.* eds. Chronic Wound Care: A Clinical Source Book for Healthcare Professionals, 3ª ed. Wayne Pa.: HMP Communications. 2001:343-356]. Sin embargo, a menudo, se recogen múltiples frotis y/o biopsias al azar desde el sitio de la herida, y algunas técnicas de muestreo

pueden de hecho propagar los microorganismos alrededor de la herida durante el proceso de recogida, lo que afecta el tiempo de curación y la morbilidad del paciente [Dow, 1999]. Esto puede ser un problema, especialmente con heridas crónicas grandes (no cicatrizantes) en las que el rendimiento de detección de la presencia bacteriana mediante el uso de muestreo y protocolos de biopsia actuales es subóptimo (insensible al diagnóstico), a pesar de que se recogen muchos frotis. Por consiguiente, los métodos actuales para obtener frotis o biopsias tisulares del sitio de la herida para un cultivo bacteriológico posterior se basan en un enfoque de muestreo no dirigido o "ciego" o biopsia por punción, y no se han optimizado para minimizar el traumatismo en la herida o para maximizar el rendimiento diagnóstico de las pruebas de bacteriología. Además, la obtención de frotis y muestras de biopsias para bacteriología puede ser laboriosa, invasiva, dolorosa, costosa y, lo que es más importante, los resultados de los cultivos bacteriológicos suelen tardar entre 2 y 3 días en regresar del laboratorio y pueden no ser concluyentes [Serena *et al.* (2008) *Int J Low Extrem Wounds*. 7(1):32-5.; Gardner *et al.*, (2007) *WOUNDS*. 19(2):31-38], lo que retrasa el diagnóstico y el tratamiento precisos [Dow, 1999]. Por ende, los frotis bacterianos no proporcionan una detección en tiempo real del estado infeccioso de las heridas. Si bien el muestreo de la herida parece ser sencillo, puede llevar a un tratamiento inadecuado, a la morbilidad del paciente y al aumento de las estancias hospitalarias si no se realiza correctamente [Bowler, 2001; Cutting, 1994; Dow, 1999; Dow, 2001]. La falta de un método de formación de imágenes no invasivo para evaluar de forma objetiva y rápida la reparación de heridas a nivel biológico (que puede ser más detallada que la simple apariencia o morfología), y para ayudar en la identificación selectiva de la recogida de frotis y muestras de biopsias tisulares para bacteriología es un obstáculo importante en la evaluación y el tratamiento de la herida clínica. Un método alternativo es altamente deseable.

A medida que se curan las heridas (crónicas y agudas), se producen una serie de cambios biológicos clave en el sitio de la herida a nivel tisular y celular [Cutting, 1994]. La curación de heridas implica una interacción compleja y dinámica de procesos biológicos divididos en cuatro fases superpuestas (hemostasia, inflamación, proliferación celular y maduración o remodelado de tejidos conectivos) que afectan a la patofisiología de la curación de heridas [Physiological basis of wound healing, in *Developments in wound care*, PJB Publications Ltd., 5-17, 1994]. Una complicación mayor común que surge durante el proceso de curación de heridas, que puede variar de días a meses, es una infección causada por bacterias y otros microorganismos [Cutting, 1994; Dow, 1999]. Esto puede dar lugar a un serio impedimento para el proceso de curación y llevar a complicaciones significativas. Todas las heridas contienen bacterias en niveles que van desde la contaminación, a través de la colonización, la colonización crítica hasta la infección, y el diagnóstico de la infección bacteriana se basa en síntomas y signos clínicos (p. ej., indicios visuales y olorosos).

Los términos más comúnmente usados para la infección de la herida han incluido la contaminación de la herida, la colonización de la herida, la infección de la herida y, más recientemente, la colonización crítica. La contaminación de la herida se refiere a la presencia de bacterias en una herida sin ninguna reacción del huésped [Ayton M. *Nurs Times* 1985, 81(46): supl. 16-19], la colonización de la herida se refiere a la presencia de bacterias en la herida que se multiplican o inician una reacción del huésped [Ayton, 1985], la colonización crítica se refiere a la multiplicación de bacterias que causan un retraso en la cicatrización de la herida, generalmente asociada con una exacerbación del dolor no notificada previamente pero aún sin reacción manifiesta del huésped [Falanga *et al.*, *J Invest Dermatol* 1994 102(1): 125-27; Kingsley A, *Nurs Stand* 2001, 15(30): 50-54, 56, 58]. La infección de la herida se refiere a la deposición y a la multiplicación de bacterias en el tejido con una reacción asociada del huésped [Ayton, 1985]. En la práctica, el término "colonización crítica" se puede usar para describir las heridas que se considera que se están moviendo de la colonización a la infección local. Sin embargo, el desafío en el entorno clínico es garantizar que esta situación se reconozca rápidamente con confianza y que se reduzca la carga biológica bacteriana lo antes posible, tal vez mediante el uso de antimicrobianos tópicos. Los patógenos potenciales de la herida se pueden clasificar en diferentes grupos, tales como, bacterias, hongos, esporas, protozoos y virus, según su estructura y capacidad metabólica [Cooper *et al.*, *Wound Infection and Microbiology*: Medical Communications (UK) Ltd para Johnson & Johnson Medical, 2003]. Aunque los virus generalmente no causan infecciones en las heridas, las bacterias pueden infectar las lesiones cutáneas que se forman durante el curso de ciertas enfermedades virales. Dichas infecciones pueden ocurrir en varios entornos, incluso en entornos de atención médica (hospitales, clínicas) y en hogares o centros de atención crónica. El control de las infecciones de la herida es cada vez más complicado, pero el tratamiento no siempre se guía por el diagnóstico microbiológico. La diversidad de microorganismos y la alta incidencia de flora polimicrobiana en la mayoría de las heridas crónicas y agudas respaldan el valor de identificar uno o más patógenos bacterianos de cultivos de heridas. El reconocimiento temprano de los agentes causantes de las infecciones de la herida puede ayudar a los profesionales del cuidado de la herida a tomar las medidas adecuadas. Además, la formación de colágeno defectuoso se debe a una mayor carga bacteriana y da como resultado tejido de granulación suelto friable con exceso de vascularización que generalmente conduce a la apertura espontánea de los bordes de una herida quirúrgica [Sapico *et al.* (1986) *Diagn Microbiol Infect Dis*. 5:31-38].

La evaluación precisa y clínicamente relevante de la herida es una herramienta clínica importante, pero este proceso actualmente sigue siendo un desafío importante. La evaluación visual actual en la práctica clínica solo proporciona una vista general del sitio de la herida (p. ej., presencia de material purulento y costras). La mejor práctica clínica actual no usa adecuadamente la información objetiva de importancia crítica sobre los cambios biológicos fundamentales subyacentes que se producen a nivel tisular y celular (p. ej., contaminación, colonización, infección, remodelado de la matriz, inflamación, infección bacteriana/microbiana y necrosis) ya que dichos índices i) no son fácilmente disponibles en el momento del examen de la herida y ii) actualmente no están integrados en el proceso

convencional de tratamiento de la herida. La evaluación visual directa del estado de salud de la herida mediante luz blanca se basa en la detección del color y en los cambios topográficos/texturales en la herida y alrededor de la misma, y por lo tanto se puede ser incapaz y poco fiable detectar cambios sutiles en el remodelado de tejidos. Más importante aún, la evaluación visual directa de las heridas a menudo no detecta la presencia de una infección bacteriana, ya que las bacterias están ocultas bajo la iluminación con luz blanca. La infección se diagnostica clínicamente con pruebas microbiológicas usadas para identificar los organismos y su susceptibilidad a los antibióticos. Aunque las indicaciones físicas de infección bacteriana se pueden observar fácilmente en la mayoría de las heridas con luz blanca (p. ej., exudado purulento, formación de costras, hinchazón, eritema), esto suele retrasarse significativamente y el paciente ya tiene un mayor riesgo de morbilidad (y otras complicaciones asociadas con infección) y la mortalidad. Por lo tanto, la visualización directa con luz blanca convencional no detecta la presencia temprana de las propias bacterias ni identifica los tipos de bacterias en la herida.

El implante y el injerto de citoblastos han despertado recientemente interés, como el cuidado y tratamiento de heridas. Sin embargo, actualmente es un reto rastrear la proliferación de citoblastos después del implante o el injerto. El seguimiento e identificación de las células neoplásicas también ha sido un desafío. Sería deseable que tales células pudieran ser supervisadas de una manera mínimamente invasiva o no invasiva.

También es útil proporcionar un modo de detectar la contaminación de otras superficies diana, entre las que se incluyen dianas no biológicas.

Los documentos US 2003/160182 A1, US 5 474 910 A, US 2006/008866 A1, WO 02/055729 A1, WO 94/21816 A1, WO 2006/007715 A1, US 6 603 552 B1, EP 1 912 059 A1, WO 00/25114A1 y US 5 981 958 A divulgan diversos métodos y aparatos que constituyen los antecedentes de la técnica en la presente divulgación.

Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un dispositivo para supervisión por fluorescencia;
 La Figura 1b muestra un ejemplo de una instalación de cuidado de heridas clínicas que usa un dispositivo para supervisión por fluorescencia;
 La Figura 2 muestra imágenes de una realización manual de un dispositivo para supervisión por fluorescencia;
 La Figura 3 muestra imágenes de cultivos bacterianos vivos capturados usando un dispositivo para supervisión por fluorescencia;
 La Figura 3J muestra un ejemplo de supervisión bacteriano usando un dispositivo para supervisión por fluorescencia;
 La Figura 4 muestra imágenes de un modelo simulado de herida animal, que demuestra la detección de bacterias autofluorescentes no invasivas usando un dispositivo para supervisión por fluorescencia;
 La Figura 5 muestra imágenes de una superficie cutánea de una muestra de carne de cerdo, que demuestra la detección autofluorescente no invasiva de colágeno y varias especies bacterianas usando un dispositivo para supervisión por fluorescencia;
 La Figura 6 muestra imágenes de una superficie muscular de una muestra de carne de cerdo, que demuestra el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para la detección de autofluorescencia de tejidos conectivos y bacterias;
 La Figura 7 muestra imágenes y gráficos espectrales que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para detectar la fluorescencia de bacterias que crecen en placas de agar y en la superficie una herida simulada en carne de cerdo;
 La Figura 8 muestra imágenes de cultivos bacterianos que demuestran un dispositivo para supervisión por fluorescencia, con y sin agentes de contraste;
 La Figura 9 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para la detección de autofluorescencia de tejidos conectivos y diversas especies bacterianas en la superficie cutánea de una muestra de carne de cerdo;
 La Figura 10 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para la detección de infección bacteriana mejorada con contraste de fluorescencia en una muestra de carne de cerdo;
 La Figura 10G muestra un ejemplo del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para supervisar la efectividad de un tratamiento fotodinámico;
 La Figura 11 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para formación de imágenes de sangre y microvasculatura;
 La Figura 12 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para formación de imágenes de la cavidad oral y la superficie cutánea;
 La Figura 12J muestra un ejemplo del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para formación de imágenes de una superficie cutánea;
 La Figura 13 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para la detección de agentes de contraste de fluorescencia exógenos *in vivo*;
 La Figura 14 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para

cirugía guiada por imagen de fluorescencia usando agentes de contraste de imagen;

La Figura 15 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para grabación de video de cirugía guiada por imagen de fluorescencia;

La Figura 16 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para resecciones quirúrgicas guiadas con imagen de autofluorescencia de tejidos en un modelo de infarto cardíaco de ratón;

La Figura 17 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para la cirugía guiada por imagen de autofluorescencia de un cerebro de ratón;

La Figura 18 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia en formación de imágenes de citoblastos cancerígenos en un ratón;

La Figura 19 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia en la formación de imágenes de citoblastos cancerígenos en un hígado y en un pulmón;

Las Figuras 19H y 19I muestran ejemplos del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para la formación de imágenes de tumores;

La Figura 20 muestra imágenes que demuestran el uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia en formación de imágenes de un modelo de ratón;

La Figura 20B muestra un ejemplo del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para formación de imágenes de modelos de animales pequeños;

La Figura 21 ilustra las fases de la curación de heridas con el tiempo;

La Figura 22 es una tabla que muestra ejemplos de biomarcadores tisulares, celulares y moleculares que se sabe están asociados con la curación de heridas;

La Figura 23 es un diagrama que compara una herida sana con una herida crónica;

La Figura 24 ilustra un ejemplo de supervisión de una herida crónica;

Las Figuras 24B-24P muestran ejemplos del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para formación de imágenes de heridas y afecciones en pacientes clínicos;

La Figura 24Q muestra un ejemplo del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para la formación de imágenes de respuesta bacteriana a la terapia fotodinámica;

La Figura 24R muestra un ejemplo del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para formación de imágenes de tejido;

La Figura 25 es un diagrama de flujo que ilustra el tratamiento de una herida crónica usando un dispositivo para supervisión por fluorescencia;

Las Figuras 26 y 27 muestran ejemplos del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para detectar contaminación en productos alimenticios;

Las Figuras 28-28C muestran ejemplos del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para detectar contaminación en la superficie;

Las Figuras 29-31 muestran ejemplos del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para aplicaciones forenses;

La Figura 32 muestra un ejemplo del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para catalogar animales;

La Figura 33 muestra un ejemplo de un kit que incluye un dispositivo para supervisión por fluorescencia; y

La Figura 34 muestra un ejemplo del uso de un dispositivo para supervisión por fluorescencia para formación de imágenes de sustancias cosméticas o dermatológicas.

Descripción detallada

La progresión de la herida es actualmente supervisada manualmente. El Panel Consultivo Nacional de Úlceras por Presión (NPUAP) desarrolló la herramienta de Escala para la Curación de Úlceras por Presión (PUSH) que describe un método de cinco pasos para caracterizar las úlceras por presión. Esta herramienta usa tres parámetros para determinar una puntuación cuantitativa que luego se usa para supervisar la úlcera por presión con el tiempo. Los parámetros cualitativos incluyen las dimensiones de la herida, el tipo de tejido y la cantidad de exudado o descarga, y las lecturas térmicas presentes después de retirar el apósito. Una herida puede ser caracterizada por su olor y color. Tal evaluación de heridas en la actualidad no incluye información biológica y molecular crítica sobre la herida. Por lo tanto, todas las descripciones de las heridas son algo subjetivas y son anotadas a mano por el médico o el enfermero.

Lo que es deseable es un método o dispositivo robusto, rentable, no invasivo y rápido basado en formación de imágenes para evaluar objetivamente las heridas en busca de cambios a nivel biológico, bioquímico y celular y para detectar de forma rápida, sensible y no invasiva la presencia más temprana de bacterias/microorganismos en las heridas. Un método o dispositivo de este tipo para la detección de cambios críticos en tejidos biológicos en heridas puede desempeñar un papel complementario con los métodos clínicos convencionales de tratamiento de heridas con el fin de guiar decisiones clave clínico-patológicas en la atención del paciente. Dicho dispositivo puede ser compacto, portátil y capaz de realizar consultas de heridas no invasivas y/o sin contacto en tiempo real de una manera segura y conveniente, lo que puede permitir que se adapte perfectamente a la práctica rutinaria de tratamiento de heridas y sea intuitivo para médico, enfermero y especialista en heridas. Esto también puede incluir el uso de este dispositivo en el entorno de atención domiciliaria (incluido el uso personal por parte de un paciente), así como en entornos de campo de batalla militar. Además, un dispositivo de este tipo basado en formación de

imágenes puede proporcionar una capacidad para supervisar la respuesta del tratamiento y curación de la herida en tiempo real mediante la incorporación de una guía de imagen valiosa "informada biológicamente" en el proceso de evaluación clínica de la herida. En última instancia, esto puede conducir a nuevos diagnósticos potenciales, planificación del tratamiento, supervisión de la respuesta al tratamiento y, por lo tanto, estrategias de intervención "adaptativas" que pueden permitir una mejora de la respuesta de curación de la herida a nivel del paciente individual. La identificación precisa de los factores sistémicos, locales y moleculares que subyacen en el problema de la curación de la herida en pacientes individuales puede permitir un tratamiento mejor adaptado.

Se han puesto a disposición una serie de tecnologías de formación de imágenes que ofrecen el potencial para satisfacer los requisitos para mejorar el diagnóstico clínico y el tratamiento de la enfermedad. De estos, la formación de imágenes por fluorescencia parece ser prometedora para mejorar la evaluación y el tratamiento de la herida clínica. Cuando se excitan con luz de longitud de onda corta (p. ej., longitudes de onda visible ultravioleta o corta), la mayoría de los componentes biológicos endógenos de los tejidos (p. ej., tejidos conectivos, tales como colágeno y elastinas, coenzimas metabólicas, proteínas, etc.) producen una fluorescencia de una longitud de onda más larga, en los intervalos de longitud de onda ultravioleta, visible, infrarrojo cercano e infrarrojo [DaCosta *et al.*, *Photochem Photobiol.* octubre de 2003, 78(4): 384-92]. La formación de imágenes por autofluorescencia tisular, la tecnología de formación de imágenes más clínicamente madura de las de emergentes basadas en la óptica, se ha usado para mejorar la detección endoscópica de cánceres tempranos y otras enfermedades en el tracto gastrointestinal [DaCosta (2002) *J Gastroenterol Hepatol. Supl.*: S85-104], la cavidad bucal [Poh *et al.*, *Head Neck.* enero de 2007, 29(1):71-6], y pulmones [Hanibuchi *et al.*, (2007) *J Med. Invest.* 54:261-6] y vejiga [D'Hallewin *et al.* (2002) *Eur Urol.* 42(5):417-25] de una manera mínimamente invasiva.

La formación de imágenes por autofluorescencia tisular proporciona un medio único de obtención de información biológicamente relevante de tejidos normales y enfermos en tiempo real, lo que permite la diferenciación entre estados de tejidos normales y enfermos [DaCosta, 2003; DaCosta *et al.* *J Clin Pathol.* 2005, 58(7):766-74]. Esto se basa, en parte, en las interacciones intrínsecamente diferentes entre la luz y el tejido (p. ej., absorción y la dispersión de la luz) que se producen en el tejido en masa y en los niveles celulares, los cambios en la morfología del tejido y las alteraciones en el contenido sanguíneo de los tejidos. En los tejidos, la sangre es un componente importante del tejido que absorbe luz (es decir, un cromóforo). Este tipo de tecnología es adecuada para formación de imágenes de enfermedades en órganos huecos (p. ej., tracto GI, cavidad bucal, pulmones, vejiga) o superficies del tejido expuestas (p. ej., piel). A pesar de esta indicación, los sistemas de formación de imágenes por fluorescencia endoscópica actuales son grandes, participan algoritmos de diagnóstico complejos y caros y, hasta la fecha, estos instrumentos se encuentran principalmente en grandes centros clínicos y muy pocos sistemas están disponibles comercialmente. Actualmente, no existe tal dispositivo óptico de formación de imágenes o por fluorescencia para la formación de imágenes de la herida. Sin embargo, puesto que las heridas son fácilmente accesibles, un dispositivo de formación de imágenes por autofluorescencia puede resultar útil para formación de imágenes rápidas, no invasivas y sin contacto en tiempo real de las heridas, para detectar y explotar la rica información biológica de la herida para superar las limitaciones actuales y mejorar la atención y tratamiento clínicos.

Se desvela un método y un dispositivo para formación de imágenes y supervisión por fluorescencia. Una realización del dispositivo es un dispositivo óptico portátil de formación de imágenes digitales. El dispositivo puede usar una combinación de luz blanca, fluorescencia tisular y formación de imágenes de reflectancia, y puede proporcionar formación de imágenes de heridas en tiempo real, evaluación, registro/documentación, supervisión y/o administración del cuidado. El dispositivo puede manual, compacto y/o ligero. Este dispositivo y este método pueden ser adecuados para la supervisión de heridas en humanos y animales.

Otros usos para el dispositivo pueden incluir:

- Formación de imágenes basadas clínicamente y en la investigación de animales pequeños y grandes (p. ej., veterinaria).
- Detección y supervisión de la contaminación (p. ej., contaminación bacteriana) en la preparación de productos alimenticios/animales en las industrias cárnicas, avícolas, lácteas, pesqueras, agrícolas.
- Detección de "contaminación de la superficie" (p. ej., contaminación bacteriana o biológica) en entornos públicos (p. ej., atención médica) y privados.
- Formación de imágenes multispectrales y detección de cánceres en pacientes humanos y/o veterinarios.
- Como herramienta de investigación para la formación de imágenes multispectrales y la supervisión de cánceres en modelos animales experimentales de enfermedades humanas (p. ej., heridas y cánceres).
- Detección forense, por ejemplo, huellas dactilares latentes y líquidos biológicos en superficies no biológicas.
- Formación de imágenes y supervisión de placas dentales, excipientes y cánceres en la cavidad bucal.
- Dispositivo de formación de imágenes y supervisión en laboratorios microbiológicos clínicos.
- Pruebas antibacterianas (p. ej., antibióticos), agentes desinfectantes.

El dispositivo comprende generalmente una fuente de luz para emitir luz para iluminar la diana, incluyendo la luz emitida al menos una longitud de onda o banda de longitud de onda que provoca la fluorescencia de al menos un biomarcador asociado con una diana; un portafiltros óptico configurado para alojar uno o más filtros ópticos; un suministro eléctrico; un dispositivo de adquisición de imágenes digitales que tiene un objetivo y está configurado

para adquirir una imagen de la diana por fluorescencia, en donde el dispositivo de adquisición de imágenes digitales es una cámara digital, una grabadora de vídeo, una videocámara, un teléfono móvil con una cámara digital incorporada, un teléfono inteligente con una cámara digital o un asistente digital personal o una cámara web, y comprende una pantalla de visualización (por ejemplo, una pantalla táctil), y una carcasa que alberga todos los componentes del dispositivo en una entidad y comprende un medio de fijación del dispositivo de adquisición de imágenes digitales en la carcasa, en donde la carcasa está configurada para ser manual, compacta y portátil. El dispositivo también puede tener: un puerto/módulo de transferencia de datos alámbricos y/o inalámbricos, una fuente de energía eléctrica e interruptores de potencia/control, y/o una empuñadura. Las fuentes de luz de excitación/iluminación pueden ser matrices de LED que emiten luz a aproximadamente 405 nm (p. ej., ± 5 nm), y se pueden acoplar con filtros adicionales de paso de banda centrados en aproximadamente 405 nm para eliminar/minimizar las bandas espectrales laterales de la luz de salida de la matriz de LED para no causar fugas de luz en el detector de formación de imágenes con sus propios filtros ópticos. El dispositivo detector de formación de imágenes digitales puede ser una cámara digital, por ejemplo, con al menos una sensibilidad ISO800, pero más preferentemente una sensibilidad ISO3200, y puede combinarse con uno o más filtros ópticos de emisión u otros mecanismos de filtrado espectral mecanizado igualmente efectivos (p. ej., miniaturizado) (p. ej., filtro sintonizable acústico-óptico o filtro sintonizable de cristal líquido). El dispositivo detector de formación de imágenes digitales puede tener una visualización y/o pantalla de control táctil, captura de imágenes y controles de zoom. La caja protectora puede ser una cubierta exterior de plástico duro o polímero, que contiene en su interior el dispositivo detector de formación de imágenes digitales, con botones de tal manera que el usuario puede tener acceso a todos los controles necesarios del dispositivo y manipularlos fácilmente. En el dispositivo se pueden insertar disipadores térmicos en miniatura o pequeños ventiladores mecánicos, u otros dispositivos de disipación térmica para permitir que se elimine el exceso de calor de las fuentes de luz de excitación, si es necesario. El dispositivo completo, incluidos todos sus accesorios y piezas accesorias integrados, se puede alimentar con energía eléctrica de CA/CC convencional y/o con un paquete de baterías recargables. El dispositivo completo también se puede fijar o montar a un aparato mecánico externo (p. ej., un trípode o un soporte móvil con un brazo giratorio) que permita la movilidad del dispositivo en una sala clínica con el funcionamiento del dispositivo con manos libres. Alternativamente, el dispositivo puede estar provisto de un marco móvil tal que sea portátil. El dispositivo se puede limpiar con una gasa húmeda mojada en agua, mientras que el mango se puede limpiar con una gasa húmeda mojada en alcohol. El dispositivo puede incluir un software que permita a un usuario controlar el dispositivo, incluido el control de los parámetros de formación de imágenes, la visualización de imágenes, el almacenamiento de datos de imágenes e información de usuarios, la transferencia de imágenes y/o datos asociados, y/o el análisis de imágenes relevantes (p. ej., algoritmos de diagnóstico).

Un diagrama esquemático de un ejemplo del dispositivo se muestra en la Figura 1. El dispositivo se muestra colocado para visualizar un objeto diana 10 o superficie diana. En el ejemplo que se muestra, el dispositivo tiene un dispositivo de adquisición de imágenes digitales 1, tal como una cámara digital, grabadora de video, videocámara, teléfono móvil con cámara digital incorporada, un teléfono "inteligente" con cámara digital, asistente digital personal (PDA), ordenador portátil/PC con una cámara digital o una cámara web. El dispositivo de adquisición de imágenes digitales 1 tiene un objetivo 2, que puede alinearse para apuntar al objeto diana 10 y puede detectar la señal óptica que emana del objeto 10 o la superficie. El dispositivo tiene un soporte de filtro óptico 3 que puede alojar uno o más filtros ópticos 4. Cada filtro óptico 4 puede tener diferentes anchos de banda espectral y pueden ser filtros de paso de banda. Estos filtros ópticos 4 pueden seleccionarse y moverse desde el objetivo de la cámara digital para detectar selectivamente señales ópticas específicas basadas en la longitud de onda de la luz. El dispositivo puede incluir fuentes de luz 5 que producen luz de excitación para iluminar el objeto 10 con el fin de obtener una señal óptica (p. ej., fluorescencia) para obtener imágenes, por ejemplo, con luz azul (p. ej., 400-450 nm), o cualquier otra combinación de longitudes de onda simples o múltiples (p. ej., longitudes de onda en los intervalos ultravioleta/visible/infrarrojo cercano/infrarrojo). La fuente de luz 5 puede comprender una matriz de LED, diodo láser y/o luces filtradas dispuestas en una variedad de geometrías. El dispositivo puede incluir un método o aparato 6 (p. ej., un disipador térmico o un ventilador de enfriamiento) para disipar el calor y enfriar las fuentes de luz de iluminación 5. El dispositivo puede incluir un método o aparato 7 (p. ej., un filtro de paso de banda óptica) para eliminar cualquier longitud de onda de luz indeseable de las fuentes de luz 5 usadas para iluminar el objeto 10 que se está representando por imágenes. El dispositivo puede incluir un método o aparato 8 para usar un medio óptico (p. ej., el uso de diodos láser en miniatura compactos que emiten un haz de luz colimado) para medir y determinar la distancia entre el dispositivo de formación de imágenes y el objeto 10. Por ejemplo, el dispositivo puede usar dos fuentes de luz, tal como dos diodos láser, como parte de un aparato de triangulación para mantener una distancia constante entre el dispositivo y el objeto 10. Otras fuentes de luz pueden ser posibles. El dispositivo también puede usar ultrasonidos, o una medida física, como una regla, para determinar una distancia constante a mantener. El dispositivo también puede incluir un método o aparato 9 (p. ej., un pivote) para permitir la manipulación y orientación de las fuentes de luz de excitación 5, 8 para maniobrar estas fuentes 5, 8 para cambiar el ángulo de iluminación de la luz que incide sobre el objeto 10 para distancias variables.

El objeto diana 10 puede marcarse con una marca 11 para permitir que se tomen varias imágenes del objeto y luego se registren conjuntamente para su análisis. La marca 11 puede implicar, por ejemplo, el uso de tintes de fluorescencia exógenos de diferentes colores que pueden producir múltiples señales ópticas distintas cuando son iluminadas por las fuentes de luz 5 y ser detectables en la imagen del objeto 10 y por lo tanto pueden permitir la orientación de múltiples imágenes (p. ej., tomadas con el tiempo) de la misma región de interés al registrar

conjuntamente los diferentes colores y las distancias entre ellos. El dispositivo de adquisición de imágenes digitales 1 puede incluir uno o más de: una interfaz 12 para un casco visor; una interfaz 13 para una impresora externa; una interfaz 14 para una tableta, un ordenador portátil, un ordenador de sobremesa u otro dispositivo informático; una interfaz 15 para que el dispositivo permita la transferencia alámbrica o inalámbrica de datos de imágenes a un sitio remoto u otro dispositivo; una interfaz 16 para un dispositivo de sistema de posicionamiento global (GPS); una interfaz 17 para un dispositivo que permite el uso de memoria adicional; y una interfaz 18 para un micrófono.

El dispositivo puede incluir un suministro eléctrico 19 tal como un suministro eléctrico de CA/CC, un banco de baterías compacto o un paquete de baterías recargables. Alternativamente, el dispositivo puede adaptarse para conectarse a un suministro eléctrico externo. El dispositivo tiene una carcasa 20 que alberga todos los componentes en una entidad. La carcasa 20 puede estar equipada con un medio para asegurar cualquier dispositivo de imagen digital dentro de la misma. La carcasa 20 puede estar diseñada para ser manual, compacta y/o portátil. La carcasa 20 puede tener una o más cajas protectoras.

Con referencia aún a la Figura 1, b) muestra un ejemplo del dispositivo en una instalación típica de cuidado de heridas. a) muestra una instalación clínica típica para el cuidado de heridas, que muestra el sillón para examen y la mesa de accesorios. b-c) se muestra un ejemplo del dispositivo en su contenedor de capa endurecida. El dispositivo puede integrarse en la práctica habitual del cuidado de heridas, lo que permite obtener imágenes del paciente en tiempo real. d) se muestra un ejemplo del dispositivo (flecha) colocado en el "carrito de cuidado de heridas" para ilustrar el tamaño del dispositivo. e) el dispositivo se puede usar para obtener imágenes con iluminación de luz blanca, mientras que f) muestra el dispositivo que se está usando para tomar imágenes de fluorescencia de una herida bajo luces tenues. g) el dispositivo se puede usar en infraestructuras de telemedicina/telesalud, por ejemplo, las imágenes de fluorescencia de las heridas de un paciente se pueden enviar por correo electrónico a un especialista en cuidado de heridas a través de un dispositivo de comunicación inalámbrica, como un teléfono inteligente en otro hospital, mediante una conexión inalámbrica/WiFi a Internet. Usando este dispositivo, se pueden enviar imágenes de fluorescencia de alta resolución como archivos adjuntos de correo electrónico a especialistas en cuidado de heridas desde sitios remotos para el cuidado de heridas para consultas inmediatas con expertos clínicos, microbiólogos, etc. en centros especializados de atención y tratamiento de heridas clínicas.

Ejemplos

A continuación se describe un ejemplo de un dispositivo para supervisión por fluorescencia. Todos los ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y no tienen por objeto ser limitativos. Los parámetros tales como longitudes de onda, dimensiones y tiempo de incubación descritos en los ejemplos pueden ser aproximados y se proporcionan solo como ejemplos.

En este ejemplo, los dispositivos usan dos matrices de LED de luz azul/violeta (p. ej., emisión de 405 nm \pm 10 nm, espectro de emisión estrecho) (Opto Diode Corporation, Newbury Park, California), cada una situada a ambos lados del montaje del detector de formación de imágenes como fuentes de luz de excitación o iluminación. Estas matrices tienen una potencia de salida de aproximadamente 1 vatio cada una, que emana de 2,5 x 2,5 cm², con un ángulo de haz de luz de 70 grados. Las matrices de LED pueden usarse para iluminar la superficie del tejido desde una distancia de aproximadamente 10 cm, lo que significa que la densidad de potencia óptica total en la superficie de la piel es de aproximadamente 0,08 W/cm². A tan bajas potencias, no se conocen daños potenciales ni en la herida diana ni en la superficie de la piel, ni en los ojos provocados por la luz de excitación. Sin embargo, puede que no sea aconsejable apuntar la luz directamente a los ojos de cualquier persona durante los procedimientos de formación de imágenes. También se debe tener en cuenta que la luz de 405 nm no representa un riesgo para la salud de acuerdo con las normas internacionales formuladas por la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC), como se detalla en la página web: http://www.iec.ch/online_news/etech/arch_2006/etech_0906/focus.htm.

La una o más fuentes de luz pueden articularse (p. ej., manualmente) para variar el ángulo de iluminación y el tamaño del punto en la superficie de la imagen, por ejemplo, usando un pivote incorporado, y se alimentan, por ejemplo, a través de una conexión eléctrica a una toma eléctrica y/o a un conjunto de baterías recargables portátiles separadas. La luz de excitación/iluminación puede ser producida por fuentes que incluyen, entre otros, diodos emisores de luz (LED) individuales o múltiples en cualquier disposición, incluidos los formatos de anillo o matriz, las bombillas con luz filtrada de longitud de onda o los láseres. También se pueden usar fuentes de luz de excitación/iluminación individuales y múltiples seleccionadas con características de longitud de onda específicas en los intervalos ultravioleta (UV), visible (VIS), infrarrojo lejano, infrarrojo cercano (NIR) e infrarrojo (IR), y pueden estar compuestos por una matriz de LED, LED orgánico, diodo láser o luces filtradas dispuestas en una variedad de geometrías. Las fuentes de luz de excitación/iluminación se pueden "sintonizar" para permitir que la intensidad de la luz que emana del dispositivo se ajuste mientras se forman imágenes. La intensidad de la luz puede ser variable. Las matrices de LED pueden fijarse a ventiladores de enfriamiento individuales o disipadores térmicos para disipar el calor producido durante su funcionamiento. Las matrices de LED pueden emitir una luz estrecha de 405 nm, que puede filtrarse espectralmente usando un filtro de paso de banda disponible en el mercado (Chroma Technology Corp, Rockingham, VT, EE. UU.) para reducir la "fuga" potencial de la luz emitida a la óptica del detector. Cuando el dispositivo se sostiene sobre una superficie de tejido (p. ej., una herida) para obtener imágenes, las fuentes de luz que iluminan pueden hacer brillar una longitud de onda de ancho de banda o de ancho de banda amplio violeta/azul

u otra longitud de onda o banda de longitud de onda de luz sobre la superficie del tejido/herida produciendo así un campo plano y homogéneo en la región de interés. La luz también puede iluminar o excitar el tejido hasta una cierta profundidad superficial. Esta luz de excitación/iluminación interactúa con los tejidos normales y enfermos y puede causar que se genere una señal óptica (p. ej., absorción, fluorescencia y/o reflectancia) en el tejido.

Al cambiar las longitudes de onda de excitación y emisión en consecuencia, el dispositivo de formación de imágenes puede interrogar los componentes del tejido (p. ej., tejidos conectivos y bacterias en una herida) en la superficie y en ciertas profundidades en el tejido (p. ej., una herida). Por ejemplo, al cambiar de una luz de longitud de onda violeta/azul (400-500 nm) a verde (500-540 nm), se puede lograr la excitación de fuentes fluorescentes de tejidos/bacterias más profundas, por ejemplo en una herida. De manera similar, al detectar longitudes de onda más largas, la emisión de fluorescencia de fuentes tisulares y/o bacterianas más profundas en el tejido puede detectarse en la superficie del tejido. Para la evaluación de heridas, la capacidad de interrogar la fluorescencia de la superficie y/o la subsuperficie puede ser útil, por ejemplo, en la detección y posible identificación de contaminación bacteriana, colonización, colonización crítica y/o infección, que puede ocurrir en la superficie y con frecuencia en profundidad en una herida (p. ej., en heridas crónicas que no cicatrizan). En un ejemplo, con referencia a la Figura 6, c) se muestra la detección de bacterias bajo la superficie de la piel (es decir, en profundidad) después de la limpieza de la herida. Este uso del dispositivo para detectar bacterias en la superficie y en profundidad en una herida y en el tejido circundante puede evaluarse en el contexto de otros signos y síntomas clínicos usados convencionalmente en centros de atención de heridas.

Realizaciones a modo de ejemplo del dispositivo se muestran en la Figura 2. El dispositivo se puede usar con cualquier dispositivo convencional de formación de imágenes digitales compactas (p. ej., un dispositivo de carga acoplada (CCD) o sensores complementarios semiconductores de metal-óxido (CMOS)) como dispositivos de adquisición de imágenes. El dispositivo a modo de ejemplo que se muestra en a) tiene una fuente de suministro eléctrico externo, las dos matrices de LED para iluminar el objeto/superficie a fotografiar, y una cámara digital disponible comercialmente firmemente fijada a un marco de metal liviano equipado con un práctico mango para la formación de imágenes. Un filtro multibanda se mantiene delante de la cámara digital para permitir el filtrado de longitud de onda de la señal óptica detectada que emana del objeto/superficie que se está fotografiando. Los cables de salida de video/USB de la cámara permiten la transferencia de datos de imágenes a un ordenador para su almacenamiento y posterior análisis. Este ejemplo usa una cámara digital Sony de 8.1 megapíxeles disponible en el mercado (cámara digital Sony Cybershot DSC-T200, Sony Corporation, América del Norte). Esta cámara puede ser adecuada debido a i) su diseño vertical delgado que se puede integrar fácilmente en el marco de la caja protectora, ii) su gran pantalla táctil LCD de pantalla ancha de 3,5 pulgadas para facilitar el control, iii) su objetivo de zoom óptico Carl Zeiss 5x y iv) su uso con poca luz (p. ej., ISO 3200). El dispositivo puede tener un flash incorporado que permite obtener imágenes convencional de luz blanca (p. ej., imágenes fijas de alta definición o video con salida de grabación de sonido). Los puertos de interfaz de la cámara pueden admitir la transferencia de datos alámbrica (p. ej., USB) o inalámbrica (p. ej., Bluetooth, WiFi y modalidades similares) o módulos adicionales de terceros a una variedad de dispositivos externos, tal como: casco visor, una impresora externa, una tableta, un ordenador portátil, un ordenador personal de sobremesa, un dispositivo inalámbrico para permitir la transferencia de datos de imágenes a un sitio remoto/otro dispositivo, un dispositivo con sistema de posicionamiento global (GPS), un dispositivo que permite el uso de memoria extra, y un micrófono. La cámara digital funciona con baterías recargables o con alimentación de CA/CC. El dispositivo de formación de imágenes digitales puede incluir, entre otros, cámaras digitales, cámaras web, cámaras SLR digitales, videocámaras/grabadoras de video, teléfonos móviles con cámaras digitales integradas, Smartphones™, asistentes digitales personales (PDA) y ordenadores portátiles/tabletas, u ordenadores de sobremesa personales, todas las cuales contienen/o están conectados a un detector/sensor de imágenes digitales.

Esta señal de luz producida por las fuentes de luz de excitación/iluminación puede ser detectada por el dispositivo de formación de imágenes usando filtros ópticos (p. ej., los disponibles en Chroma Technology Corp, Rockingham, VT, EE. UU.) que rechazan la luz de excitación pero permiten detectar las longitudes de onda seleccionadas de la luz emitida desde el tejido, formando así una imagen en la pantalla. Hay un soporte del filtro óptico fijado al marco de la caja protectora delante del objetivo de la cámara digital que puede acomodar uno o más filtros ópticos con diferentes anchos de banda espectral discreta, como se muestra en b) y c) de la Figura 2. b) muestra el dispositivo con las matrices de LED encendidas para emitir una luz violeta/azul brillante, con un filtro de emisión único en su lugar. c) muestra el dispositivo usando un soporte de filtro óptico múltiple usado para seleccionar el filtro apropiado para la formación de imágenes específicas de la longitud de onda deseada, d) muestra el dispositivo que se sostiene con una mano mientras se toman imágenes de la superficie cutánea de un pie.

Estos filtros de paso de banda pueden seleccionarse y alinearse frente al objetivo de la cámara digital para detectar de manera selectiva señales ópticas específicas de la superficie del tejido/herida en función de la longitud de onda de la luz deseada. El filtrado espectral de la señal óptica detectada (p. ej., absorción, fluorescencia, reflectancia) también se puede lograr, por ejemplo, usando un filtro sintonizable de cristal líquido (LCTF), o un filtro sintonizable acústico-óptico (AOTF) que es un filtro de paso de banda espectral sintonizable electrónicamente en estado sólido. El filtrado espectral también puede implicar el uso de filtros variables continuos y/o filtros ópticos de paso de banda manual. Estos dispositivos pueden colocarse frente al detector de formación de imágenes para producir imágenes multispectrales, hiperespectrales y/o longitudes de onda selectivas de tejidos.

El dispositivo puede modificarse usando filtros de polarización ópticos o de orientación variable (p. ej., lineal o circular combinados con el uso de placas de ondas ópticas) fijados de manera razonable a las fuentes de luz de excitación/iluminación y al dispositivo detector de formación de imágenes. De esta manera, el dispositivo se puede
 5 usar para obtener imágenes de la superficie del tejido con iluminación de luz polarizada y detección de luz no polarizada o viceversa, o iluminación de luz polarizada y detección de luz polarizada, ya sea con reflectancia de luz blanca y/o imágenes de fluorescencia. Esto puede permitir obtener imágenes de heridas con reflexiones especulares minimizados (p. ej., reflejos de imágenes de luz blanca), así como permitir imágenes de polarización de fluorescencia y/o cambios dependientes de la anisotropía en tejidos conectivos (p. ej., colágenos y elastina) en la
 10 herida y en tejidos normales circundantes. Esto puede proporcionar información útil sobre la orientación espacial y la organización de las fibras del tejido conectivo asociadas con el remodelado de la herida durante la curación [Yasui *et al.*, (2004) Appl. Optar. 43: 2861-2867].

Todos los componentes del dispositivo de formación de imágenes pueden integrarse en una estructura única, como una estructura cerrada diseñada ergonómicamente con un mango, lo que permite que se sostenga cómodamente con una o ambas manos. El dispositivo también se puede proporcionar sin ningún mango. El dispositivo es liviano, portátil y permite imágenes digitales en tiempo real (p. ej., imágenes fijas y/o en vídeo) de cualquier superficie diana (por ejemplo, la piel y/o la cavidad bucal, que también es accesible) usando luz blanca, modos de imagen de fluorescencia y/o reflectancia. El dispositivo se puede escanear a través de la superficie corporal para obtener
 20 imágenes al sostenerlo a distancias variables de la superficie, y se puede usar en un ambiente/habitación iluminado para obtener una imagen de reflectancia/fluorescencia de luz blanca. El dispositivo se puede usar en un ambiente/habitación sombrío u oscuro para optimizar las señales de fluorescencia del tejido y minimizar las señales de fondo de las luces de la habitación. El dispositivo se puede usar para la visualización directa (p. ej., a simple vista) o indirecta (p. ej., a través de la pantalla de visualización del dispositivo de imagen digital) de las heridas y los
 25 tejidos normales circundantes.

Según los ejemplos no abarcados por la invención reivindicada, el dispositivo también puede incorporarse al no ser manual o portátil, por ejemplo, al estar fijado a un mecanismo de montaje (p. ej., un trípode o soporte) para usar como un dispositivo óptico de imagen relativamente estacionario para imágenes de luz blanca, fluorescencia y reflectancia de objetos, materiales y superficies (p. ej., un cuerpo). Esto puede permitir que el dispositivo se use en
 30 un escritorio o mesa o para imágenes de "línea de montaje" de objetos, materiales y superficies. En algunas realizaciones, el mecanismo de montaje puede ser móvil.

Otras características de este dispositivo pueden incluir la capacidad de grabación de video e imagen digital, posiblemente con audio, métodos de documentación (p. ej., con almacenamiento de imágenes y software de análisis) y transmisión de datos alámbrica o inalámbrica para necesidades de telemedicina/E-salud remotas. Por ejemplo, e) y f) de la Figura 2 muestran una realización del dispositivo en el que el dispositivo de adquisición de imágenes es un dispositivo de comunicación móvil tal como un teléfono móvil. El teléfono móvil usado en este
 40 ejemplo es un Samsung Modelo A-900, que está equipado con una cámara digital de 1.3 megapíxeles. El teléfono está instalado en el marco de soporte para obtener imágenes convenientes. e) muestra el uso del dispositivo para obtener imágenes de una hoja de papel con tinta fluorescente que muestra la palabra "Herida", f) muestra imágenes de los dedos teñidos con tinta fluorescente y detección de las bacterias comunes de la piel *P. Acnes*. Las imágenes del teléfono móvil pueden enviarse de forma inalámbrica a otro teléfono móvil o de manera inalámbrica (p. ej., a través de la conectividad Bluetooth) a un ordenador personal para el almacenamiento y análisis de imágenes. Esto
 45 demuestra la capacidad del dispositivo para realizar imágenes de fluorescencia manual en tiempo real y la transmisión inalámbrica a un sitio/persona remotos como parte de una infraestructura de cuidado de heridas de telemedicina/E-salud.

A fin de demostrar las capacidades del dispositivo de imágenes en el cuidado de heridas y otras aplicaciones relevantes, se llevaron a cabo varios experimentos de factibilidad usando el ejemplo particular descrito. Cabe señalar que durante todos los experimentos de imágenes de fluorescencia, la cámara Sony (Cámara digital Sony Cybershot DSC-T200, Sony Corporation, Norteamérica) se configuró de manera que las imágenes se capturaron sin flash, y con el modo de imagen "Macro" establecido. Las imágenes fueron capturadas a 8 megapíxeles. El flash se usó para capturar imágenes de reflectancia de luz blanca. Todas las imágenes se almacenaron en la tarjeta de
 50 memoria xD para su posterior transferencia a un ordenador personal para el almacenamiento a largo plazo y el análisis de imágenes.

Todas las imágenes/películas de reflectancia de luz blanca y fluorescencia capturadas con el dispositivo se importaron a Adobe Photoshop para el análisis de imágenes. Sin embargo, el software de análisis de imágenes se diseñó usando MatLab™ (Mathworks) para permitir que se usen una variedad de algoritmos espectrales basados en
 60 imágenes (p. ej., relaciones de fluorescencia de rojo a verde, etc.) para extraer datos de imágenes pertinentes (p. ej., datos espaciales y espectrales) para detección cuantitativa/valor diagnóstico. El post-procesamiento de imágenes también incluía la manipulación matemática de las imágenes.

65 Formación de imágenes de muestras bacteriológicas

El dispositivo de formación de imágenes puede ser útil para formación de imágenes y/o supervisión en laboratorios de microbiología clínica. El dispositivo se puede usar para obtener imágenes cuantitativas de colonias bacterianas y cuantificar el crecimiento de colonias en ensayos microbiológicos comunes. Las imágenes de fluorescencia de las colonias bacterianas se pueden usar para determinar la cinética del crecimiento. El software puede usarse para proporcionar un recuento automático de colonias bacterianas.

Para demostrar la utilidad del dispositivo en un laboratorio de bacteriología/cultivo, se cultivaron cultivos bacterianos vivos en placas de agar de sangre de oveja. Las especies bacterianas incluyen *streptococcus pyogenes*, *serratia marcescens*, *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa* (American Type Culture Collection, ATCC). Estos se cultivaron y se mantuvieron en condiciones de incubación convencionales a 37 °C y se usaron para la experimentación durante la "fase de crecimiento exponencial". Una vez que se detectaron colonias en las placas (aproximadamente 24 h después de la inoculación), el dispositivo se usó para obtener imágenes de las placas de agar que contenían especies bacterianas individuales en una habitación oscura. Usando luz de excitación violeta/azul (aproximadamente 405 nm), el dispositivo se usó para obtener imágenes de autofluorescencia verde y roja combinadas (aproximadamente 490-550 nm y aproximadamente 610-640 nm de emisión) y solo autofluorescencia roja (aproximadamente 635 +/- 10 nm, la longitud de onda de emisión máxima para porfirinas endógenas fluorescentes) de cada placa de agar. Se tomaron imágenes de fluorescencia de cada especie bacteriana a lo largo del tiempo para comparar y supervisar el crecimiento de colonias.

Ahora se hace referencia a la Figura 3. a) muestra el dispositivo que se usa para obtener imágenes de cultivos bacterianos vivos que crecen en placas de agar de sangre de oveja para detectar la autofluorescencia bacteriana. b) muestra la imagen de autofluorescencia emitida por *pseudomonas aeruginosa*. El dispositivo también se puede usar para detectar, cuantificar y/o supervisar el crecimiento de colonias bacterianas a lo largo del tiempo usando fluorescencia, como se demuestra en c) con imágenes de fluorescencia del crecimiento del *staphylococcus aureus* autofluorescente en una placa de agar 24 horas después de la inoculación. Note la presencia de colonias bacterianas individuales distintas en la imagen inferior. Usando luz de excitación violeta/azul (p. ej., 405 nm), el dispositivo se usó para detectar tanto autofluorescencia de emisión verde combinado como rojo (p. ej., 490-550 nm + 610-640 nm) y solo rojo (p. ej., 635 +/- 10 nm, la longitud de onda de emisión máxima para las porfirinas endógenas fluorescentes) de varias especies bacterianas vivas, incluido el *streptococcus pyogenes*, que se muestra en d); *serratia marcescens*, que se muestra en e); *staphylococcus aureus*, mostrado en f); *staphylococcus epidermidis*, mostrado en g); *escherichia coli*, que se muestra en h); y *pseudomonas aeruginosa*, que se muestra en i). Tenga en cuenta que las imágenes de autofluorescencia obtenidas por el dispositivo de las colonias bacterianas pueden proporcionar un contraste de imagen útil para mediciones cuantitativas longitudinales simples de la colonización bacteriana y la cinética de crecimiento, así como un medio de supervisar potencialmente la respuesta a la intervención terapéutica, con antibióticos, terapia fotodinámica (PDT), terapia de luz de bajo nivel, oxigenoterapia hiperbárica (HOT) o productos avanzados para el cuidado de heridas, como ejemplos.

La alta resolución espacial del detector de la cámara combinada con una significativa imagen de señal a ruido de autofluorescencia bacteriana con el dispositivo permitió la detección de colonias muy pequeñas (p. ej., <1 mm de diámetro). El dispositivo proporcionó un medio sensible y portátil para obtener imágenes de colonias bacterianas individuales que crecen en placas de agar convencional. Esto proporcionó un medio para cuantificar y supervisar la cinética del crecimiento de colonias bacterianas, como se aprecia en c), así como supervisar potencialmente la respuesta a la intervención terapéutica, con antibióticos o terapia fotodinámica (PDT) como ejemplos, con el tiempo usando fluorescencia. Por lo tanto, el dispositivo puede servir como una herramienta útil en el laboratorio de microbiología.

La Figura 3J muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes en a) la práctica convencional de laboratorio de bacteriología, b) en este caso, la imagen de fluorescencia de una placa de Petri que contiene *Staphylococcus aureus* combinada con un software de análisis de imagen exclusivo permite que las colonias bacterianas se cuenten rápidamente, y en este caso la imagen de fluorescencia de la placa de cultivo muestra ~182 (+/- 3) colonias (manchas verdes azuladas brillantes) que crecen en agar a 37 °C (excitación de aproximadamente 405 nm, emisión de aproximadamente 500-550 nm (verde), emisión de aproximadamente >600 nm (rojo)).

Además de proporcionar detección de cepas bacterianas, el dispositivo puede usarse para diferenciar la presencia y/o ubicación de diferentes cepas bacterianas (p. ej., *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*), por ejemplo en heridas y tejidos circundantes. Esto puede basarse en los diferentes distintivos de emisión de autofluorescencia de diferentes cepas bacterianas, incluidas las de las bandas de longitudes de onda de emisión a 490-550 nm y 610-640 nm cuando son excitadas por la luz violeta/azul, tal como la luz alrededor de 405 nm. Se pueden usar otras combinaciones de longitudes de onda para distinguir entre otras especies en las imágenes. Esta información se puede usar para seleccionar el tratamiento apropiado, como la elección del antibiótico.

Dicha formación de imágenes de muestras de bacteriología puede ser aplicable a la supervisión del cuidado de heridas.

Uso en supervisión de curación de heridas

El dispositivo se puede escanear por encima de cualquier herida (p. ej., en la superficie del cuerpo) de manera que la luz de excitación pueda iluminar el área de la herida. Luego, la herida se puede inspeccionar usando el dispositivo, de manera que el operador pueda ver la herida en tiempo real, por ejemplo, a través de un visor en el dispositivo de imágenes o a través de un dispositivo de visualización externo (p. ej., una imagen vertical, una pantalla de televisión, un monitor de ordenador, un proyector LCD o un casco visor). También puede ser posible transmitir las imágenes obtenidas desde el dispositivo en tiempo real (p. ej., a través de una comunicación inalámbrica) a un sitio de visualización remota, por ejemplo con fines de telemedicina, o enviar las imágenes directamente a una impresora o almacenamiento de memoria de ordenador. La imagen se puede realizar dentro de la evaluación clínica rutinaria del paciente con una herida.

Antes de obtener imágenes, los marcadores fiduciales (p. ej., usando una pluma de tinta fluorescente indeleble) se pueden colocar en la superficie de la piel cerca de los bordes o el perímetro de la herida. Por ejemplo, cuatro puntos, cada uno de un color de tinta fluorescente diferente de plumas de tinta fluorescente indeleble separadas, que pueden proporcionarse como un kit al operador clínico, pueden colocarse cerca del margen o límite de la herida en la superficie de la piel normal. El dispositivo puede obtener imágenes de estos colores usando la luz de excitación y un filtro de banda multispectral que coincide con la longitud de onda de emisión de los cuatro puntos de tinta. Luego se puede realizar un análisis de la imagen, mediante el registro conjunto de los marcadores fiduciales para la alineación entre imágenes. Por ende, es posible que el usuario no tenga que alinear el dispositivo de formación de imágenes entre diferentes sesiones de imágenes. Esta técnica puede facilitar la obtención de imágenes longitudinales (es decir, a lo largo del tiempo) de las heridas, y el operador clínico, por lo tanto, puede obtener imágenes de una herida a lo largo del tiempo sin necesidad de alinear el dispositivo de formación de imágenes durante cada adquisición de imágenes.

Además, para ayudar a calibrar la intensidad de las imágenes de fluorescencia, se puede colocar una "tira" convencional de fluorescencia simple desechable en el campo de visión durante la obtención de imágenes de la herida (p. ej., usando un adhesivo suave que pega la tira a la piel temporalmente). La tira puede estar impregnada con uno o varios tintes fluorescentes diferentes de concentraciones variables que pueden producir intensidades de fluorescencia predeterminadas y calibradas cuando están iluminadas por la fuente de luz de excitación, que puede tener longitudes de onda o bandas de longitudes de onda de emisión de fluorescencia única (p. ej., 405 nm) o múltiple para calibración de intensidad de imagen. La tira desechable también puede tener los cuatro puntos como se ha descrito anteriormente (p. ej., cada uno de diámetros o tamaños diferentes y cada uno de un color de tinta fluorescente diferente con un único punto negro colocado al lado) de plumas de tinta fluorescente indeleble separados. Con la tira colocada cerca del margen o límite de la herida en la superficie normal de la piel, el dispositivo se puede usar para tomar imágenes de luz blanca y fluorescencia. La tira puede ofrecer una forma conveniente de tomar múltiples imágenes a lo largo del tiempo de una herida determinada y luego alinear las imágenes mediante el análisis de imágenes. Asimismo, la tira de "calibración de intensidad" fluorescente también puede contener un aparato de medición lineal adicional, como una regla de longitud fija para ayudar en las mediciones de distancia espacial de las heridas. Dicha tira puede ser un ejemplo de una diana de calibración que puede usarse con el dispositivo para ayudar a calibrar o medir parámetros de imagen (p. ej., tamaño de la herida, intensidad de fluorescencia, etc.), y se puede usar otra diana de calibración similar.

Puede ser deseable aumentar la consistencia de los resultados de la imagen y reproducir la distancia entre el dispositivo y la superficie de la herida, ya que la intensidad de la fluorescencia del tejido puede variar ligeramente si la distancia cambia durante las sesiones de imagen múltiples. Por lo tanto, en una realización, el dispositivo puede tener dos fuentes de luz, como rayos láser de baja potencia, que se pueden usar para triangular rayos individuales sobre la superficie de la piel para determinar una distancia fija o variable entre el dispositivo y la superficie de la herida. Esto se puede hacer usando una disposición geométrica simple entre las fuentes de luz láser, y puede permitir que el operador clínico visualice fácilmente los puntos láser en la superficie de la piel y ajuste la distancia del dispositivo a la herida durante varias sesiones de imágenes. Otros métodos para mantener una distancia constante pueden incluir el uso de ultrasonidos, o el uso de una medida física, tal como una regla.

Uso en formación de imágenes de luz blanca

El dispositivo se puede usar para tomar imágenes en luz blanca de la herida total con tejidos normales circundantes normales usando un aparato de medición (p. ej., una regla) colocado dentro del campo de visión de la imagen. Esto puede permitir una evaluación visual de la herida y el cálculo/determinación de parámetros cuantitativos como el área, la circunferencia, el diámetro y el perfil topográfico de la herida. La curación de la herida puede evaluarse mediante mediciones planimétricas del área de la herida en múltiples momentos (p. ej., en visitas clínicas) hasta la curación de la herida. La duración de la curación de la herida se puede comparar con el tiempo de cicatrización esperado calculado mediante las mediciones de momentos múltiples de la reducción del radio de la herida usando la ecuación $R = \sqrt{A/\pi}$ (R , radio; A , área de herida planimétrica; π constante 3.14). Esta información cuantitativa sobre la herida se puede usar para rastrear y supervisar los cambios en el aspecto de la herida con el tiempo, a fin de evaluar y determinar el grado de curación de la herida causada por medios naturales o por cualquier intervención terapéutica. Estos datos pueden almacenarse electrónicamente en el expediente médico del paciente para futuras referencias. El operador puede realizar imágenes de luz blanca durante la evaluación clínica inicial del paciente.

Uso en formación de imágenes de autofluorescencia

El dispositivo puede estar diseñado para detectar la totalidad o una mayoría de autofluorescencia (AF). Por ejemplo, usando un filtro de banda multispectral, el dispositivo puede obtener imágenes de autofluorescencia tisular que emana de las siguientes biomoléculas tisulares, así como la absorción óptica asociada a la sangre, por ejemplo, bajo excitación de 405 nm: colágeno (tipos I, II, III, IV, V y otros) que tienen un color verde, elastina que tiene un color amarillo verdoso-naranja, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), flavina adenina dinucleótido (FAD), que emiten una señal de autofluorescencia azul-verde y bacterias/microorganismos, la mayoría de los cuales parecen que tienen una amplia emisión de autofluorescencia (p. ej., verde y roja).

El análisis de la imagen puede incluir el cálculo de una relación de AF de rojo a verde en la imagen. Los cálculos de intensidad pueden obtenerse a partir de regiones de interés en las imágenes de la herida. Las imágenes de pseudo-color se pueden mapear en las imágenes de luz blanca de la herida.

Ejemplos en la curación de heridas

Ahora se hace referencia a la Figura 4. El dispositivo fue probado en un modelo de heridas contaminadas con bacterias. Para esto, la carne de cerdo, con piel, fue comprada a un carnicero. Para simular las heridas, se usó un escalpelo para hacer incisiones, que varían en tamaño de 1,5 cm² a 4 cm² en la piel y lo suficientemente profundas para ver la capa muscular. El dispositivo se usó para obtener imágenes de algunas muestras de carne sin la adición de bacterias a las heridas simuladas. Para ello, la muestra de carne se dejó a temperatura ambiente durante 24 h para que las bacterias de la carne crezcan, y luego se realizaron imágenes con el dispositivo usando tanto la reflectancia de luz blanca como la autofluorescencia, para comparación.

Para probar la capacidad del dispositivo para detectar tejidos conectivos y varias bacterias comunes presentes en las heridas típicas, se preparó una muestra de carne de cerdo con heridas simuladas aplicando seis especies bacterianas a cada uno de seis sitios pequeños de incisión de herida de 1,5 cm² en el superficie de la piel: *streptococcus pyogenes*, *serratia marcescens*, *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*, *escherichia coli* y *pseudomonas aeruginosa*. Se hizo una pequeña incisión adicional en la piel de la carne, en la que no se agregaron bacterias, para servir como control. Sin embargo, se esperaba que las bacterias de los otros seis sitios de incisiones pudieran contaminar este sitio a tiempo. El dispositivo se usó para obtener imágenes de la muestra de carne cargada de bacterias usando emisión de reflectancia de luz blanca y de autofluorescencia tisular inducida por luz violeta/azul, usando un filtro de banda de emisión dual (450-505 nm y 590-650 nm) y un filtro de emisión de una sola banda (635 +/- 10 nm) a la izquierda y un filtro de banda única en el transcurso de tres días, a intervalos de 24 h, durante los cuales la muestra de carne se mantuvo a 37 °C. La formación de imágenes también se realizó en un recipiente de poliestireno extruido en el que se almacenó la muestra de carne durante los tres días.

La Figura 4 muestra los resultados del dispositivo usado para la detección no invasiva de la autofluorescencia de bacterias en un modelo de herida animal simulado. En las imágenes de luz blanca convencional, las bacterias estaban ocultas dentro del sitio de la herida, como se muestra en a) y se amplían en b). Sin embargo, bajo la luz de excitación violeta/azul, el dispositivo era capaz de permitir la identificación de la presencia de bacterias en el sitio de la herida en función del aumento espectacular de la fluorescencia roja de las porfirinas bacterianas contra un fondo de fluorescencia verde brillante del tejido conectivo (p. ej., colágeno y elastinas) como se aprecia en c) y se amplía en d). La comparación de b) y d) muestra un aumento dramático en la fluorescencia roja de las porfirinas bacterianas contra un fondo de fluorescencia verde brillante del tejido conectivo (p. ej., colágeno y elastinas). Se observó que con la autofluorescencia, también se detectaron colonias bacterianas en la superficie de la piel en función de su emisión de fluorescencia verde, lo que provocaba que las colonias individuales aparecieran como puntos verdes en la piel. Estos no fueron vistos bajo examen de luz blanca. La formación de imágenes de fluorescencia de los tejidos conectivos ayudó a determinar los márgenes de la herida como se aprecia en e) y f), y algunas áreas de la piel (marcadas con "*" en c) aparecieron más fluorescentes rojas que otras áreas, lo que posiblemente indica una infección subcutánea por bacterias que producen porfirina, e) y f) también muestran el dispositivo que detecta bacterias rojas fluorescentes en la herida quirúrgica, que están ocultas bajo imágenes de luz blanca.

El dispositivo mapeó la biodistribución de bacterias en el sitio de la herida y en la piel circundante y, por lo tanto, puede ayudar a dirigirse a áreas específicas de tejidos que requieren muestreo o biopsia para pruebas microbiológicas. Además, el uso del dispositivo de formación de imágenes puede permitir la supervisión de la respuesta de los tejidos infectados por bacterias a una variedad de tratamientos médicos, incluido el uso de antibióticos y otras terapias, tales como terapia fotodinámica (PDT), oxigenoterapia hiperbárica (HOT), terapia de luz de bajo nivel, o metaloproteinasa anti-matriz (MMP). El dispositivo puede ser útil para la visualización de la biodistribución bacteriana en la superficie, así como dentro de la profundidad del tejido de la herida, y también para los tejidos normales circundantes. El dispositivo puede ser útil para indicar la distribución espacial de una infección.

Uso del dispositivo con agentes de contraste en la supervisión de heridas

Según la invención, el dispositivo se usa con agentes de contraste exógenos, por ejemplo, el profármaco ácido aminolevulínico (ALA) en una dosis baja. El ALA puede administrarse por vía tópica a la herida y la imagen puede

realizarse 1-3 horas más tarde para mejorar la fluorescencia roja de las bacterias de la herida.

El profármaco ácido aminolevulínico (ALA) induce la formación de porfirina en casi todas las células vivas. Muchas especies de bacterias expuestas al ALA pueden inducir la fluorescencia de la protoporfirina IX (PpIX). El uso de ALA de dosis ultra-baja puede inducir la formación de PpIX en las bacterias y, por ende, puede aumentar la emisión de fluorescencia roja, lo que puede potenciar el contraste de fluorescencia de rojo a verde de las bacterias con el dispositivo. El ALA no es fluorescente por sí mismo, pero PpIX es fluorescente a aproximadamente 630 nm, 680 y 710 nm, siendo la emisión de 630 nm la más fuerte. El dispositivo de formación de imágenes se puede usar para obtener imágenes de la fluorescencia verde y roja de la herida y los tejidos circundantes. El tiempo necesario para obtener un aumento significativo/apreciable en la fluorescencia roja (p. ej., pico a 630 nm) usando el dispositivo de formación de imágenes después de la aplicación de ALA (~20 µg/ml) a los intervalos de la herida de 10-30 minutos, pero este tiempo puede ser optimizado, y depende también de la dosis de ALA que también se puede optimizar.

Por consiguiente, un operador clínico puede premezclar el ALA, que generalmente se proporciona comercialmente en forma liofilizada con solución salina fisiológica u otro tipo de crema/pomada/hidrogel/apósito comercialmente disponible, etc., en una dosis determinada y administrar el agente por vía tópica pulverizándolo, vertiéndolo o aplicando con cuidado el agente en el área de la herida antes de la obtención de imágenes. Aproximadamente 10-30 minutos después, aunque este tiempo puede variar, la imagen de fluorescencia se puede realizar en una habitación escasamente iluminada u oscura. Las bacterias ocultas bajo luz blanca y, quizás, poco autofluorescentes, pueden aparecer como áreas fluorescentes de color rojo brillante en la herida y alrededor de ella. Las imágenes de fluorescencia se pueden usar para dirigir el muestreo, la biopsia y/o los aspirados con aguja fina diana de la herida para el cultivo bacteriano basándose en la señal de fluorescencia bacteriana única, y esto se puede hacer a diferentes profundidades, para heridas superficiales y profundas.

El dispositivo también se puede usar junto con agentes "profármacos" exógenos, que incluyen, entre otros, ALA, que está aprobado por la FDA para indicaciones terapéuticas clínicas, para aumentar la producción endógena de porfirinas en bacterias/microorganismos y por lo tanto, aumentar la intensidad de las señales de fluorescencia de "porfirina" únicas que emanan de estas bacterias para mejorar la sensibilidad de detección y la especificidad del dispositivo. Por consiguiente, el dispositivo se puede usar para visualizar de manera conveniente la fluorescencia inducida por fotosensibilizador (p. ej., PpIX) en bacterias, que crecen en cultivo o en heridas de pacientes para su posterior muestreo/biopsia o tratamiento dirigido guiado por formación de imágenes, por ejemplo, usando terapia fotodinámica (PDT) u oxigenoterapia hiperbárica (HOT). El dispositivo cuando se usa, por ejemplo, con agentes de contraste de fluorescencia consumibles comercialmente disponibles tiene la capacidad de aumentar la señal hasta el fondo para la detección sensible de bacterias, en las heridas y alrededor de las mismas. Cabe señalar que ALA está disponible comercialmente.

En un ejemplo, el dispositivo se usó para obtener imágenes de cultivos bacterianos vivos (*staphylococcus aureus*, cultivado en placas de agar durante 24 h antes de la obtención de imágenes) usando luz de excitación azul/violeta. Después de 30 minutos de incubación de *staphylococcus aureus* -20 µg/ml de ALA a 37 °C, se detectó un aumento significativo en la fluorescencia roja de las bacterias, en comparación con aquellas colonias que no recibieron ALA. Por consiguiente, el dispositivo puede explotar el uso de estrategias de agentes de contraste para aumentar la señal hasta el fondo para la detección sensible de bacterias, por ejemplo, en heridas. El tiempo necesario para que el ALA aumente la fluorescencia PpIX de las bacterias en cultivo a niveles significativos fue de aproximadamente 0,5 h, lo que sugiere que este enfoque puede ser clínicamente práctico. Las pruebas en muestras de carne simuladas contaminadas con bacterias revelaron resultados similares a los obtenidos a partir de cultivos bacterianos. La aplicación tópica de 0,2 µg/ml de ALA mediante pulverización sobre heridas en la piel de cerdo produjo un aumento espectacular del contraste de fluorescencia del rojo de porfirina bacteriana aproximadamente 2 h después de la administración de ALA. Esto demuestra que el dispositivo puede permitir la detección de contaminación bacteriana con imágenes de fluorescencia en los sitios de la herida y en cualquier otra parte de la superficie de la piel, que anteriormente estaba oculta bajo imágenes de luz blanca.

Uso con agentes de formación de imágenes activados y dirigidos a grupos moleculares exógenos

La disponibilidad de kits de detección y viabilidad bacteriológicos moleculares de fluorescencia disponibles en el mercado puede ofrecer otro uso para el dispositivo en el cuidado de heridas. Dichos kits se pueden usar para distinguir rápidamente de manera cuantitativa las bacterias vivas y muertas, incluso en una población mixta que contiene un intervalo de tipos bacterianos. Los ensayos convencionales de recuento directo de la viabilidad bacteriana se basan normalmente en las características metabólicas o en la integridad de la membrana. Sin embargo, los métodos que dependen de las características metabólicas a menudo solo funcionan para un subconjunto limitado de grupos bacterianos, y los métodos para evaluar la integridad de la membrana bacteriana generalmente tienen altos niveles de fluorescencia de fondo. Ambos tipos de determinaciones también experimentan ser muy sensibles a las condiciones de crecimiento y tinción.

Las sondas de direccionamiento molecular ópticas exógenas adecuadas pueden prepararse usando kits de marcado de fluorescencia disponibles en el mercado, tales como los esteres y kits activos de Alexa Fluor (p. ej., kits de marcado de anticuerpos Zenon y kits de ensayo de proteasa EnzChek, Invitrogen) para marcar proteínas,

anticuerpos monoclonales, ácidos nucleicos y oligonucleótidos (Invitrogen). Por ejemplo, estos bioconjugados de tinte fluorescente cubren los siguientes intervalos de longitud de onda: tintes de Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 635, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700 y Alexa Fluor 750, en los que el número indicado se refiere a la longitud de onda de excitación del tinte. Estos kits pueden ofrecer espectros de emisión de fluorescencia bien diferenciados, que brindan muchas opciones para la detección de fluorescencia multicolor y la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, en función de la selección apropiada de filtros de emisión de fluorescencia con el dispositivo de formación de imágenes. Los tintes de fluorescencia ofrecen una alta absorbancia en longitudes de onda de salida máxima de fuentes de excitación comunes, son fluorescentes brillantes e inusualmente fotoestables de sus bioconjugados, y ofrecen una buena solubilidad en agua de los tintes reactivos para facilitar la conjugación en la sala de examen clínico y la resistencia de los conjugados a la precipitación y agregación. Los espectros de fluorescencia de los tintes son insensibles al pH en un amplio intervalo, lo que los hace particularmente útiles para la obtención de imágenes de heridas, ya que el pH de las heridas puede variar. Además, existen otros agentes fluorescentes comerciales o no comerciales que pueden ser apropiados para la obtención de imágenes biológicas de las heridas y pueden combinarse con el dispositivo descrito, incluidos los agentes de acumulación sanguínea fluorescentes y varias sondas activadas por enzimas o proteasas de heridas de VisEn Medical (Boston, Mass., EE. UU.), por ejemplo.

Estos bioconjugados fluorescentes dirigidos pueden prepararse usando dichos kits de marcado antes del examen clínico de la herida usando el dispositivo de formación de imágenes en modo de fluorescencia, y pueden almacenarse en recipientes herméticos para evitar el fotoblanqueamiento. Dichos bioconjugados de fluorescencia pueden prepararse en solución a una concentración conocida y apropiada antes de la imagen de fluorescencia de la herida usando el dispositivo, y luego administrarse/aplicarse directamente a la herida y a los tejidos normales circundantes ya sea por vía tópica (p. ej., mediante aerosol/pulverización, técnicas de lavado), o según los ejemplos no abarcados por la invención reivindicada, administrado por vía oral en una bebida o sistémicamente mediante inyección intravenosa. Dichos tintes pueden dirigirse a componentes biológicos específicos en función del resto diana, y pueden incluir: bacterias, hongos, levaduras, esporas, virus, microbios, parásitos, exudados, pH, vasos sanguíneos, dinucleótido adenina nicotinamida reducida (NADH), dinucleótido adenina falvina (FAD), microorganismos, tipos específicos de tejidos conectivos (p. ej., colágenos, elastina), componentes tisulares, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial (EGF), factor de crecimiento epitelial, antígeno de membrana de células epiteliales (ECMA), factor inducible por hipoxia (HIF-1), anhidrasa carbónica IX (CAIX), laminina, fibrina, fibronectina, factor de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformante (TGF), proteína de activación de fibroblastos (FAP), enzimas (p. ej., caspasas, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), etc.), inhibidores tisulares de metaloproteinasas (p. ej., TIMPs), óxido nítrico sintasa (NOS), NOS inducible y endotelial, lisosomas en células, macrófagos, neutrófilos, linfocitos, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), anti-neuropéptidos, endopeptidasas neutrales (NEP), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), elastasas de neutrófilos, catepsinas, arginasas, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), proteína-2 inflamatoria de macrófago (MIP-2), proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) y proteína-1 quimioatrayente de macrófago (MCP-1), neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos, miofibroblastos, interleucina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral (TNF), óxido nítrico (NO) (kit de Calbiochem, modelo DAF-2 DA), c-myc, beta-catenina, células progenitoras endoteliales (EPCs) de la médula ósea. Los agentes ópticos exógenos pueden incluir, entre otros, cualquiera de los siguientes: balizas moleculares activadas (p. ej., dirigidas), nanopartículas que tienen agentes fluorescentes (p. ej., marcadas en la superficie y/o que contienen o llevan agentes fluorescentes), y nanopartículas de dispersión o absorbentes (p. ej., oro, plata).

El ensayo con kits de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight™ (de Invitrogen, Molecular Probes) usa mezclas de tinción de ácido nucleico fluorescente verde SYTO® 9 y tinción de ácido nucleico fluorescente roja, yoduro de propidio, aunque estos tintes fluorescentes pueden intercambiarse con otros agentes fluorescentes existentes o emergentes. Estas tinciones difieren tanto en sus características espectrales como en su capacidad para penetrar en células bacterianas sanas. Cuando se usa solo, la tinción SYTO 9 marca bacterias con membranas intactas y dañadas. En cambio, el yoduro de propidio penetra solo en las bacterias con membranas dañadas, compitiendo con la tinción de SYTO 9 por los sitios de unión de ácido nucleico cuando ambos tintes están presentes. Cuando se mezcla en las proporciones recomendadas, la tinción de SYTO 9 y el yoduro de propidio producen una tinción verde fluorescente de bacterias con membranas celulares intactas y una tinción roja fluorescente de bacterias con membranas dañadas. Por lo tanto, las bacterias vivas con membranas intactas emiten fluorescencia verde, mientras que las bacterias muertas con membranas dañadas emiten fluorescencia roja. El fondo permanece prácticamente no fluorescente. En consecuencia, la relación de intensidades de fluorescencia verde a roja puede proporcionar un índice cuantitativo de viabilidad bacteriana.

Las bacterias vivas y muertas pueden ser vistas por separado o simultáneamente por el dispositivo de formación de imágenes con conjuntos de filtros ópticos adecuados. Además, se dispone de kits de ensayo de fluorescencia similares para la identificación de bacterias con el signo Gram (es decir, positivo/negativo), que es un parámetro útil en la planificación del tratamiento de heridas, y se puede usar junto con el dispositivo de formación de imágenes. Dichos agentes de fluorescencia son generales y aplicables a la mayoría de los tipos de bacterias, y pueden usarse para determinar la viabilidad bacteriana y/o el signo de Gram directamente en/dentro de la herida o en las muestras

de cultivo derivadas de frotis o de biopsias tisulares *ex vivo* obtenidas del sitio de la herida (p. ej., superficialmente o en profundidad) para la evaluación cuantitativa en tiempo real usando el dispositivo de formación imágenes. Dichos agentes fluorescentes de la fluorescencia pueden prepararse en solución por adelantado a una concentración conocida y apropiada antes de la imagen de fluorescencia de la herida usando el dispositivo, y luego administrarse/aplicarse directamente a la herida y a los tejidos normales circundantes, ya sea por vía tópica (p. ej., mediante aerosol/pulverización, técnicas de lavado), o quizás sistémicamente vía inyección intravenosa. Acto seguido, se puede realizar la toma de imágenes en consecuencia después de un tiempo definido para que los agentes reaccionen con las dianas. Es posible que se requiera un lavado de los agentes sin marcar antes de tomar imágenes con el dispositivo. Para ello, se puede usar solución salina fisiológica. El agente fluorescente unido a la diana puede permanecer en la herida y los tejidos circundantes para obtener imágenes de fluorescencia.

Por lo tanto, cuando se usa con sistemas indicadores fluorescentes, el dispositivo de formación de imágenes puede proporcionar un medio relativamente rápido para evaluar la viabilidad bacteriana después de la exposición a agentes antimicrobianos. La capacidad de medir repetidamente los mismos pacientes o animales puede reducir la variabilidad dentro de los experimentos de tratamiento y permitir una confianza igual o mayor en la determinación de la eficacia del tratamiento. Esta tecnología de imágenes no invasiva y portátil puede reducir la cantidad de animales usados durante dichos estudios y tiene aplicaciones para la evaluación de compuestos de prueba durante el descubrimiento de fármacos.

Un número de fluoróforos orgánicos disponibles comercialmente tienen propiedades que dependen de la concentración de iones hidrógeno, haciéndolos útiles como sondas para medir el pH, y normalmente tienen propiedades de absorción UV/visible sensibles al pH. La mayoría de los tintes fluorescentes sensibles al pH disponibles en el mercado empleados en estudios intracelulares proporcionan una señal fluorescente reducida en medios ácidos o, alternativamente, el pKa del tinte está fuera de la ventana de pH intracelular crítica de entre 5 y 8 unidades de pH. Sin embargo, otros agentes fluorescentes sensibles al pH responden aumentando sus intensidades de fluorescencia. Por ejemplo, Invitrogen/Molecular Probes ofrecen una variedad de indicadores de pH fluorescentes, sus conjugados y otros reactivos para mediciones de pH en sistemas biológicos. Entre estos se encuentran varias sondas con respuesta óptica única y características de localización especializadas: por ejemplo, los indicadores de pH SNARF de luz visible excitables permiten a los investigadores determinar el pH intracelular en el intervalo fisiológico usando técnicas de radiometría de doble emisión o excitación dual, proporcionando así herramientas útiles para microscopía de barrido láser confocal y citometría de flujo. Las sondas LysoSensor, así como los indicadores basados en el fluoróforo Oregon Green, se pueden usar para estimar el pH en los orgánulos ácidos de una célula. También hay indicadores de pH fluorescentes acoplados a dextranos que pueden usarse. Tras la carga en las células, los dextranos indicadores pueden retenerse bien, pueden no unirse a las proteínas celulares y pueden tener una tendencia reducida a compartimentarse. De nuevo, dichos agentes fluorescentes pueden prepararse en solución por adelantado a una concentración conocida y apropiada antes de la imagen de fluorescencia de la herida usando el dispositivo, y luego administrarse/aplicarse directamente a la herida y a los tejidos normales circundantes ya sea por vía tópica (p. ej., mediante aerosol/pulverización, técnicas de lavado), sistémicamente o por ejemplo, mediante inyección intravenosa u oral.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a la Figura 24. Como ejemplo, el dispositivo de formación de imágenes se puede usar clínicamente para determinar el estado de curación de una herida crónica y el éxito del desbridamiento de la herida. Por ejemplo, en la figura se muestra una úlcera de pie típica en una persona con diabetes, con (i) el borde no cicatrizado (es decir, callo) que contiene células ulcerogénicas con marcadores moleculares indicativos de deterioro de la curación y (ii) células fenotípicamente normales pero con células alteradas fisiológicamente, que se pueden estimular para sanar. A pesar del aspecto de una herida después del desbridamiento, puede no estar cicatrizando y puede ser necesario evaluar la presencia de marcadores moleculares específicos de inhibición y/o tejido hiperqueratósico (p. ej., c-myc y β -catenina). Usando el dispositivo de formación de imágenes en combinación con sondas moleculares exógenas marcadas con fluorescencia contra tales dianas moleculares, el médico puede determinar la expresión *in situ* de biomarcadores moleculares. Con el dispositivo, una vez que se desbridó una herida, las imágenes de fluorescencia del área de la herida y los análisis de imagen pueden permitir la orientación de la biopsia para la posterior inmunohistoquímica y esto puede determinar si el grado de desbridamiento fue suficiente. Si el grado de desbridamiento fue insuficiente, como se muestra en el diagrama inferior izquierdo, se pueden encontrar células positivas para c-myc (que tiene un color verde) y β -catenina nuclear (que tiene un color morado) en función de su fluorescencia, lo que indica la presencia de células ulcerogénicas, lo que puede evitar que la herida se cure correctamente e indicar que es necesario un desbridamiento adicional. La falta de cicatrización también puede ser demarcada por una epidermis más gruesa, una capa cornificada más gruesa y la presencia de núcleos en la capa cornificada. Si el desbridamiento fue satisfactorio, como en el diagrama inferior derecho inferior, no se puede encontrar tinción alguna para c-myc o β -catenina, lo que indica una ausencia de células ulcerogénicas y un desbridamiento exitoso. Estos marcadores de inhibición pueden ser útiles, pero el objetivo es la curación real definida por la aparición de un nuevo epitelio, la disminución del área de la herida y la ausencia de drenaje. Esta información se puede recopilar usando el dispositivo de formación de imágenes de fluorescencia y se puede almacenar electrónicamente en el expediente médico del paciente, lo que puede proporcionar un análisis objetivo junto con informes de patología y microbiología. Al comparar el tiempo de curación esperado con el tiempo de

curación real (es decir, el progreso de la curación) usando el dispositivo de formación de imágenes, se pueden implementar estrategias de tratamiento adaptativo por paciente.

La Figura 24B muestra un ejemplo del uso del dispositivo para obtener imágenes de la cicatrización de una úlcera por presión. a) Se muestra la imagen de luz blanca tomada con el dispositivo del pie derecho de un paciente diabético con una úlcera por presión. b) La imagen de fluorescencia correspondiente muestra la fluorescencia roja brillante de las bacterias (los resultados de bacteriología confirmaron la presencia de un fuerte crecimiento de *Staphylococcus aureus*) que son invisibles bajo el examen convencional de luz blanca (flechas amarillas). Observe el fuerte crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* alrededor de la periferia de la herida que no cicatriza (flecha amarilla larga). c-d) muestra las imágenes espectrales separadas (no mezcladas) rojo-verde-azul de la imagen de fluorescencia sin procesar en b), que se usan para producir mapas de imagen codificados espectralmente de las intensidades de fluorescencia verde (p. ej., colágeno) y rojo (p. ej., bacterias) calculado usando algoritmos matemáticos y se muestra en falso color con escala de color. f-g) muestra ejemplos de métodos de procesamiento de imágenes usados que mejoran el contraste de la señal de autofluorescencia bacteriana endógena al calcular la relación de intensidad de fluorescencia rojo/verde para revelar la presencia y la biodistribución de bacterias (rojo-naranja-amarillo) en la herida abierta y alrededor de la misma. Estos datos ilustran la capacidad de usar un software de análisis de imágenes personalizado o disponible comercialmente para analizar matemáticamente las imágenes de fluorescencia obtenidas por el dispositivo y mostrarlas de una manera significativa para uso clínico, y esto puede hacerse en tiempo real. (Barra de escala 1 cm).

La Figura 24C muestra un ejemplo del uso del dispositivo para obtener imágenes de una herida crónica sin cicatrización. a) la imagen de luz blanca tomada con el dispositivo del seno izquierdo de una paciente con *Pyoderma gangrenosum*, muestra una herida crónica que no cicatriza (flecha azul) y una herida curada (flecha roja). Las bacterias generalmente no pueden visualizarse mediante la visualización convencional de luz blanca usada en el examen clínico convencional de las heridas. b) se muestra la imagen de fluorescencia correspondiente de las mismas heridas (en este ejemplo, usando excitación a 405 nm, emisión de 500-550 nm (verde), emisión de >600 nm (rojo)). Tenga en cuenta que la herida no cicatrizada tiene un color oscuro bajo la fluorescencia (principalmente debido a la absorción de la luz por la excitación y la luz de emisión de fluorescencia por parte de la sangre), mientras que las bacterias aparecen como puntos puntuales rojos brillantes en la herida curada (flecha roja). Bajo la fluorescencia, la piel circundante normal tiene un color verde cian debido a la fluorescencia del colágeno endógeno (405 nm de excitación). Por el contrario, la herida no curada (flecha azul) parece tener una banda de fluorescencia roja muy brillante alrededor del borde de la herida, confirmada con cultivos de frotis (bacteriología) que contiene un gran crecimiento de *Staphylococcus aureus* (con pocos bacilli Gram positivos y escasos cocci Gram positivos, confirmados por microscopía). c) imagen de luz blanca de la herida curada en a, b) y d) imagen de fluorescencia correspondiente que muestra fluorescencia roja brillante de bacterias (flechas rosadas), que están ocultas bajo luz blanca. e) luz blanca y f) imágenes de fluorescencia correspondientes de la herida mamaria no curada. Tenga en cuenta que las bacterias (*Staphylococcus aureus*) parecen estar localizadas principalmente alrededor del borde/límite de la herida (flecha amarilla), mientras que hay menos bacterias ubicadas en la herida (X), determinadas por la biodistribución de las bacterias visualizadas directamente mediante imágenes de fluorescencia, pero invisibles bajo luz blanca (flecha negra, e). (Barra de escala en cm).

La Figura 24D ilustra además la formación de imágenes de una herida crónica sin cicatrización usando un ejemplo del dispositivo de formación de imágenes. a) imagen de luz blanca tomada con el dispositivo del seno izquierdo de una paciente con *Pyoderma gangrenosum*, que muestra una herida crónica que no cicatriza (flecha azul) y una herida curada (flecha azul). Las bacterias no pueden visualizarse mediante la visualización convencional de luz blanca usada en el examen clínico de las heridas. b) imagen de fluorescencia correspondiente de las mismas heridas (excitación de 405 nm, emisión de 500-550 nm (verde), emisión de >600 nm (rojo)). Mientras que el pezón parece ser normal en blanco sin contaminación obvia de bacterias, la imagen de fluorescencia muestra la presencia de bacterias que emanan de los conductos del pezón. Los frotis del pezón mostraron que las bacterias eran *Staphylococcus epidermidis* (crecimiento ocasional encontrado en el cultivo). (Barra de escala en cm).

La Figura 24E muestra un área central y el borde de una herida crónica sin cicatrización visualizados con el dispositivo de formación de imágenes. a) imagen de luz blanca tomada con el dispositivo del seno izquierdo de una paciente con *Pyoderma gangrenosum*, que muestra el área central y el borde de una herida crónica que no cicatriza. a) luz blanca y b) imágenes de fluorescencia correspondientes de la herida en el seno no curada (excitación de 405 nm, emisión de 500-550 nm (verde), emisión de >600 nm (rojo)). Tenga en cuenta que las bacterias (*Staphylococcus aureus*; mostradas mediante muestreo bacteriano) parecen estar localizadas principalmente alrededor del borde/límite de la herida, mientras que hay menos bacterias ubicadas en la herida (X), determinadas por la biodistribución de bacterias visualizadas directamente mediante imágenes de fluorescencia, pero invisibles bajo luz blanca. (Barra de escala en cm).

La Figura 24F muestra imágenes adicionales de una herida crónica sin cicatrización usando el dispositivo de formación de imágenes. a) imagen de luz blanca tomada con el dispositivo del seno izquierdo de una paciente con *Pyoderma gangrenosum*, que muestra una herida crónica que no cicatriza. Las bacterias no pueden visualizarse mediante la visualización convencional de luz blanca usada en el examen clínico de las heridas. b) imagen de fluorescencia correspondiente de la misma herida (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm

de emisión (rojo)). Las imágenes de fluorescencia muestran la presencia de bacterias alrededor del borde/margen de la herida antes de la limpieza (b) y después de la limpieza (c). En este ejemplo, la limpieza implicó el uso de una gasa convencional y solución salina tamponada con fosfato para limpiar la superficie de la herida (dentro y fuera) durante 5 minutos. Después de la limpieza, la fluorescencia roja de las bacterias disminuye considerablemente, lo que indica que algunas de las bacterias fluorescentes rojas pueden residir debajo de la superficie del tejido alrededor del borde de la herida. Pequeñas cantidades de bacterias (fluorescente roja) permanecieron en el centro de la herida después de la limpieza. Esto ilustra el uso del dispositivo de formación de imágenes para supervisar los efectos de la limpieza de heridas en tiempo real. Como ejemplo adicional, d) muestra una imagen de luz blanca de una herida crónica que no cicatriza en el mismo paciente ubicado en la pantorrilla izquierda. e) muestra las imágenes de fluorescencia correspondientes previa a la limpieza (e) y posterior a la limpieza (f). El muestreo del área central de la herida reveló el crecimiento ocasional de *Staphylococcus aureus*, con un fuerte crecimiento de *Staphylococcus aureus* en el borde (flecha amarilla). La limpieza resultó en una reducción de las bacterias fluorescentes (*Staphylococcus aureus*) en la superficie de la herida según se determinó usando el dispositivo óptico de formación de imágenes manual. El uso del dispositivo de formación de imágenes dio como resultado la detección en tiempo real de bacterias ocultas de luz blanca y esto permitió una alteración en la forma en que se trató al paciente, de modo que, después de las imágenes de fluorescencia, las heridas y los alrededores (bacterias contaminadas) se volvieron a limpiar a fondo o a limpiar por primera vez debido a la detección *de novo* de bacterias. Además, tenga en cuenta el uso de una "tira" de calibración-medición de adhesivo desechable para ayudar en el enfoque de formación de imágenes y esta "tira" puede adherirse a cualquier parte de la superficie del cuerpo (p. ej., cerca de una herida) para permitir las mediciones espaciales de la herida. La tira de calibración también puede ser claramente fluorescente y se puede usar para agregar información específica del paciente a las imágenes, incluido el uso de múltiples tintes fluorescentes exógenos para fines de códigos de barras, cuya información se puede integrar directamente en las imágenes de fluorescencia de las heridas. (Barra de escala en cm).

La Figura 24G ilustra el uso del dispositivo de formación de imágenes para supervisar la cicatrización de heridas con el tiempo. El dispositivo de formación de imágenes se usa para rastrear los cambios en el estado de curación y la biodistribución bacteriana (p. ej., contaminación) de una herida crónica que no cicatriza del seno izquierdo de una paciente con *Pyoderma gangrenosum*. A lo largo de seis semanas se muestran imágenes de luz blanca (a-m) y las imágenes de fluorescencia correspondientes de la herida curada (b-n) y de la herida crónica que no cicatriza (c-o). (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm de emisión (rojo)), tomadas usando el dispositivo de formación de imágenes en modos de luz blanca y fluorescencia. En b-n), se detecta la presencia de pequeñas colonias bacterianas de fluorescencia roja brillante (flechas amarillas) y su localización cambia con el tiempo en la herida curada. Los frotis bacterianos confirmaron que no se detectaron bacterias en el microscopio y no se observó crecimiento bacteriano en el cultivo. En c-o), por el contrario, la herida no curada tiene una banda de fluorescencia roja muy brillante alrededor del borde de la herida, confirmada con cultivos de frotis (bacteriología) que contienen un gran crecimiento de *Staphylococcus aureus* (con pocos *bacilli* Gram positivos y escasos *cocci* Gram positivos, confirmado por microscopía), que cambia en la biodistribución a lo largo del tiempo (es decir, c-o). Estos datos demuestran que el dispositivo de formación de imágenes puede proporcionar información biológica y molecular en tiempo real, así como ser usado para supervisar cambios morfológicos y moleculares en las heridas a lo largo del tiempo.

La Figura 24H muestra otro ejemplo del uso del dispositivo para supervisar el estado de la herida a lo largo del tiempo. El dispositivo de formación de imágenes se usa para rastrear los cambios en el estado de curación y la biodistribución bacteriana (p. ej., contaminación) de una herida de la pantorrilla izquierda de una paciente de 21 años con *Pyoderma gangrenosum*. Las imágenes de luz blanca (a-i) y las imágenes de fluorescencia correspondientes de (b-j) una herida tratada con oxigenoterapia hiperbárica (HOT) se muestran a lo largo de seis semanas. (Parámetros de fluorescencia: excitación de 405 nm, emisión de 500-550 nm (verde), emisión >600 nm (rojo)), a-i) las imágenes de luz blanca revelan distintos cambios macroscópicos en la herida a medida que sana, lo que se indica por la reducción en el tamaño con el tiempo (p. ej., cierre) desde la semana 1 (diámetro de ~2 cm de largo) hasta la semana 6 (diámetro del eje de ~0,75 cm de largo). En b-j), la imagen de fluorescencia en tiempo real de la fluorescencia bacteriana endógena (autofluorescencia) en la herida y alrededor de la misma puede rastrearse con el tiempo y correlacionarse con las imágenes de luz blanca y las mediciones de cierre de la herida (a-i). b) muestra una clara banda verde de fluorescencia en el límite inmediato de la herida (flecha amarilla; se muestra que está contaminado con un crecimiento abundante de *Staphylococcus aureus*), y esta banda cambia con el tiempo a medida que la herida sana. Las bacterias de fluorescencia roja también se ven más lejos de la herida (flecha naranja) y su biodistribución cambia con el tiempo (b-j). Los límites de tejido de herida a perilesional a normal se pueden ver claramente por fluorescencia en la imagen j). El tejido conectivo (en este ejemplo, colágenos) en la piel normal aparece como una fluorescencia de color verde pálido (j) y el remodelado del tejido conectivo durante la cicatrización de la herida se puede supervisar con el tiempo, durante varios tratamientos de la herida que incluyen, como es el caso, la oxigenoterapia hiperbárica de heridas crónicas.

La Figura 24I ilustra el uso del dispositivo de formación de imágenes para detectar frotis bacterianos durante la evaluación rutinaria de la herida en la clínica. En imágenes de fluorescencia, la muestra puede dirigirse o seleccionar áreas específicas de contaminación/infección bacteriana usando la guía de imagen de fluorescencia en tiempo real. Esto puede disminuir el potencial de contaminación de los tejidos no infectados al reducir la propagación de bacterias durante los procedimientos de muestreo rutinarios, lo que puede ser un problema en los métodos

convencionales de muestreo de heridas. Se determinó que los resultados de frotis de esta muestra son de *Staphylococcus aureus* (con pocos *bacilli* Gram positivos y escasos *cocci* Gram positivos, confirmados mediante microscopía).

- 5 La Figura 24J muestra un ejemplo del co-registro de a) luz blanca y b) imágenes de fluorescencia correspondientes realizadas con el dispositivo de formación de imágenes en un paciente con úlceras en el pie no curadas asociadas con diabetes. Usando una sonda de medición de temperatura sin contacto (recuadro en a) con visor láser cruzado, se realizaron mediciones directas de temperatura en la piel normal (amarillo "3 y 4") y en las úlceras del pie (amarillo "1 y 2") (infectadas con *Pseudomonas aeruginosa*, según lo confirmado por el cultivo bacteriológico), lo que indica la capacidad de agregar información basada en la temperatura a la evaluación de la herida durante el examen clínico. Las heridas infectadas tienen temperaturas elevadas, como se ve en el promedio de 34,45 °C en las heridas infectadas en comparación con los 30,75 °C en la superficie normal de la piel, y estos datos ilustran la posibilidad de mediciones multimodales que incluyen luz blanca, fluorescencia e información térmica para la evaluación de la salud de la herida/evaluación infecciosa en tiempo real. Tenga en cuenta que ambas heridas que no cicatrizan en el pie derecho de este paciente contenían un gran crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (además de los *cocci* Gram positivos y los *bacilli* Gram negativos), que en este ejemplo aparecen como áreas fluorescentes de color verde brillante en la herida (b).

- La Figura 24K muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes para supervisar una úlcera por presión. a) se muestra la imagen de luz blanca tomada con el dispositivo de formación de imágenes del pie derecho de un paciente diabético caucásico con una úlcera por presión. b) la imagen de fluorescencia correspondiente muestra la fluorescencia roja brillante de las bacterias (los resultados de bacteriología confirmaron la presencia de un fuerte crecimiento de *Staphylococcus aureus*) que son invisibles bajo el examen convencional de luz blanca (flechas amarillas). La piel muerta aparece como un color verde de luz blanca/pálida (flechas blancas). Observe el fuerte crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* alrededor de la periferia de las heridas abiertas que no cicatrizan (flechas amarillas). c) muestra la imagen de fluorescencia de un apósito antimicrobiano de plata de aplicación tópica. El dispositivo de formación de imágenes puede usarse para detectar la señal de fluorescencia endógena de productos avanzados para el cuidado de heridas (p. ej., hidrogeles, vendajes para heridas, etc.) o las señales de fluorescencia de dichos productos que se han preparado con un tinte fluorescente con una longitud de onda de emisión dentro de la sensibilidad de detección del detector de formación de imágenes en el dispositivo. Según los ejemplos no abarcados por la invención reivindicada, el dispositivo se puede usar para la administración/aplicación guiada por imágenes de productos avanzados para el tratamiento del cuidado de heridas y para supervisar posteriormente su distribución y depuración a lo largo del tiempo.

- La Figura 24L muestra un ejemplo del uso del dispositivo para supervisar una úlcera por presión. a) imagen de luz blanca tomada con el dispositivo del pie derecho de un paciente diabético caucásico con una úlcera por presión. b) la imagen de fluorescencia correspondiente muestra el área fluorescente roja brillante de las bacterias (los resultados bacteriológicos confirmaron la presencia de un crecimiento intenso de *Staphylococcus aureus*, SA) en el borde de la herida y las bacterias fluorescentes verdes brillantes (los resultados bacteriológicos confirmaron la presencia de un crecimiento intenso de *Pseudomonas aeruginosa*, PA) que son invisibles bajo el examen convencional de luz blanca, c) la espectroscopia de fluorescencia tomada de la herida reveló diferencias espectrales únicas entre estas dos especies bacterianas: SA tiene un pico de emisión de autofluorescencia rojo característico (aproximadamente 630 nm), mientras que PA carece de fluorescencia roja pero tiene un pico de autofluorescencia verde fuerte a alrededor de 480 nm.

- La Figura 24M muestra un ejemplo del uso del dispositivo para supervisar una herida crónica que no cicatriza. a) se muestra la imagen de luz blanca tomada con el dispositivo de formación de imágenes de heridas crónicas que no cicatrizan en un paciente varón negro de 44 años de edad con diabetes tipo II. Las bacterias no pueden visualizarse por la visualización convencional de luz blanca (a-g) usada en el examen clínico convencional de las heridas, b-h) imagen de fluorescencia correspondiente de las mismas heridas (excitación de 405 nm, emisión de 500-550 nm (verde), emisión de >600 nm (rojo)). Este paciente presentó múltiples heridas abiertas sin cicatrización. Los cultivos de frotis tomados de cada área de la herida usando la guía de imagen de fluorescencia revelaron los crecimientos abundantes de *Pseudomonas aeruginosa* (flecha amarilla) que tienen un color fluorescentes verde brillante, y *Serratia marcescens* (círculos) que tiene un color fluorescente rojo. (Barra de escala en cm).

- La Figura 24N es un diagrama esquemático que ilustra un ejemplo de un uso de dianas de "calibración", que pueden ser de diseño personalizado, multipropósito y/o desechables, para su uso durante la obtención de imágenes de heridas con el dispositivo de formación de imágenes. La tira, que en este ejemplo es adhesiva, puede contener una combinación de una o más de: herramientas de medición espacial (p. ej., escala de longitud), código de barras de información para integrar información médica específica del paciente y gradientes de concentración impregnados de tintes fluorescentes para calibración de la imagen de fluorescencia en tiempo real. Para este último, se pueden usar múltiples concentraciones de varios tintes fluorescentes exógenos u otros agentes de fluorescencia (p. ej., puntos cuánticos) para la calibración de intensidad de fluorescencia multiplexada, por ejemplo, cuando se usa más de una sonda exógena marcada con fluorescencia para imágenes moleculares de tejido/célula/moleculares dirigidas de heridas *in vivo*.

La Figura 24O muestra un ejemplo del uso de una realización del dispositivo de formación de imágenes para supervisar bacterias, por ejemplo, para supervisar una respuesta de tratamiento, a) imagen de microscopía de fluorescencia de una tinción de bacterias vivas/muertas vendida por Invitrogen Corp. (es decir, producto de BacLight), b) imagen de microscopía de fluorescencia de una tinción de marcado de bacterias con tinción de Gram vendida por Invitrogen Corp. Al usar el dispositivo de formación de imágenes (c) con dichos productos, las bacterias vivas (verdes) y muertas (rojas) (e) pueden distinguirse en tiempo real *ex vivo* (p. ej., en el frotis o la biopsia de tejido) seguido de un muestreo bacteriano de una herida, u otra superficie del cuerpo, por ejemplo, en el muestreo de la mejilla bucal oral, como en d). Esta tinción bacteriana de Gram en tiempo real o la evaluación basada en imágenes vivas/muertas pueden ser útiles para resultados de bacteriología en tiempo real o relativamente rápidos que se pueden usar para tratamientos de refinado, como antibióticos u otros tratamientos desinfectantes, o para supervisar la respuesta al tratamiento.

La Figura 24P muestra un ejemplo del uso del dispositivo usado para obtener imágenes de la infección de la uña del dedo del pie, a) luz blanca y b) autofluorescencia correspondiente del dedo del pie derecho de un sujeto que demuestra el contraste mejorado de la infección que proporciona la imagen de fluorescencia en comparación con la visualización de luz blanca (excitación de 405 nm, emisión de 500-550 nm (verde), emisión de >600 nm (rojo)).

La Figura 24Q muestra un ejemplo de imagen usando el dispositivo para supervisar la respuesta de la carne infectada por bacterias con un desinfectante (p. ej., peróxido de hidrógeno (Virox5TM)). a) Se preparó una muestra de tejido porcino *ex vivo* en placas de Petri y se contaminó con *Staphylococcus aureus* antes de la administración tópica de b) Virox5TM y la obtención de imágenes de fluorescencia (con un dispositivo manual), c). La descomposición del tejido comienza a ocurrir rápidamente, causada por el desinfectante, mientras que se observa un cambio en las características de fluorescencia de las bacterias (p. ej., el color de fluorescencia roja comienza a cambiar a un color de fluorescencia naranja, como se aprecia en d), especialmente después de una agitación suave de la muestra y con el tiempo, aquí aproximadamente 5 minutos de incubación con la solución Virox5TM. Estos datos sugieren el uso del dispositivo para supervisar la desinfección bacteriana, por ejemplo, en entornos clínicos y no clínicos (excitación de 405 nm; emisión de 490-550 nm y >600 nm).

Además de los profármacos que aumentan la fluorescencia, los avances en medicina han permitido el uso generalizado de biomarcadores fluorescentes para diagnosticar enfermedades a nivel molecular. La medición precisa de la señal del biomarcador fluorescente en tejidos biológicos puede ser un parámetro crítico para obtener información biomolecular sobre la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, pero históricamente ha planteado un desafío significativo. Hasta la fecha, este tipo de imágenes moleculares avanzadas no se ha notificado para el cuidado de heridas.

El dispositivo descrito en la presente memoria también se puede usar en combinación con fluorescentes, dispersantes de luz o agentes de contraste de fluorescencia exógenos absorbentes de luz que se pueden usar de forma pasiva y/o dirigidos a dianas moleculares únicas y específicas en la herida para mejorar la detección y el diagnóstico de la infección de la herida. Estas dianas pueden ser cualquier componente biológico y/o molecular en la herida o tejidos circundantes normales que tengan un valor de detección y/o diagnóstico conocido (p. ej., biomarcadores de tejidos normales y heridas). Todos los agentes exógenos pueden administrarse en la herida por vía tópica y/o sistémica, y pueden incluir, entre otros, cualquier agente/fármaco exógeno (p. ej., liposomas encapsulados, perlas u otros agentes vehiculares biocompatibles) que se puedan acoplar/conjugar con un resto fluorescente/dispersores apropiado seleccionado en longitud de onda apropiado (p. ej., tintes fluorescentes orgánicos, puntos cuánticos y otras nanopartículas semiconductoras fluorescentes, metales coloidales (p. ej., oro, plata, etc.)). Los agentes/sondas fluorescentes y/o dispersores de luz, y/o agentes/tintes cromogénicos (es decir, absorción) pueden prepararse usando técnicas de bioconjugación convencional para incluir restos para dirigirse a biomarcadores específicos. Dichos restos pueden incluir anticuerpos monoclonales (p. ej., enteros y/o fragmentos), y otros restos específicos de tejido (incluidos, entre otros, péptidos, oligómeros, aptámeros, moléculas de unión a receptores, inhibidores enzimáticos, toxinas, etc.). El dispositivo también se puede usar para obtener imágenes *in situ* de la expresión controlada por un promotor activable de proteínas generadoras de luz en modelos de heridas preclínicos. Además, las infecciones de la herida también pueden detectarse usando el dispositivo de formación de imágenes y luego tratarse con terapias fototérmicas, tales como las nanopartículas de oro que absorben la luz conjugadas con anticuerpos específicos que se dirigen específicamente a las bacterias.

La Figura 24R muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes usado para obtener imágenes de tintes/sondas/agentes fluorescentes en tejidos biológicos, a) la imagen de luz blanca de un trozo de carne (*ex vivo*) no revela la presencia de un tinte fluorescente, mientras que en b) el dispositivo permite la detección precisa de fluorescencia y la supervisión de la biodistribución del tinte fluorescente. Si bien se muestra para tejido *ex vivo*, estas capacidades se pueden trasladar a aplicaciones *in vivo* que incluyen, entre otros, imágenes de la biodistribución de fotosensibilizantes fluorescentes en tejidos para terapia fotodinámica (PDT) de heridas, cáncer, infección u otras enfermedades. Las imágenes de luz blanca pueden proporcionar un contexto anatómico para las imágenes de fluorescencia. Estas capacidades también se pueden usar para supervisar el fotoblanqueamiento de agentes fluorescentes (incluidos los fotosensibilizadores), así como para la administración guiada por imágenes de tratamientos múltiples de PDT (excitación de 405 nm, emisión de 500-550 nm (verde), emisión de >600 nm (rojo)). El dispositivo puede proporcionar supervisión de farmacocinética, biodistribución y/o fotoblanqueamiento en PDT. De

manera similar, el dispositivo puede ser útil para supervisar terapias de luz de bajo nivel.

El dispositivo también se puede usar con otros agentes de detección molecular, tales como "balizas moleculares" o "sondas inteligentes", que producen fluorescencia solo en presencia de dianas biológicas únicas y específicas (p. ej., enzimas asociadas con la salud de la herida). Dichas sondas pueden ser útiles para identificar especies bacterianas específicas o distintivos GRAM, por ejemplo. Por ejemplo, la curación de heridas cutáneas es un proceso altamente complejo que implica cinco fases superpuestas (inflamación, formación de tejido de granulación, epitelización, producción de matriz y remodelado) asociadas con una serie de eventos migratorios y de remodelado que se cree que requieren la acción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores, TIMPs. Los análisis *in vivo* de las heridas agudas y crónicas humanas, así como de una variedad de diferentes modelos de curación de heridas, han implicado un papel funcional de las MMP y los TIMP durante la reparación normal de las heridas, mientras que se cree que la desregulación de su actividad contribuye a la curación dañada de las heridas. La degradación de las matrices extracelulares es necesaria para eliminar el tejido dañado y las matrices provisionales y para permitir la formación de vasos y la reepitelización. En cambio, en las heridas crónicas o sin cicatrización, se piensa que la sobreexpresión de las proteínas en su forma inactiva contribuye a la patología subyacente e inhibe los procesos normales de reparación de tejidos. Las balizas moleculares son indicadores fluorescentes activables que usan el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para controlar la emisión de fluorescencia en respuesta a estímulos biológicos específicos. Por lo general, comprenden un enlazador específico de la enfermedad que acerca un colorante inhibidor a un fluoróforo para silenciar su fluorescencia. Tras las interacciones específicas entre el enlazador y la diana (p. ej., la hibridación de ácidos nucleicos, la escisión del péptido específico de la proteasa, la escisión de los fosfolípidos específicos de la fosfolipasa), el colorante inhibidor se retira de la vecindad del fluoróforo para restaurar su fluorescencia. Estas sondas inteligentes pueden ofrecer varios órdenes de sensibilidad de magnitud que dirigen las sondas debido al alto grado incorporado de amplificación de señal desde no fluorescente hasta altamente fluorescente. Dependiendo de sus interacciones específicas del enlazador-diana, también pueden ser capaces de interrogar anomalías moleculares específicas en los niveles de expresión de proteínas o genes. Debido a estas ventajas, las sondas inteligentes han sido recientemente aclamadas como "un salto cuántico" en comparación con las sondas tradicionales para la detección temprana del cáncer. Dichos agentes exógenos se pueden usar, por ejemplo, para la detección óptica relativamente rápida, no invasiva, sensible y específica de infecciones de la herida, para identificar especies bacterianas/microorganismos específicos presentes y diagnóstico microbiano *in situ*, para supervisar el estado de salud de la herida, y notificar en tiempo real acerca de la efectividad del tratamiento y el cuidado.

Además, cuando se usa en combinación con agentes ópticos exógenos, el dispositivo se puede usar para identificar a los pacientes que responden mínimamente a diversos tratamientos establecidos y experimentales, lo que permite una rápida evaluación cuantitativa visual no invasiva o sin contacto de la respuesta al tratamiento para cambios oportunos en la terapia a fin de optimizar los desenlaces clínicos del tratamiento.

Además, la supervisión en tiempo real de los efectos antimicrobianos *in vitro* y en sistemas de prueba de modelos animales usando el dispositivo de formación de imágenes puede mejorar la comprensión básica de la acción de los antibióticos y facilitar estudios únicos de enfermedades *in vivo*.

Ejemplos

La Figura 5 muestra un ejemplo del dispositivo que se usa para la detección autofluorescente no invasiva de colágeno y varía las especies bacterianas en la superficie de la piel de una muestra de carne de cerdo. A diferencia de las imágenes de luz blanca, las imágenes de autofluorescencia pudieron detectar la presencia de varias especies bacterianas 24 h después de que se aplicaron por vía tópica en pequeñas incisiones hechas en la piel (es decir, *streptococcus pyogenes*, *serratia marcescens*, *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermidis*, *escherichia coli*, y *pseudomonas aeruginosa*). a) muestra imágenes de luz blanca de la carne de cerdo usada para la prueba. Se aplicaron varias especies bacterianas a pequeñas incisiones hechas en la piel en el día 0, y se marcaron de la siguiente manera: 1) *streptococcus pyogenes*, 2) *serratia marcescens*, 3) *staphylococcus aureus*, 4) *staphylococcus epidermidis*, 5) *escherichia coli*, y 6) *pseudomonas aeruginosa*. El dispositivo de formación de imágenes se usó para detectar colágeno y autofluorescencia bacteriana a lo largo del tiempo. La fluorescencia del tejido conectivo fue intensa y también se detectó fácilmente. Algunas especies bacterianas (p. ej., *pseudomonas aeruginosa*) producen una autofluorescencia verde significativa (450-505 nm) que saturó la cámara del dispositivo, b) muestra la imagen de autofluorescencia en el día 0, ampliada en c).

El dispositivo también fue capaz de detectar la propagación de las bacterias sobre la superficie de la carne a lo largo del tiempo. d) muestra una imagen en el día 1, y f) muestra una imagen en el día 3, ya que la muestra de carne se mantuvo a 37 °C. Se puede observar una fluorescencia roja en algunos de los sitios de la herida (5, 6) en c). Como se muestra en d) y amplificado en e), después de 24 h, el dispositivo detecta un aumento dramático en la autofluorescencia bacteriana del sitio de la herida 5) *escherichia coli* y 6) *pseudomonas aeruginosa*, produciendo esta última una significativa autofluorescencia verde y roja. c) y e) muestran el dispositivo que detecta la fluorescencia usando una banda dual (450-505 nm verde y 590-650 nm) a la izquierda y un filtro de banda única (635 +/- 10 nm) a la derecha, de la superficie de la herida. Como se muestra en f), en el día 3, el dispositivo detecta el aumento significativo en la autofluorescencia bacteriana (en verde y rojo) de los otros sitios de la herida, así como

la contaminación bacteriana (indicada por la flecha en f) en el recipiente de poliestireno extruido en el que se conservó la muestra de carne. El dispositivo también fue capaz de detectar la propagación de las bacterias sobre la superficie de la carne. Esto demuestra la detección en tiempo real de especies bacterianas en las heridas simuladas, el crecimiento de esas bacterias a lo largo del tiempo y la capacidad del dispositivo para proporcionar supervisión longitudinal del crecimiento bacteriano en las heridas. El dispositivo puede ofrecer información crítica sobre la biodistribución de las bacterias en la superficie de la herida que puede ser útil para dirigir el muestreo bacteriano y las biopsias de tejidos. Observe, en d) y f), la intensa señal de fluorescencia verde del colágeno endógeno en el borde de la muestra de carne de cerdo.

Este ejemplo demuestra el uso del dispositivo para la detección en tiempo real de cambios biológicos en el tejido conjuntivo y el crecimiento bacteriano basándose solo en la autofluorescencia, lo que sugiere una capacidad práctica del dispositivo para proporcionar supervisión longitudinal del crecimiento bacteriano en las heridas.

Ahora se hace referencia a la Figura 6, que muestra ejemplos del dispositivo usado para la detección de autofluorescencia de tejidos conectivos (p. ej., colágeno, elastina) y bacterias en la superficie muscular de una muestra de carne de cerdo, a) muestra que la imagen de luz blanca de la carne de cerdo usada para las pruebas no muestra signos evidentes de contaminación o deterioro bacteriano microbiano. Sin embargo, como se aprecia en b), las imágenes de la misma área con el dispositivo bajo excitación con luz azul/violeta revelaron un área fluorescente roja brillante del músculo que indica el potencial de contaminación bacteriana en comparación con el lado adyacente del músculo. En el borde de la piel también se puede observar una autofluorescencia de colágeno extremadamente verde brillante. En c), el dispositivo se usó para interrogar quirúrgicamente fluorescencia roja sospechosa para proporcionar una biopsia dirigida para patología o bacteriología posterior. Tenga en cuenta también la capacidad del dispositivo para detectar por fluorescencia la contaminación (flecha) del instrumento quirúrgico (p. ej., fórceps) durante la cirugía. En d), el dispositivo se usó para dirigir la colección de espectroscopia de fluorescencia usando una sonda de fibra óptica de un área que se sospecha que está infectada por bacterias (el recuadro muestra el dispositivo que se está usando para dirigir la sonda de espectroscopia en la misma área del músculo fluorescente rojo en b, c). e) muestra un ejemplo del dispositivo que se usa para detectar la contaminación por varias películas delgadas de bacterias en la superficie del recipiente de poliestireno extruido en el que se mantuvo la muestra de carne. La autofluorescencia de las bacterias aparece como vetas de fluorescencia verde y roja bajo luz de excitación violeta/azul de las diversas especies bacterianas aplicadas previamente a la carne. Por consiguiente, el dispositivo es capaz de detectar bacterias en superficies no biológicas donde están ocultas bajo la observación de luz blanca convencional (como en a).

Además de la detección de bacterias en heridas y en la superficie de la piel, el dispositivo también fue capaz de identificar áreas sospechosas de tejido muscular, que luego pueden ser interrogadas mediante cirugía o biopsia dirigida para verificación patológica, o por otros medios ópticos tales como espectroscopia de fluorescencia usando una sonda de fibra óptica. Además, se detectó contaminación por varias bacterias en la superficie del recipiente de poliestireno extruido en el que se mantuvo la muestra de carne. La autofluorescencia de las bacterias aparece como vetas de fluorescencia verde y roja bajo luz de excitación violeta/azul de las diversas especies bacterianas aplicadas previamente a la carne.

Para determinar las características de autofluorescencia de las bacterias que crecen en cultivo y en las heridas cutáneas simuladas, se usaron imágenes de fluorescencia hiperespectral/multiespectral para medir cuantitativamente los espectros de intensidad de fluorescencia de las bacterias bajo la excitación con luz azul/violeta. Ahora se hace referencia a la Figura 7. En la Figura 7, el dispositivo se usó para detectar la fluorescencia de bacterias que crecen en placas de agar y en la superficie de una herida simulada en carne de cerdo, como se ha analizado anteriormente para las Figuras 4 y 5. La autofluorescencia bacteriana se detectó en los intervalos de longitud de onda verde y roja usando el dispositivo en el cultivo (a) y en muestras de carne (d). Se usaron imágenes hiperespectrales/multiespectrales para obtener imágenes de las bacterias (*E. Coli*) en el cultivo (b) y para medir los espectros cuantitativos de intensidad de fluorescencia de las bacterias (línea roja: porfirinas, verde, citoplasma, azul, fondo de agar) (c). La flecha roja muestra el pico de 635 nm de fluorescencia de porfirina detectado en las bacterias. La imagen hiperespectral/multiespectral también confirmó la fuerte fluorescencia verde (*, cuadrado derecho en d) de *P. aeruginosa* (con poca fluorescencia de porfirina, línea amarilla en f) en comparación con *E. coli* (cuadrado izquierdo en d) donde se detectó una fluorescencia de rojo de porfirina significativa e) y g) muestran las imágenes hiperespectrales/multiespectrales codificadas por colores correspondientes a *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente, de la superficie de la carne después de 2 días de crecimiento (incubada a 37 °C); y f) y h) muestran la correspondiente espectroscopia de fluorescencia codificada por colores. En i), también se midieron matrices de excitación-emisión (EEM) para las diversas especies bacterianas en solución, lo que demuestra la capacidad de seleccionar los anchos de banda óptimos de longitud de onda de excitación y emisión para su uso con filtros ópticos en el dispositivo de imágenes. El EEM para *E. coli* muestra una fuerte fluorescencia verde y una importante fluorescencia roja de las porfirinas bacterianas endógenas (flecha).

Este ejemplo muestra que las bacterias emiten autofluorescencia verde y roja, con algunas especies (p. ej., *pseudomonas aeruginosa*) que producen más de las primeras. *Escherichia coli* produjo una autofluorescencia roja significativa a partir de porfirinas endógenas. Dichas diferencias espectrales intrínsecas entre especies bacterianas son significativas porque pueden proporcionar un medio para diferenciar entre diferentes especies bacterianas

usando autofluorescencia sola. También se midieron matrices de excitación-emisión (EEM) para cada una de las especies bacterianas usadas en estos estudios piloto, que confirmaron que bajo la excitación con luz azul/violeta, todas las especies producían una fluorescencia verde y/o roja significativa, esta última producida por porfirinas. La información espectral derivada de matrices de excitación-emisión puede ayudar a optimizar la selección de anchos de banda de longitud de onda de excitación y emisión para uso con filtros ópticos en el dispositivo de formación de imágenes para permitir la diferenciación de especies inter-bacterianas *ex vivo* e *in vivo*. De esta manera, el dispositivo se puede usar para detectar cambios sutiles en la presencia y cantidad de tejidos conectivos endógenos (p. ej., colágenos y elastinas), así como bacterias y/u otros microorganismos, como levaduras, hongos y moho en las heridas y tejidos normales circundantes, basados en distintivos de autofluorescencia únicos de estos componentes biológicos.

Además de los profármacos que mejoran la fluorescencia, los avances en medicina han permitido el uso generalizado de biomarcadores fluorescentes para diagnosticar enfermedades a nivel molecular. La medición precisa de la señal del biomarcador fluorescente en tejidos biológicos puede ser un parámetro crítico para obtener información biomolecular sobre la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, pero históricamente ha planteado un desafío significativo. Hasta la fecha, este tipo de imágenes moleculares avanzadas no se ha notificado para el cuidado de heridas. Con el uso del dispositivo descrito aquí, puede ser posible obtener imágenes y supervisar dichos biomarcadores con fines de diagnóstico.

Imágenes de modelos de heridas usando agentes de contraste exógenos

Cuando se usan para evaluar heridas, las imágenes de autofluorescencia tisular pueden detectar cambios relativos en el remodelado del tejido conectivo durante la curación de la herida, así como la presencia temprana de bacterias que contaminan, colonizan y/o infectan heridas (incluyendo, entre otros, la producción inducida por bacterias del exudado e inflamación de la herida). Cuando la mayoría de las heridas se iluminan con luz violeta/azul, los tejidos endógenos en la matriz del tejido conectivo (p. ej., colágeno y elastina) emiten una señal fluorescente verde fuerte característica, mientras que las bacterias endógenas emiten una señal de fluorescencia roja única debido a la producción de porfirinas endógenas. Estas bacterias incluyen, pero no se limitan a, especies comunes que se encuentran normalmente en los sitios de la herida (p. ej., especies de *staphylococcus*, *streptococcus*, *E. coli* y *pseudomonas*). Al usar la autofluorescencia, la información crítica de la herida se obtiene en tiempo real para proporcionar un medio de detección temprana de determinantes biológicos claves del estado de salud de la herida, lo que puede ayudar a estratificar a los pacientes para un cuidado y tratamiento optimizados de la herida.

El profármaco ácido aminolevulínico (ALA) induce la formación de porfirina en casi todas las células vivas. Muchas especies de bacterias expuestas al ALA pueden inducir la fluorescencia de la protoporfirina IX (PpIX) [Dietel *et al.*, (2007). Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 86: 77-86]. Se investigó el uso de ALA de dosis ultra baja para inducir la formación de PpIX en las bacterias y, por lo tanto, aumentar la emisión de fluorescencia roja, a fin de aumentar el contraste de fluorescencia de rojo a verde de las bacterias con el dispositivo de formación de imágenes. El dispositivo se usó para obtener imágenes de cultivos bacterianos vivos (*staphylococcus aureus*, cultivado en placas de agar durante 24 h antes de la obtención de imágenes) usando luz de excitación azul/violeta, como se aprecia en la Figura 8, que demuestra el dispositivo que se está usando en un laboratorio de bacteriología/cultivo.

En a), el dispositivo se usó para obtener imágenes de cultivos bacterianos vivos (*staphylococcus aureus*, cultivados en placas de agar durante 24 h antes de la obtención de imágenes) bajo luz blanca (círculos). En b), la luz de excitación violeta/azul revela la autofluorescencia bacteriana roja, que se puede distinguir de la autofluorescencia verde débil de fondo del medio de crecimiento de agar. En c), para aumentar el contraste de fluorescencia de rojo a verde del *staphylococcus aureus* contra el agar de fondo, usado habitualmente una dosis ultra baja (~20 µg/ml) del fotosensibilizador ácido aminolevulínico (ALA, en solución salina tamponada con fosfato) en la terapia fotodinámica (PDT) se agregó tópicamente a algunas de las colonias en la placa de agar (identificadas como "ALA +" en los círculos), mientras que el resto de la placa de agar fue negativo a ALA. Después de 30 minutos de incubación a 37 °C, el dispositivo se usó nuevamente para obtener imágenes de la placa de agar bajo excitación con luz azul/violeta, revelando así un aumento significativo en la fluorescencia roja (de la protoporfirina IX PpIX inducida por ALA,) de bacterias de *staphylococcus aureus*, en comparación con las colonias (cuadradas) que no recibieron ALA. La comparación de b) con c) muestra que la adición de ALA puede ser beneficiosa para el aumento de la fluorescencia bacteriana. d) muestra la imagen RGB de c) con la fluorescencia verde de la placa de agar eliminada, lo que revela el aumento de la fluorescencia bacteriana roja en las colonias de *s. aureus* tratadas con ALA. Esto demuestra la capacidad del dispositivo para explotar el uso de estrategias de agentes de contraste para aumentar la señal al fondo para la detección sensible de bacterias, por ejemplo, en heridas. El tiempo necesario para que el ALA aumente la fluorescencia de PpIX a niveles detectables fue de 30 minutos, lo que sugiere que este enfoque técnico también puede ser clínicamente práctico. Es más, esto también demuestra que el dispositivo se puede usar para obtener imágenes de fluorescencia fotosensibilizadora (p. ej., PpIX) en bacterias, que crecen en cultivo o en heridas de pacientes para el tratamiento posterior con PDT.

Después de 30 minutos de incubación de *staphylococcus aureus* ~20 µg/ml de ALA a 37 °C, se detectó un aumento significativo en la fluorescencia roja de las bacterias, en comparación con aquellas colonias (cuadrado) que no

recibieron ALA. Esto demuestra la capacidad del dispositivo para explotar el uso de estrategias de agentes de contraste para aumentar la señal al fondo para la detección sensible de bacterias, por ejemplo, en heridas. El tiempo necesario para que el ALA aumente la fluorescencia PpIX de las bacterias en cultivo a niveles significativos fue de aproximadamente 0,5 h, lo que sugiere que este enfoque técnico también puede ser clínicamente práctico. Las pruebas en muestras de carne simuladas contaminadas con bacterias revelaron resultados similares a los obtenidos a partir de cultivos bacterianos. La aplicación tópica de 0,2 µg/ml de ALA mediante pulverización sobre heridas en la piel de cerdo produjo un aumento espectacular del contraste de fluorescencia roja de porfirina bacteriana aproximadamente 2 h después de la administración de ALA. Esto puede permitir la detección de contaminación bacteriana con imágenes de fluorescencia en los sitios de la herida y en cualquier otra parte de la superficie de la piel, que anteriormente estaba oculta bajo imágenes de luz blanca, como se demostró con referencia a las Figuras 9 y 10.

La Figura 9 muestra ejemplos de uso del dispositivo para la detección de autofluorescencia de tejidos conectivos y varía las especies bacterianas en la superficie de la piel de una muestra de carne de cerdo. Para determinar si la intensidad de la fluorescencia bacteriana se puede aumentar para obtener imágenes con el dispositivo, se aplicó el profármaco ácido aminolevulínico no tóxico (ALA) (~0,2 mg/ml PBS) tópicamente a la superficie de la piel mediante pulverización usando un botella atomizadora. La muestra de carne se colocó luego en un incubador hermético a la luz a 37 °C durante aproximadamente 3-4 h hasta que se realizó la luz blanca y la imagen de fluorescencia usando el dispositivo de formación de imágenes.

Haciendo referencia a la Figura 9, a) muestra imágenes de luz blanca de la carne de cerdo usada para la prueba. En b), se aplicaron varias especies bacterianas a pequeñas incisiones en la piel [(1) *streptococcus pyogenes*, 2) *serratia marcescens*, 3) *staphylococcus aureus*, 4) *staphylococcus epidermidis*, 5) *escherichia coli*, y 6) *pseudomonas aeruginosa*]. Bajo luz de excitación violeta/azul, el dispositivo muestra autofluorescencia bacteriana (fluorescencia verde y roja en los sitios de la herida). La presencia de fluorescencia roja de porfirina endógena también se puede observar en otras áreas de la superficie de la piel (flecha roja). La fluorescencia del colágeno brillante también se puede observar en el borde de la muestra (flecha azul). Las bacterias en la superficie del recipiente de poliestireno extruido que contiene la muestra de carne, también se detectan mediante autofluorescencia con el dispositivo, pero están ocultas bajo luz blanca (panel izquierdo). Esto indica que el dispositivo se puede usar para detectar y formar imágenes de la presencia de bacterias o microbios y otros patógenos en una variedad de superficies, materiales, instrumentos (p. ej., instrumentos quirúrgicos) en hospitales, centros de atención crónica, asilos para ancianos y otros entornos de atención médica donde la contaminación puede ser la principal fuente de infección. El dispositivo se puede usar junto con la detección, identificación y enumeración convencional de organismos indicadores y estrategias de patógenos.

En c), se aplicó tópicamente el profármaco ácido aminolevulínico no tóxico (ALA) (0,2 mg/ml) tópicamente a la superficie de la piel para determinar si se puede mejorar la fluorescencia bacteriana. El resultado, aproximadamente 1 h después de la administración de ALA, fue un aumento dramático en la fluorescencia de la porfirina bacteriana (fluorescencia roja brillante) tanto en el tejido de la piel como en los sitios de la herida, así como en la superficie del recipiente de poliestireno extruido en el que se mantuvo la muestra de carne (flechas). Esto ilustra las posibilidades para la orientación de la biopsia por guía de imagen de fluorescencia, y el uso del dispositivo para la detección y posterior tratamiento de áreas infectadas usando PDT, por ejemplo.

La Figura 10 muestra ejemplos del uso del dispositivo para la detección de la infección bacteriana con contraste de fluorescencia en una muestra de carne de cerdo, a) muestra la imagen en luz blanca de la carne de cerdo. Se aplicaron varias especies bacterianas a pequeñas incisiones hechas en la piel (flecha). En b), se aplicó tópicamente el profármaco ácido aminolevulínico (ALA) no tóxico (0,2 µg/ml) por vía tópica mediante pulverización usando una botella atomizadora común y se usó el dispositivo de formación de imágenes para obtener imágenes de la fluorescencia roja protoporfirina IX (PpIX) inducida por ALA resultante. Las imágenes de la superficie de la piel (aproximadamente 2 h después de la administración de ALA) con luz violeta/azul (405 nm) dieron como resultado un aumento espectacular del contraste de fluorescencia roja de la porfirina bacteriana que indica la detección de la presencia de contaminación bacteriana con imágenes de fluorescencia en las incisiones de la herida quirúrgica simulada (flechas) y en otras partes de la superficie de la piel, que antes estaban ocultas bajo imágenes de luz blanca (círculo en a y b). Tenga en cuenta que algunas áreas de la superficie de la piel que no se expusieron al oxígeno debido a que la muestra se colocó "bajo la piel" en el recipiente no emiten fluorescencia de color rojo brillante, posiblemente debido a la sospecha de dependencia del oxígeno para la producción bacteriana de PpIX. Algunas bacterias producen señales de autofluorescencia verde brillante que también son detectadas por el dispositivo. En c), en otra muestra de carne de cerdo, las bacterias ocultas bajo imágenes de luz blanca (círculo) se detectan fácilmente usando imágenes de autofluorescencia solamente (recuadro). Sin embargo, como se muestra en d), la aplicación tópica de ALA en dosis bajas causó un aumento dramático en la fluorescencia bacteriana después de 2 h, lo que demuestra la utilidad de los profármacos exógenos como agentes potenciadores del contraste de imagen de fluorescencia para una mejor detección de la contaminación bacteriana. Tenga en cuenta la autofluorescencia verde brillante de colágeno endógeno y elastinas en los tejidos conectivos en la muestra. En e) y f), la fluorescencia inducida por ALA permitió la detección de bacterias ocultas en la superficie de la piel (círculos), lo que ofrece la posibilidad de dirigir una biopsia guiada por imagen y el uso del dispositivo para la detección y el tratamiento posterior de áreas infectadas mediante PDT, por ejemplo.

El dispositivo también se puede usar junto con agentes pro-fármacos exógenos, que incluyen, entre otros, ALA que está aprobado por la FDA para indicaciones terapéuticas clínicas, para aumentar la producción endógena de porfirinas en bacterias/microorganismos y aumentar así las intensidades de señales de fluorescencia "porfirina" únicas que emanan de estas bacterias para mejorar la sensibilidad de detección y la especificidad del dispositivo. Por lo tanto, el dispositivo se puede usar para visualizar de manera conveniente la fluorescencia inducida por fotosensibilizador (p. ej., PpIX) en bacterias, que crecen en cultivo o en heridas de pacientes para su posterior muestreo o biopsia dirigida guiada por imágenes, o tratamiento con terapia fotodinámica (PDT) [Jori *et al.* *Láseres Surg Med.* junio de 2006; 38 (5): 468-81; Dougherty *et al.* (1998) *J. Natl. Inst. Cancer* 90, 889-905; Carruth (1998) *Int. J. Clin. Pract.* 52, 39-42; Bissonnette *et al.* (1997) *Dermatol. Clin* 15, 507-519]. La PDT puede proporcionar un complemento al tratamiento antibiótico actual o una alternativa en la que los antibióticos ya no funcionan (p. ej., cepas resistentes a los medicamentos). La evidencia disponible sugiere que las cepas resistentes a múltiples antibióticos son tan fácilmente destruidas por la PDT como las cepas naíves, y que las bacterias pueden no desarrollar fácilmente resistencia a la PDT. Esto puede ser vital para el tratamiento de heridas en pacientes sometidos a terapia contra el cáncer, pacientes con VIH que demuestran resistencia a los antibióticos y ancianos con infecciones orales persistentes [Hamblin *et al.* (2004) *Photochem Photobiol Sci.* 3:436-50].

El dispositivo se puede usar para detectar bacterias o microorganismos en la herida y en los tejidos normales circundantes usando luz azul/violeta de excitación/iluminación de baja potencia, pero también se puede usar inmediatamente después para destruirlos, por ejemplo, usando PDT u otras terapias. Mediante el uso de luz roja de excitación/iluminación de alta potencia, las porfirinas endógenas en bacterias o microorganismos pueden ser destruidas en el sitio de la herida por PDT. Por lo tanto, este dispositivo puede tener la capacidad de servir como un instrumento todo en uno no invasivo o sin contacto de "buscar y tratar" para el cuidado de heridas clínicas. Además, una vez que se detectan bacterias o microorganismos, el dispositivo se puede usar para tratar y/o desinfectar el sitio de la herida con PDT, y luego se puede volver a tomar una imagen del sitio para determinar la eficacia del tratamiento con PDT. En algunas realizaciones, el dispositivo puede usarse solo con fines de detección/diagnóstico y no puede realizar ningún tratamiento terapéutico por sí mismo. El dispositivo se puede usar de manera continua hasta que la herida completa y el tejido normal circundante se hayan desinfectado, y la herida se pueda supervisar posteriormente de manera longitudinal como parte del seguimiento clínico convencional. Las imágenes de fluorescencia del dispositivo se pueden usar para determinar la biodistribución del fotosensibilizador o fotoproductos PDT [Gudgin *et al.* (1995) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 29, 91-93; König *et al.* (1993) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 18, 287-290], ya que la mayoría de estos son intrínsecamente fluorescentes, y por lo tanto el dispositivo puede servir como un medio para dirigir la luz de tratamiento de PDT. Por lo tanto, el dispositivo puede guiar, mediante formación de imágenes, la integridad del tratamiento con PDT. De manera similar, el dispositivo puede usarse para guiar otras terapias.

Dado que se sabe que algunos fotosensibilizadores se fotoblanquean [Jongen *et al.* (1997) *Fis. Med. Biol.* 42, 1701-1716; Georgakoudi *et al.* (1997) *Photochem. Photobiol.* 65, 135-144; Rhodes *et al.* (1997) *J. Investig. Dermatol.* 108, 87-91; Grossweiner (1986) *Lasers Surg. Med.* 6, 462-466; Robinson *et al.* (1998) *Photochem. Photobiol.* 67, 140-149; Rotomskis *et al.* (1996) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 33, 61-67], la capacidad de obtención de imágenes de fluorescencia del dispositivo se puede usar para determinar el grado o la velocidad de fotoblanqueamiento del fotosensibilizador. Esta información puede ser útil para optimizar la dosimetría de PDT [Grossweiner (1997) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 38, 258-268] a fin de asegurar un tratamiento adecuado de la enfermedad, al mismo tiempo que minimiza el daño a los tejidos normales circundantes. El dispositivo, con fuentes de luz de excitación que pueden seleccionarse para longitudes de onda e intensidades de excitación específicas, en una realización, puede usarse para suministrar también la luz para PDT combinada con cualquier fotosensibilizador de PDT disponible comercialmente y/o experimental. Por lo tanto, puede tener utilidad en las indicaciones clínicas de PDT existentes (p. ej., para la superficie de la piel u órganos huecos) y/o en el ámbito de la investigación comercial/académica y el desarrollo de futuros agentes fotosensibles de la PDT, tanto preclínica como clínicamente.

La Figura 10G muestra un ejemplo del uso del dispositivo para supervisar la respuesta de las bacterias a la terapia fotodinámica (PDT). Se prepararon tejidos porcinos *ex vivo* en placas de Petri y se contaminaron con *Staphylococcus aureus* bioluminiscente (BL) 24 h antes de la BL y la imagen de fluorescencia de las muestras usando el dispositivo. Las imágenes de fluorescencia bioluminiscentes y correspondientes se realizaron en a, d) tejidos musculares no contaminados, y b, e) contaminados con SA antes y después de la PDT. Tenga en cuenta que *Staphylococcus aureus* produjo un color rojo fluorescente (flecha blanca en e). La PDT se realizó en la muestra de carne contaminada con bacterias (marcada con un círculo amarillo) incubando la muestra con un fotosensibilizador común llamado azul de metileno (MB) durante aproximadamente 30 minutos, seguido de la eliminación del exceso de MB (y enjuague con PBS) y la exposición posterior a una fuente de luz de aproximadamente 670 nm (aquí una matriz de LED) durante unos 10 minutos a $\sim 10 \text{ J/cm}^2$ para causar el tratamiento fotodinámico. La comparación de las escalas de intensidad de BL en b) y c) muestra una marcada disminución en la intensidad de BL en la muestra de carne tratada después de la PDT (p. ej., la PDT ha destruido una proporción medible de las bacterias bioluminiscentes, disminuyendo así la intensidad de la señal de BL) y las características de fluorescencia (p. ej., la intensidad y la biodistribución) de la bacteria *Staphylococcus aureus* (color rojo) se pueden ver usando el dispositivo de formación de imágenes manual después de la PDT. Tenga en cuenta que la intensa fluorescencia verde en la muestra de carne (flecha rosa en e) fue causada por una contaminación cruzada involuntaria de la muestra de carne

por *Pseudomonas aeruginosa* no BL durante el experimento (confirmada por bacteriología), y el dispositivo detectó esto. Estos datos sugieren el uso del dispositivo para supervisar el uso de PDT para el tratamiento de la contaminación bacteriana en muestras biológicas (y no biológicas). (405 nm de excitación; 490-550 nm y >600 nm de emisión).

Este dispositivo se puede usar como dispositivo de formación de imágenes y/o supervisión en laboratorios de microbiología clínica. Por ejemplo, el dispositivo se puede usar para obtener imágenes cuantitativas de colonias bacterianas y cuantificar el crecimiento de colonias en ensayos de microbiología comunes. Las imágenes de fluorescencia de las colonias bacterianas se pueden usar para determinar la cinética del crecimiento.

Obtención de imágenes de sangre en heridas

La angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, es un importante proceso natural requerido para curar heridas y para restaurar el flujo sanguíneo a los tejidos después de una lesión o traumatismo. Las terapias para la angiogénesis, que están diseñadas para "activar" el nuevo crecimiento capilar, están revolucionando la medicina al proporcionar un enfoque unificado para el tratamiento de afecciones paralizantes y que ponen en peligro la vida. La angiogénesis es un proceso fisiológico requerido para la curación de heridas. Inmediatamente después de la lesión, la angiogénesis se inicia por múltiples señales moleculares, que incluyen factores hemostáticos, inflamación, factores de crecimiento de citoquinas e interacciones entre la célula y la matriz. Los nuevos capilares proliferan a través de una cascada de eventos biológicos para formar tejido de granulación en el lecho de la herida. Este proceso puede mantenerse hasta las etapas terminales de la curación, cuando la angiogénesis se detiene por niveles disminuidos de factores de crecimiento, resolución de la inflamación, matriz tisular estabilizada e inhibidores endógenos de la angiogénesis. Los defectos en la vía de angiogénesis alteran la granulación y retrasan la curación, y estos son evidentes en las heridas crónicas [Tonnesen *et al.* (2000) *J Invest Dermatol Symp Proc.* 5(1):40-6]. Al iluminar la superficie del tejido con bandas de longitud de onda estrechas seleccionadas (p. ej., componentes azul, verde y rojo) de luz o detectando la reflectancia de la luz blanca en varios anchos de banda estrechos del espectro visible (p. ej., longitudes de onda seleccionadas de absorción máxima del espectro de absorción de sangre de luz blanca), el dispositivo también se puede usar para obtener imágenes de la presencia de redes de sangre y microvasculares dentro de la herida y alrededor de la misma, incluido el tejido normal circundante, lo que también revela áreas de eritema e inflamación.

Ahora se hace referencia a la Figura 11. El dispositivo puede usar filtros ópticos individuales (p. ej., 405 nm, 546 nm, 600 nm, +/- 25 nm cada uno) para demostrar la posibilidad de obtener imágenes de sangre y microvasculatura en heridas. Las imágenes de luz blanca de una herida se pueden recopilar con el dispositivo y luego con el dispositivo, equipado con un filtro de paso de banda triple (p. ej., 405 nm, 546 nm, 600 nm, +/- 25 nm cada uno), colocado frente al detector de formación de imágenes puede visualizar los anchos de banda estrechos separados de los componentes de luz reflejada de azul (A), verde (V) y rojo (R) de la herida. Estas bandas de longitud de onda pueden seleccionarse en función de las longitudes de onda de absorción máximas de la sangre, que contienen hemoglobina oxigenada y desoxigenada, en el intervalo de longitud de onda de luz visible. Las imágenes resultantes pueden producir la absorción relativa, y por lo tanto la reflectancia, de la luz visible por la sangre en el campo de visión. La imagen de "absorción de sangre" resultante produce una imagen de alto contraste de la presencia de redes de sangre y/o microvasculares en la herida y en los tejidos normales circundantes. El médico puede seleccionar el conjunto de filtros ópticos apropiado para su uso con el dispositivo para obtener imágenes de la sangre y/o la distribución microvascular en la herida y combinar esta información con una o ambas imágenes de autofluorescencia e imágenes con agentes de contraste exógenos. Esto puede proporcionar un conjunto de información global sobre la herida y los tejidos normales circundantes en los niveles morfológico, topográfico, anatómico, fisiológico, biológico y molecular, que actualmente puede no ser posible dentro de la práctica convencional del cuidado de heridas.

La Figura 11 muestra ejemplos del dispositivo usado para obtener imágenes de sangre y microvasculatura en heridas. El dispositivo se usó para obtener imágenes de un pedazo de papel de filtro teñido con sangre (a) y la oreja de un ratón durante la cirugía (b). Se recogieron imágenes de luz blanca de cada espécimen usando el dispositivo de formación de imágenes, en modo no fluorescente, y luego se equipó con un filtro de paso de banda triple colocado frente al detector de formación de imágenes (405 nm, 546 nm, 600 nm, +/- 25 nm cada uno) para obtener imágenes de los anchos de banda estrechos separados de los componentes de luz reflejada azul (A), verde (V) y rojo (R) de los especímenes. Estas bandas de longitud de onda se seleccionaron en función de las longitudes de onda de absorción máxima de la sangre en el intervalo de longitud de onda de la luz visible (recuadro en a) muestra el perfil espectral de absorción de la hemoglobina oxigenada y desoxigenada en la sangre. Esto muestra que al usar un filtro de transmisión multibanda simple, es posible combinar las tres imágenes A, V, R en una sola imagen de "equivalente de luz blanca" que mide la absorción relativa de luz por la sangre en el campo de visión. La imagen de "absorción de sangre" resultante produce una imagen de alto contraste de la presencia de sangre que contiene hemoglobina oxigenada y desoxigenada. El dispositivo se puede usar con filtros de ancho de banda más estrechos para obtener imágenes de mayor contraste de absorción de sangre en heridas, por ejemplo.

La regulación de la angiogénesis a lo largo del tiempo durante la reparación de la herida *in vivo* ha sido en gran parte inexplorada, debido a las dificultades en la observación de eventos en los vasos sanguíneos. Aunque las

pruebas iniciales del dispositivo de formación de imágenes fueron exploratorias, la modificación simple del prototipo existente puede permitir la obtención de imágenes longitudinales de cambios dinámicos en el suministro de sangre y las redes microvasculares durante el proceso de curación de heridas *in vivo*.

5 Imagen de la piel y cavidad bucal

Este dispositivo puede ser adecuado para obtener imágenes de la piel, la boca y la cavidad bucal. El dispositivo puede permitir la detección de cambios en el tejido conectivo debido a lesiones cutáneas menores (p. ej., cortes, abrasiones) y bacterias endógenas que se encuentran comúnmente en la piel normal (p. ej., *Propionibacterium*

10 *acnes* o *P. acnes*).

Este dispositivo también puede ser adecuado para imágenes multispectrales y/o supervisión de placas dentales, portadores y/o cánceres en la cavidad bucal. El dispositivo se puede usar para detectar la presencia de placas, enfermedades periodontales, portadores y cánceres, así como infecciones bucales locales, basadas en la presencia

15 de distintivos de autofluorescencia únicos en tejidos anormales o neoplásicos. El dispositivo puede usar luz blanca, fluorescencia, con o sin autofluorescencia o agentes fluorescentes exógenos, e imágenes de reflectancia para proporcionar detección y diagnóstico en tiempo real de enfermedades periodontales, placas, y portadores y cánceres en la cavidad bucal. El dispositivo puede grabar las imágenes para la catalogación de historiales médicos. A diferencia del enfoque de visión directa (es decir, a simple vista) usado por un producto existente tal como el

20 Sistema VELscope, por la compañía con sede en Vancouver LED Medical Diagnostics Inc. (LED-MD), el presente dispositivo puede proporcionar imágenes digitales y grabación de información de luz blanca, fluorescencia y reflectancia del tejido.

En dermatología, el dispositivo puede usarse para detectar bacterias en la piel normal. Por ejemplo, la Figura 12

25 demuestra la imagen de autofluorescencia de alta resolución de la piel normal de las caras de los pacientes en las que se detecta una clara fluorescencia roja de la bacteria común *Propionibacterium acnes*.

La Figura 12 muestra ejemplos del uso del dispositivo para imágenes fijas o imágenes de video no invasivas de alta resolución de la cavidad bucal y la superficie de la piel en pacientes. Como se muestra en a), el dispositivo se puede

30 usar para obtener imágenes de la boca y la cavidad bucal. La excitación con luz azul/violeta excita la autofluorescencia de los dientes, que aparece como una fluorescencia verde intensa, en comparación con las encías ricas en sangre. El uso de este dispositivo puede detectar fácilmente la enfermedad periodontal y la caries de acuerdo con la autofluorescencia de los dientes y los tejidos de las encías. La fluorescencia roja en el borde de los labios se detecta en *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) que se encuentra comúnmente en los poros de la piel. La

35 fluorescencia roja es producida por porfirinas bacterianas endógenas. Note la detección de *P. acnes* en poros individuales (flecha roja) en el labio. De manera similar, en b), la fluorescencia roja de las porfirinas endógenas en la fauna bacteriana normal de la lengua se detecta fácilmente como una "manta" fluorescente roja brillante en la superficie de la lengua. El dispositivo también se puede usar para detectar cánceres tempranos en la cavidad bucal en función de las diferencias en las propiedades ópticas (p. ej., absorción, dispersión, autofluorescencia) entre los

40 tejidos normales y pre- y neoplásicos. El dispositivo se puede usar para "escanear" la cavidad oral de los cánceres de la mucosa, o para determinar los efectos de los agentes terapéuticos antineoplásicos como la PDT u otras técnicas. El dispositivo también se puede usar para obtener imágenes de la superficie de la piel. En c)-e), el dispositivo toma imágenes de la piel en las caras de los pacientes al detectar la autofluorescencia producida por la excitación de luz violeta/azul de la superficie de la piel. La fluorescencia roja de *P. acnes* puede detectarse

45 fácilmente en las regiones de la cara (e). El dispositivo se puede usar para visualizar y/o supervisar los efectos potenciales de las intervenciones dermatológicas (p. ej., cremas tópicas, fármacos y otros antibióticos, etc.) en la piel de los pacientes. En f) y g), el dispositivo también se usó para obtener imágenes de cortes menores (flecha, h), rasguños y abrasiones en la piel de los pacientes, así como psoriasis en un dedo (flecha, i). Bajo luz violeta/azul, el dispositivo detectó autofluorescencia tisular de los componentes del tejido conectivo (p. ej., colágeno y elastina) del

50 sitio de la herida y la piel normal circundante para producir imágenes de alta resolución de lesiones cutáneas sutiles. *P. acnes* es el agente causante del acné vulgar (es decir, las espinillas) y es un residente común de las glándulas pilosebáceas de la piel humana, y está oculto bajo la visualización de luz blanca. Estas imágenes autofluorescentes se obtuvieron sin la necesidad de agentes/fármacos exógenos y demuestran la capacidad del dispositivo para detectar la fluorescencia de la porfina bacteriana en los poros de la piel.

55 La Figura 12J muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes para la detección de fluorescencia en tiempo real de la flora bacteriana común en la piel. a) La fluorescencia roja en la nariz y alrededor de la misma se detecta en *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) que se encuentra comúnmente en los poros de la piel. b) La imagen de fluorescencia también se puede usar para detectar y supervisar más de una especie bacteriana en la piel al mismo tiempo, por ejemplo, *Propionibacterium acnes* aparece como fluorescente roja (flecha roja) mientras que *Pseudomonas Aeruginosa* tiene un color verde brillante (flechas verdes). Estos datos sugieren el uso del dispositivo para distinguir concentraciones/niveles relativos de varias especies bacterianas, determinar sus

60 biodistribuciones en la superficie corporal y supervisar la respuesta a los tratamientos antibacterianos en aplicaciones de dermatología y cosmetología, c) muestra un ejemplo de una imagen de fluorescencia de un cultivo cultivado en agar de un frotis tomado de piel normal en la nariz de un voluntario sano. Los resultados de bacteriología mostraron la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

65

Tal capacidad para captar imágenes y documentar la presencia y la biodistribución de bacterias en la superficie de la piel hace que el dispositivo sea potencialmente útil en los campos de dermatología y cosmetología. Por ejemplo, la imagen de fluorescencia se puede realizar antes, durante y después de la aplicación del tratamiento dermatológico y/o formulaciones farmacéuticas/cosméticas (p. ej., cremas tópicas, fármacos y otros antibióticos, agentes desinfectantes de la piel, tratamientos para el acné, etc.) a las afecciones normales y anormales de la piel, que incluyen, entre otros, formación de cicatrices, hiperpigmentación, acné, psoriasis, eccema, erupciones cutáneas, etc. La eliminación de tatuajes guiada por imagen de fluorescencia/reflectancia (p. ej., mediante cirugía o tratamientos con láser disponibles) también puede ser una opción con el dispositivo. El dispositivo también se usó para obtener imágenes de cortes menores, arañazos y abrasiones en la piel de los pacientes y bajo luz violeta/azul, autofluorescencia tisular de componentes de tejido conectivo (p. ej., colágeno y elastina) del sitio de la herida y la piel normal circundante ayudada a detectar cambios ocultos en luz blanca en los tejidos conectivos durante la curación de la herida cutánea menor (como se aprecia en la Figura 12 h, i). Además, el dispositivo también puede servir como una herramienta basada en imágenes práctica, rentable y sensible para la detección temprana de cánceres de piel ocultos y lesiones no neoplásicas (es decir, benignas) de manera no invasiva [Chwirot *et al.* (1998) *Eur J Cancer*. 34(10):1730-4]. El dispositivo se puede usar para proporcionar una guía de imagen para la escisión quirúrgica de las lesiones o para PDT. Para este último, las imágenes de fluorescencia pueden supervisar la respuesta de la PDT y determinar la finalización del tratamiento a lo largo del tiempo con múltiples exploraciones de imagen longitudinal del área afectada. El dispositivo se puede usar en tiempo real para determinar la localización y la biodistribución del fotosensibilizador de PDT y el fotoblanqueamiento, y esto se puede mapear en la imagen de luz blanca del área a tratar para una comparación anatómica. Los cambios en las propiedades ópticas entre lo normal y las enfermedades o los tejidos quemados pueden detectarse usando las capacidades de imagen de luz blanca y fluorescencia del dispositivo. El dispositivo también se puede usar para visualizar, evaluar y supervisar longitudinalmente el proceso de curación en quemaduras o determinar la respuesta de injertos de piel o sustitutos temporales de piel en el tratamiento de pacientes con quemaduras [Bishop (2004) *Crit. Care Nurs Clin North Am.* 2004;16(1): 145-77]. El dispositivo también puede servir para detectar y controlar el daño cutáneo tardío inducido por radiación durante el tratamiento de pacientes con radiación ionizante [Charles (2007) *J Radiol Prot.* 27(3):253-74].

Además, el dispositivo se puede usar para obtener imágenes de la boca y la cavidad bucal, particularmente en la realización en la que el dispositivo es pequeño y compacto. Los estudios de imagen piloto mostraron que el dispositivo puede detectar bacterias endógenas en la cavidad bucal (p. ej., en la superficie de la lengua y entre los dientes en la línea de las encías), lo que sugiere un uso en la detección clínica de caries y enfermedad periodontal [Pretty (2006) *J Dent*. 34(10):727-39]. Adicionalmente, la autofluorescencia tisular ha demostrado ser útil en la detección de cánceres orales [Kois *et al.* (2006) *Dent Today*. 25(10):94, 96-7]. El dispositivo se puede usar para detectar cánceres tempranos en la cavidad bucal en función de las diferencias en las propiedades ópticas (p. ej., absorción, dispersión, autofluorescencia) entre tejidos orales normales, pre- y neoplásicos. Además, el dispositivo se puede usar para "escanear" la cavidad bucal en busca de cáncer de mucosa y supervisar la respuesta a la terapia.

En general, el dispositivo se puede usar para visualizar y/o supervisar dianas como una diana cutánea, una diana oral, una diana otorrinolaringológica, una diana ocular, una diana genital, una diana anal y cualquier otra diana adecuada en un sujeto.

Uso en heridas malignas

Una herida maligna también es conocida como necrosis tumoral, herida tumoral, herida neoplásica ulcerante o herida cutánea maligna. Una herida maligna puede ser un desafío emocional y físico para los pacientes, las familias e incluso para el médico experimentado. Las heridas tumorales y ulcerantes pueden ser antiestéticas, malolientes y dolorosas. Estas heridas pueden ser indicadores de la progresión de la enfermedad y pueden infectarse, lo que provoca una curación tardía/impedida y morbilidad asociada y, por lo tanto, reduce la calidad de vida de los pacientes.

Muchos pacientes con cáncer viven con el conocimiento de que su enfermedad es progresiva e incurable. Para una minoría significativa de estas personas, esta realidad puede estar presente en forma de una lesión cutánea necrótica, exudante y maloliente, que puede ser un recordatorio físico constante de la progresión de la enfermedad (Mortimer PS. en: Doyle *et al.* Editores. *Oxford Textbook of Palliative Medicine* (2ª ed.). Oxford: Oxford University Press, 1998, 617-27; Englund F. *RCN Contact* 1993; Winter: 2-3). Estas lesiones se conocen comúnmente como "heridas tumorales", y el término "tumoral" se refiere a un proceso maligno de crecimiento ulcerante y proliferativo (Grocott P. *J Wound Care* 1995; 4(5): 240-2). Las lesiones que tienen un patrón de crecimiento predominantemente proliferativo pueden convertirse en una lesión con forma de "hongo" o "coliflor" nodular, mientras que una lesión que se está ulcerando producirá una herida con apariencia de cráter (Grocott P. *J Wound Care* 1999, 8 (5):232-4; Collier M. *Nurs Times* 1997; 93(44): supl. 1-4). Dichas lesiones también pueden presentarse con una apariencia mixta de áreas en proliferación y ulceración (Young T. *Community Nurse* 1997; 3(9): 41-4).

Una herida maligna puede desarrollarse de una de las siguientes maneras:

- Como resultado de un tumor primario de la piel como un carcinoma de células escamosas o un melanoma.

- A través de la invasión directa de las estructuras de la piel por un tumor subyacente, por ejemplo, cáncer de mama o neoplasias hematológicas como el linfoma cutáneo de linfocitos T (micosis fungoide).
- De la propagación metastásica de un tumor distante. La metástasis puede ocurrir a lo largo de los planos tisulares, capilares o vasos linfáticos.

5 Las heridas malignas a menudo son difíciles de tratar por relación con su ubicación, olor, exudados excesivos y la propensión a sangrar. Cada herida maligna puede ser única en su apariencia y síntomas de presentación. Los síntomas comunes asociados con las heridas malignas incluyen mal olor, exudados excesivos, infección, sangrado, maceración y excoriación de la piel perilesional, prurito, dolor, mala estética y efectos estéticos de los apósitos.

10 Actualmente, el enfoque de atención es principalmente holístico y paliativo, con el objetivo de controlar los síntomas en el sitio de la herida y reducir el impacto de la herida en la vida diaria del paciente, principalmente mediante la identificación de infecciones bacterianas/microbianas y la supervisión de signos de curación. A menos que se controle la patología, no se espera que estas heridas sanen.

15 El dispositivo descrito puede ser útil para realizar una evaluación clínica de tales heridas (p. ej., examen físico y biológico). El dispositivo puede proporcionar: un medio de evaluación completa de la herida basada en imágenes al inicio y a intervalos regulares durante todo el tratamiento (es decir, supervisión longitudinal), evaluación de la herida que incluye ubicación, tamaño de la herida, color, tipo y cantidad de cualquier descarga o drenaje, imágenes de luz blanca en serie (p. ej., para cambios de color) y fluorescencia (p. ej., para cambios estructurales, celulares, biológicos y moleculares de tejidos) de heridas malignas crónicas, y puede proporcionar una evaluación de cualquier signo y síntoma de infección en tiempo real, que afectaría a la planificación y a la eficacia del tratamiento. El dispositivo puede integrarse en la práctica clínica actual para la evaluación y el cuidado de dichas heridas malignas.

Imagen de agentes de contraste de fluorescencia exógena

25 El desarrollo de métodos analíticos altamente eficientes capaces de explorar sistemas biológicos a nivel de sistema es una tarea importante que se requiere para cumplir con los requisitos del campo emergente de biología de sistemas. La imagen molecular óptica es una herramienta muy poderosa para estudiar la dinámica temporal y espacial de biomoléculas específicas y sus interacciones en tiempo real *in vivo*. Se han producido varios avances recientes en imágenes moleculares ópticas, como el desarrollo de sondas moleculares que hacen que las imágenes sean más brillantes, más estables y más informativas biológicamente (p. ej., FPs y los nanocristales semiconductores, también denominados como puntos cuánticos), el desarrollo de enfoques de imágenes que proporciona mayor resolución y mayor penetración en los tejidos, y aplicaciones para medir eventos biológicos desde la molécula hasta el nivel del organismo. Estos avances también pueden aplicarse al diagnóstico de enfermedades (p. ej., cuidado de heridas) y detección sistemática farmacéutica. Sin embargo, los dispositivos de formación de imágenes por fluorescencia actuales son grandes, complicados e involucran componentes ópticos caros y detectores de cámara muy sensibles, lo que hace que estos sistemas sean extremadamente caros. El dispositivo desarrollado aquí ofrece una alternativa a estos sistemas de limitación de costos para estudios preclínicos o de investigación, así como una posible traducción clínica de tales métodos.

40 Ahora se hace referencia a la Figura 13. El dispositivo también se usó para obtener imágenes del animal para observación general bajo fluorescencia para determinar el grado de fluorescencia del fotosensibilizador BPD en toda la superficie de la piel. La Figura 13 demuestra la utilidad del dispositivo para imágenes en tiempo real y detección sensible de agentes de contraste de fluorescencia exógenos *in vivo* (p. ej., puntos cuánticos, QDots). En a), el dispositivo se usó para obtener imágenes de agentes de contraste de fluorescencia exógenos en una rata sacrificada que portaba células de tumor de mama humano metastatizadas en el hueso en la pata trasera. La rata fue inyectada previamente con un fotosensibilizador de fluorescencia llamado derivado de benzo-porfirina (BPD) para un experimento de terapia fotodinámica no relacionada. A la rata se le administraron dos soluciones de nanopartículas semiconductoras fluorescentes separadas (aquí, QDots), cada una emitiendo fluorescencia en soluciones a 540 (+/- 15) nm y 600 (+/- 15) nm mediante inyección subcutánea en la pata trasera izquierda. Las inyecciones estaban separadas aproximadamente 1 cm. Seguidamente se usó el dispositivo para obtener imágenes de todo el cuerpo de la rata usando una luz de excitación azul/violeta. La piel evaluada apareció en rojo, y esto probablemente se debió a la combinación de la fluorescencia del fotosensibilizador derivado de benzo-porfirina (BPD) administrado a la rata antes del experimento, que fue para la PDT posterior, así como la contaminación del polvo y los alimentos de la jaula en la que se alojaba la rata.

Con referencia aún a la Figura 13, en b) la fluorescencia de los QDots verde y rojo (recuadro) se detectó fácilmente debajo de la piel en el lugar de la inyección, con los QDots rojos emitiendo la señal más brillante, debido a la mayor penetración de luz roja en el tejido. c) muestra una imagen ampliada de la pata trasera mostrada en b). El dispositivo fue capaz de detectar múltiples agentes de contraste de fluorescencia simultáneamente junto con la autofluorescencia del tejido de fondo con suficiente señal a ruido (flechas verdes y rojas) para permitir su uso en imágenes de fluorescencia preclínica y clínica esperada de agentes de contraste de fluorescencia dirigidos molecularmente multiplexados *in vivo*. Tenga en cuenta que la fluorescencia verde es más débil que la roja porque tanto la luz de excitación violeta/azul como la fluorescencia QDot verde posterior son absorbidas preferentemente por la sangre y la luz fluorescente QDot roja tiene una mayor profundidad de penetración a través del tejido. En d), el dispositivo también se usó para obtener imágenes del animal para observación general bajo fluorescencia para

determinar el grado de fluorescencia del fotosensibilizador BPD en toda la superficie de la piel. El dispositivo también puede ser útil para guiar inyecciones intravenosas usando agujas al detectar vasos sanguíneos superficiales debajo de la piel. Por lo tanto, el dispositivo puede usarse para detectar tumores fluorescentes, tales como los que se transfectan con proteínas fluorescentes y se cultivan subcutáneamente en un modelo de xenoinjerto u ortotópico.

- 5 Por ende, el dispositivo se puede usar para visualizar múltiples biomarcadores de curación de heridas y/o infecciosos usando agentes de direccionamiento molecular fluorescentes exógenos multiplexados (p. ej., para bacteriología basada en imágenes *in situ*).

- 10 Para mejorar el uso de los agentes de contraste de fluorescencia en la investigación preclínica y, finalmente, para la traducción clínica de tecnologías de formación de imágenes moleculares ópticas, es deseable poder diferenciar e identificar de manera relativamente rápida varios agentes fluorescentes. En e) y f), el dispositivo también se usó como un medio para identificar de manera relativamente rápida qué agentes de contraste de fluorescencia había en las jeringas antes de la inyección, lo cual no era posible bajo luz blanca convencional, lo que demuestra la utilidad del dispositivo como tecnología guiada por imagen de fluorescencia rentable para proporcionar información útil
- 15 rápidamente durante procedimientos quirúrgicos y/o PDT guiados por imagen de fluorescencia, en los que los compuestos fluorescentes se usan comúnmente, posiblemente incluso en técnicas emergentes de cuidado de heridas.

Cirugía guiada por imagen de fluorescencia

- 20 Un área emergente es el uso de imágenes de fluorescencia para la detección sistemática de diagnóstico y la cirugía guiada por imágenes. Superando las limitaciones de la cirugía convencional con luz blanca, las imágenes de fluorescencia se pueden usar para ayudar en la resección quirúrgica de tumores *in vivo* basada en la fluorescencia (p. ej., autofluorescencia o fluorescencia de agentes de contraste exógenos dirigidos/no dirigidos), así como para
- 25 verificar la integridad de extirpación del tumor (p. ej., márgenes claros). La cirugía guiada por imagen de fluorescencia ha demostrado mejoras en la supervivencia, preclínica y clínicamente [Bogaards *et al.* (2004) *Lasers Surg Med.* 35:181-90]. Por ejemplo, durante la cirugía exploratoria en una rata, el dispositivo puede proporcionar imágenes convencionales de luz blanca del campo quirúrgico.

- 30 Ahora se hace referencia a la Figura 14. Se realizaron varias pruebas para demostrar la utilidad del dispositivo para la cirugía guiada por imagen de fluorescencia en animales pequeños. La cirugía exploratoria se realizó en una rata hembra eutanasiada usando el dispositivo de formación de imágenes. La Figura 14 muestra ejemplos del uso del dispositivo para cirugía guiada por imagen de fluorescencia usando agentes de contraste de formación de imágenes. Durante la cirugía exploratoria, el dispositivo proporcionó imágenes de luz blanca convencional del campo
- 35 quirúrgico, aquí, el abdomen de una rata hembra (a). El cirujano usó la pantalla de visualización del dispositivo para guiar el procedimiento, cambiando fácil y rápidamente entre el modo de luz blanca y de fluorescencia. En b), usando luz de excitación violeta/azul, el dispositivo proporcionó un contraste agregado entre diferentes tipos de tejidos, lo cual no fue posible durante la obtención de imágenes con luz blanca. Por ejemplo, los tejidos conectivos aparecieron en el fluorescente verde brillante (flecha verde), mientras que la superficie de la piel (con el fotosensibilizante
- 40 fluorescente rojo BPD) apareció de color rojo (flecha roja), y los QDots previamente inyectados en la pata trasera aparecieron en un rojo brillante (flecha azul). La imagen de fluorescencia se usó para detectar la contaminación de los instrumentos y equipos quirúrgicos (p. ej., gasas, cintas, mantas, etc.) durante el procedimiento quirúrgico. En c), el dispositivo también demostró utilidad al detectar una gasa quirúrgica sucia/contaminada durante el procedimiento. En comparación con la luz blanca convencional bajo la cual toda la gasa parecía limpia, la gasa usada para limpiar
- 45 la piel y el campo quirúrgico durante la cirugía parecían fluorescentes rojas (izquierda) en comparación con una gasa limpia (derecha).

- El dispositivo también se usó para la detección en tiempo real de agentes de contraste fluorescentes exógenos (p. ej., para el seguimiento de células marcadas y el destino en experimentos *in vivo*, para estudios de ingeniería tisular en medicina regenerativa, etc.) en un modelo animal. Para esto, durante la cirugía, el dispositivo se usó en modo de
- 50 fluorescencia para visualizar la presencia de QDots fluorescentes rojos inyectados en el músculo cardíaco y en los pulmones de la rata (d). Bajo la luz de excitación violeta/azul, los QDots rojos pueden detectarse fácilmente en el corazón (e) y en los pulmones (f), que aparecen oscuros debido a la alta concentración de sangre en estos órganos, lo que demuestra la utilidad del dispositivo para guiar y dirigirse a biopsias o procedimientos microquirúrgicos, especialmente aquellos dirigidos a la detección y extirpación de cánceres (p. ej., usando autofluorescencia o mejora
- 55 del contraste de fluorescencia) Observe la autofluorescencia roja brillante detectada por el dispositivo a partir de material alimenticio digerido en el colon. En g), el dispositivo demostró su utilidad en la obtención de imágenes de fantasmas tumorales fluorescentes comúnmente usados en la investigación de imágenes de animales pequeños. Los fantasmas tumorales esféricos sólidos dopados con tinte fluorescente se prepararon en diferentes tamaños y se
- 60 colocaron en el campo quirúrgico para demostrar la capacidad del dispositivo para proporcionar imágenes de fluorescencia de "alto contraste" rápidas en modelos de cáncer de animales pequeños.

- Estos resultados muestran que el dispositivo puede ser útil para detectar lesiones de tamaño sub-mm con guía de fluorescencia, lo que puede ser útil para dirigir biopsias o procedimientos microquirúrgicos, especialmente aquellos
- 65 dirigidos a la detección y extirpación de cánceres (p. ej., usando autofluorescencia o mejora de contraste de fluorescencia). El dispositivo también puede tener utilidad en la obtención de imágenes de fantasmas tumorales

fluorescentes comúnmente usados en la investigación de imágenes de animales pequeños.

La Figura 15 muestra ejemplos del dispositivo que se está usando para la grabación en video de la cirugía guiada por imagen de fluorescencia de alta resolución de la rata en la Figura 9. El dispositivo puede ser capaz de proporcionar imágenes digitales fijas y películas tomadas con luz blanca convencional (LB) (a) y fluorescencia (FL) (b), que se pueden cambiar fácilmente. En este caso, el dispositivo se usó para capturar películas digitales de un procedimiento quirúrgico en una rata usando imágenes de luz blanca y de fluorescencia. El cirujano usó la pantalla de visualización digital del dispositivo para guiar el procedimiento quirúrgico completo usando fluorescencia en la que la luz blanca no proporcionó la información adecuada. En c)-e), por ejemplo, bajo excitación con luz azul/violeta, la imagen de fluorescencia proporcionó al cirujano un contraste de imagen significativo entre diferentes tipos de tejidos. Los vasos sanguíneos pueden verse claramente bajo fluorescencia y los tejidos conectivos pueden distinguirse del tracto gastrointestinal. El material alimenticio digerido también se puede distinguir. El dispositivo puede proporcionar una solución de imágenes en tiempo real para una intervención quirúrgica guiada por imagen o una biopsia que le permita al cirujano emitir juicios críticos durante el procedimiento. La captura digital de imágenes y/o la película de la cirugía puede permitir el análisis retrospectivo del procedimiento para los registros sanitarios del paciente y la futura capacitación en habilidades del personal médico. El dispositivo también puede grabar audio durante el procedimiento quirúrgico, lo que permite recopilar un registro completo de cada procedimiento. La utilidad del dispositivo también se demostró como una herramienta muy útil para la microcirugía mínimamente invasiva guiada por imágenes en animales, y potencialmente en procedimientos humanos.

La Figura 16 muestra ejemplos del dispositivo que se usa para resecciones quirúrgicas guiadas con imagen de autofluorescencia de tejidos en un modelo de infarto cardíaco de ratón (a). Durante la cirugía exploratoria, el dispositivo proporcionó imágenes de luz blanca (LB) convencional del campo quirúrgico abierto, en este caso, el abdomen del ratón (b). El cirujano usó la pantalla de visualización del dispositivo para guiar el procedimiento, cambiando fácil y rápidamente entre el modo de luz blanca y de fluorescencia. Usando luz de excitación violeta/azul, el dispositivo proporcionó un alto contraste entre diferentes tipos de tejidos, lo cual no fue posible durante la obtención de imágenes con luz blanca (c). Por ejemplo, varios órganos internos se visualizaron usando imágenes de autofluorescencia de alta resolución. En d), se puede obtener imágenes del animal intacto con fluorescencia antes y durante la cirugía (e).

La Figura 17 muestra ejemplos del dispositivo que se usa para la cirugía guiada por imagen de autofluorescencia en tiempo real no invasiva de un cerebro de ratón. Durante la cirugía exploratoria, el dispositivo proporcionó imágenes de luz blanca (LB) convencional del campo quirúrgico abierto (a); en este caso, se puede ver el cráneo del ratón. El cirujano usó la pantalla de visualización del dispositivo para guiar el procedimiento quirúrgico, cambiando fácil y rápidamente entre el modo de LB y fluorescencia (FL). b) muestra la vista del campo quirúrgico (en este caso, con el cráneo intacto) proporcionado por el dispositivo de formación de imágenes bajo autofluorescencia tisular. Tenga en cuenta que el área quirúrgica es oscura, principalmente debido a la absorción de la luz de excitación violeta/azul y la autofluorescencia resultante causada por la sangre. El hocico y los ojos tienen un color fluorescente rojo brillante en comparación con la fluorescencia verde brillante del pelaje. c) muestra el campo quirúrgico con la base del cráneo removida bajo LB, mientras que d) muestra la imagen de autofluorescencia de la superficie del cerebro usando el dispositivo de formación de imágenes con luz de excitación azul/violeta. La inyección de un agente de contraste exógeno (en este caso, puntos cuánticos fluorescentes rojos) directamente en el hemisferio derecho del cerebro produce una fluorescencia roja brillante (flechas) (e). Esto demuestra la utilidad del dispositivo para obtener imágenes de los agentes de contraste de fluorescencia, específicamente para la cirugía guiada por imagen de fluorescencia de alta resolución.

Uso en Atención Clínica

Aunque la práctica actual de tratamiento de heridas apunta a disminuir la morbilidad y la mortalidad de las heridas en los pacientes, una limitación es la disponibilidad de recursos para la atención médica. Actualmente se está explorando el potencial de incorporar la tecnología de telemedicina en las necesidades del cuidado de heridas. El cuidado de heridas es una representación del cuidado de afecciones crónicas y debilitantes que requieren atención especializada a largo plazo. El mayor efecto de la mejora de las condiciones de vida y los avances en la atención médica a nivel mundial han llevado a las personas a vivir más tiempo. Por lo tanto, el porcentaje de personas de edad avanzada en el mundo y personas con afecciones médicas crónicas que requieren atención médica está aumentando. Con la escalada en los costos de la atención médica y el impulso de la industria hacia la atención ambulatoria, esto es parte de la crisis de la atención médica que exige atención inmediata.

El presente dispositivo puede proporcionar información biológicamente relevante sobre las heridas y puede explotar la infraestructura emergente de telemedicina (p. ej., E-salud) para proporcionar una solución para la tecnología móvil de cuidado de heridas y puede tener un gran impacto en el tratamiento de la atención médica de la herida. El cuidado de heridas representa un gran porcentaje de las visitas domiciliarias realizadas por enfermeros y trabajadores sanitarios. A pesar de las mejores prácticas, algunas heridas no se curan como se espera y requieren los servicios de un especialista clínico. El dispositivo descrito en este caso puede permitir el acceso a recursos clínicos especializados para ayudar a tratar las heridas desde la comodidad del hogar del paciente o el centro de atención crónica, lo que reduce el tiempo de viaje para los clientes, aumenta la disponibilidad para los especialistas

en heridas clínicas y puede reducir los costos para el sistema salud.

Se han discutido diferentes usos del dispositivo de formación de imágenes para la evaluación de heridas, la supervisión y la administración del cuidado. El dispositivo se puede usar para detectar y supervisar los cambios en los tejidos conectivos (p. ej., colágeno, elastina) y el suministro de sangre/vascular durante el proceso de curación de la herida, supervisar la necrosis del tejido y el exudado en heridas basadas en la fluorescencia, detectar y diagnosticar infecciones de la herida, incluso indicando potencialmente categorías críticas "clínicamente significativas" de la presencia de bacterias o microorganismos (p. ej., para detectar contaminación, colonización, colonización crítica e infección) en la superficie y en la profundidad de las heridas [Kingsley, *Ostomy Wound Manage.* julio de 2003; 49 (7A Supl.): 1-7], proporcionar información topográfica de la herida e identificar los márgenes de la herida y los tejidos normales circundantes. Los datos de imágenes de fluorescencia y reflectancia del tejido se pueden "mapear" en las imágenes de luz blanca de la herida, lo que permite la visualización en la herida y los tejidos normales circundantes de la información esencial bioquímica y fotobiológica de la herida (p. ej., fluorescencia), que no ha sido posible hasta la fecha. Las imágenes de las heridas en tiempo real se pueden realizar a lo largo del tiempo para supervisar los cambios en la curación de las heridas y, potencialmente, para supervisar la efectividad de los tratamientos al proporcionar información útil sobre los cambios biológicos subyacentes que están ocurriendo a nivel tisular/celular (p. ej., remodelado de la matriz, inflamación), infección y necrosis). Esto puede proporcionar información cuantitativa y objetiva de la herida para la detección, el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento en los pacientes. En particular, el dispositivo se puede usar para supervisar y/o rastrear la efectividad de la terapia a nivel biológico (p. ej., a nivel bacteriano), que puede proporcionar más información que supervisar solo el aspecto macroscópico/morfológico usando luz blanca.

El dispositivo puede proporcionar orientación de biopsia guiada por imagen no invasiva en tiempo real, guía de procedimientos clínicos, caracterización de tejidos y puede permitir el tratamiento guiado por imagen usando modalidades convencionales y emergentes (p. ej., PDT). Además, el uso del dispositivo de formación de imágenes se puede usar para correlacionar la información crítica biológica y molecular de la herida obtenida por fluorescencia (p. ej., autofluorescencia del tejido endógeno y/o administración de agentes de contraste de fluorescencia dirigidos a biomarcadores moleculares exógenos) con las guías de evaluación y tratamiento clínica actual y emergente del cuidado de la herida, como las pautas NERDS y STONES propuestas por Sibbald *et al.* (Sibbald *et al.* Increased Bacterial Burden and Infection: The Story of NERDS and STONES. *ADV SKIN WOUND CARE* 2006;19:447-61). Los datos de imagen de fluorescencia obtenidos con el dispositivo pueden usarse para caracterizar, espacial y espectralmente, el equilibrio bacteriano y la carga en los niveles superficiales y profundos de las heridas. El dispositivo puede proporcionar orientación de biopsia guiada por imagen no invasiva en tiempo real, guía de procedimiento clínico, caracterización de tejidos y puede permitir el tratamiento guiado por imagen usando modalidades convencionales y emergentes (p. ej., terapia fotodinámica, PDT). El dispositivo se puede usar en el entorno clínico e integrarse en los regímenes clínicos convencionales para el cuidado de heridas, y puede tener un papel distinto en áreas de enfermedades infecciosas. También se debe tener en cuenta que este dispositivo se puede usar además para el análisis en tiempo real, la supervisión y la atención de heridas crónicas y agudas en animales y mascotas, a través de la atención veterinaria convencional.

Este dispositivo puede permitir la evaluación de la curación de heridas en tiempo real para una gran base de cohorte de pacientes. En particular, las personas mayores, los diabéticos, las personas inmunodeprimidas y las personas inmobilizadas tienen una mayor incidencia de heridas crónicas y otras afecciones dérmicas que resultan de la mala circulación y la inmovilidad, p. ej. úlceras por presión, como llagas, úlceras por estasis venosa y úlceras diabéticas. Estas condiciones crónicas aumentan considerablemente el costo de la atención y reducen la calidad de vida del paciente. A medida que estos grupos aumentan en número, aumentará la necesidad de productos avanzados para el cuidado de heridas. Este dispositivo puede afectar la atención al paciente al permitir un medio rentable de supervisión de heridas crónicas y agudas en varios entornos, incluidos hospitales, clínicas ambulatorias, centros de atención crónica, atención médica en el hogar, salas de emergencia y otras áreas críticas en centros médicos. Además, dicho personal de enfermería y ambulancia puede transportar y usar fácilmente un dispositivo de formación de imágenes manual y portátil. La identificación temprana de la formación de cicatrices, que está relacionada con la producción de tejido conectivo y el remodelado de la herida, y las infecciones bacterianas pueden detectarse y tratarse de manera adecuada, algo que actualmente es difícil. Además, los desarrollos recientes en productos avanzados para el cuidado de heridas incluyen múltiples tipos de apósitos (p. ej., Películas, hidrocoloides, espumas, antimicrobianos, alginatos, no adherentes, impregnados), hidrogeles, limpiadores de heridas y agentes de desbridamiento, productos genotecnológicos de tejidos (p. ej., reemplazos cutáneos, sustitutos y productos genotecnológicos tisulares, como los tejidos biológicos sintéticos basados en polímeros y los factores de crecimiento, limpiadores de heridas, productos farmacológicos y las terapias físicas también pueden beneficiarse del dispositivo aquí desarrollado, ya que puede permitir la supervisión longitudinal basada en imágenes de la efectividad de tales tratamientos. Las terapias físicas pueden incluir hidroterapia, estimulación eléctrica, dispositivos de estimulación electromagnética, terapia ultravioleta, oxigenoterapia hiperbárica, dispositivos de ultrasonido, dispositivos de diodo emisor de luz (LED)/láser e imágenes/documentación de heridas.

El análisis del tejido de la herida suele ser necesario para evaluar la curación de las heridas de la piel. El porcentaje del tejido de granulación, la fibrina y la necrosis en la herida y su cambio durante el tratamiento pueden proporcionar información útil que puede guiar el tratamiento de la herida. El análisis de imágenes puede incluir algoritmos de

clasificación y reconocimiento de patrones estadísticos avanzados para identificar píxeles individuales en las imágenes de heridas de fluorescencia recogidas con el dispositivo en función de la información óptica de la herida y el tejido normal circundante. Por consiguiente, el análisis de la imagen puede permitir que las imágenes de la herida se mapeen en varios componentes de la herida, incluyendo el área total de la herida, la epitelización, la granulación, la descamación, la necrótica, la hipergranulación, la infección, la socavación del tejido y los márgenes del tejido circundante. Esto tiene la ventaja adicional de proporcionar una determinación relativamente rápida de las tasas de curación de heridas, así como una guía informativa sobre las decisiones de gestión del paciente.

La Figura 25 ilustra el flujo de trabajo de administración proyectado para el dispositivo de formación imágenes en un entorno de cuidado de heridas clínicas. El dispositivo se puede integrar fácilmente en la evaluación rutinaria de la herida, el diagnóstico, el tratamiento y la supervisión longitudinal de la respuesta, y puede proporcionar información biológica y molecular crítica de la herida en tiempo real para una rápida toma de decisiones durante las intervenciones adaptativas.

Este dispositivo puede integrarse fácilmente en las infraestructuras informáticas de atención médica existentes (p. ej., PC de escritorio y de bolsillo usados por un número creciente de médicos u otros profesionales sanitarios) para la catalogación longitudinal de imágenes para el tratamiento de heridas en pacientes dentro del entorno clínico convencional. La recepción inalámbrica y la transmisión de las capacidades de datos del dispositivo pueden permitir la supervisión del cuidado y la curación de heridas de forma remota a través de la infraestructura de telemedicina inalámbrica existente y futura. El dispositivo se puede usar para transferir datos médicos esenciales (p. ej., el estado de la herida) a través de servicios de internet o inalámbricos, como los servicios de teléfono móvil, PDA o teléfono inteligente, a sitios remotos que pueden permitir intervenciones médicas remotas, con una utilidad adicional en aplicaciones médicas militares para el tratamiento de heridas en el campo de batalla. El dispositivo puede permitir la obtención de imágenes en la superficie en tiempo real de los sitios de la herida y el personal del punto de atención puede llevarlo fácilmente en entornos clínicos. El uso de dispositivos de formación de imágenes digitales, altamente sensibles y rentables, disponibles en el mercado, tales como cámaras digitales, teléfonos móviles, PDAs, ordenadores portátiles, tabletas, cámaras web y teléfonos inteligentes, etc., como componente de captura o grabación de imágenes, el dispositivo puede ofrecer documentación basada por imágenes de la curación de heridas y el seguimiento de la efectividad del tratamiento. Además, esta tecnología puede adaptarse para funcionar también en modo "inalámbrico" para permitir intervenciones médicas remotas al adaptarla potencialmente para su uso con cámaras digitales de alta resolución integradas en teléfonos móviles disponibles comercialmente.

Al usar la telemedicina basada en la web y la infraestructura de supervisión médica remota, el dispositivo de formación de imágenes puede integrarse en un concepto de "almacenamiento y envío" de sistemas de evaluación de heridas. Además de proporcionar imágenes digitales, este sistema puede presentar un conjunto completo de datos clínicos que cumplan con las recomendaciones de las guías de práctica clínica. El dispositivo desvelado actualmente puede integrarse en un sistema de evaluación de heridas basado en ordenador (p. ej., con un software de análisis de imágenes) para ser usado por un centro de atención médica para mejorar las bases de datos clínicas existentes y respaldar la implementación de guías de práctica basadas en evidencia. Dicha infraestructura de telemedicina integrada se puede usar para supervisar a los pacientes en el domicilio o en centros de atención a largo plazo, que pueden beneficiarse de la supervisión rutinaria por médicos calificados, pero actualmente no tienen acceso a esta atención. Este dispositivo se puede desarrollar aún más en un sistema manual de diagnóstico de punto de atención portátil, que puede representar un gran avance en la detección, supervisión, tratamiento y prevención de la propagación de enfermedades infecciosas en los países desarrollados y en desarrollo. Este conocimiento puede mejorar significativamente las herramientas de diagnóstico disponibles para los profesionales que tratan heridas crónicas en entornos en los que los cultivos cuantitativos son inaccesibles.

El dispositivo puede permitir imágenes digitales con capacidades de zoom óptico y digital (p. ej., aquellas integradas en dispositivos de imágenes digitales comúnmente disponibles). La calidad de imagen fija o de video puede estar en formato de "alta definición" para lograr imágenes de alta resolución espacial de la superficie del tejido. Las imágenes pueden grabarse como imágenes fijas/congeladas y/o en formato de video/película e imprimirse usando protocolos convencionales de impresión de imágenes que requieren (p. ej., conectarse por USB) o no (p. ej., PictBridge) requieren un ordenador personal. Los datos de imágenes/video pueden transferirse a un ordenador personal para el almacenamiento de archivos de datos y/o la visualización y/o el análisis/manipulación de imágenes. El dispositivo también puede transferir datos a una impresora o a un ordenador personal usando capacidades alámbricas o inalámbricas (p. ej., Bluetooth). La visualización se puede realizar en la pantalla del dispositivo manual y/o además de la visualización simultánea en una pantalla/monitor de video (p. ej., cascos visores y gafas) usando cables de video de salida convencional. Este dispositivo puede mostrar, en combinación o por separado, información sobre la longitud de onda óptica y la intensidad de fluorescencia/reflectancia con dimensiones espaciales de la escena de la imagen para permitir mediciones cuantitativas de distancias (p. ej., supervisar cambios en la morfología/topografía del tejido) con el tiempo. El dispositivo también puede permitir el almacenamiento de imágenes digitales/video/catalogación de imágenes y datos médicos relacionados del paciente, por ejemplo, usando software dedicado con capacidades de análisis de imágenes y/o algoritmos de diagnóstico.

Análisis de imagen

El análisis de imágenes se puede usar junto con el dispositivo para medir cuantitativamente las intensidades de fluorescencia y los cambios relativos en múltiples espectros de fluorescencia (p. ej., imágenes multiplexadas) de las sondas de direccionamiento molecular ópticas exógenas en la herida y los tejidos normales circundantes. Las biodistribuciones de las sondas fluorescentes pueden determinarse en función de las imágenes de fluorescencia recogidas y estas pueden supervisarse a lo largo del tiempo entre sesiones de imágenes de heridas clínicas individuales para detectar cambios. Al determinar la presencia y los cambios relativos en abundancia cuantitativamente, usando el dispositivo, de todas y cada una de las sondas fluorescentes espectralmente únicas, el operador clínico puede determinar en tiempo real o casi en tiempo real el estado y la respuesta de salud y/o curación para el tratamiento a lo largo del tiempo de una herida determinada, por ejemplo, mediante el uso de una tabla de consulta en la que se muestran señales específicas tisulares, celulares y moleculares en correlación con la salud, el estado de curación y respuesta de la herida, cuyo ejemplo se muestra en la Figura 21 (adaptado de Bauer *et al.*, Vasc & Endovasc Surg 2005, 39:4). Esto puede permitir que el médico determine si una herida está sanando basándose en información biológica y molecular que, de lo contrario, no podría ser posible con las tecnologías existentes. Además, la presencia y abundancia de bacterias/microorganismos y su respuesta al tratamiento pueden ofrecer un medio para adaptar la terapia en tiempo real en lugar de incurrir en retrasos en la evaluación de la respuesta con pruebas bacteriológicas convencionales de cultivos de heridas.

Las técnicas de análisis de imágenes se pueden usar para calibrar las imágenes iniciales o primeras de la herida usando un criterio fluorescente portátil colocado dentro del campo de visión durante la toma de imágenes con el dispositivo. El análisis de la imagen también puede permitir una visualización de un falso o pseudocolor en un monitor para diferenciar diferentes componentes biológicos (p. ej., tejidos, celulares y moleculares) de la herida y los tejidos normales circundantes, incluidos los biomarcadores identificados por autofluorescencia y los identificados por el uso de agentes de contraste de fluorescencia/absorción dirigidos o no dirigidos exógenos.

Ejemplos de tales biomarcadores se enumeran en la Figura 22 (adaptado de Brem *et al.* Journal of Clinical Investigation, 117:5, 2007) e ilustran en la Figura 23. En la Figura 23, el diagrama muestra los mecanismos de curación de heridas en personas sanas en comparación con personas con heridas diabéticas. En individuos sanos (izquierda), el proceso de curación de la herida aguda se guía y mantiene mediante la integración de múltiples señales moleculares (p. ej., en forma de citoquinas y quimiocinas) liberadas por queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. Durante la hipoxia inducida por la herida, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) liberado por los macrófagos, los fibroblastos y las células epiteliales induce la fosforilación y activación de la eNOS en la médula ósea, lo que provoca un aumento en los niveles de NO, lo cual desencadena la movilización de las EPC de la médula ósea a la circulación. Por ejemplo, la quimioquina SDF-1 α promueve el retorno de estas EPCs al sitio de la lesión, donde participan en la neovascularización. En un modelo murino de diabetes (derecha), la fosforilación de la eNOS en la médula ósea se ve afectada, lo que limita directamente la movilización de EPC de la médula ósea a la circulación. La expresión de SDF-1 α disminuye en las células epiteliales y en los miofibroblastos en la herida diabética, lo que evita que EPC retorne a las heridas y, por lo tanto, limita la curación de la herida. Se ha demostrado que el establecimiento de hiperoxia en el tejido de la herida (p. ej., a través de la terapia con HBO) activó muchas isoformas NOS, aumentó los niveles de NO y aumentó la movilización de EPC a la circulación. Sin embargo, se requirió la administración local de SDF-1 α para desencadenar el retorno de estas células en el sitio de la herida. Estos resultados sugieren que la terapia de HBO combinada con la administración de SDF-1 α puede ser una opción terapéutica potencial para acelerar la curación de heridas diabéticas sola o en combinación con los protocolos clínicos existentes.

Se pueden usar mapas de color asignados previamente para mostrar simultáneamente los componentes biológicos de la herida y los tejidos normales circundantes, incluidos los tejidos conectivos, la sangre, la microvascularidad, las bacterias, los microorganismos, etc., así como los fármacos/agentes farmacológicos marcados con fluorescencia. Esto puede permitir la visualización en tiempo real o casi en tiempo real (p. ej., menos de 1 minuto) de la salud, la curación y el estado infeccioso del área de la herida.

Los algoritmos de análisis de imágenes pueden proporcionar una o más de las siguientes características:

Gestión de imágenes digitales del paciente

- Integración de una variedad de dispositivos de adquisición de imágenes
- Registro de todos los parámetros de imágenes, incluidos todos los agentes de contraste de fluorescencia exógena
- Configuraciones de calibraciones y escalas múltiples
- Algoritmos de cálculo y desmezcla de imagen espectral incorporada para la determinación cuantitativa de señales de autofluorescencia tisular/bacteriana y fluorescencia de agente exógeno
- Herramientas de anotación convenientes
- Archivo digital
- Publicación web

Procesamiento y análisis de imágenes básico

- Paquete completo de procesamiento de imágenes y funciones de análisis cuantitativo. Los algoritmos de pegado

de imágenes permitirán pegar una serie de imágenes panorámicas o parcialmente superpuestas de una herida en una sola imagen, ya sea en modo automático o manual

- Herramientas de medición fáciles de usar
- Configuración intuitiva de los parámetros de procesamiento
- Editor manual conveniente.

Generación de informes

- Potente generador de informes de imágenes con plantillas profesionales que pueden integrarse en las infraestructuras de informes clínicos existentes o en las infraestructuras de datos médicos de pacientes de telemedicina/e-salud. Los informes se pueden exportar a PDF, Word, Excel, por ejemplo.

Gran biblioteca de soluciones automatizadas

- Soluciones automatizadas personalizadas para diversas áreas de evaluación de heridas, incluido el análisis cuantitativo de imágenes.

Aunque se han descrito algoritmos, técnicas o software de análisis de imágenes, esta descripción también se extiende a un dispositivo informático, un sistema y un método para llevar a cabo este análisis de imágenes.

Terapia de citoblastos y supervisión del cáncer

El dispositivo puede usarse para formación de imágenes y detección de cánceres en humanos y/o animales. El dispositivo puede usarse para detectar cánceres en función de las diferencias inherentes en las características de fluorescencia entre dichos cánceres y los tejidos normales circundantes en los pacientes. Este dispositivo también se puede usar para la detección de cánceres basados en imágenes en mascotas, por ejemplo, en entornos veterinarios.

El dispositivo también se puede usar como una herramienta de investigación para la obtención de imágenes multispectrales y la supervisión de cánceres en modelos animales experimentales de enfermedades humanas (p. ej., heridas o cánceres). El dispositivo se puede usar para detectar y/o visualizar la presencia de cánceres y rastrear el crecimiento tumoral en modelos animales de cáncer, particularmente usando estirpes celulares tumorales transfectadas con proteína fluorescente (p. ej., en los intervalos de longitud de onda visible y NIR).

El dispositivo de formación de imágenes se puede usar junto con terapias celulares existentes y emergentes útiles para el reacondicionamiento de heridas crónicas y acelerar su curación. Para esto, pueden administrarse citoblastos marcados con fluorescencia en el sitio de la herida antes de obtener imágenes con el dispositivo. Los citoblastos pluripotenciales (PSCs), los precursores de todos los citoblastos más especializados, son capaces de diferenciarse en una variedad de tipos de células, incluidos los fibroblastos, las células endoteliales y los queratinocitos, todos los cuales son componentes celulares críticos para la curación. Un informe reciente sobre un ensayo clínico no controlado sugiere que la aplicación directa de médula ósea autóloga y sus células cultivadas puede acelerar la curación de heridas crónicas que no cicatrizan (Badiavas *et al.*, Arch Dermatol 2003; 139(4): 510-16). Teniendo en cuenta las anomalías patofisiológicas presentes en las heridas crónicas, existe la posibilidad de que los citoblastos puedan reconstituir los componentes dérmicos, vasculares y otros necesarios para una curación óptima. El dispositivo se puede usar para visualizar y rastrear los citoblastos marcados en el sitio de la herida a lo largo del tiempo y determinar su biodistribución y efecto terapéutico. El uso de agentes dirigidos a la fluorescencia exógena molecular, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, puede confirmar la diferenciación de los citoblastos *in vivo* y también puede ayudar a determinar la respuesta de la herida a este tratamiento.

Por ejemplo, este dispositivo se puede usar para identificar, rastrear y/o supervisar citoblastos tumorales neoplásicos y citoblastos en general (p. ej., en modelos experimentales de cánceres de animales pequeños preclínicos y otros modelos clínicos). Un ejemplo se muestra en las Figuras. El dispositivo también puede resultar útil para obtener imágenes de terapias celulares clínicas, incluido el tratamiento de enfermedades que usan citoblastos.

Ahora se hace referencia a la Figura 18. En a), se muestra un modelo de ratón usando luz blanca. En b), los órganos individuales del ratón se ven claramente usando el dispositivo de formación de imágenes por fluorescencia, c) muestra el hígado del ratón fotografiado con el dispositivo, y no se ve fluorescencia. d) muestra los pulmones del ratón en luz blanca. e) muestra los pulmones del ratón fotografiado con el dispositivo, con los citoblastos tumorales neoplásicos claramente observados como puntos fluorescentes brillantes.

Con referencia ahora a la Figura 19, en a), el hígado del modelo de ratón de la Figura 18 no es visible bajo imágenes de fluorescencia. b), d) y f) muestran diferentes vistas de los pulmones del ratón bajo luz blanca. c), e) y g) muestran la vista correspondiente de los pulmones de ratones con imágenes del dispositivo, mostrando claramente los citoblastos tumorales neoplásicos como puntos fluorescentes brillantes.

La Figura 19H muestra un ejemplo del uso del dispositivo para la detección de ratones desnudos con tumores

ováricos humanos. a) Imagen de luz blanca de ratones de control tratados con virus y no tratados, que muestran una cavidad abdominal abierta, b) la imagen de fluorescencia correspondiente de los ratones tratados y de control muestra una fluorescencia de color naranja-rojo del virus marcado ópticamente en los nódulos tumorales en el mesenterio (flechas amarillas), en comparación con el control, c) muestra una vista ampliada de los mesenterios, que ilustra la biodistribución de la sonda óptica del virus dentro de los nódulos tumorales, así como la capacidad para detectar nódulos tumorales submilimétricos (flecha azul), en comparación con el ratón de control d). Tenga en cuenta que la fluorescencia de la sonda se puede diferenciar de la autofluorescencia del tejido intestinal de fondo. Estos datos ilustran el uso potencial del dispositivo para la respuesta al tratamiento de imagen que incluye, entre otros, viroterapias y terapias celulares, así como para la resección quirúrgica guiada por imágenes de muestras de tumores fluorescentes (c; *recuadros*) (excitación de 405 nm), emisión 500-550 nm (verde), emisión >600 nm (rojo)).

La Figura 19I muestra un ejemplo del uso del dispositivo no abarcado por la invención reivindicada para la detección/visualización en ratones desnudos portadores de tumores de colon que reciben un cóctel fluorescente de sondas exógenas separadas de direccionamiento a células tumorales verdes y rojas después de la operación. a) Luz blanca y b) imagen de fluorescencia multiespectral correspondiente de la cavidad abdominal abierta que muestra la detección simultánea de las sondas moleculares verde (flecha verde) y roja (flecha roja), que pueden analizarse con el software de desmezcla espectral. El dispositivo puede modificarse para permitir también la obtención de imágenes endoscópicas. En este ejemplo, c) se unió una sonda endoscópica rígida al dispositivo de formación de imágenes manual y d) luz blanca y e) se obtuvieron imágenes de fluorescencia de tejido resecado quirúrgicamente del ratón en la imagen a, b). Estos datos sugieren el uso del dispositivo con accesorios de sonda endoscópica para imágenes de fluorescencia endoscópicas portátiles en tiempo real *in vivo* en pacientes humanos y veterinarios para una variedad de aplicaciones de detección, diagnóstico o supervisión de tratamiento (basadas en la investigación y la clínica), f) el dispositivo (p. ej., con capacidades endoscópicas) puede ser capaz de obtener imágenes de fluorescencia de múltiples "sondas" espectralmente únicas que pueden usarse *in vivo* (excitación de 405 nm; canales de emisión de 490-550 nm y > 600 nm).

Este dispositivo se puede usar para la obtención de imágenes multiespectrales y la detección de cánceres en humanos y animales. Este dispositivo también se puede usar para detectar cánceres en función de las diferencias inherentes en las características de fluorescencia entre dichos cánceres y los tejidos normales circundantes en los pacientes. Este dispositivo también se puede usar para la detección de cánceres basados en imágenes en animales como mascotas o ganado, por ejemplo, en entornos veterinarios.

Este dispositivo también puede ser adecuado como herramienta de investigación para la obtención de imágenes multiespectrales y la supervisión de cánceres en modelos animales experimentales de enfermedades humanas (p. ej., heridas y cánceres). El dispositivo se puede usar para detectar y/o visualizar la presencia de cánceres y se puede usar para rastrear el crecimiento tumoral en modelos animales de cáncer, particularmente usando estirpes celulares tumorales transfectadas con proteína fluorescentes (p. ej., en los intervalos de longitud de onda visibles y NIR).

Guiado de imagen

El dispositivo también puede ser útil para proporcionar una guía de imagen fluorescente, por ejemplo en procedimientos quirúrgicos, incluso sin el uso de tintes o marcadores. Ciertos tejidos y/u órganos pueden tener diferentes espectros fluorescentes (p. ej., fluorescencia endógena) cuando se observan con el dispositivo de imagen, o por ejemplo bajo ciertas condiciones de luz de excitación.

La Figura 20 demuestra la utilidad del dispositivo para la cirugía asistida por imágenes de fluorescencia. Con la ayuda de imágenes de fluorescencia que usan el dispositivo, diferentes órganos de un modelo de ratón pueden distinguirse más claramente que bajo luz blanca. b, c y g muestran el modelo murino bajo luz blanca. a, d-f y h-j muestran el modelo murino como se muestra con el dispositivo.

La Figura 20B muestra un ejemplo del uso del dispositivo para obtener imágenes de modelos de animales pequeños. En este caso, la cámara de la ventana del pliegue dorsal de la piel del ratón se visualiza bajo luz blanca (a, c) y fluorescencia (b, d). Tenga en cuenta la luz blanca de alta resolución y las imágenes de fluorescencia obtenidas por el dispositivo. Los pies y la cara tienen un color rojo fluorescente brillante debido a la autofluorescencia endógena del lecho de la jaula y de los materiales en polvo de los alimentos. (405 nm de excitación; 490-550 nm y > 600 nm de canales de emisión).

Piel elaborada por bioingeniería

Varios productos cutáneos elaborados por bioingeniería o equivalentes de piel están disponibles comercialmente para el tratamiento de heridas agudas y crónicas, así como también para quemaduras. Estos han sido desarrollados y probados en heridas humanas. Los equivalentes de piel pueden contener células vivas, como fibroblastos o queratinocitos, o ambos, mientras que otros están hechos de materiales acelulares o extractos de células vivas (Phillips. J Dermatol Surg Oncol 1993; 19(8): 794-800). El efecto clínico de estas construcciones es un 15-20 % mejor que la terapia de "control" convencional, pero existe un debate sobre qué constituye un control apropiado. La

- piel elaborada por bioingeniería puede funcionar mediante el suministro de células vivas que se conocen como "material inteligente" porque son capaces de adaptarse a su entorno. Hay evidencia de que algunos de estas construcciones vivas pueden liberar factores de crecimiento y citoquinas (Falanga *et al.* J Invest Dermatol 2002; 119(3): 653-60). Se pueden usar agentes moleculares fluorescentes exógenos junto con tales sustitutos de la piel para determinar la integridad del injerto, así como la respuesta biológica de la herida a la terapia. La curación de defectos cutáneos de espesor total puede requerir una síntesis y remodelado extensas de los componentes dérmicos y epidérmicos. Los fibroblastos desempeñan un papel importante en este proceso y se incorporan a la última generación de sustitutos dérmicos artificiales.
- El dispositivo de formación de imágenes descrito aquí se puede usar para determinar el destino de los fibroblastos sembrados en el sustituto de la piel y se puede determinar la influencia de los fibroblastos sembrados en la migración celular y la degradación del sustituto dérmico después del trasplante al sitio de la herida. Las heridas pueden tratarse con sustitutos dérmicos sembrados con fibroblastos autólogos o sustitutos acelulares. Los fibroblastos sembrados, marcados con un marcador de células fluorescentes, pueden luego detectarse en las heridas con un dispositivo de formación de imágenes por fluorescencia y luego evaluarse cuantitativamente usando análisis de imágenes, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente.

Agentes terapéuticos a base de polímeros

- Hay una serie de productos poliméricos médicos disponibles comercialmente para el cuidado de heridas. Por ejemplo, Rimon Therapeutics produce Theramers™ (www.rimontherapeutics.com) que son polímeros médicos que tienen actividad biológica en sí mismos, sin el uso de fármacos. Rimon Therapeutics produce los siguientes productos para el cuidado de heridas, que se pueden convertir en fluorescentes únicos cuando se excitan con luz de excitación de 405 nm: Angiogenic Theramer™, que induce el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (es decir, angiogénesis) en heridas u otro tejido isquémico; MI Theramer™, que inhibe la actividad de las metaloproteasas de matriz (MMPs), un grupo ubicuo de enzimas que están implicadas en muchas afecciones en las que el tejido está debilitado o destruido; AM Theramer™, un termoplástico que destruye las bacterias gram + y gran - sin dañar las células de los mamíferos; y ThernaGel™, un polímero que cambia de líquido a gel fuerte de manera reversible alrededor de la temperatura corporal. Cada uno puede ser fluorescente mediante la adición de tintes fluorescentes o nanopartículas fluorescentes seleccionadas para ser excitadas, por ejemplo, a luz de 405 nm con una emisión de fluorescencia de longitud de onda más larga.

- Al usar el dispositivo de formación de imágenes, la aplicación de dichos agentes polímeros fluorescentes puede guiarse por imágenes fluorescentes en tiempo real. Esto puede permitir que el agente Theramer se administre/aplique con precisión (p. ej., tópicamente) en el sitio de la herida. Tras la aplicación del agente a la herida, el dispositivo de formación de imágenes fluorescente se puede usar para determinar cuantitativamente los efectos terapéuticos de los Theramers en la herida, así como para rastrear la biodistribución de estos en la herida a lo largo del tiempo, *in vivo* y no invasivamente. También puede ser posible agregar una baliza molecular, posiblemente con otra longitud de onda de emisión fluorescente, al MI Theramer™ que puede emitir fluorescencia en presencia de enzimas de la herida (p. ej., MMPs), y esto puede indicar en tiempo real la respuesta de la herida al MI Theramer™. Puede ser posible usar una emisión de fluorescencia para la aplicación de Theramer guiada por imagen en el sitio de la herida y otra emisión de fluorescencia diferente para la supervisión de la respuesta terapéutica y otras emisiones de fluorescencia para otras mediciones. La efectividad relativa de la inhibición de MMP y los tratamientos antimicrobianos se puede determinar simultáneamente con el tiempo. Usando el análisis de imágenes, puede ser posible la comparación en tiempo real de los cambios en la fluorescencia de estas señales en la herida. Esto imprime un aspecto cuantitativo al dispositivo, e imprime su utilidad clínica.

- Cabe señalar que se pueden agregar otros agentes de fluorescencia bio-seguros a los siguientes materiales que se usan actualmente para el cuidado de heridas. El material fluorescente puede luego visualizarse y supervisarse usando el dispositivo.

- Apósitos húmedos para heridas: Esto proporciona un ambiente húmedo y propicio para mejorar las tasas de curación en comparación con los apósitos tradicionales. La principal base de consumidores a la que se dirigen los fabricantes para estos apósitos son las personas mayores de 65 años, que sufren heridas crónicas como úlceras por presión y úlceras por estasis venosa. Los que padecen diabetes y como resultado, las úlceras desarrolladas forman parte de la población diana.
- Hidrogeles: esto agrega humedad a las heridas secas, creando un ambiente adecuado para una curación más rápida. Su característica adicional es que pueden usarse en heridas infectadas. Estos también están diseñados para heridas secas a ligeramente exudativas.
- Apósitos hidrocoloides: los hidrocoloides sellan el lecho de la herida y evitan la pérdida de humedad. Forman un gel al absorber los exudados para proporcionar un ambiente de curación húmedo. Estos se usan para heridas leves a moderadamente exudativas sin infección.
- Apósitos de alginato: absorben los exudados de la herida para formar un gel que proporciona un ambiente húmedo para la curación. Se usan principalmente para heridas altamente exudativas.
- Apósitos de espuma: estos absorben el drenaje de la herida y mantienen una superficie húmeda de la herida, permitiendo un ambiente propicio para la cicatrización de la herida. Se usan en heridas moderadamente

exudativas.

- Apósito de película transparente: no son absorbentes, pero permiten la permeabilidad al vapor de humedad, asegurando así una superficie húmeda de la herida. Tienen por objeto heridas secas o ligeramente exudativas. Los ejemplos incluyen apósitos de película transparente a base de espuma de alginato.
- 5 • Antimicrobianos: proporcionan una acción antibacteriana para desinfectar la herida. De particular interés es el uso de apósitos nanocristalinos de plata. La carga biológica, en particular las proteasas y toxinas acumuladas liberadas por las bacterias que dificultan la curación y causan dolor y exudación, se reduce significativamente con la liberación prolongada de plata.
- 10 • Apósitos activos para heridas: estos comprenden productos de ingeniería tisular altamente evolucionados. Los biomateriales y los sustitutos de la piel se incluyen en esta categoría; estos están compuestos completamente de biopolímeros como el ácido hialurónico y el colágeno o biopolímeros junto con polímeros sintéticos como el nylon. Estos apósitos promueven activamente la curación de heridas al interactuar directa o indirectamente con los tejidos de la herida. Los sustitutos de la piel son dispositivos de bioingeniería que personifican la estructura y la función de la piel.
- 15 • Ácido hialurónico: este es un componente natural de la matriz extracelular y desempeña un papel importante en la formación de tejido granular, la reepitelización y el remodelado. Proporciona hidratación a la piel y actúa como absorbente.

20 Otros productos para el cuidado de heridas que pueden visualizarse usando el dispositivo desvelado incluyen Theramers, geles que contienen plata (p. ej., hidrogeles), piel artificial, citoblastos ADD, metaloproteinasas anti-matriz y ácido hialurónico. Se pueden agregar agentes fluorescentes a otros productos para permitir la obtención de imágenes usando el dispositivo. En algunos casos, es posible que los productos ya sean luminiscentes y que no requieran la adición de agentes fluorescentes.

25 El dispositivo también se puede usar para supervisar los efectos de dichos tratamientos a lo largo del tiempo.

Aplicación para productos alimenticios

30 El dispositivo de formación de imágenes también puede ser útil para supervisar productos alimenticios (p. ej., productos cárnicos) en busca de contaminación. Esto puede ser útil, por ejemplo, en la preparación de productos alimenticios/animales en las industrias cárnica, avícola, láctea, pesquera y agrícola. El dispositivo se puede usar como parte de un enfoque multidisciplinario integrado para los servicios analíticos de laboratorio dentro de este sector, que puede proporcionar capacidades que incluyen la detección de la contaminación basada en imágenes y una guía para obtener muestras para las pruebas. El dispositivo se puede usar para la detección, identificación y supervisión en tiempo real del nivel de contaminación/adulteración de la carne bacteriana y microbiana de otros productos alimenticios. Puede usarse para el seguimiento de la contaminación bacteriana en el entorno de la planta de procesamiento de alimentos y, por lo tanto, puede proporcionar un método basado en imágenes para determinar la seguridad y la calidad de los alimentos. En realizaciones en las que el dispositivo es manual, compacto y portátil, el dispositivo de formación de imágenes puede ser útil en las áreas de preparación de alimentos para determinar la seguridad de los productos alimenticios frente a la contaminación bacteriana/microbiana. El dispositivo también se puede usar para la detección y el análisis relativamente rápidos de bacterias/microbios en muestras de carne (y en superficies de preparación) recogidas o muestreadas, por ejemplo, como parte del proceso de inspección regulada de calidad y seguridad de los alimentos, durante el procesamiento y en productos alimenticios terminados. Este dispositivo se puede usar en las industrias de la carne, horticultura y acuicultura para implementar procedimientos de inspección/detección de seguridad alimenticia que cumplan con los requisitos de seguridad y calidad de los alimentos. El dispositivo se puede usar para detectar contaminantes en los alimentos, por ejemplo, contaminantes que se encuentran en las industrias cárnica, avícola, láctea y pesquera. Esta tecnología puede ser útil como sistema de detección de contaminantes fecales, ya que las bacterias fecales producen porfirinas que el dispositivo puede detectar fácilmente.

50 La detección y la identificación precisa de patógenos transmitidos por los alimentos, como *Listeria monocytogenes* (LM), en las muestras de alimentos y en las líneas de procesamiento pueden ser fundamentales tanto para garantizar la calidad de los alimentos como para rastrear los brotes de patógenos bacterianos en el suministro de alimentos. Los métodos de detección actuales empleados en las instalaciones de producción y procesamiento de alimentos se basan generalmente en el muestreo aleatorio múltiple de la superficie del equipo (p. ej., muestreo) y los posteriores ensayos de diagnóstico de base molecular (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, RT-PCR) que pueden proporcionar confirmación cuantitativa de la presencia de LM, normalmente dentro de un plazo de 24-72 h. Sin embargo, debido a las restricciones de tiempo y costo, generalmente solo las zonas seleccionadas al azar de una instalación de producción de alimentos determinada se someten a pruebas de contaminación de patógenos a la vez, y el potencial significativo de un submuestreo durante el muestreo de superficie de "primer pase" del equipo puede no detectar patógenos que causan consecuencias sanitarias y económicas catastróficas. Además, la incapacidad de i) muestrear rápidamente todas las áreas de la superficie durante el muestreo de "primer pase" para identificar áreas con alta probabilidad de infección, ii) para documentar visualmente este proceso de detección sistemática inicial (p. ej., no hay métodos de formación de imágenes disponibles hasta la fecha), iii) el retraso en la obtención de resultados de laboratorio, iv) los altos costos asociados con los métodos actuales, y v) lo que es más importante, la posibilidad de que no se detecten infecciones por patógenos mortales ha intensificado esfuerzos para

mejorar la detección temprana y precisa de patógenos de origen alimentario de manera rentable.

El dispositivo puede ser útil para proporcionar una manera relativamente rápida y precisa de detectar tales patógenos. El dispositivo se puede usar con un ensayo de un "cóctel" de sonda de fluorescencia multicolor (p. ej., una combinación de dos o más agentes de contraste) que puede identificar inequívocamente (y hacer visible) solo *Listeria monocytogenes* viable de otras especies de *Listeria* usando tecnología de sonda altamente específica de genes. Esto puede permitir la detección específica de LM vivos en tiempo real, minimizando potencialmente la necesidad de métodos convencionales de enriquecimiento que requieran mucho tiempo. Este método también se puede expandir para incluir la detección de otros patógenos de interés, incluyendo *Enterobacter sakazakii*, especies de *Camylobacter* (*C. coli*, *C. jejuni* y *C. lari*), bacterias coliformes y bacterias de la especie *E. coli* (incluyendo cepas de *Escherichia coli* negativas a lactosa e indoles), *Salmonella*, todas las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus aureus* y por separado todas las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se pueden detectar otras bacterias seleccionando una sonda o combinación de sondas adecuadas. Por ejemplo, una combinación de dos o más agentes de contraste puede diseñarse para que sea específica para ciertas bacterias, y puede dar como resultado un distintivo fluorescente detectable único cuando se toma una imagen usando el dispositivo de formación de imágenes.

El dispositivo de formación de imágenes se puede usar (p. ej., cuando se combina con agentes de contraste específicos para bacterias exógenas aplicadas, que incluyen una sonda multidiana o una combinación de sondas) para la detección sistemática relativamente rápida de "primer pase" de las superficies de preparación y manejo de alimentos para el muestreo específico y pruebas microbiológicas. Este dispositivo puede permitir una vigilancia basada en imágenes relativamente rápida de cualquier superficie de equipos y productos alimenticios y puede capturar el distintivo de fluorescencia de bacterias/patógenos transmitidos por los alimentos en tiempo real. El dispositivo se puede usar en combinación con, por ejemplo, un ensayo de un "cóctel" de sondas de fluorescencia de varios colores (y sus combinaciones) que puede identificar inequívocamente (y hacer visible) solo *Listeria monocytogenes* viable de otras especies de *Listeria* usando tecnología de sonda altamente específica de genes, como se ha descrito anteriormente. Dicho "cóctel" de sondas puede diseñarse para dirigirse específicamente a ciertos patógenos en función de una combinación específica de sondas que se sabe que son sensibles a tales patógenos y que se sabe que dan una respuesta de fluorescencia característica. Además de la detección de dichos patógenos, el dispositivo puede permitir la diferenciación de la presencia y/o ubicación de diferentes cepas, en función de su respuesta de fluorescencia distintiva diferente.

La Figura 26 muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes para el examen en tiempo real de productos cárnicos en el suministro de alimentos. En este caso, a) la luz blanca y b) la imagen de autofluorescencia correspondiente de un trozo de carne de cerdo muestra la diferencia entre varios tejidos, incluidos el hueso y el tendón (flecha blanca), la grasa y el músculo, c) la luz blanca y b) la imagen de autofluorescencia correspondiente de un "borde de corte" del hueso, en el que el cartílago (flecha azul) tiene un color verde brillante bajo la luz de fluorescencia debido a la autofluorescencia del colágeno, mientras que varios tipos de tejidos internos del hueso, incluida la médula ósea (flecha roja) se puede diferenciar usando la fluorescencia. La última observación puede sugerir adicionalmente el uso del dispositivo óptico de formación de imágenes manual para la guía de imagen de fluorescencia en tiempo real durante la cirugía ortopédica en pacientes humanos y veterinarios, como se ha analizado anteriormente. (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm de emisión (rojo)).

La Figura 27 muestra otro ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes para el examen en tiempo real de productos cárnicos en el suministro de alimentos. En este caso, a) luz blanca y b) imágenes de autofluorescencia correspondientes de un trozo de carne de cerdo que se ha mantenido durante 2 días a 37 °C. La imagen de autofluorescencia muestra la presencia de una contaminación bacteriana mixta en la superficie de la carne (áreas de fluorescencia roja; flechas amarillas) que incluyen, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* y *E. Coli*. (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm de emisión (rojo)).

Contaminación de la superficie

El dispositivo de formación de imágenes puede ser útil para la detección de contaminación de la superficie, como la detección de "contaminación bacteriana de la superficie" en entornos de atención médica. Este dispositivo se puede usar para detectar y visualizar la presencia de bacterias/microbios y otros patógenos en una variedad de superficies/materiales/instrumentos (en particular los relacionados con la cirugía) en hospitales, centros de atención crónica y hogares de ancianos, en los que hay contaminación. Es la principal fuente de infección. El dispositivo se puede usar junto con la detección, identificación y enumeración convencional de organismos indicadores y estrategias de patógenos.

La Figura 28 muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes para el examen en tiempo real de muestras de tierra y algas, en un ejemplo de muestreo/detección ambiental de contaminantes. A) Luz blanca y b) Imágenes de autofluorescencia correspondientes de una placa de Petri que contiene una muestra de tierra y mineral. c) Un ejemplo del dispositivo de formación de imágenes usado para detectar contaminantes de tierra fluorescentes/materiales peligrosos. En este caso, por ejemplo, se añadió un líquido marcado con fluoresceína a la tierra antes de la imagen de fluorescencia para ilustrar el uso potencial del dispositivo de formación de imágenes

para la detección y supervisión de sustancias contaminantes ambientales y contaminantes, d) un ejemplo del dispositivo de formación de imágenes usado para obtener luz blanca y e) imágenes de autofluorescencia de un cultivo de algas verdes cultivadas en condiciones de laboratorio, que ilustra la utilidad potencial del dispositivo de formación de imágenes para la supervisión en tiempo real de las condiciones del agua basadas en imágenes de fluorescencia (p. ej., purificación de agua potable/pruebas de seguridad, o crecimiento de algas en plantas de producción a gran escala). Como ejemplo del dispositivo de formación de imágenes usado para detectar enfermedades en plantas, f) muestra una imagen de luz blanca de una planta doméstica común, mientras que g) muestra la imagen de autofluorescencia correspondiente de una infección micótica que tiene un color verde brillante (flechas amarillas) que afecta a las hojas de las plantas, en comparación con el tejido de la hoja sana que tiene un color marrón rojizo brillante. (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm de emisión (rojo)). Por lo tanto, el dispositivo puede ser útil para obtener imágenes de materiales vegetales.

La Figura 28B muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes usado para la detección de la contaminación oculta con luz blanca de fluidos biológicos en entornos públicos y privados, a) luz blanca y b-c) autofluorescencia correspondiente de los fluidos biológicos que contaminan un inodoro y una encimera de tocador de baño. Estos datos sugieren que el dispositivo de formación de imágenes se puede usar para detectar la contaminación de la superficie por muestras/fluidos biológicos/infecciosos potencialmente peligrosas para el muestreo, la limpieza o la supervisión guiada por imágenes. (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm de emisión (rojo)).

La Figura 28C muestra un ejemplo del uso del dispositivo para la detección de contaminación bacteriana de instrumentos quirúrgicos (b; flecha verde) usando imágenes de fluorescencia. (canales de 405 nm de excitación; 490-550 nm y >600 nm de emisión).

Usos forenses

El uso del dispositivo de formación de imágenes para identificar los contaminantes y dianas de la superficie puede ser útil en aplicaciones forenses. Por ejemplo, el dispositivo puede ser útil para la detección forense de huellas dactilares latentes y fluidos biológicos en superficies no biológicas. El dispositivo puede ofrecer un medio relativamente económico, compacto y portátil para obtener imágenes digitales (p. ej., con luz blanca, fluorescencia y/o reflectancia) de huellas dactilares latentes y fluidos biológicos, y otras sustancias de interés forense. La primera se puede hacer fluorescente usando tintes de fluorescencia de huella digital disponibles en el mercado, y la última se puede detectar usando la autofluorescencia de los fluidos o agentes colorantes fluorescentes "dirigidos" aplicados exógenamente (tal como Luminol). Las imágenes pueden ser grabadas digitalmente. El dispositivo también se puede usar durante los procedimientos de autopsia para detectar hematomas.

La Figura 29 muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes para la detección de fluorescencia en tiempo real de fugas de líquidos usando un tinte trazador para fugas fluorescente exógeno. a) Imagen de luz blanca de un grifo típico, b) imagen de fluorescencia correspondiente (que muestra la presencia del fluido con fugas (con tinte de fluorescencia agregado), e imagen compuesta de luz blanca y fluorescencia. Tenga en cuenta que la fuga (en este ejemplo, el agua) no es visible con luz blanca, pero se detecta fácilmente usando fluorescencia. Estos datos sugieren que el dispositivo de formación de imágenes puede ser útil para un rastreo por formación de imágenes y detección de fugas de líquidos/fluidos relativamente rápidos (excitación de 405 nm, emisión de 500-550 nm (verde), >600 nm de emisión (rojo)).

La Figura 30 muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes para la detección de fluorescencia en tiempo real de contaminantes de la superficie). a) imagen de luz blanca de una superficie de banco de laboratorio típica y b) un área que se va a visualizar con el dispositivo de formación de imágenes, c) las imágenes de fluorescencia se pueden usar para detectar contaminantes que no se visualizan fácilmente con luz blanca (a, b).

El dispositivo de formación de imágenes también se puede usar para detectar huellas dactilares latentes, por ejemplo, usando un tinte fluorescente para mejorar las crestas de huellas dactilares en una superficie de la mesa. Esto se puede hacer, por ejemplo, al incluir un tinte fluorescente combinado con superglue (p. ej., cianoacrilato) para desarrollar un contraste de huellas dactilares contra las superficies de fondo. Se pueden usar tintes fluorescentes de infrarrojo lejano e infrarrojo cercano para reducir el potencial de fondo autofluorescente. Estos datos sugieren el uso del dispositivo de formación de imágenes para la detección relativamente rápida basada en imágenes de contaminantes no biológicos y biológicos, así como huellas dactilares, por ejemplo, en aplicaciones forenses. (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm de emisión (rojo)).

El dispositivo también puede ser útil en aplicaciones contra la falsificación. La Figura 31 muestra un ejemplo del dispositivo de formación de imágenes que se usa para obtener imágenes de moneda común (en este ejemplo, un billete canadiense de 20\$) en a) luz blanca y b, c) modos de autofluorescencia. Invisibles bajo luz blanca (a), se pueden observar medidas especiales contra la falsificación bajo fluorescencia: es decir, las fibras de fluorescencia incrustadas (b) y la marca de agua incrustada de los billetes de banco (c) se pueden distinguir espectralmente (flechas). Estos datos sugieren que el dispositivo se puede usar para fines de lucha contra la falsificación. (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm de emisión (rojo)).

Catalogación

- El dispositivo de imágenes puede permitir la catalogación de animales con base fluorescente, como los animales de laboratorio. La Figura 32 muestra un ejemplo del uso del dispositivo de formación de imágenes para la detección de fluorescencia en tiempo real de las etiquetas de identificación de "código de barras" para animales de laboratorio. La figura muestra a) una imagen de luz blanca de una rata de laboratorio típica y b) una imagen de fluorescencia de la rata marcada con un código de barras fluorescente. El uso de múltiples tintes/colores fluorescentes en combinación con patrones/barras de códigos de barras puede usarse para la "catalogación multiplexada" de animales, por ejemplo, para estudios de investigación longitudinales. Estos datos sugieren el uso del dispositivo de formación de imágenes para la catalogación con códigos de barras basado en imágenes de alto rendimiento relativamente rápida de animales de laboratorio para su uso en c) colonias de animales de "contención de patógenos" en laboratorios de investigación y para el genotipado de animales (p. ej., animales transgénicos, recuadro en c), por ejemplo. (405 nm de excitación, 500-550 nm de emisión (verde), >600 nm de emisión (rojo)). El dispositivo también se puede usar para obtener imágenes de códigos de barras basados en fluorescencia u otros sistemas de codificación en otras aplicaciones, como el seguimiento de inventario y el seguimiento del punto de venta.

Kits para un dispositivo

- El dispositivo de formación de imágenes puede proporcionarse en un kit, por ejemplo, incluyendo el dispositivo y un agente de contraste fluorescente. El agente de contraste puede ser uno o más de los descritos anteriormente. Por ejemplo, el agente de contraste puede ser para marcar un biomarcador en una herida, en el que el kit es para aplicaciones de supervisión de heridas.
- La Figura 33 muestra un ejemplo de un kit que incluye el dispositivo de formación de imágenes, a) muestra el mango y la pantalla de visualización táctil, y b) muestra la carcasa externa y las fuentes de luz de excitación. El dispositivo de formación de imágenes puede usarse para escanear la superficie corporal de pacientes humanos y veterinarios para la evaluación de heridas basadas en imágenes, o para aplicaciones de imágenes sin heridas. El dispositivo y cualquier accesorio (p. ej., fuentes de alimentación eléctrica/con batería), agentes de contraste de fluorescencia exógenos potenciales, etc.) pueden colocarse de forma conveniente en recipientes rígidos para transporte en entornos clínicos y no clínicos (incluyendo sitios remotos, hogar de la tercera edad y entornos de laboratorio de investigación).

Usos cosméticos o dermatológicos

- El dispositivo de formación de imágenes también se puede usar para obtener imágenes de productos cosméticos o dermatológicos.
- La Figura 34 muestra un ejemplo del uso del dispositivo para obtener imágenes de productos cosméticos. Por ejemplo, cuatro cremas cosméticas disponibles comercialmente se muestran en a) luz blanca y b) modos de imagen de fluorescencia, que muestran el contraste de fluorescencia entre las cremas y la piel de fondo. Estos datos ilustran el uso potencial del dispositivo de formación de imágenes manual para usar en la imagen de la presencia y los posibles efectos biológicos de los cosméticos (p. ej., rehidratación de la piel, remodelado de colágeno, reparación de daños por quemaduras solares, exfoliación de la piel) y o agentes o fármacos dermatológicos (canales de excitación de 405 nm; emisión de 490-550 nm y >600 nm)).
- El dispositivo de formación de imágenes puede usarse en modos de luz blanca y fluorescencia para mejorar la administración de estos tratamientos, así como para supervisar su efectividad a lo largo del tiempo de forma no invasiva y cuantitativa. El dispositivo se puede usar en combinación con otras modalidades de imagen, por ejemplo, métodos de imagen térmica, entre otros.
- Este dispositivo también se puede usar para someter a ensayo agentes antibacterianos, antibióticos o desinfectantes. Las imágenes de fluorescencia proporcionadas por este dispositivo pueden usarse, por ejemplo, en combinación con imágenes de luz blanca, para detectar cuantitativamente la efectividad de los tratamientos farmacéuticos en cultivos bacterianos y otros sistemas modelo, durante el descubrimiento, la optimización y la evaluación de fármacos, por ejemplo, para el tratamiento de heridas.

Todos los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria son solo para fines de ilustración y no tienen por objeto ser limitativos. Un experto en la materia entenderá que son posibles otras variaciones.

REIVINDICACIONES

1 Un método de formación de imágenes y supervisión por fluorescencia de una diana para detectar contaminación en una diana, comprendiendo el método:

- 5 marcar un biomarcador seleccionado en la diana con al menos un agente de contraste fluorescente exógeno específico de bacterias, en donde el marcado comprende aplicar tópicamente el agente de contraste a la diana; con un dispositivo para formación de imágenes y supervisión por fluorescencia de la diana, que comprende: una fuente de luz (5) para emitir una luz para iluminar la diana, incluyendo la luz emitida al menos una longitud de onda o banda de longitud de onda que causa la fluorescencia de al menos un biomarcador asociado con la diana; un portafiltros óptico (3) configurado para alojar uno o más filtros ópticos; un suministro eléctrico (19); un dispositivo de adquisición de imágenes digitales (1) que tiene un objetivo (2) y está configurado para adquirir una imagen por fluorescencia de la diana, en donde el dispositivo de adquisición de imágenes digitales es una cámara digital, una grabadora de vídeo, una videocámara, un teléfono móvil con una cámara digital incorporada, un teléfono inteligente con una cámara digital o un asistente digital personal o una cámara web, y comprende una pantalla de visualización; y una carcasa (20) que alberga todos los componentes del dispositivo en una entidad y comprende un medio de fijación del dispositivo de adquisición de imágenes digitales en la carcasa, en donde la carcasa está configurada para ser manual, compacta y portátil, iluminando la diana con la fuente de luz del dispositivo con una longitud de onda de 400 nm a 450 nm, preferentemente 405 nm;
- 10 detectar la fluorescencia con una longitud de onda de 500 a 550 nm y superior a 600 nm con el dispositivo de adquisición de imágenes digitales; y
- 15 detectar la presencia y/o ubicación de una cepa bacteriana en la diana en tiempo real, en función de la fluorescencia detectada; y
- 20 mostrar en la pantalla de visualización del dispositivo de adquisición de imágenes digitales una imagen de la cepa bacteriana detectada, en tiempo real.

2. El método de la reivindicación 1, en donde aplicar un agente de contraste fluorescente exógeno específico de bacterias a la diana incluye aplicar una mezcla de dos o más agentes de contraste.

- 30 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde aplicar un agente de contraste exógeno específico de bacterias a la diana comprende marcar una o más de: *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii*, *Camylobacter coli*, *Camylobacter jejuni*, *Camylobacter lari*, bacterias coliformes, bacterias de la especie *E. coli*, *Salmonella*, bacterias de la especie *Staphylococcus aureus*, bacterias del género *Staphylococcus* y *Pseudomonas aeruginosa* presentes en la diana con uno o más agentes de contraste fluorescentes.

- 35 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además, cuando se detectan bacterias en la diana iluminada, diferenciar entre cepas de bacterias presentes en la diana iluminada.

- 40 5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la diana comprende uno de un producto alimenticio, una superficie de manipulación de alimentos y una superficie de producción de alimentos.

- 45 6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la diana es una diana biológica, una diana cutánea, una diana forense, un entorno quirúrgico, un producto alimenticio o es una parte de un inodoro, una encimera, un instrumento médico o quirúrgico, una superficie de preparación de alimentos, una superficie de manipulación de alimentos o un equipo de procesamiento de alimentos.

7. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además iluminar la diana sobre la que se ha aplicado el agente de contraste con luz blanca emitida por al menos una fuente de luz blanca del dispositivo portátil.

- 50 8. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el al menos un biomarcador preseleccionado se selecciona entre el grupo que consiste en: bacterias, hongos, levaduras, esporas, virus, microbios, parásitos, tejidos conectivos, componentes tisulares, exudados, pH, vasos sanguíneos, nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH), flavina adenina dinucleótido (FAD), microorganismos, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial (EGF), factor de crecimiento epitelial, antígeno de membrana de células epiteliales (ECMA), factor inducible por hipoxia (HIF-1), anhidrasa carbónica IX (CAIX), laminina, fibrina, fibronectina, factor de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformante (TGF), proteína de activación de fibroblastos (FAP), inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), óxido nítrico sintasa (NOS), NOS inducible y endotelial, lisosomas en células, macrófagos, neutrófilos, linfocitos, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), anti-neuropéptidos, endopeptidasas neutras (NEP), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), elastasas neutrófilas, catepsinas, arginasas, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2), proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2), y proteína quimioatrayente de macrófagos-1 (MCP-1), neutrófilos polimorfonucleares (PMN), macrófagos, miofibroblastos, interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF), óxido nítrico (NO), c-myc, beta-catenina, células progenitoras endoteliales (EPC), metaloproteinasas de matriz (MMP) e inhibidores de MMP.

- 65 9. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el agente de contraste es ácido aminolevulínico (ALA).

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el agente de contraste se selecciona de entre el grupo que consiste en moléculas fluorescentes, tintes cromogénicos, puntos cuánticos (QDot), balizas moleculares, nanopartículas que tienen agentes fluorescentes y nanopartículas de dispersión o absorción.

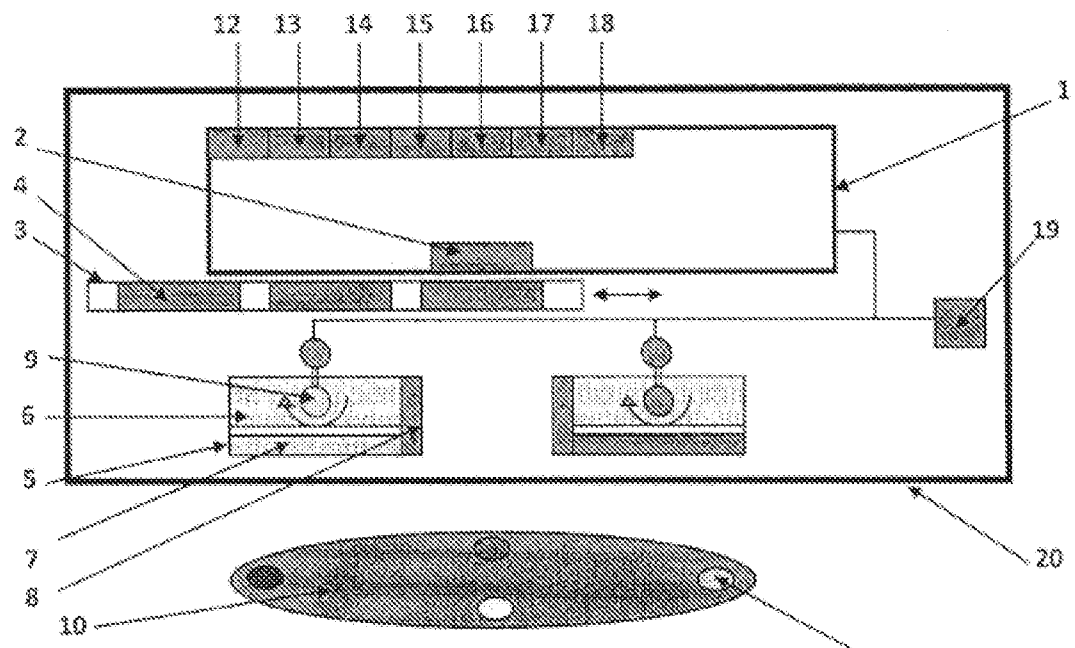


Figura 1

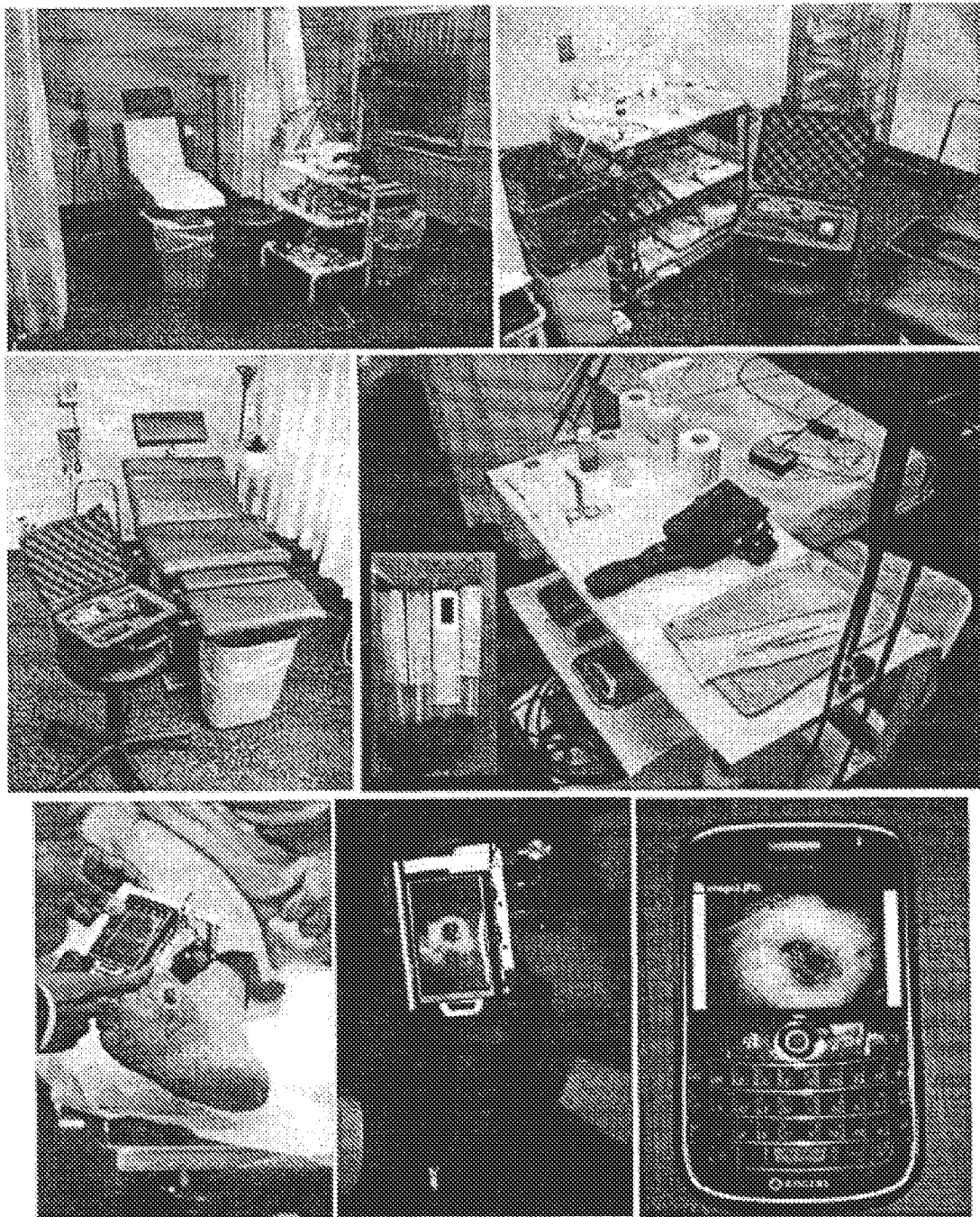


Figura 1B

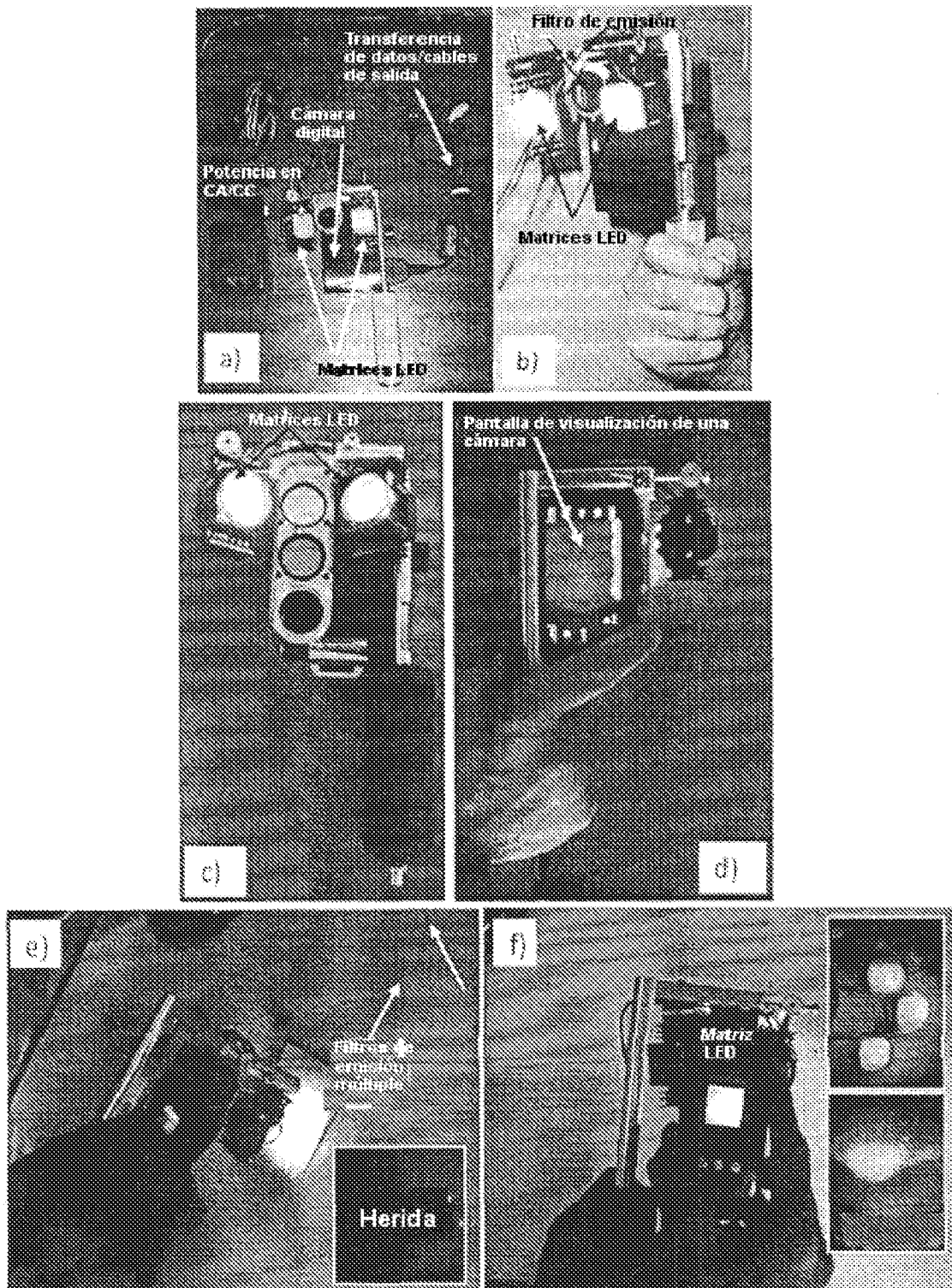


Figura 2

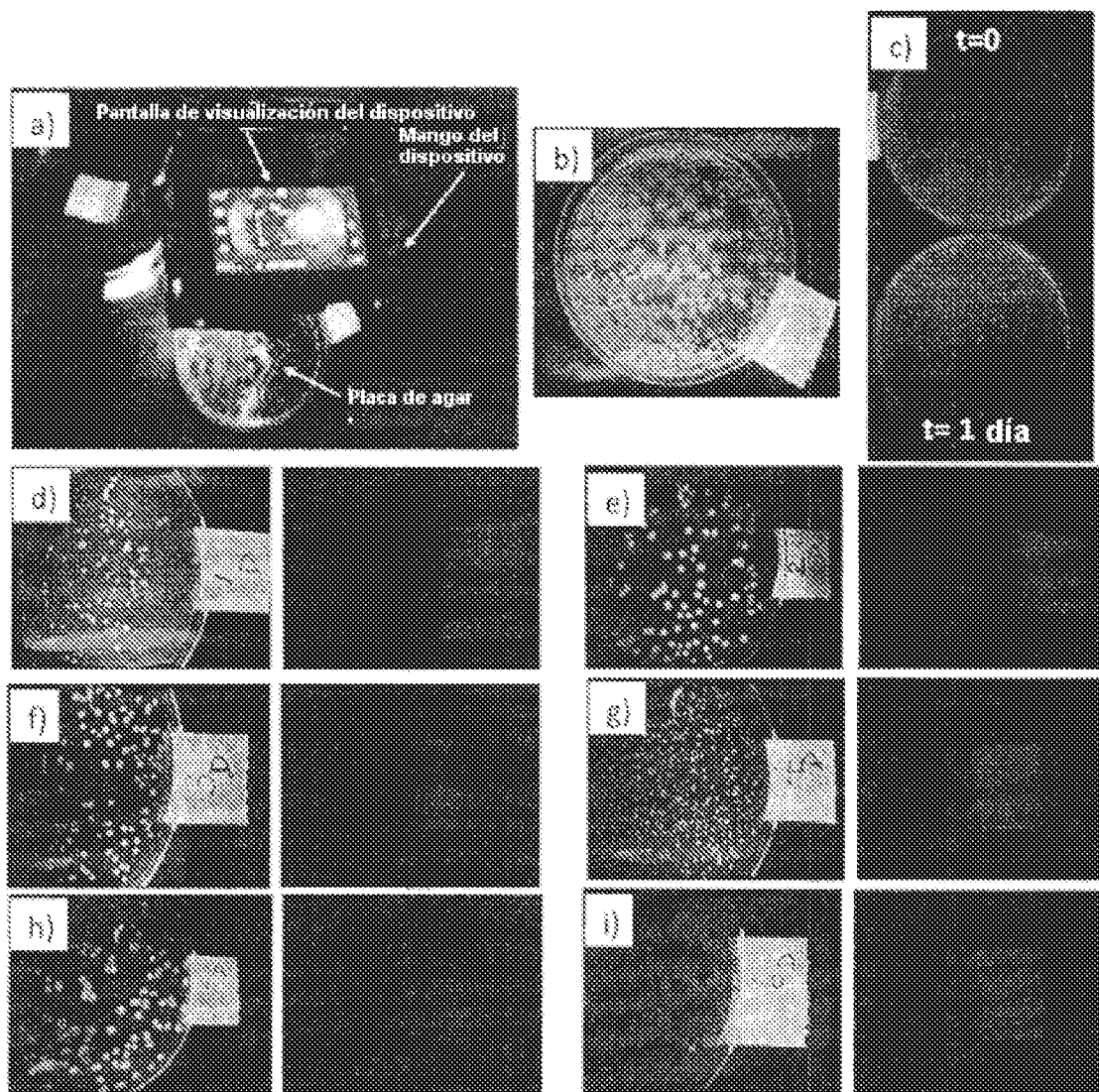


Figura 3

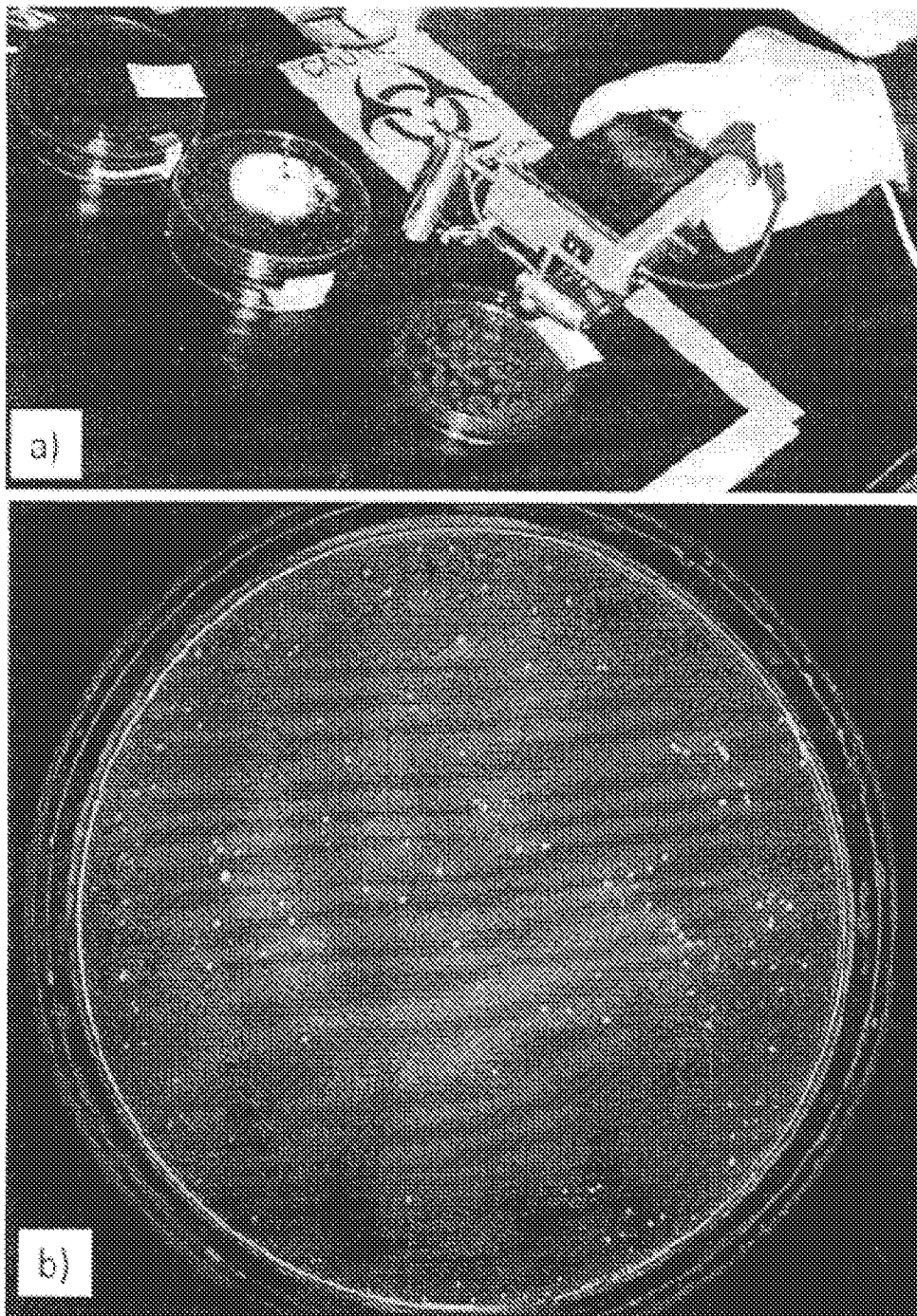


Figura 3J

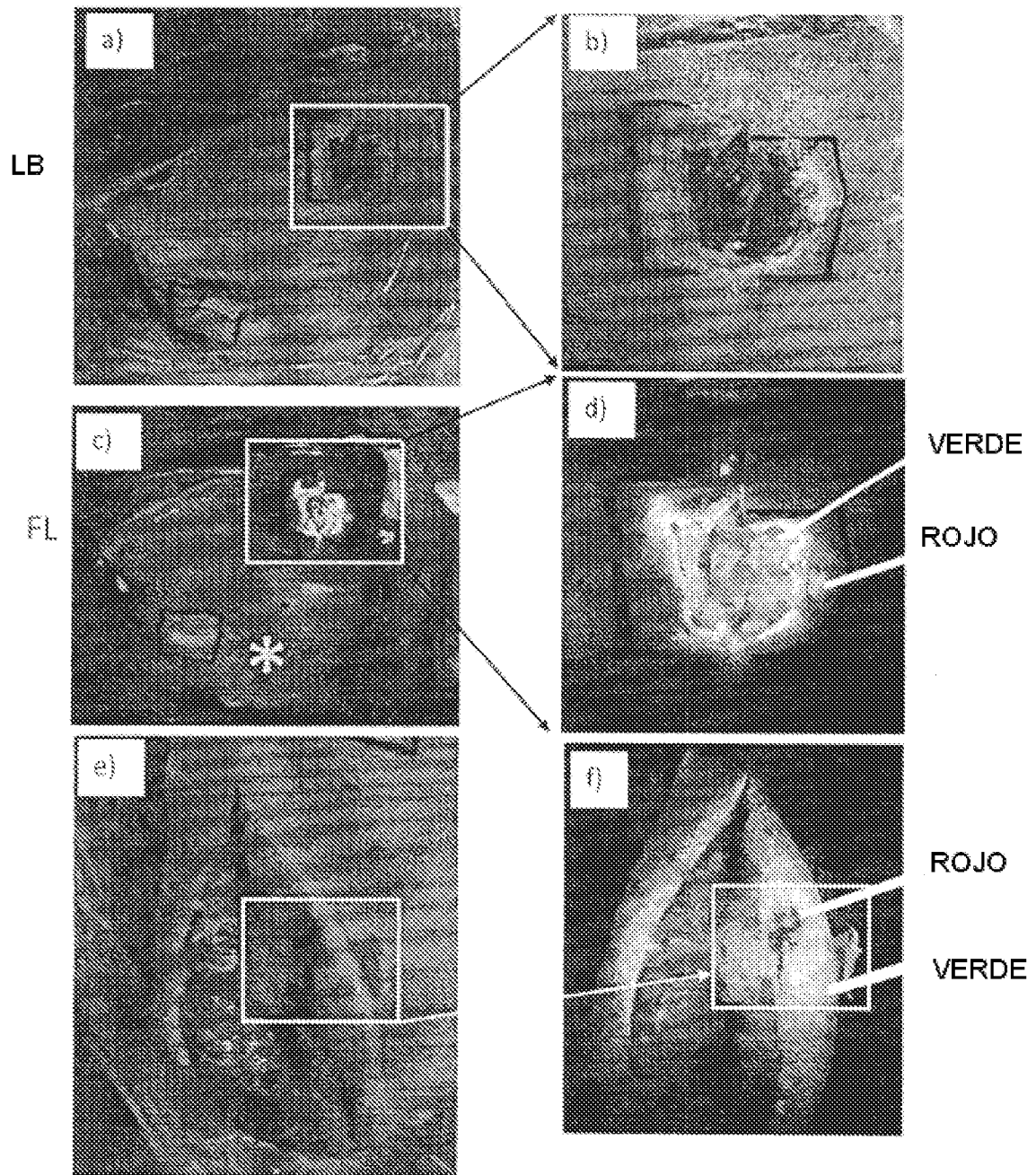


Figura 4

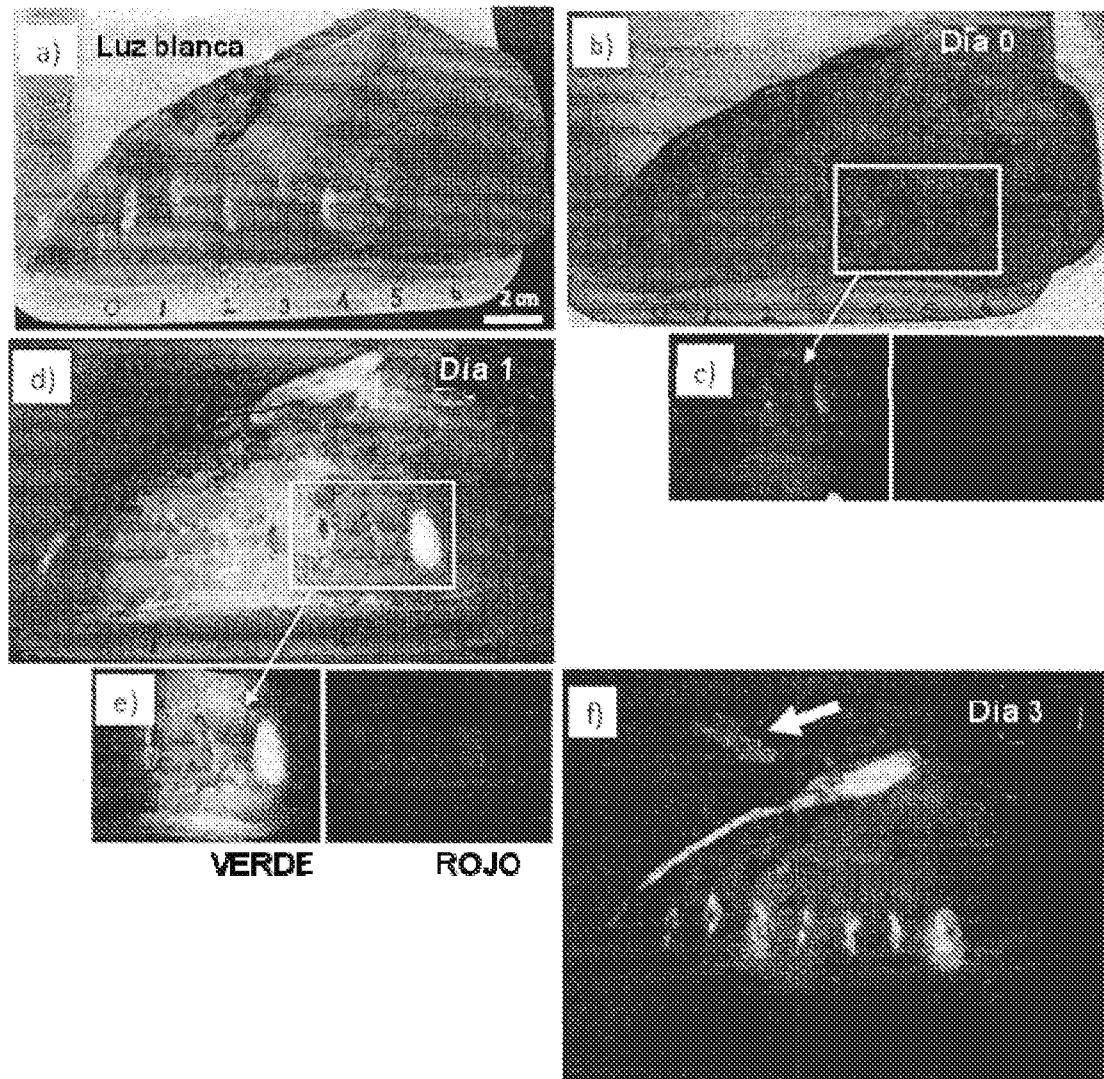


Figura 5

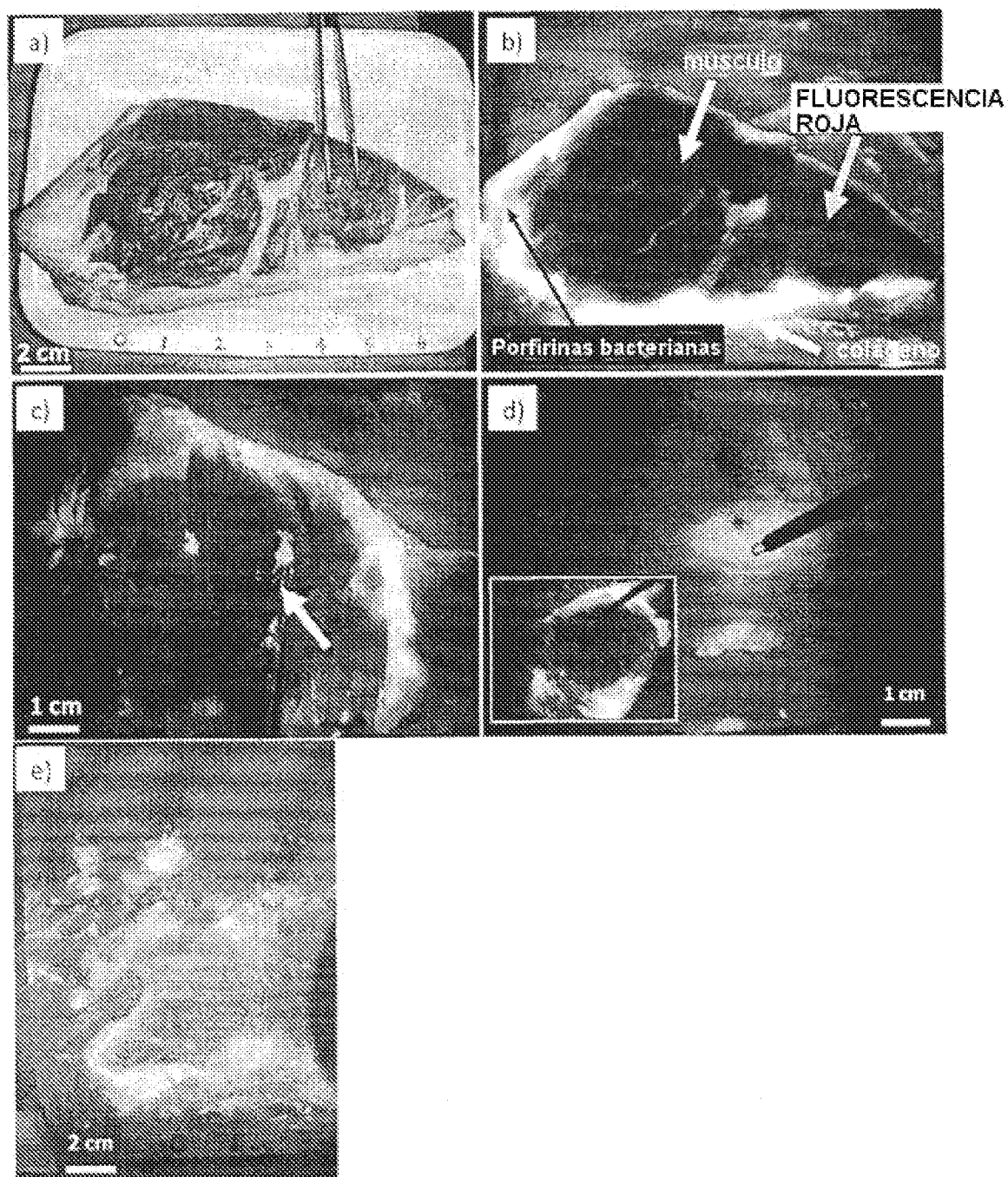


Figura 6

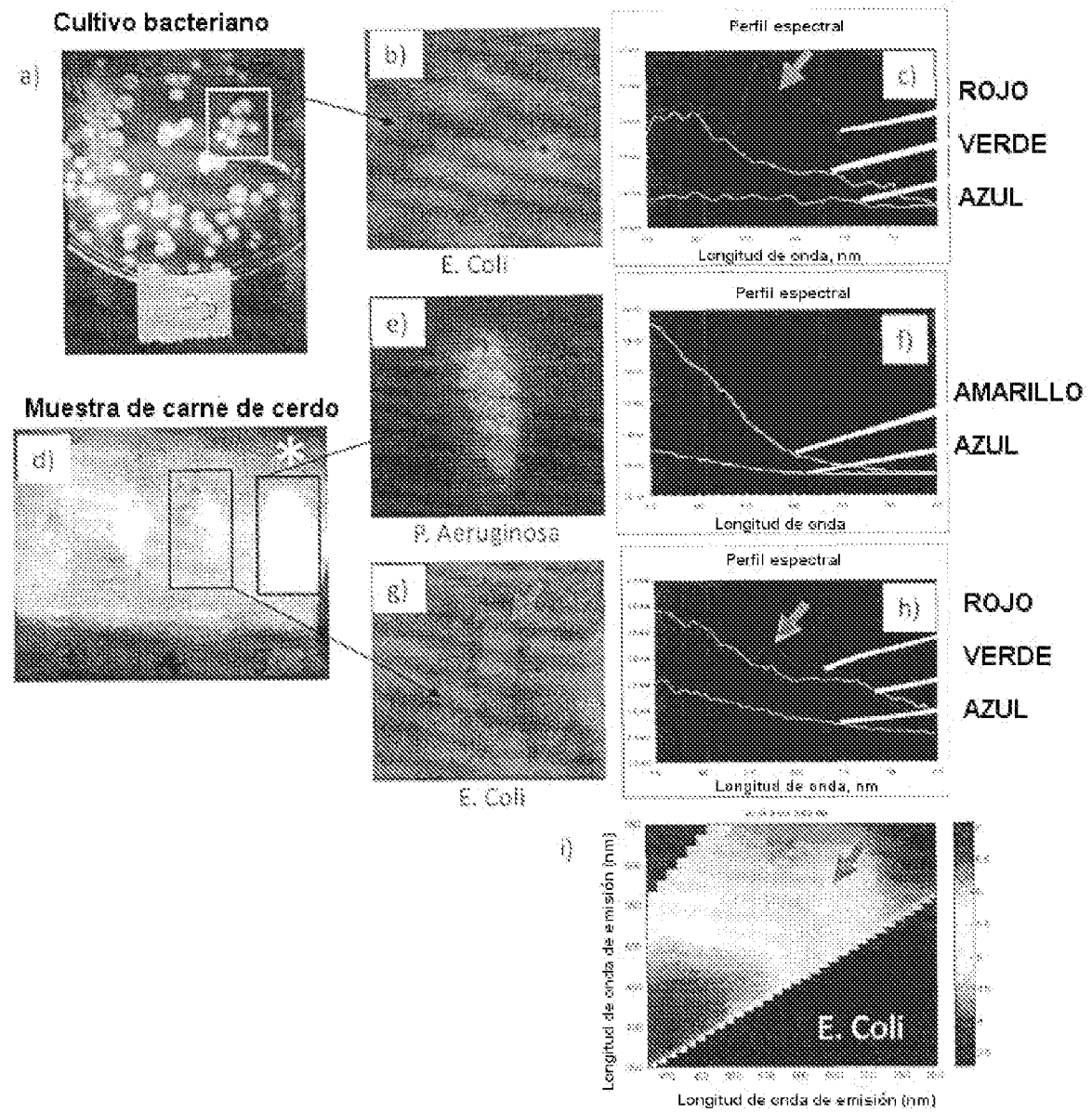


Figura 7

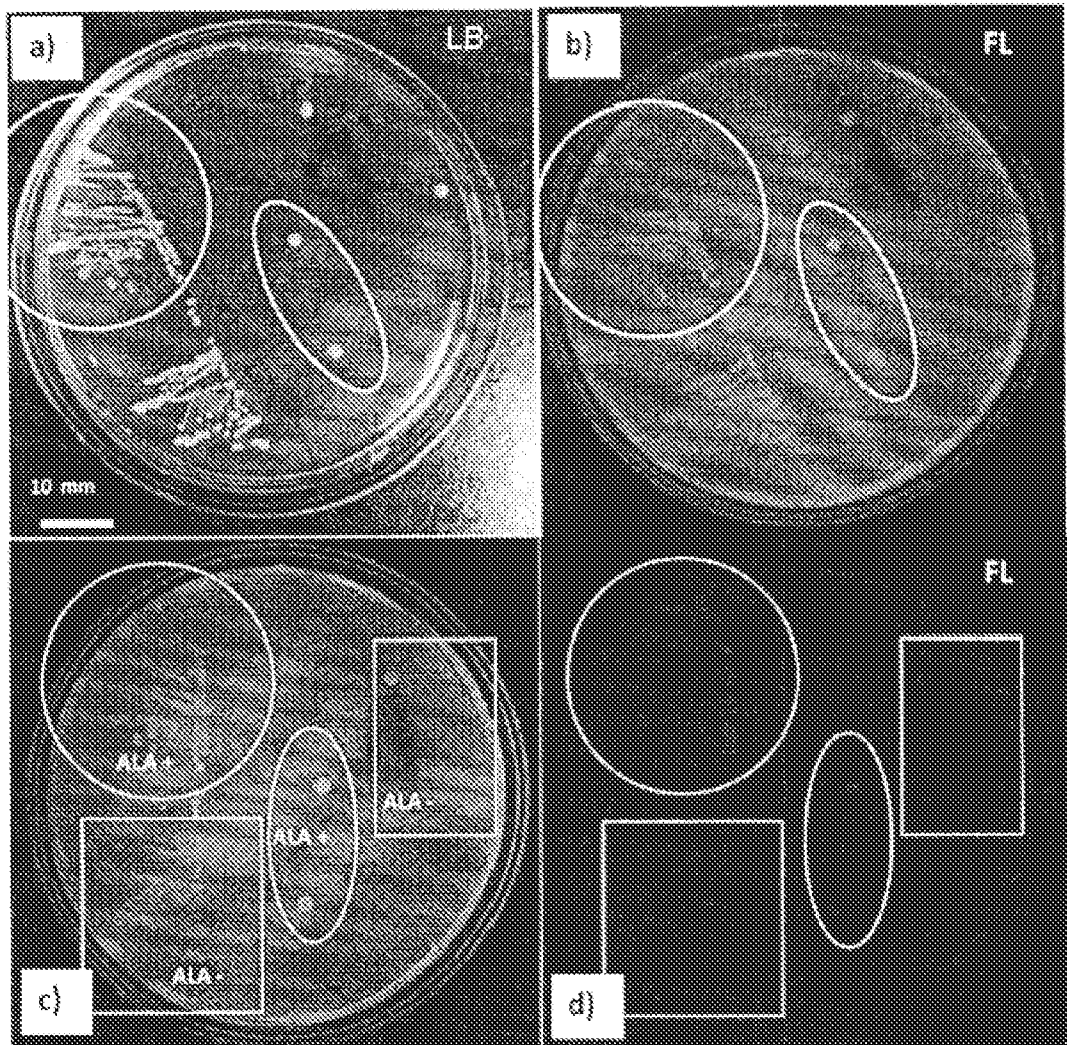


Figure 8

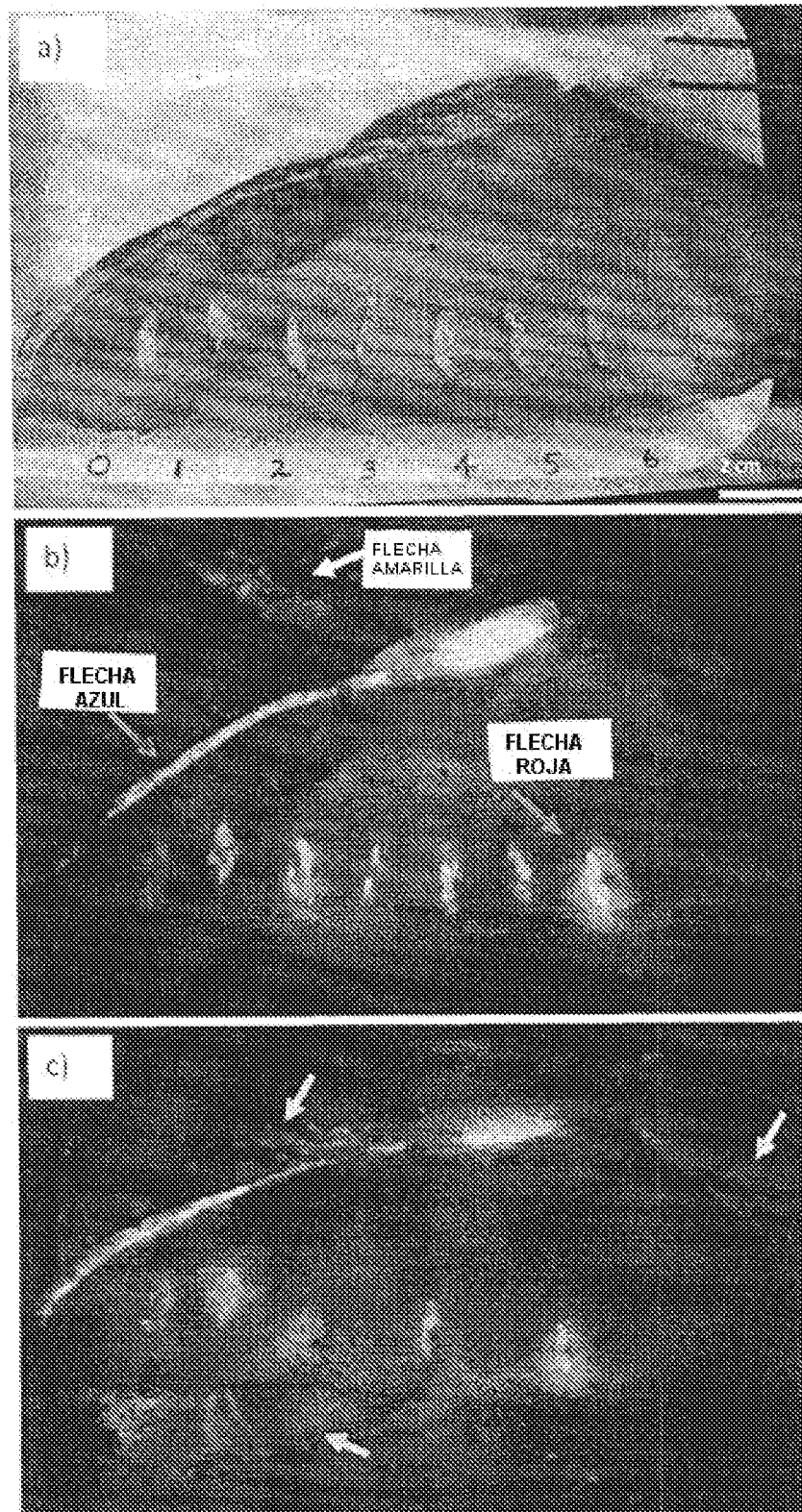


Figura 9

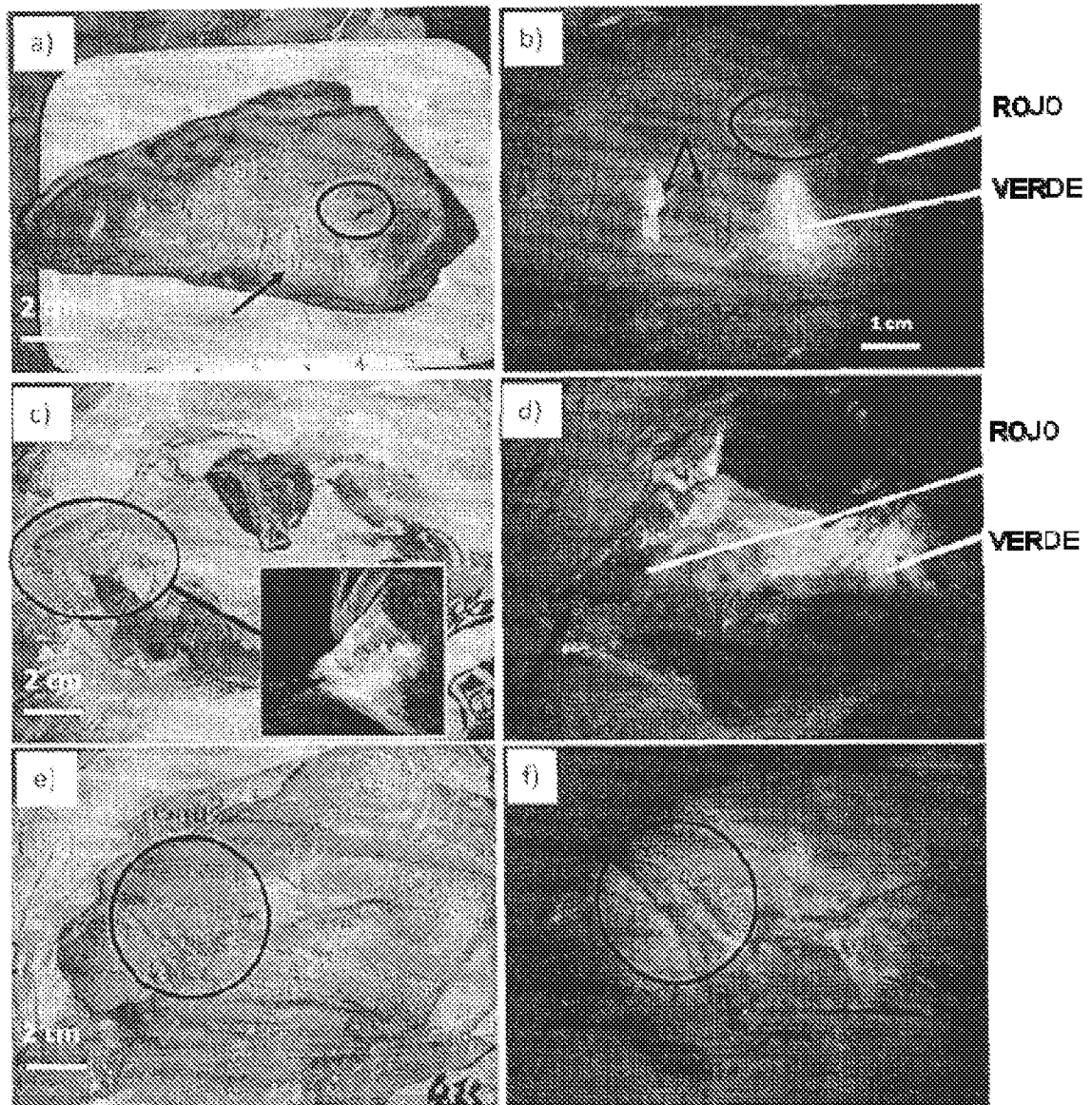


Figura 10

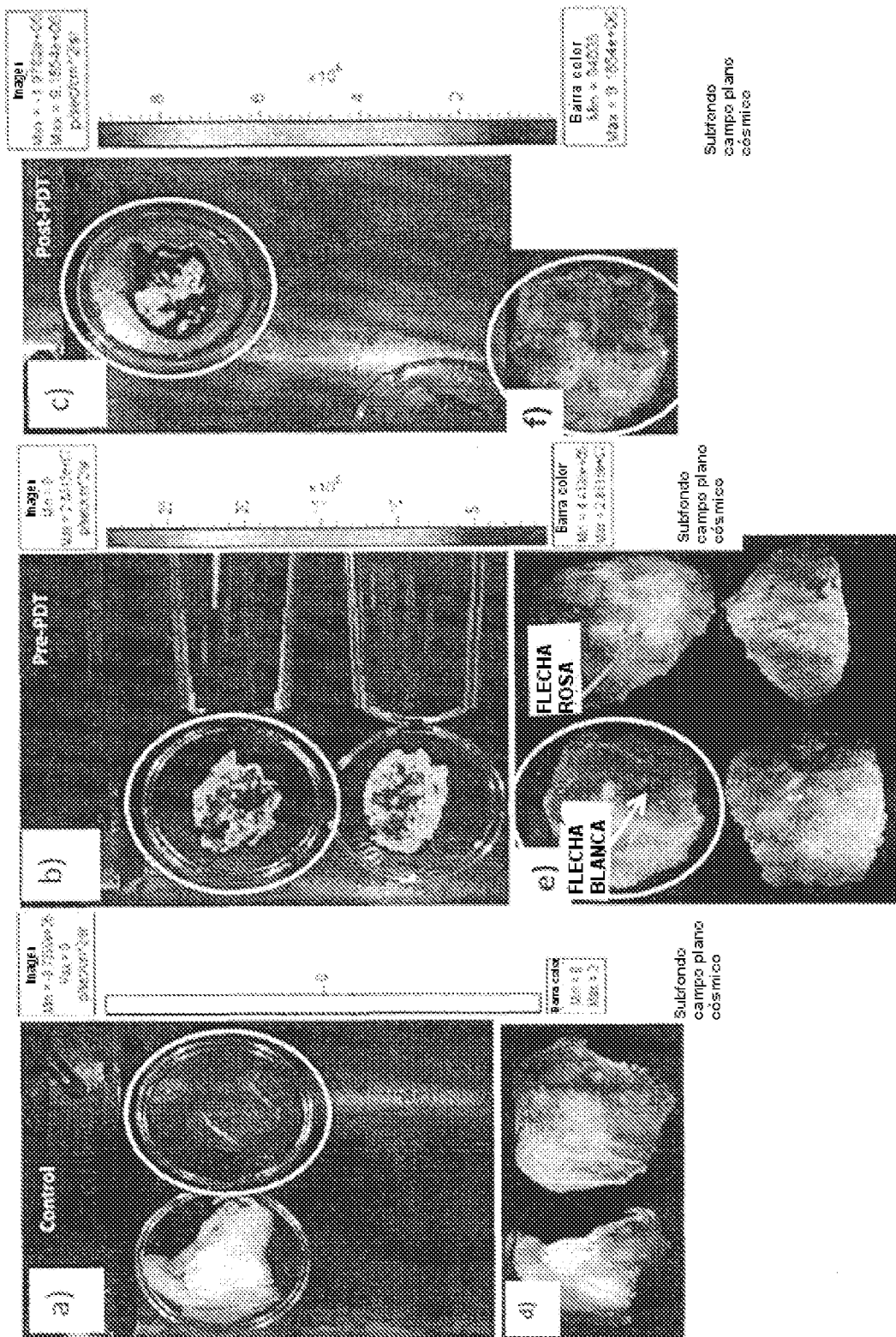


Figura 10G

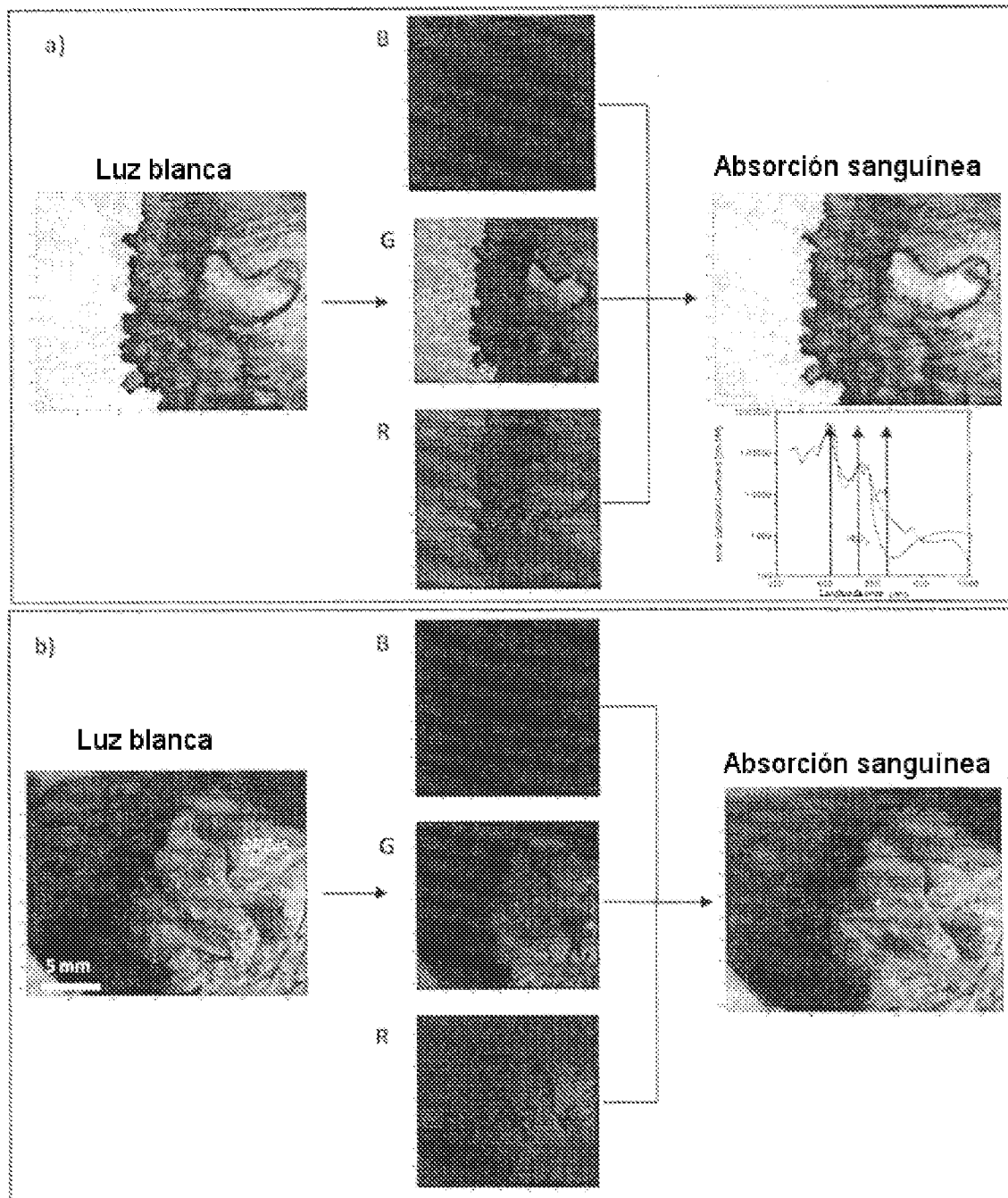


Figura 11

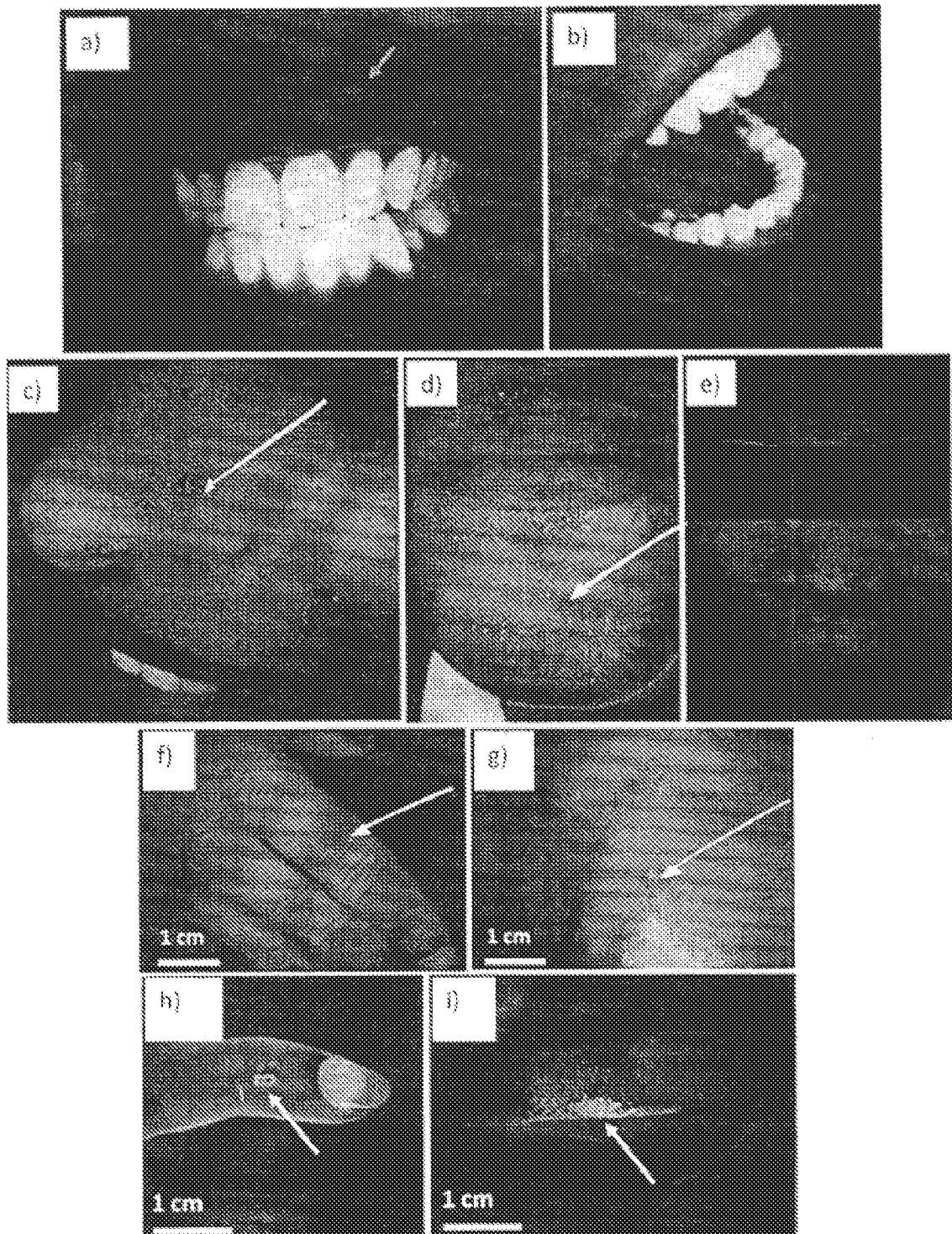


Figura 12

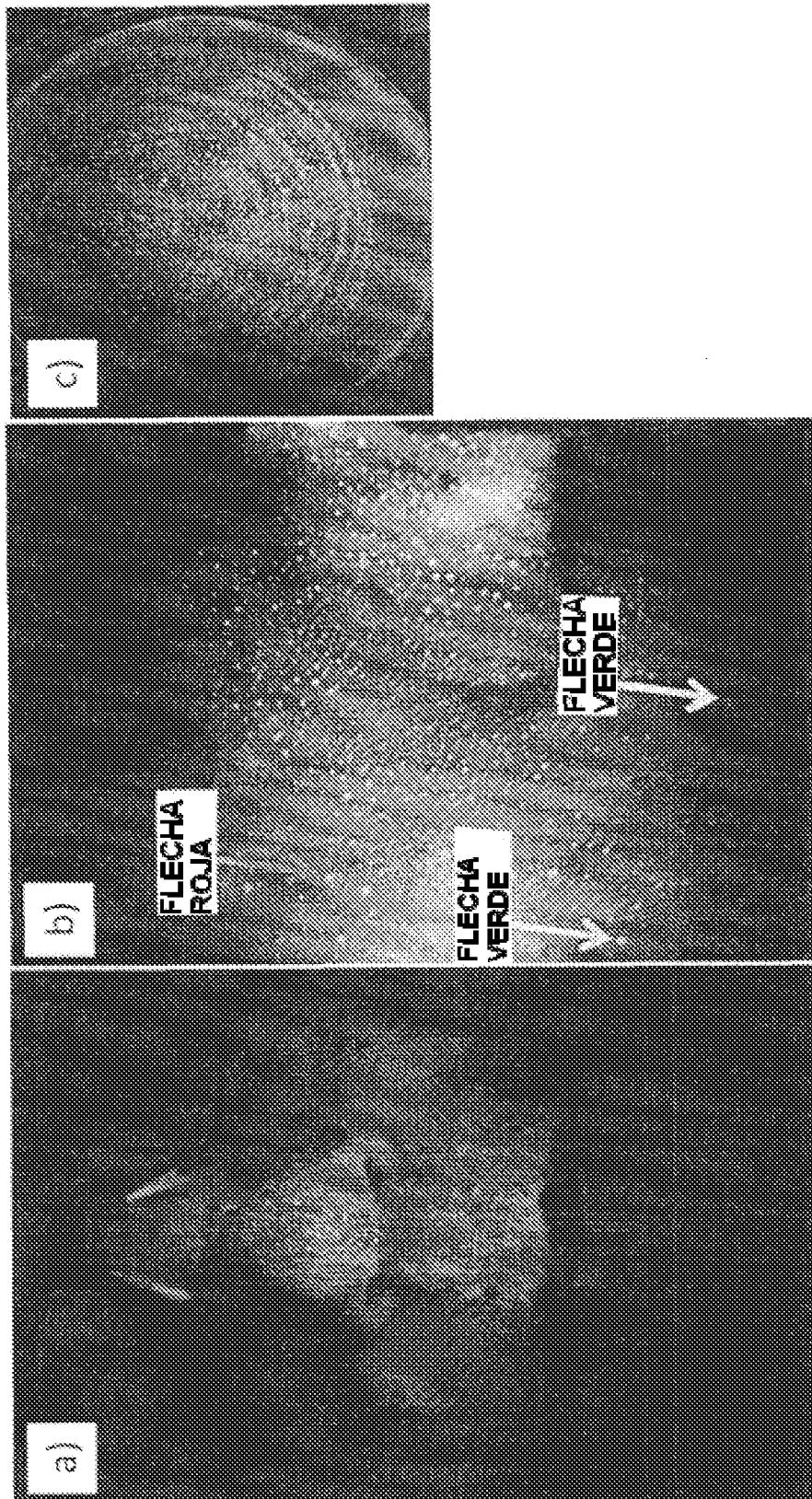


Figure 12J

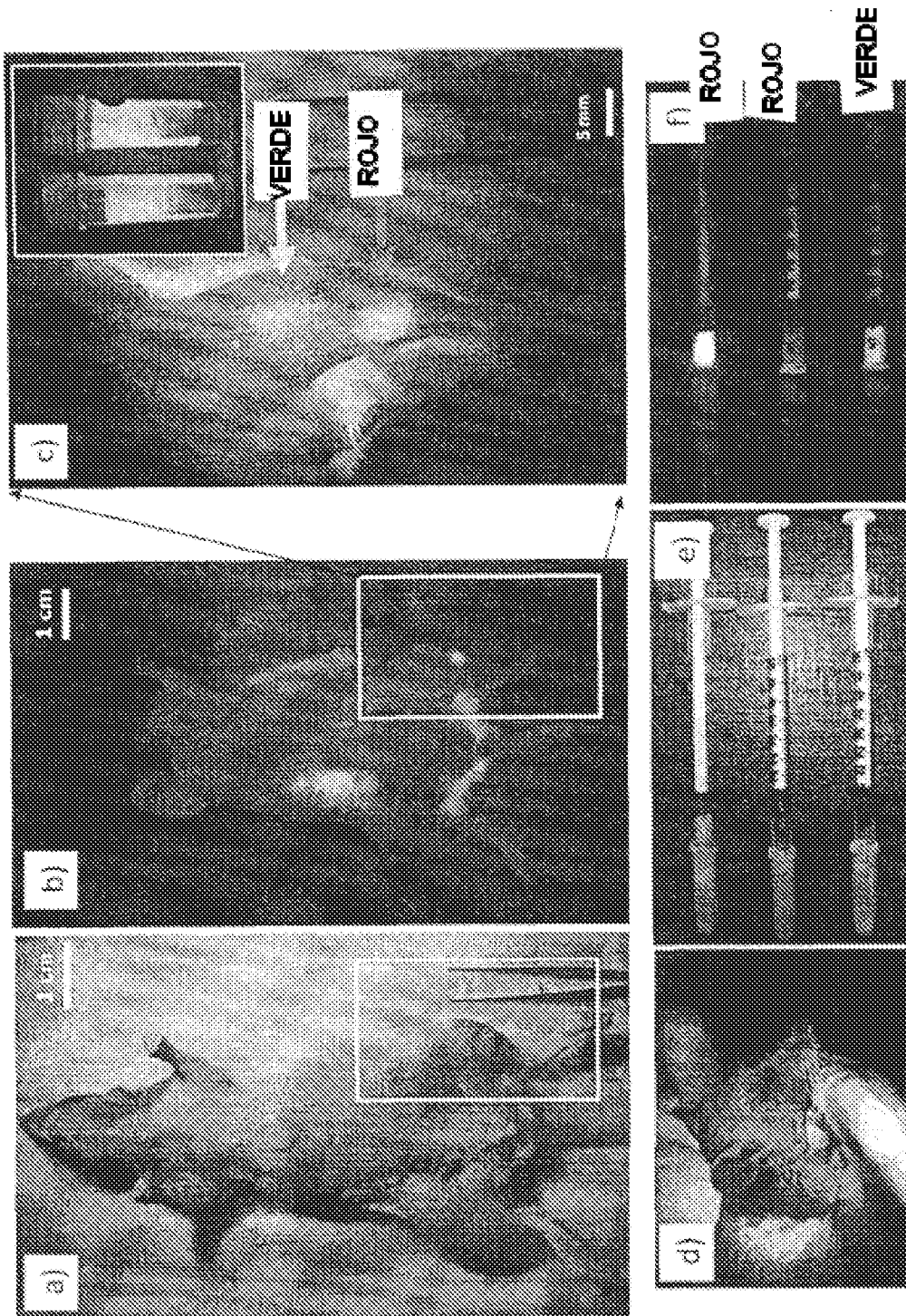


Figura 13

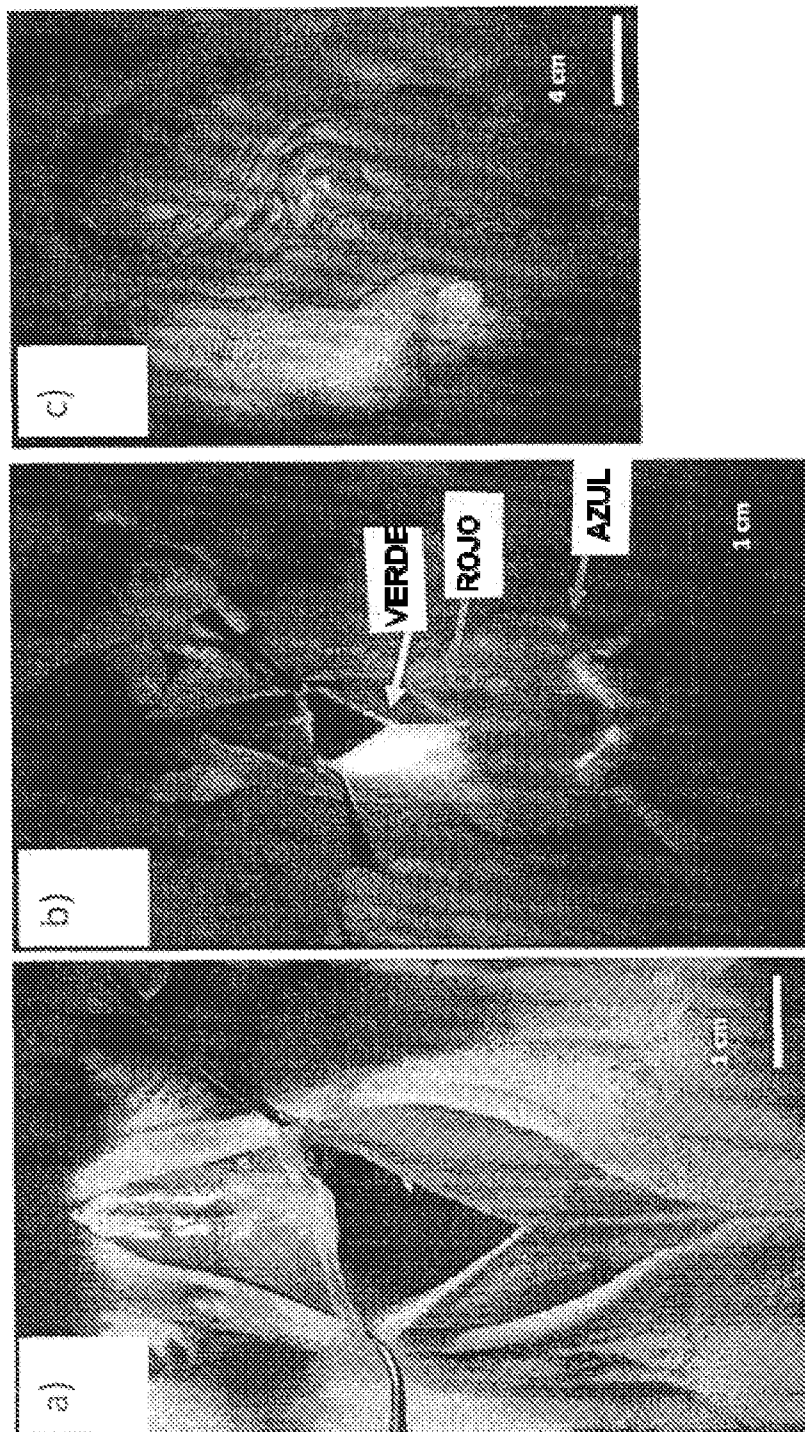


Figura 14

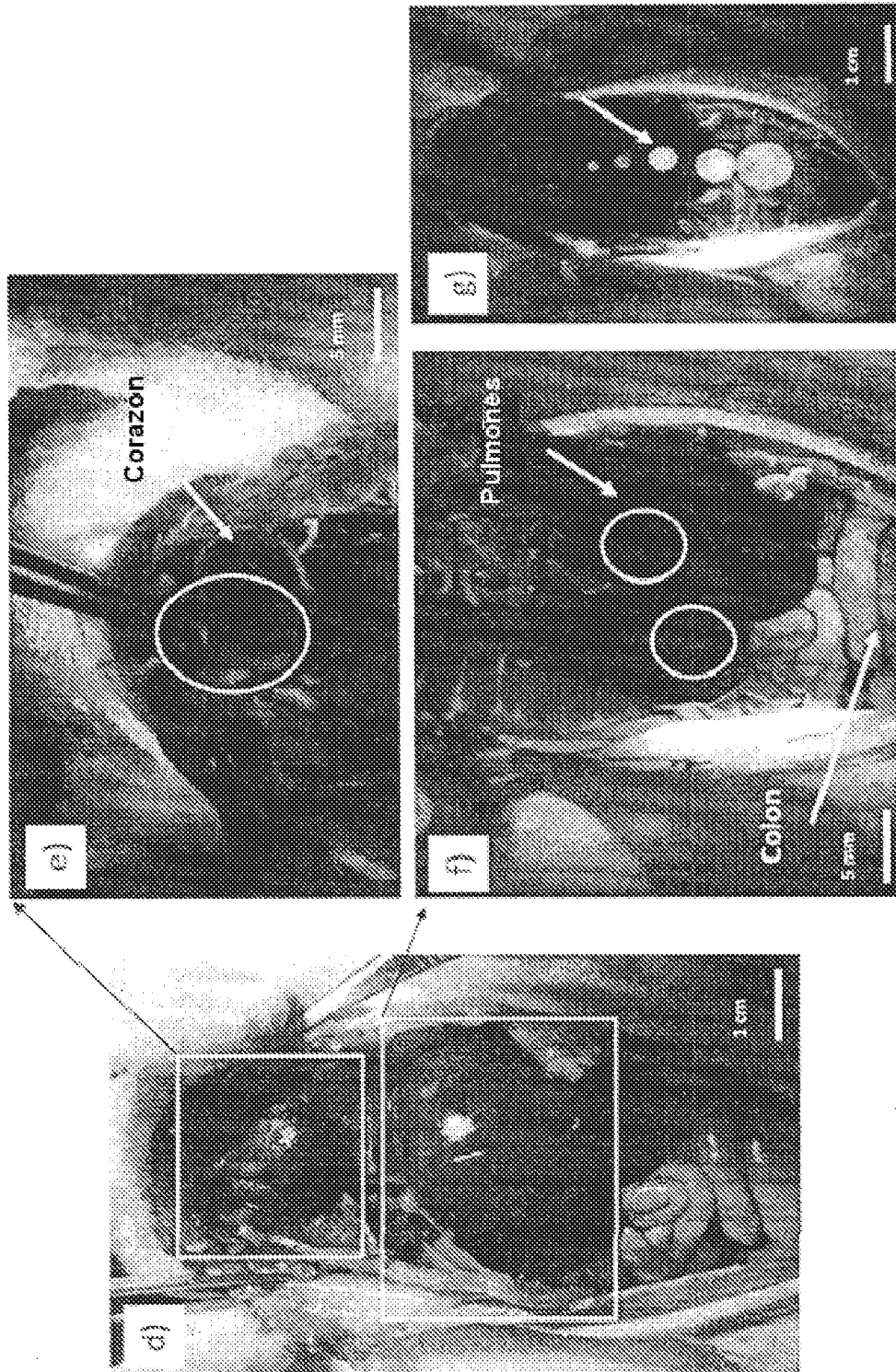


Figura 14

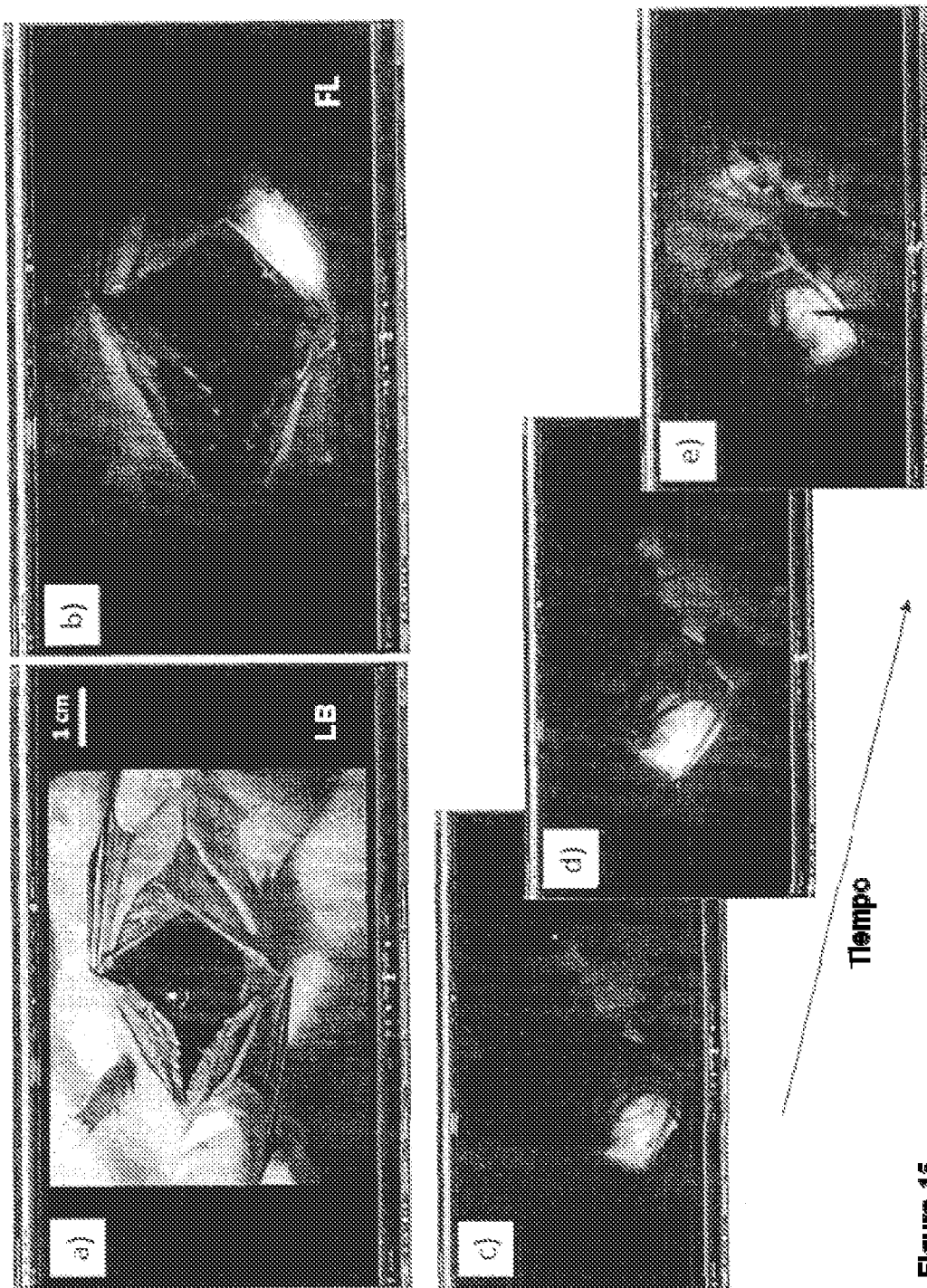


Figura 15

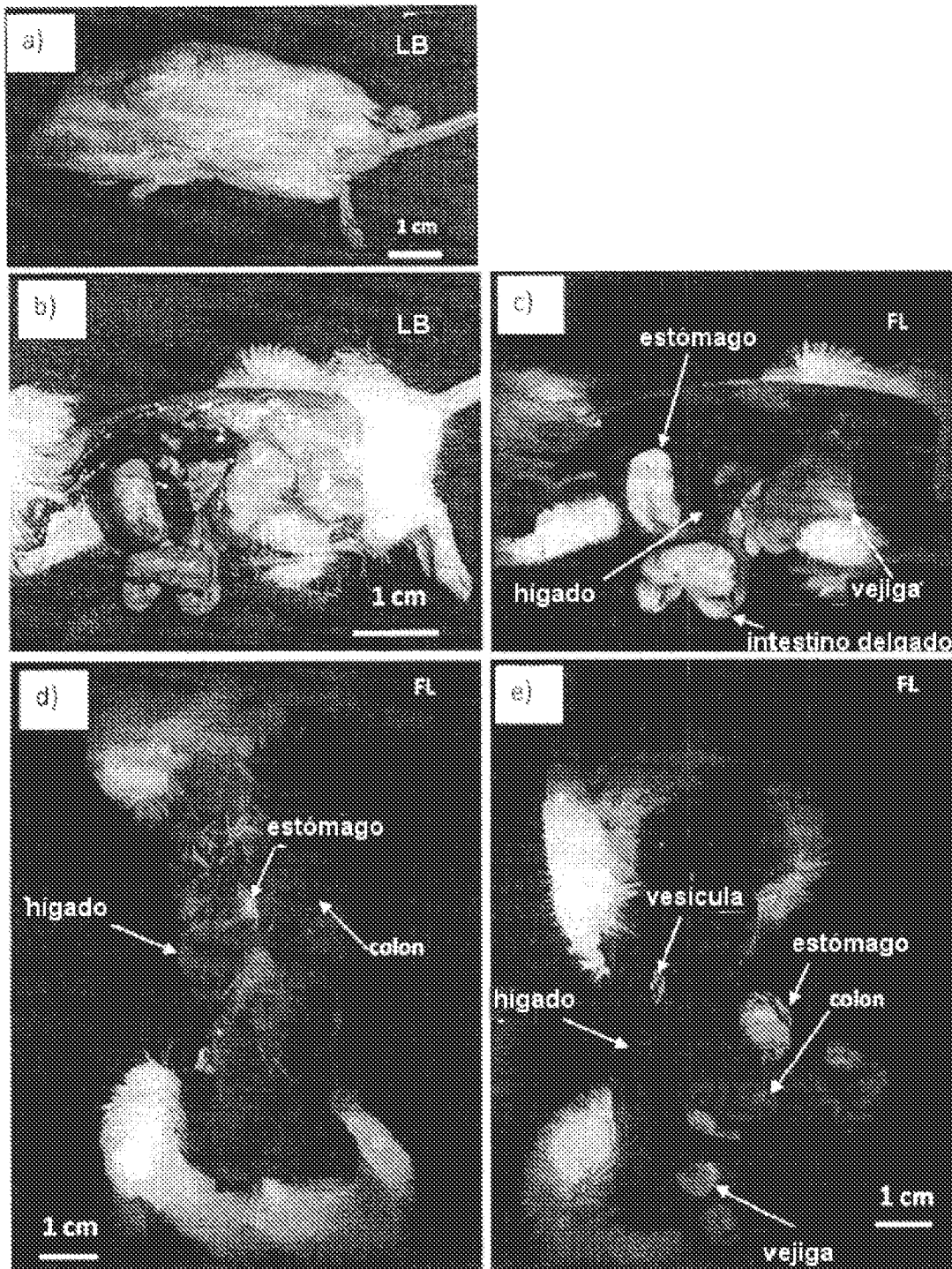


Figura 16

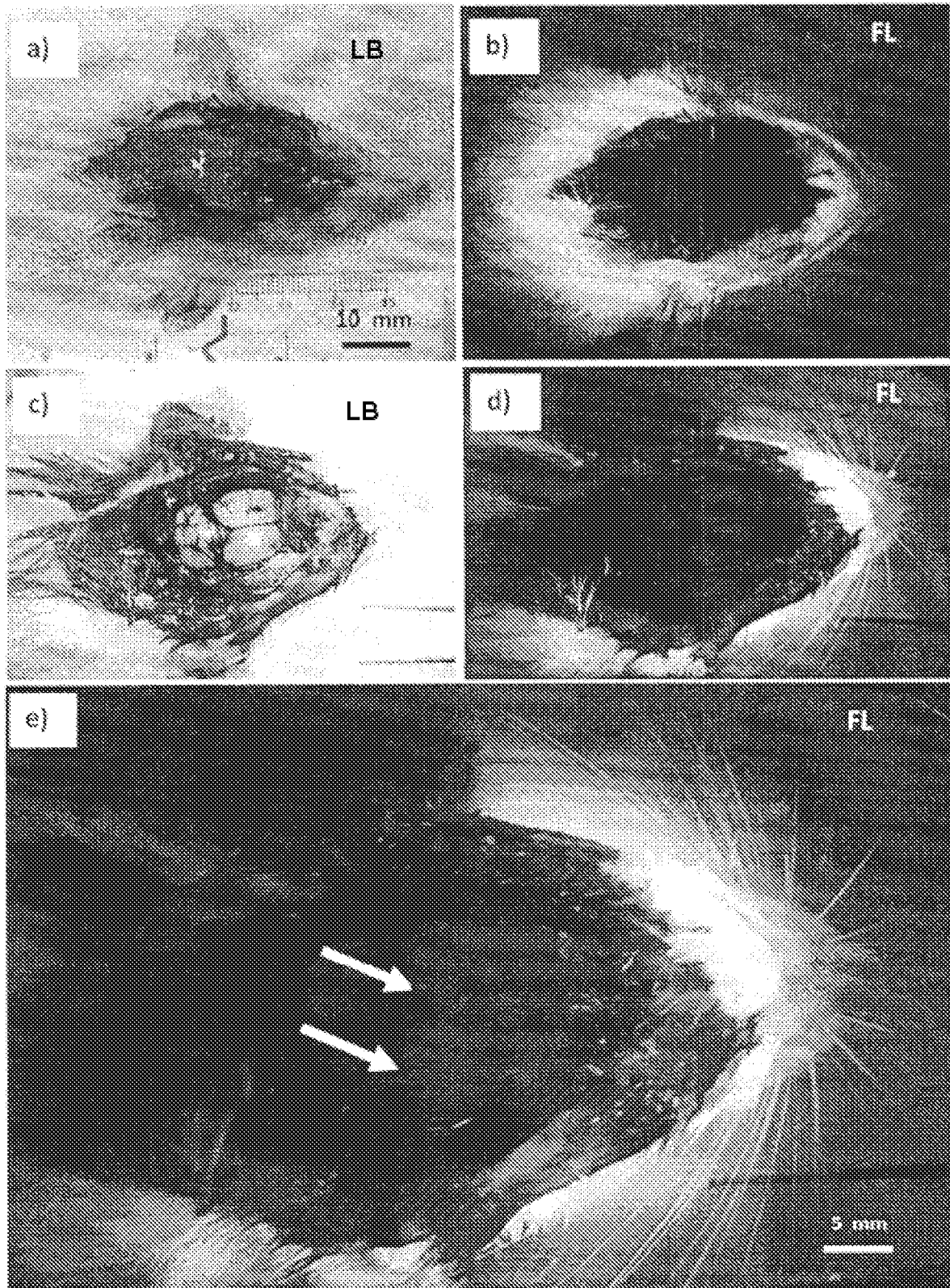


Figura 17

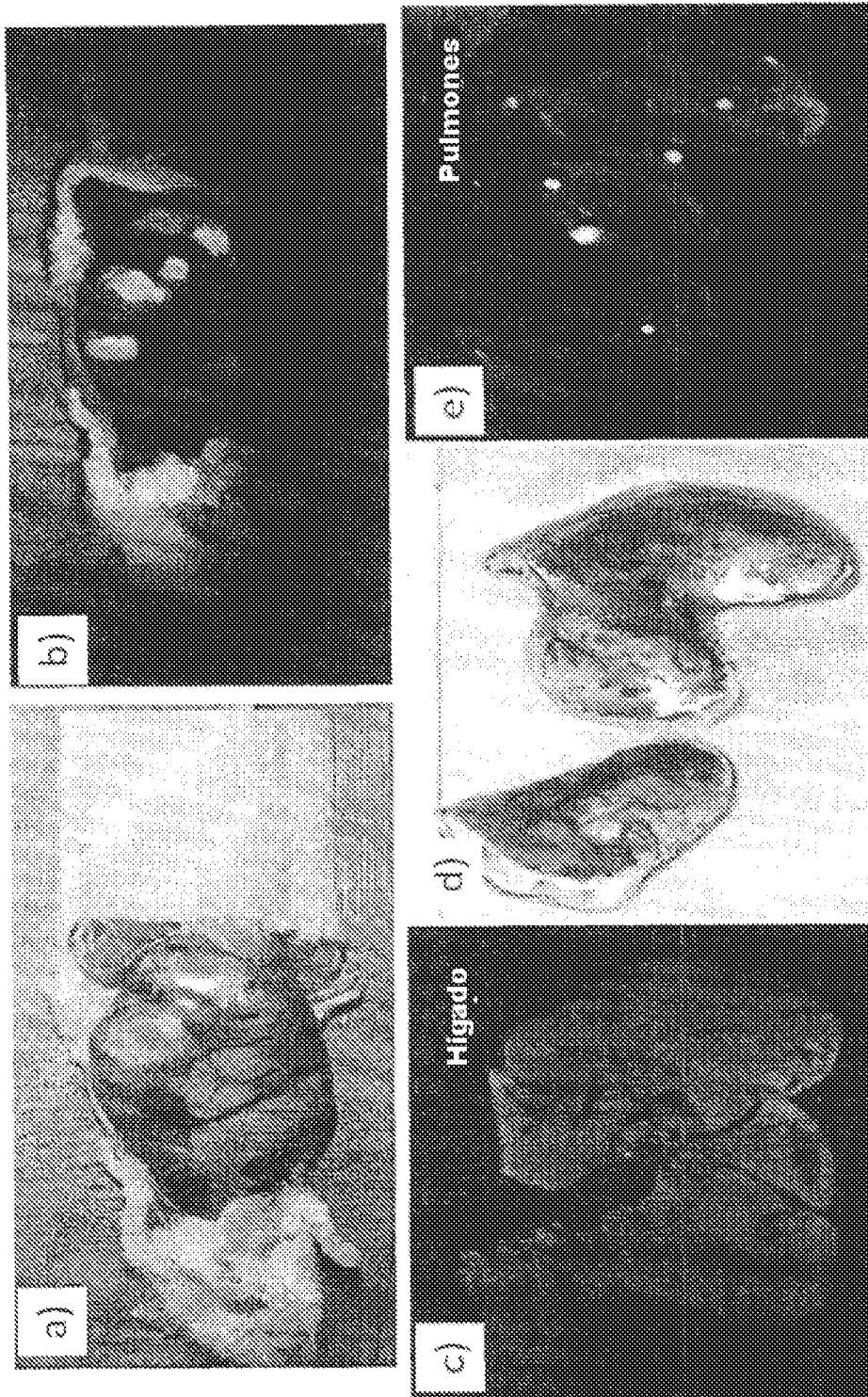


Figura 18

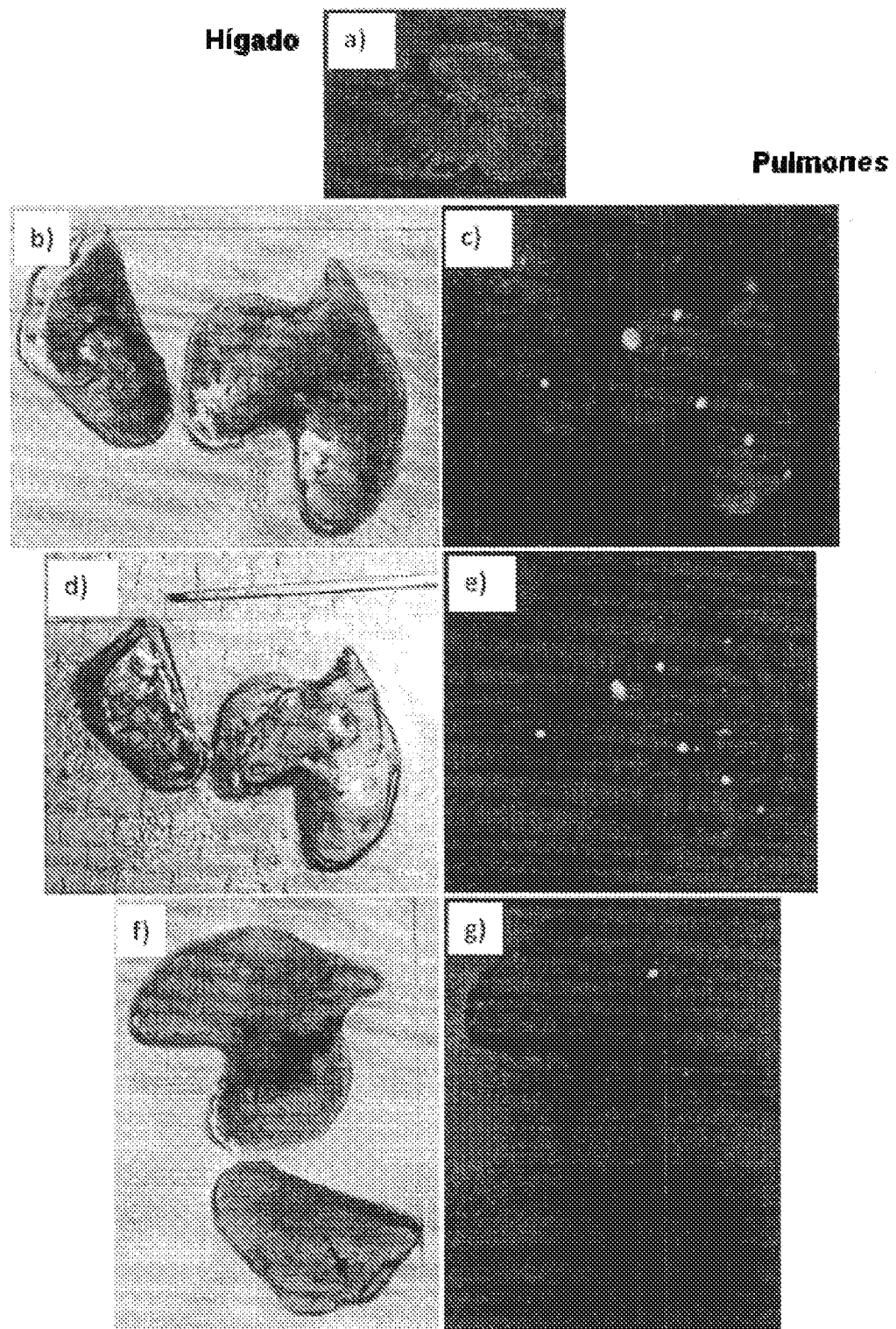


Figura 19

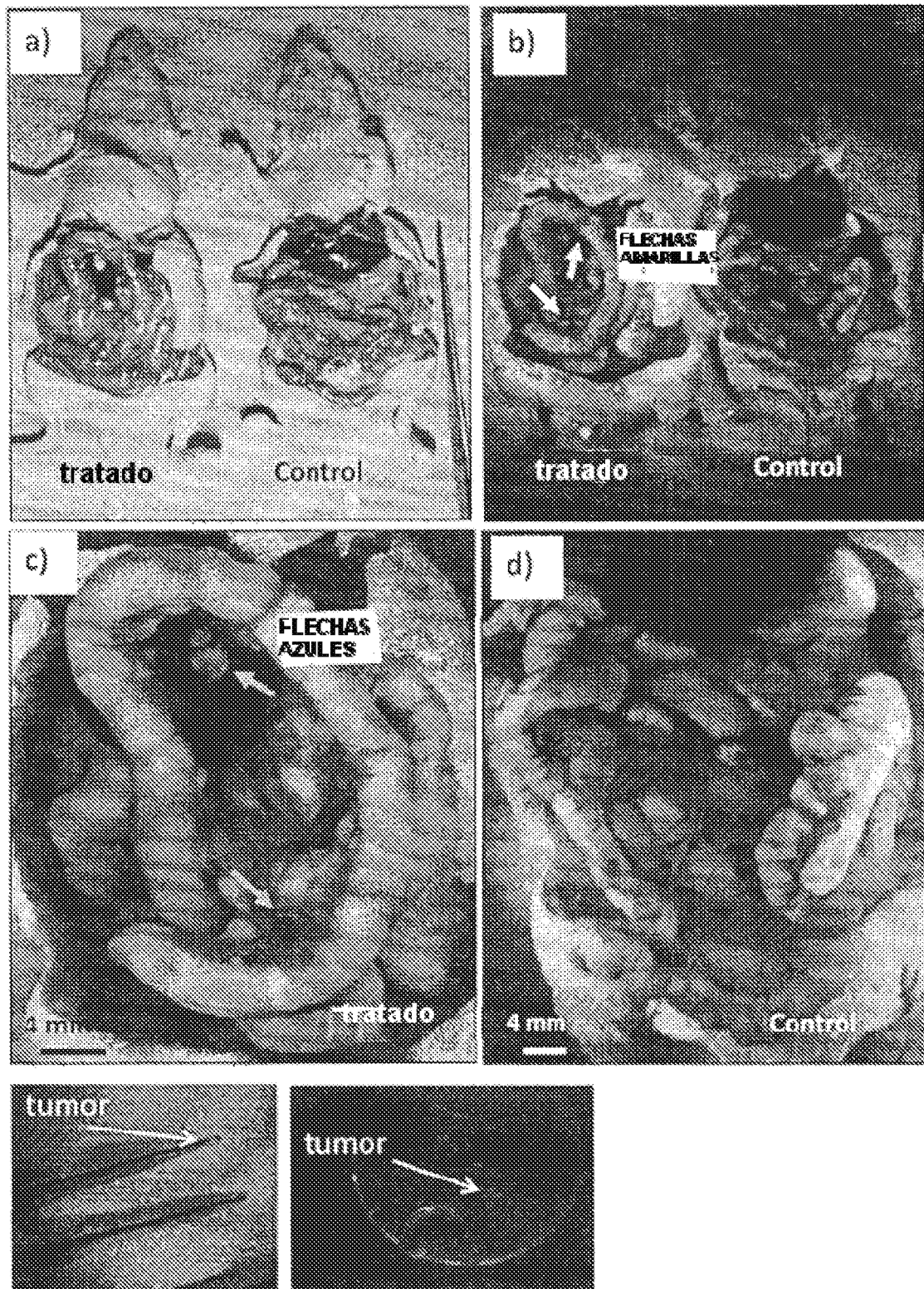


Figura 19H

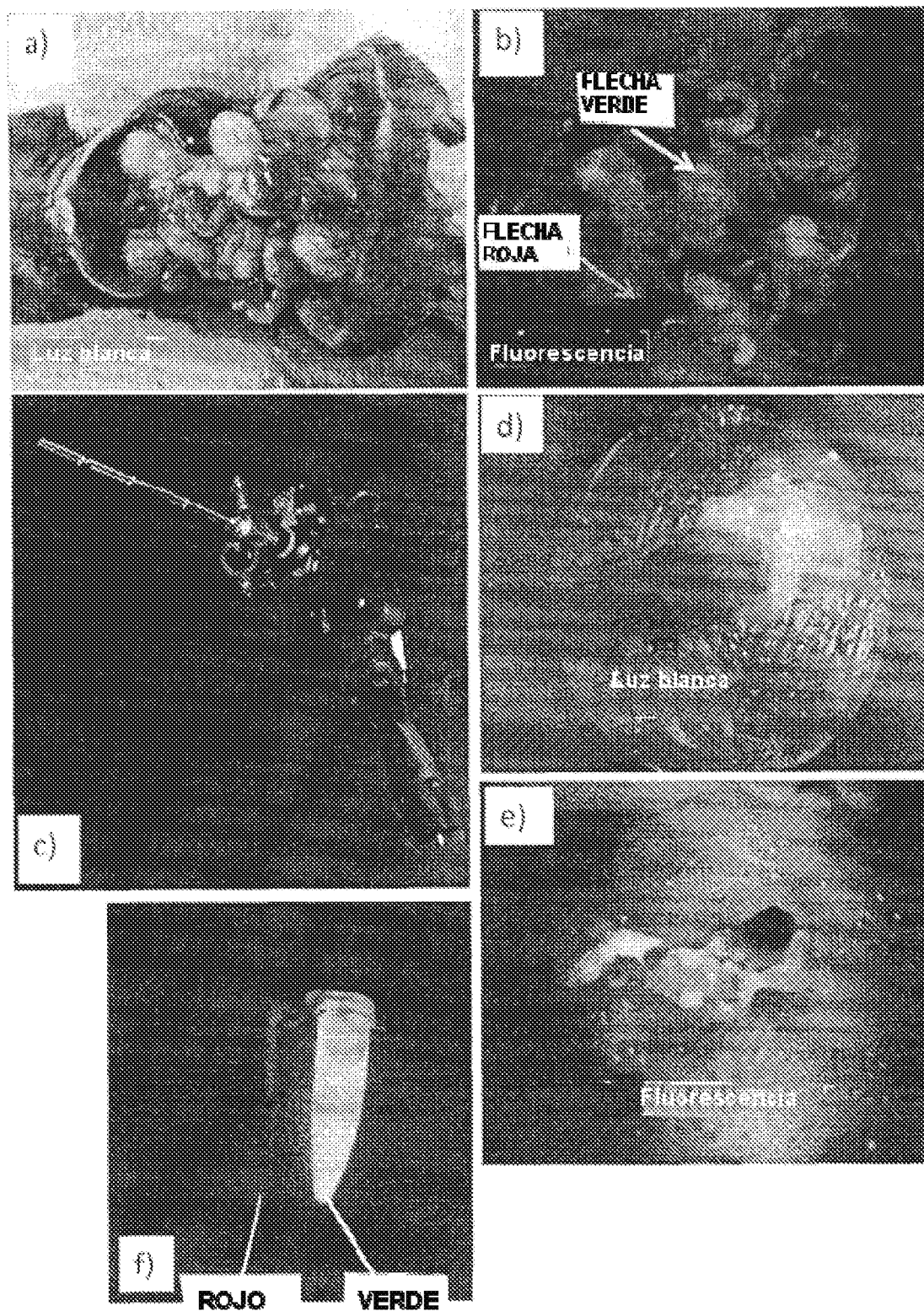


Figura 19I

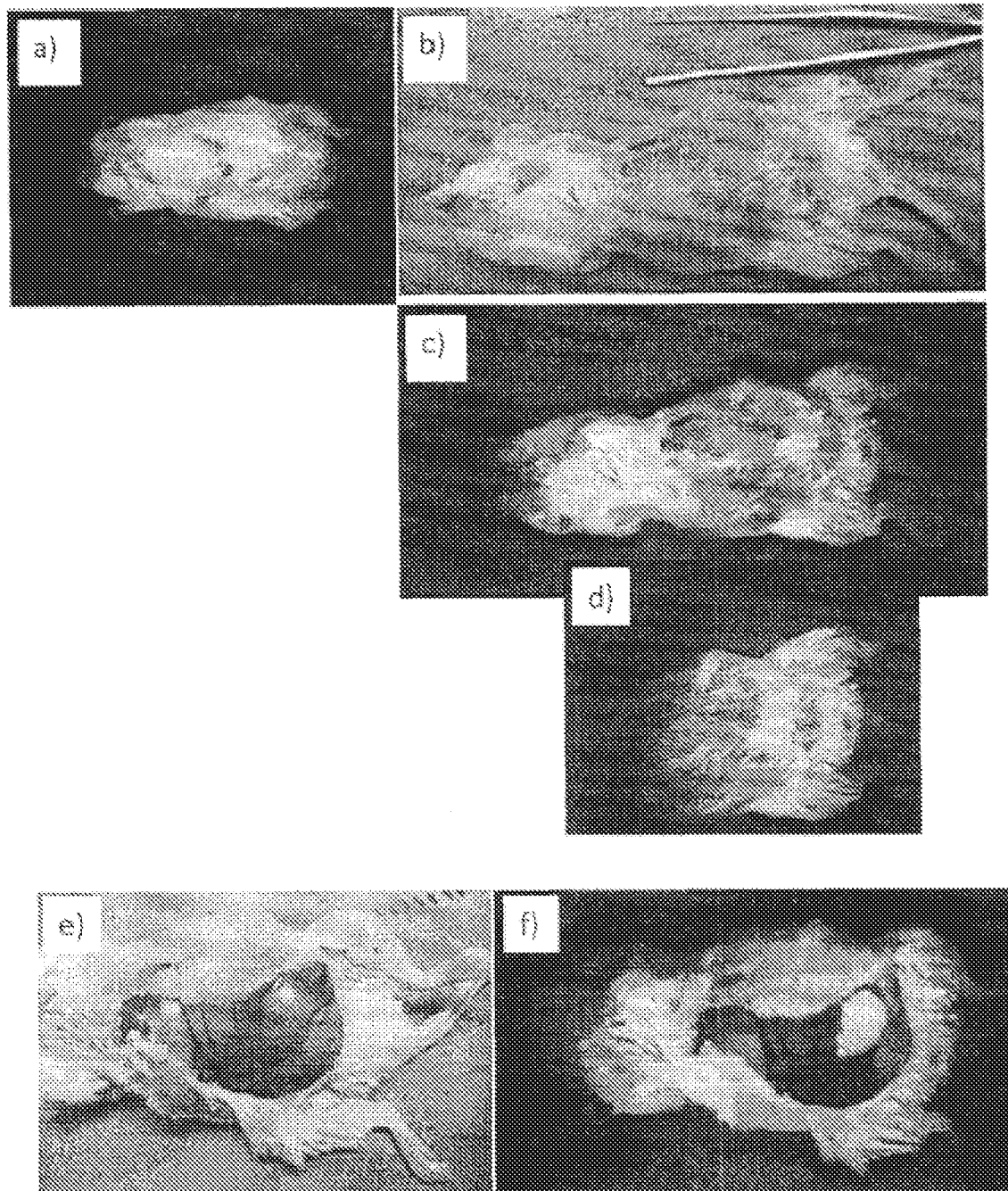


Figura 20

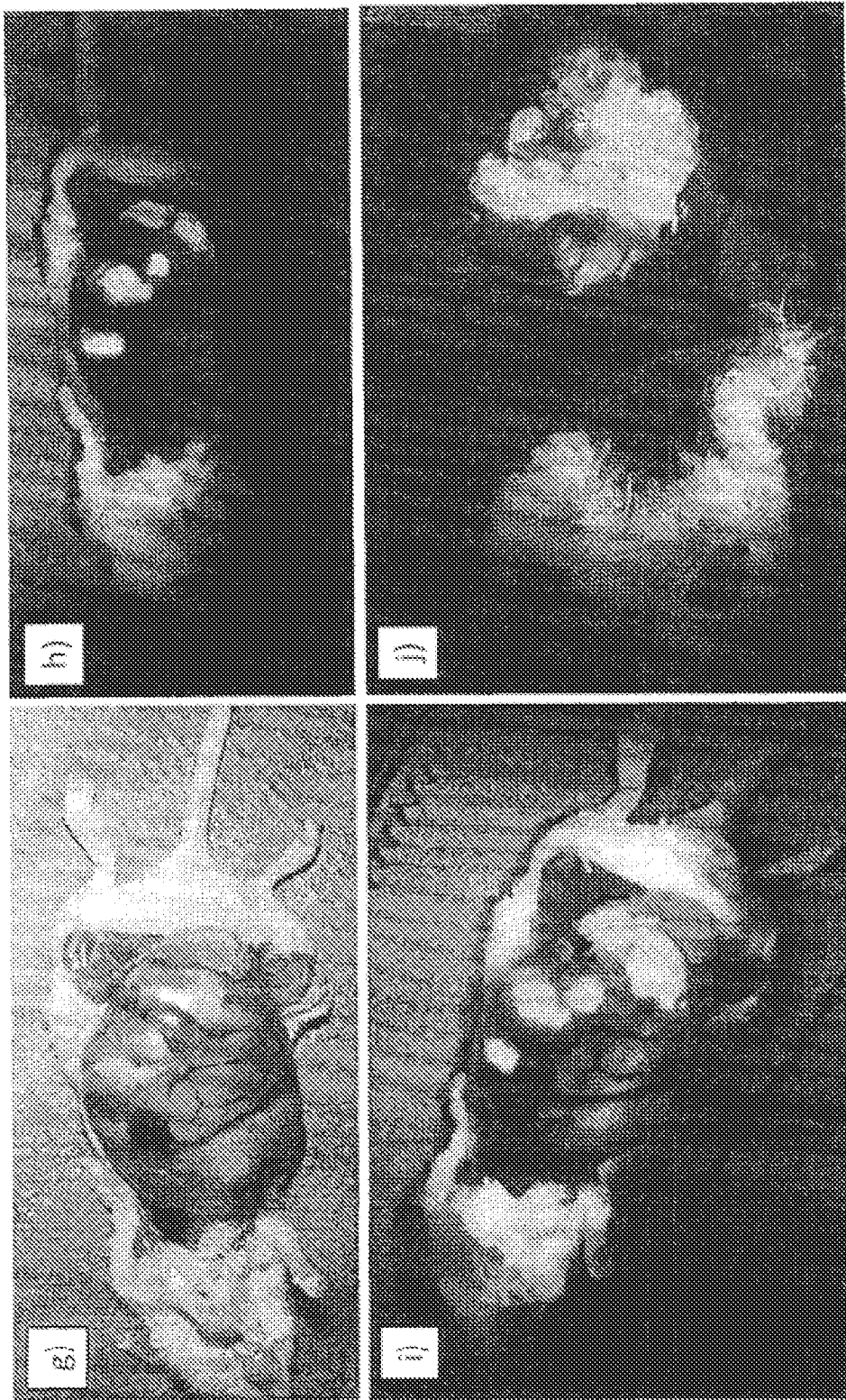


Figure 20

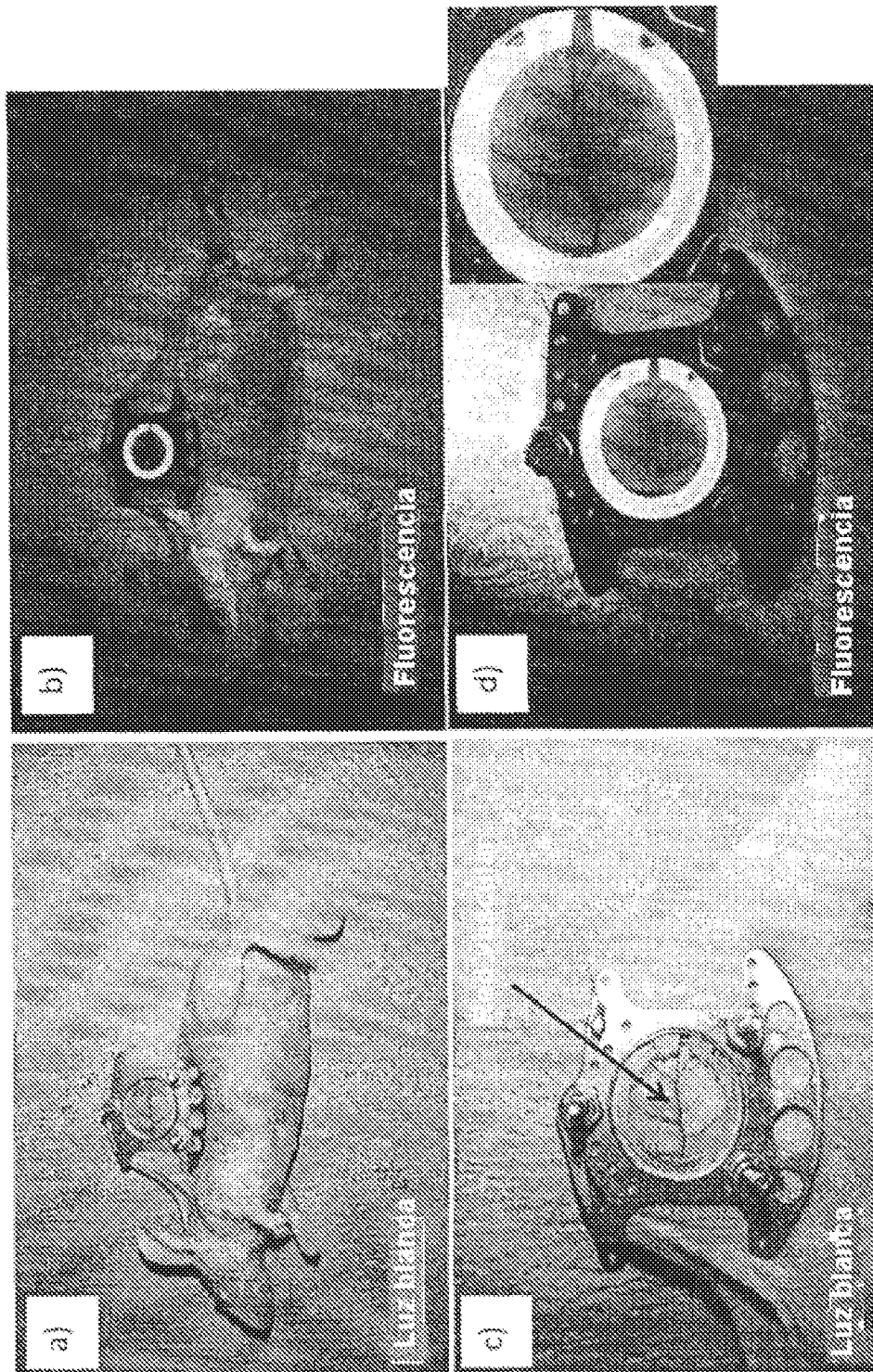


Figura 20B

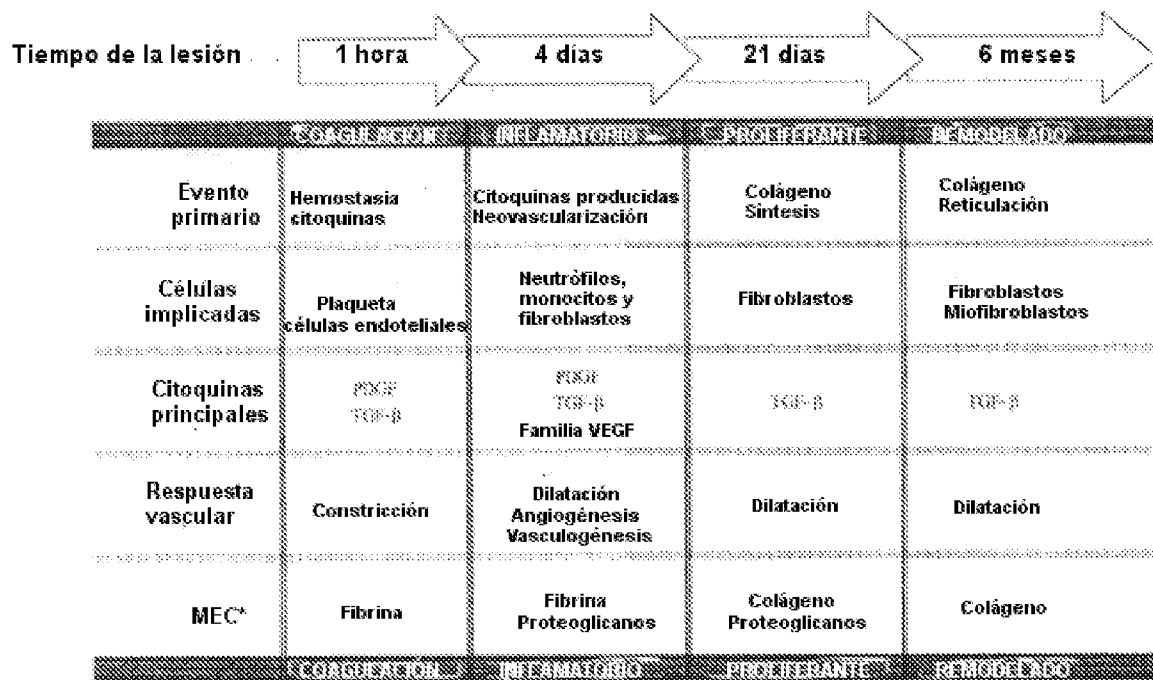


Figura 21

	Herida crónica en un paciente diabético	Herida crónica en una ratón diabético
Macromolecular		
Recuento de nervios	↓	↓
Angiogénesis	↓	↓
Formación de tejido por granulación	↓	↓
Contenido de colágeno	↓	↓
Actividad enzimática		
NEP	↑	↑
NOS	↑	↓
Arginasa	↑	↑ (ratón, crónica)
		↑ (rata)
MMPs	↑	↑
Concentración de TIMP	↓	---
Neutrófilo elastasa	↑	---
Cathepsina G	↑	---
Factores de crecimiento y receptores		
IGF-1	↓	↓
IGF-2	↑	↑
IGF-R1 (ARNm)	---	↑ (ARNm)
TGF-β1	↓	↓
TGF-β2	↑	---
TGF-β3	↑	---
TGF-βR1 y -R2	↓	---
PDGF	↓	↓
PDGF-R	---	---
KGF (ARNm)	---	---
αFGF (ARNm)	---	---
βFGF (ARNm)	---	---
FGF-R1, -2, -3 (ARNm)	---	---
IL-6	---	---
VEGF	---	---
NGF	---	---
MIP-2	---	---
MCP-1	---	---
TNF-α (ARNm)	---	---
IL-1β (ARNm)	---	---
Otras		
GSH	↓	↓

Figura 22

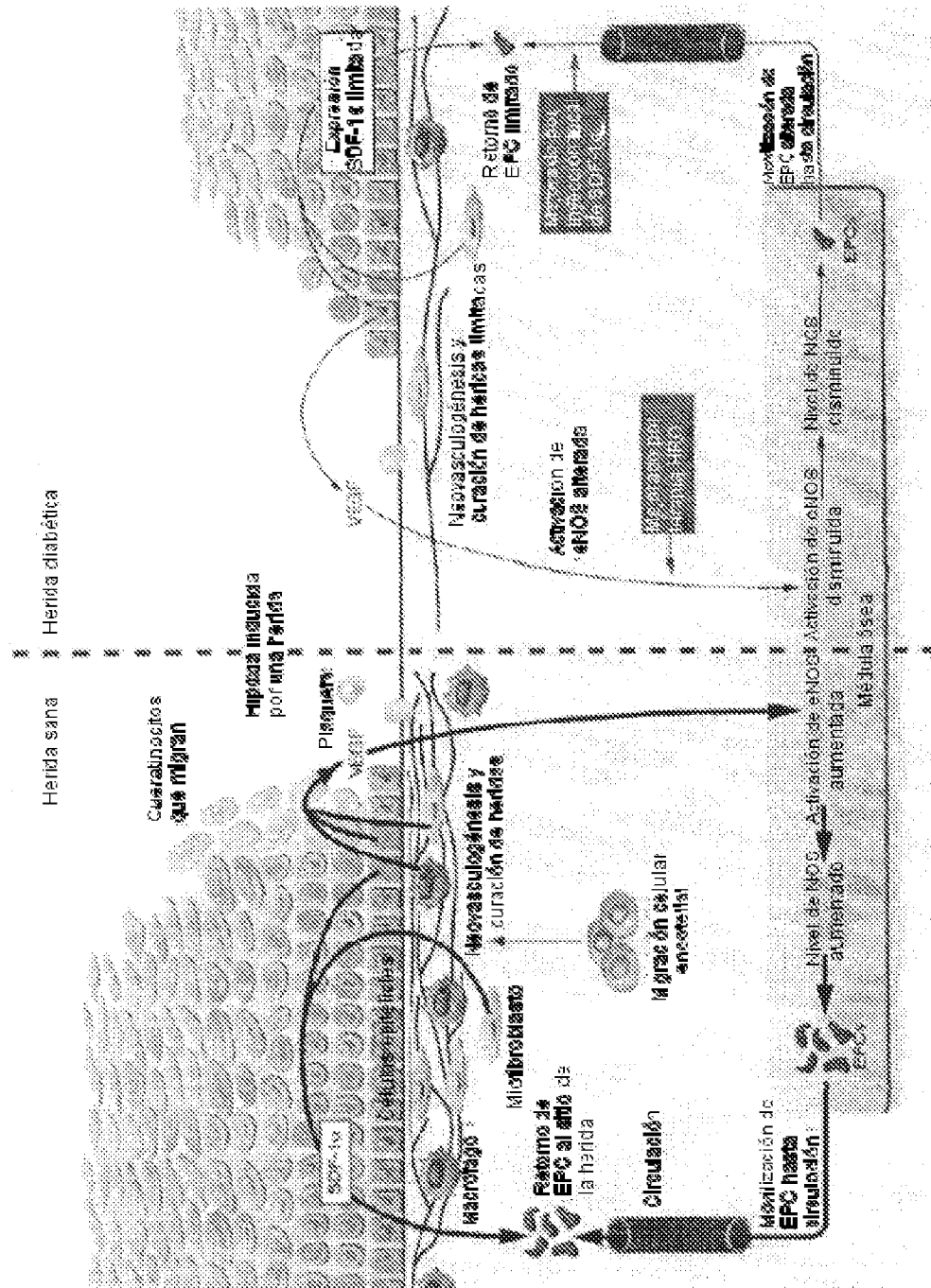


Figura 23

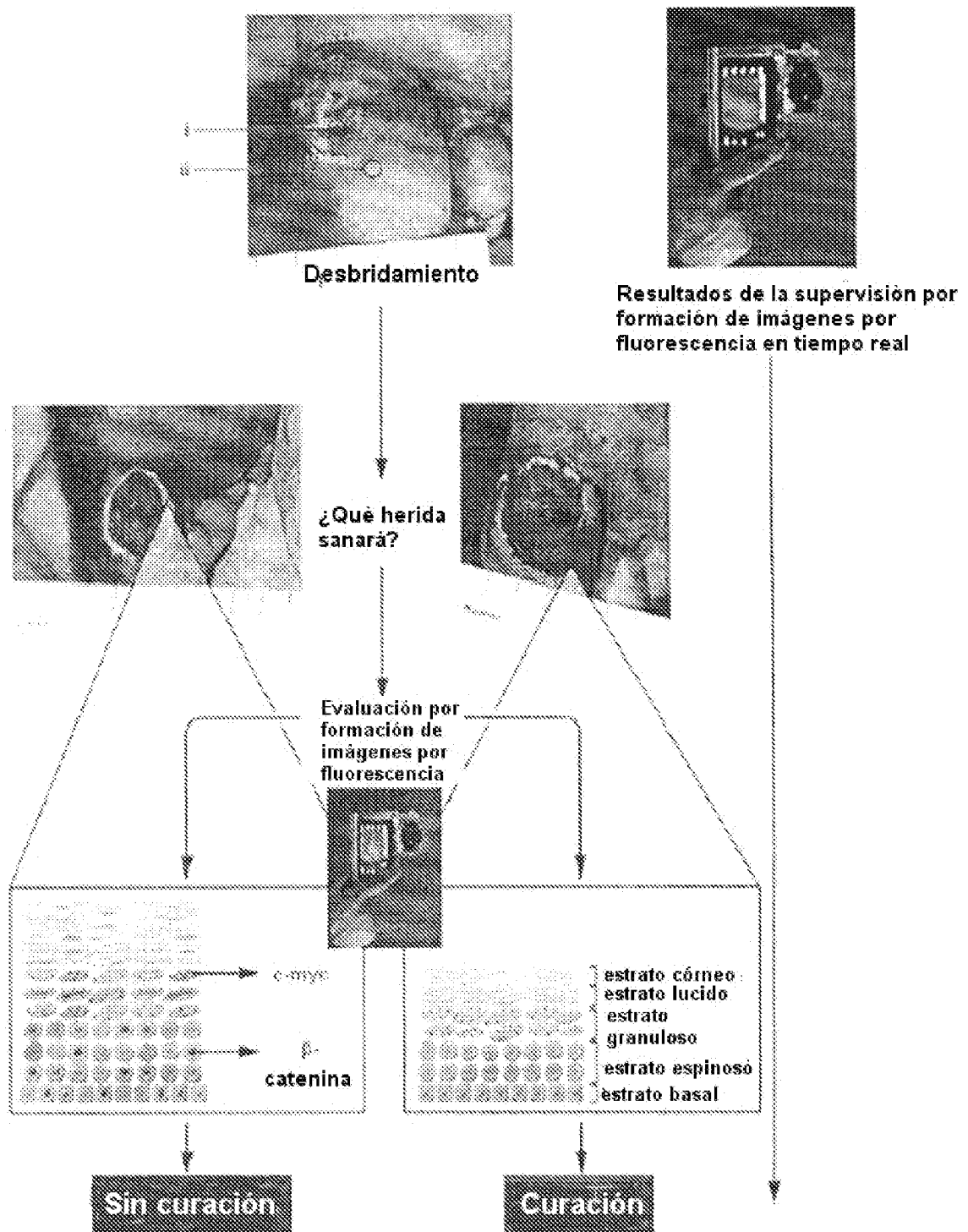


Figura 24

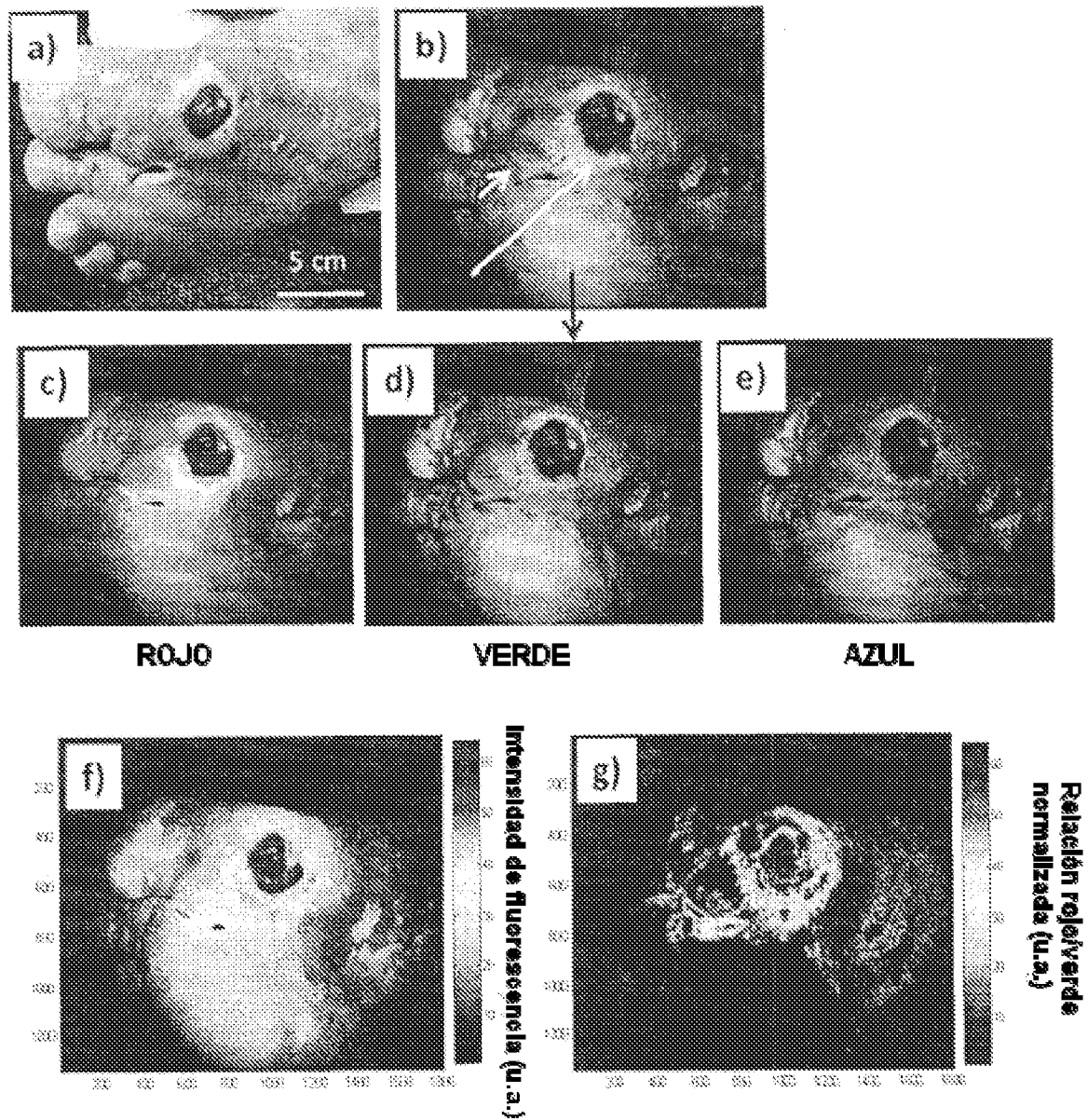


Figura 24B

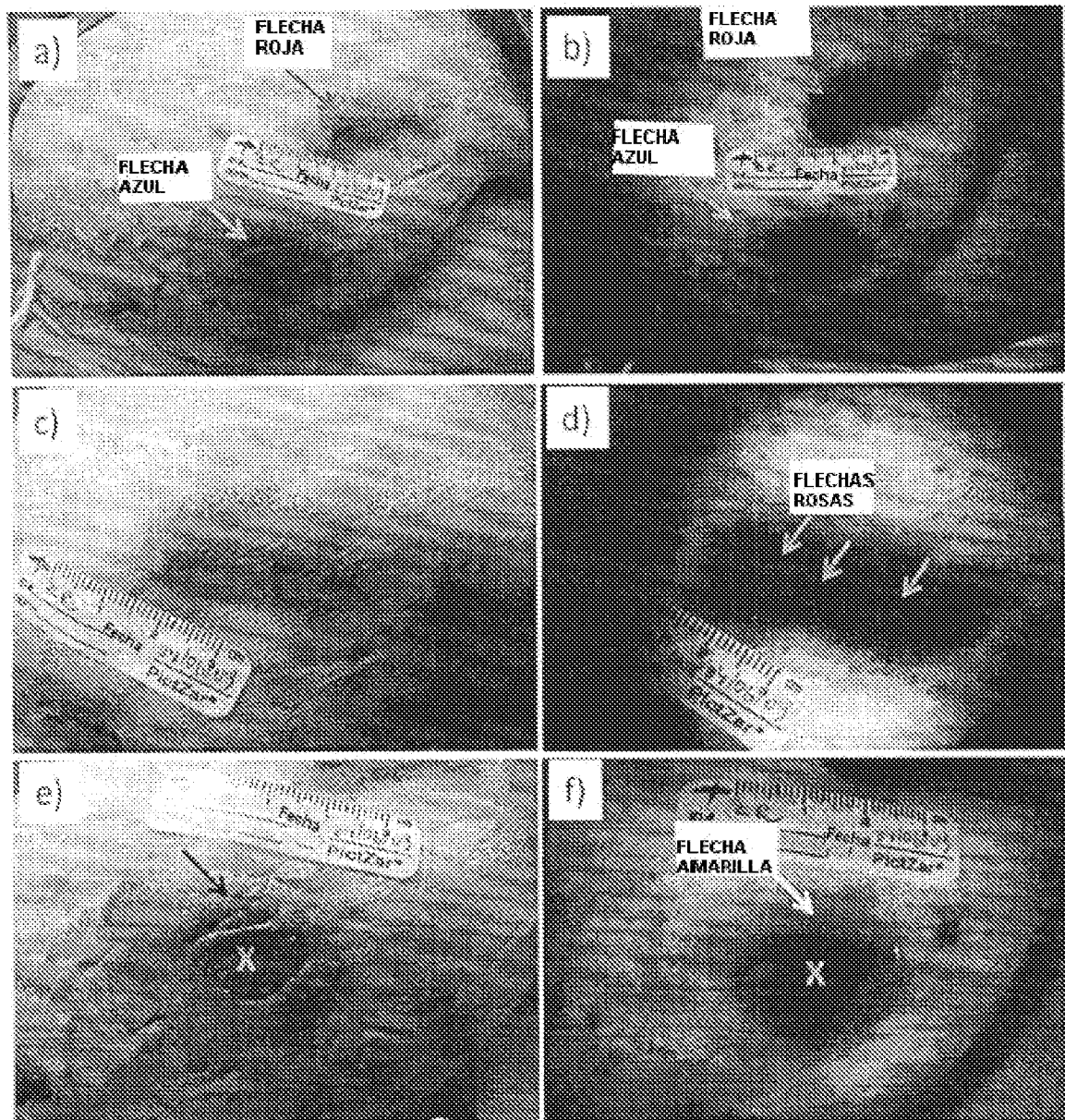


Figura 24C

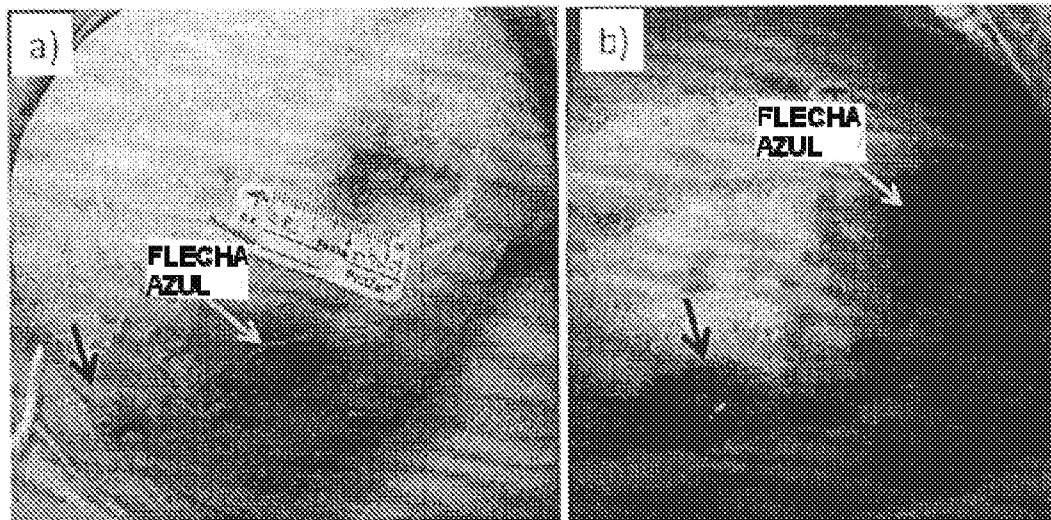


Figura 24D

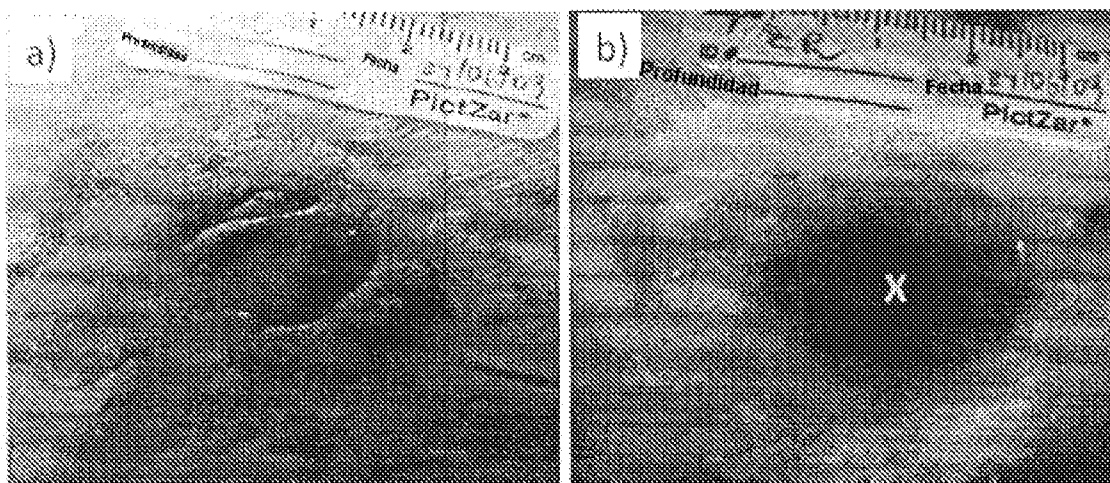


Figura 24E

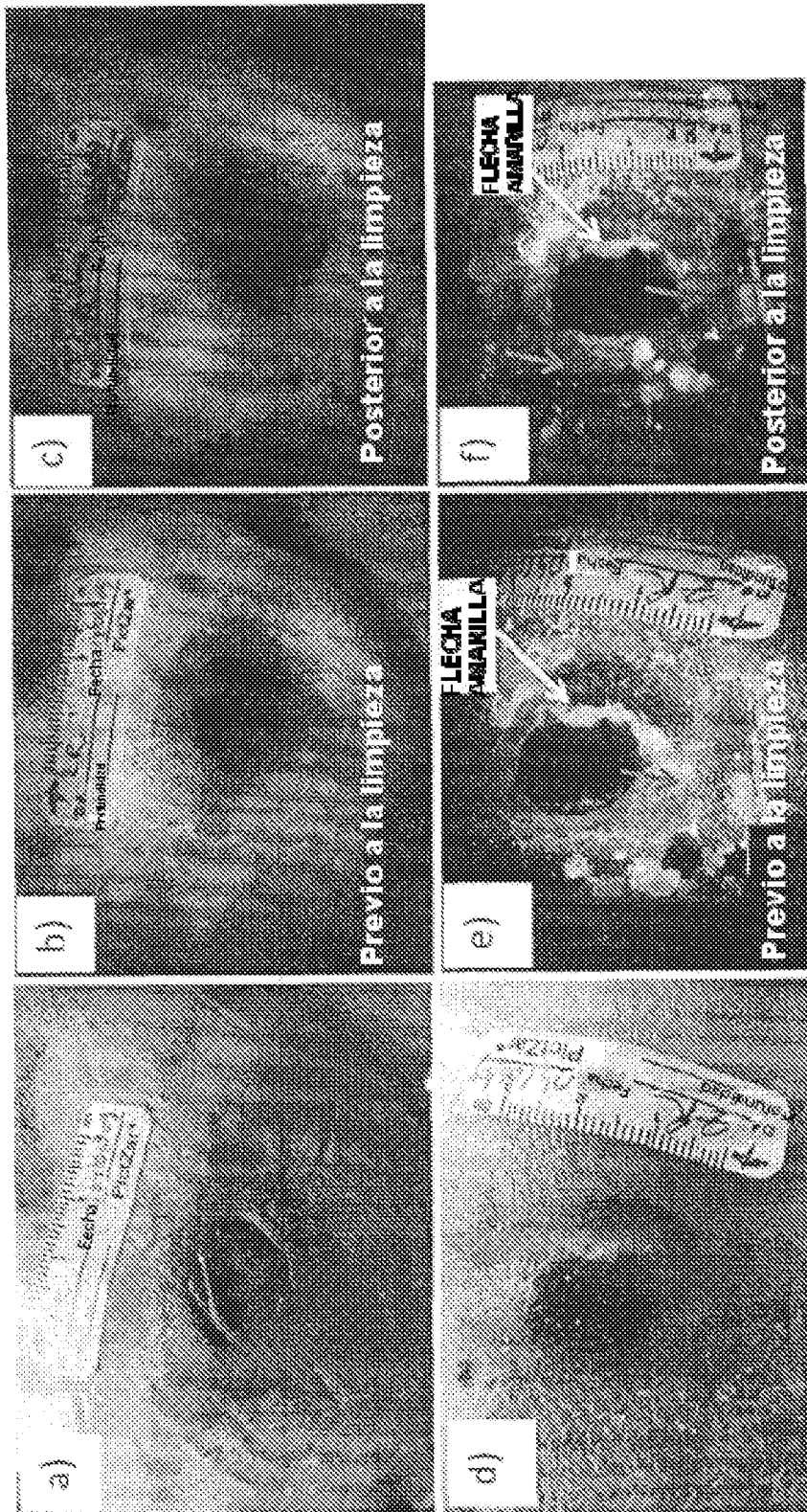


Figura 24F

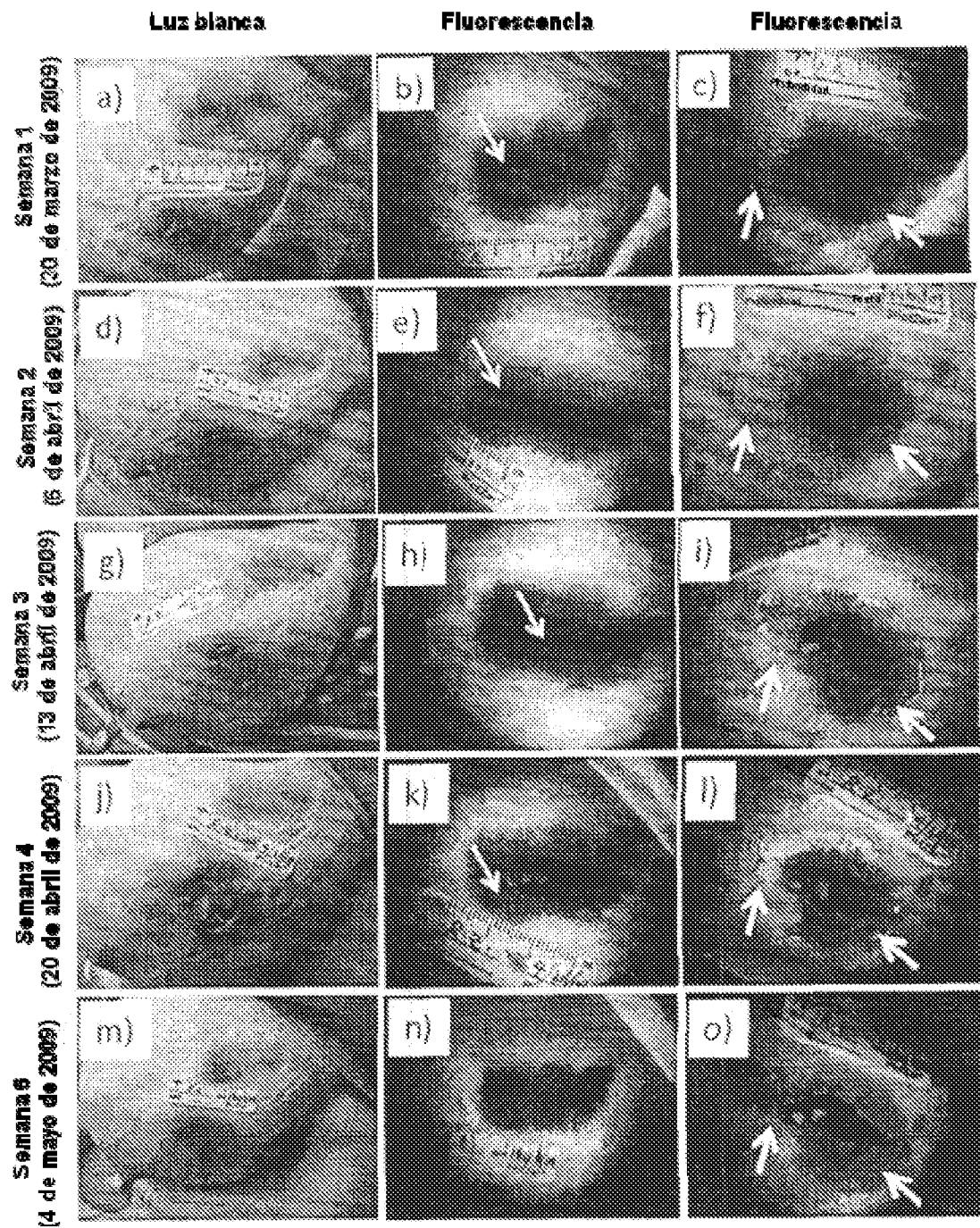


Figura 24G

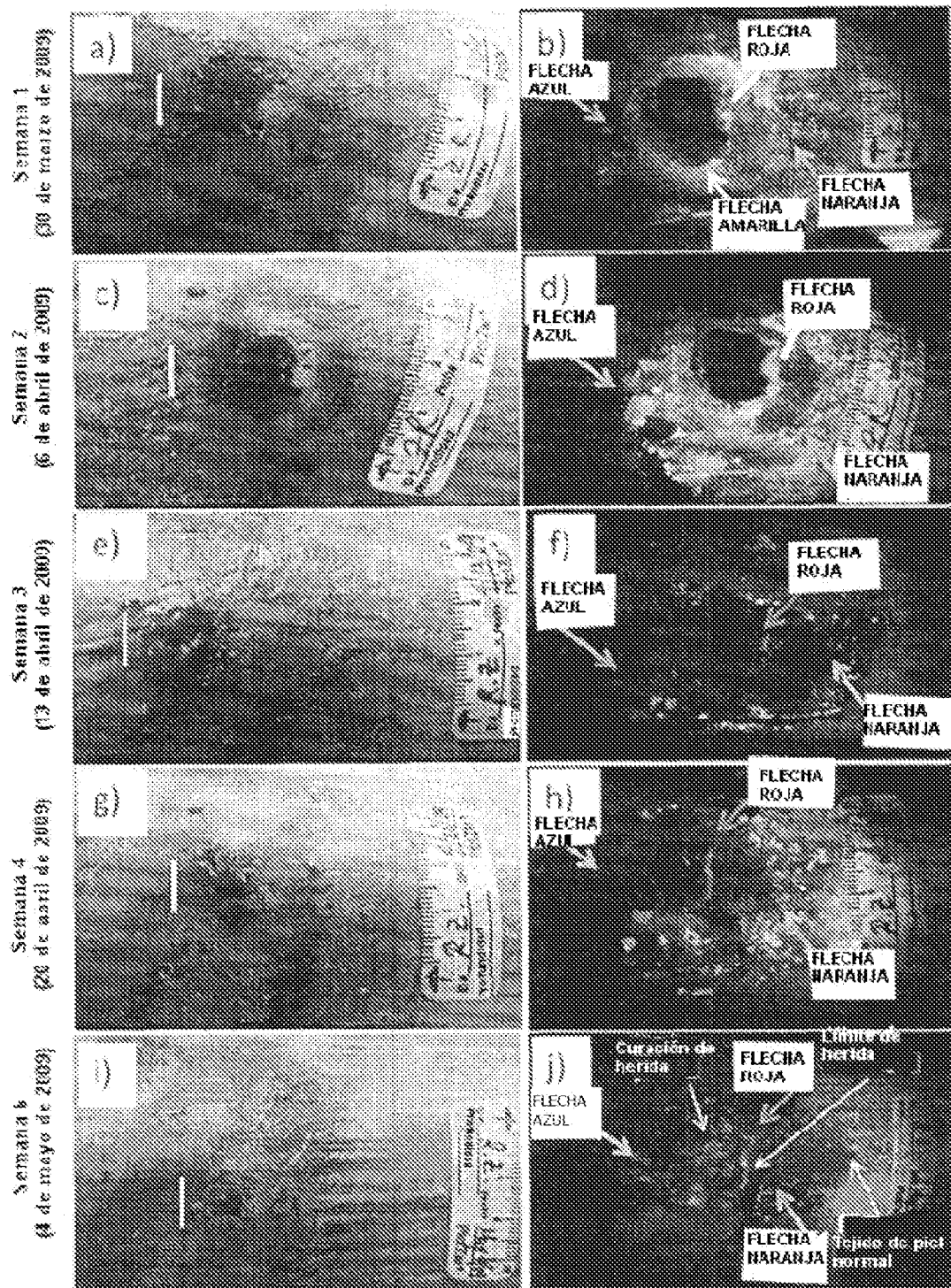


Figura 24H

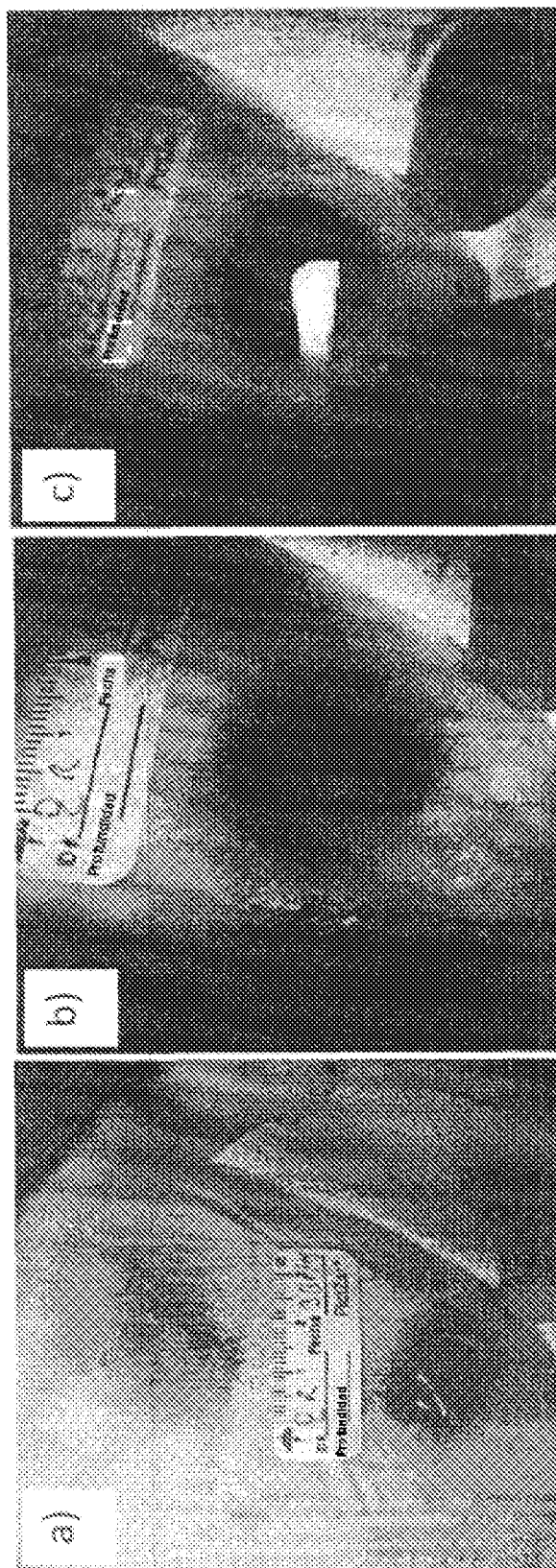


Figura 24I

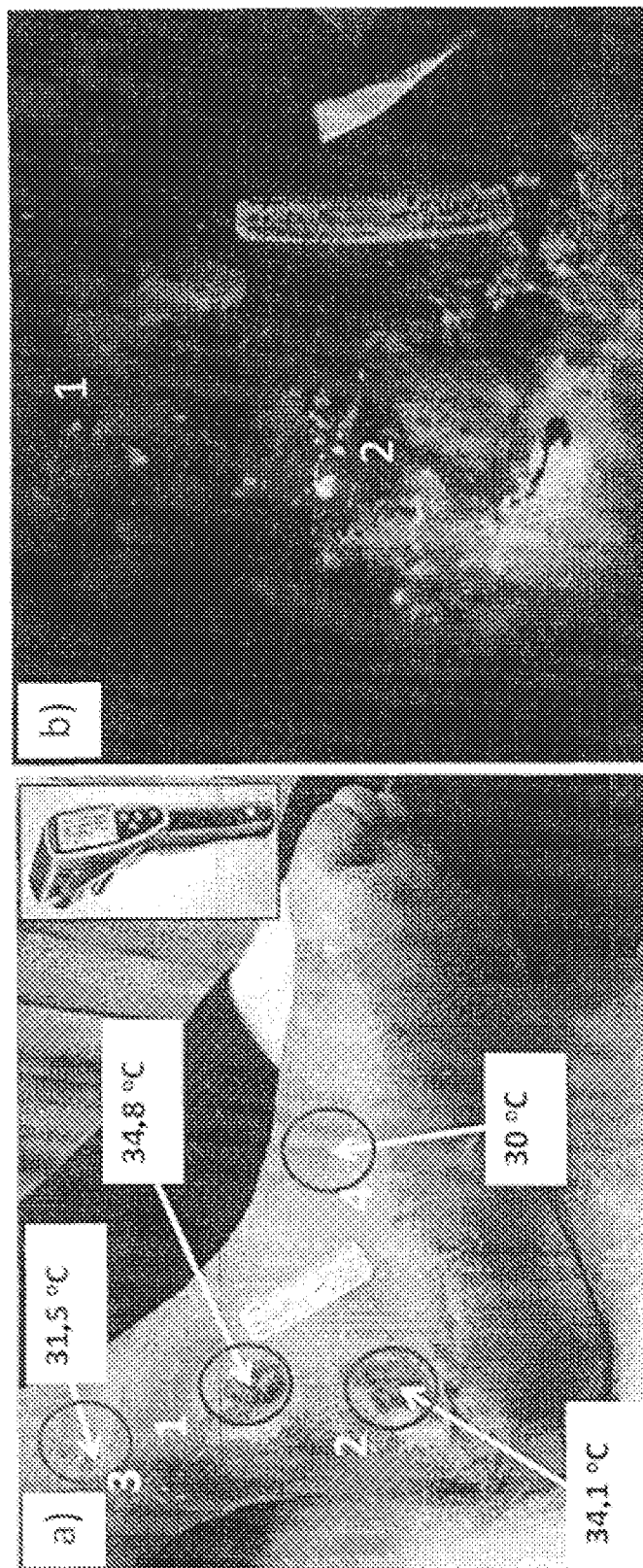


Figura 24J

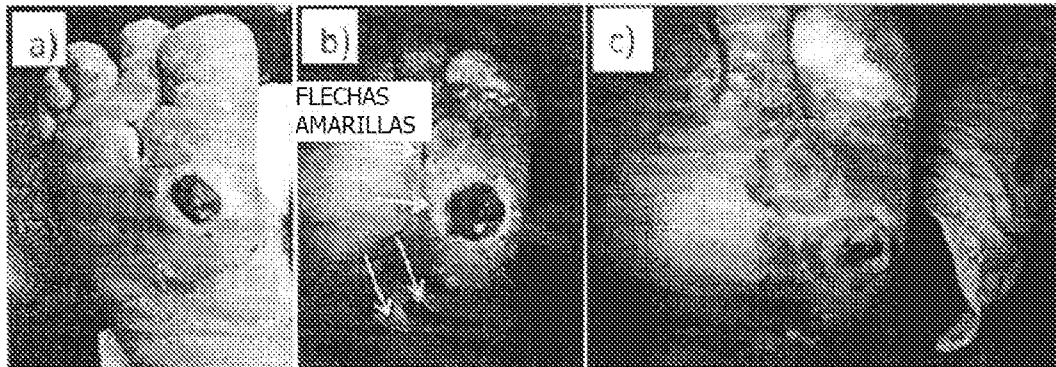


Figura 24K

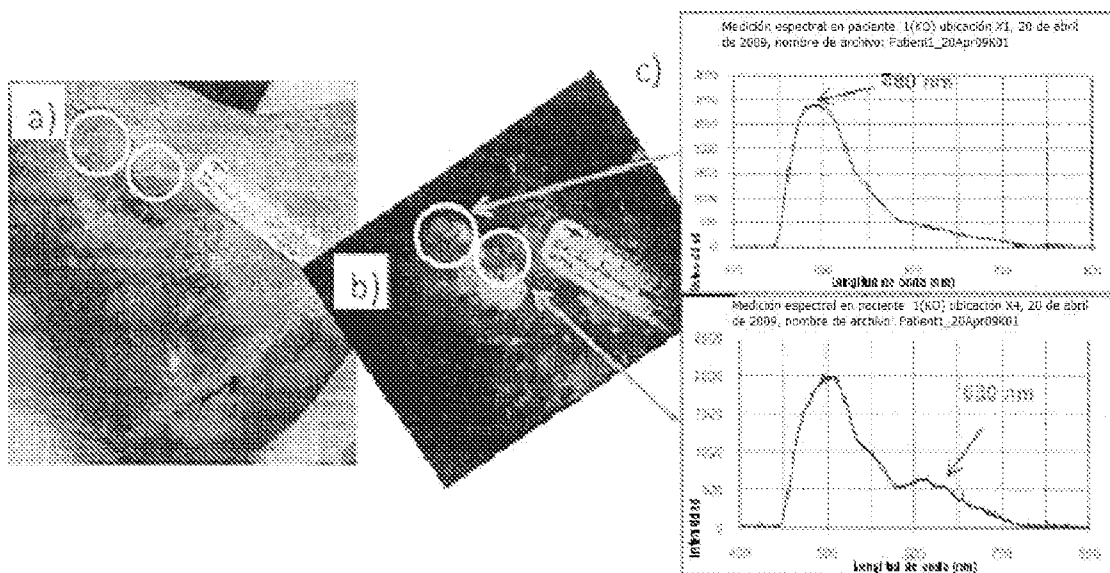


Figura 24L

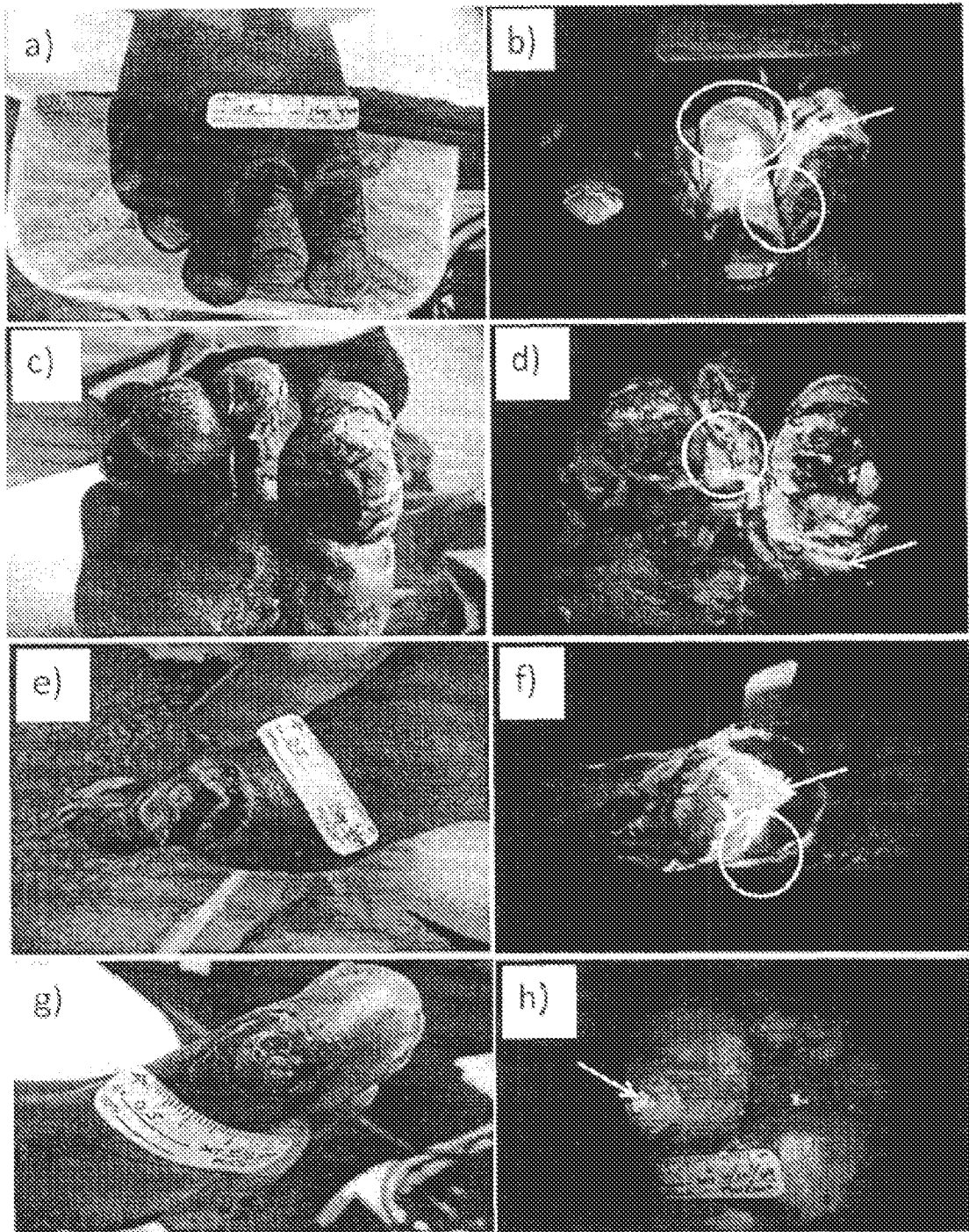


Figura 24M

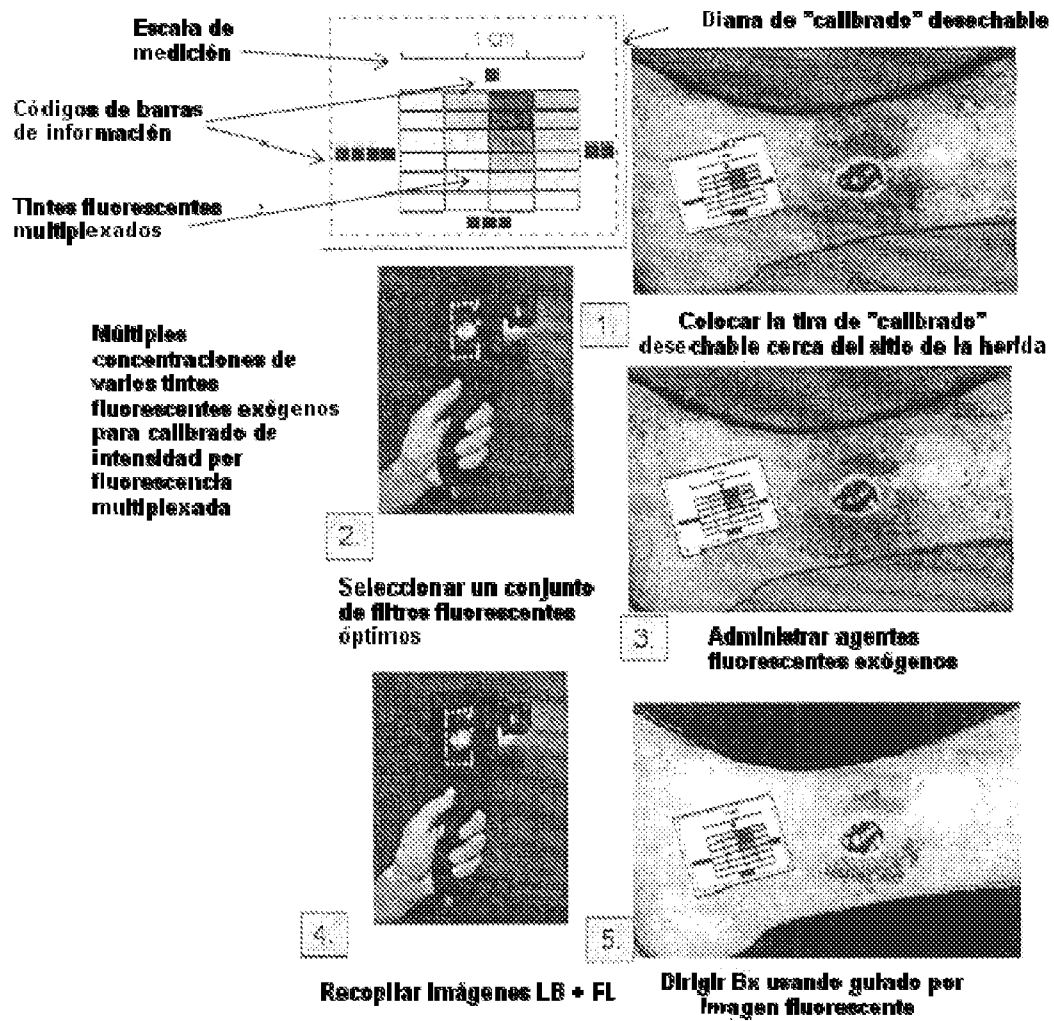


Figura 24N

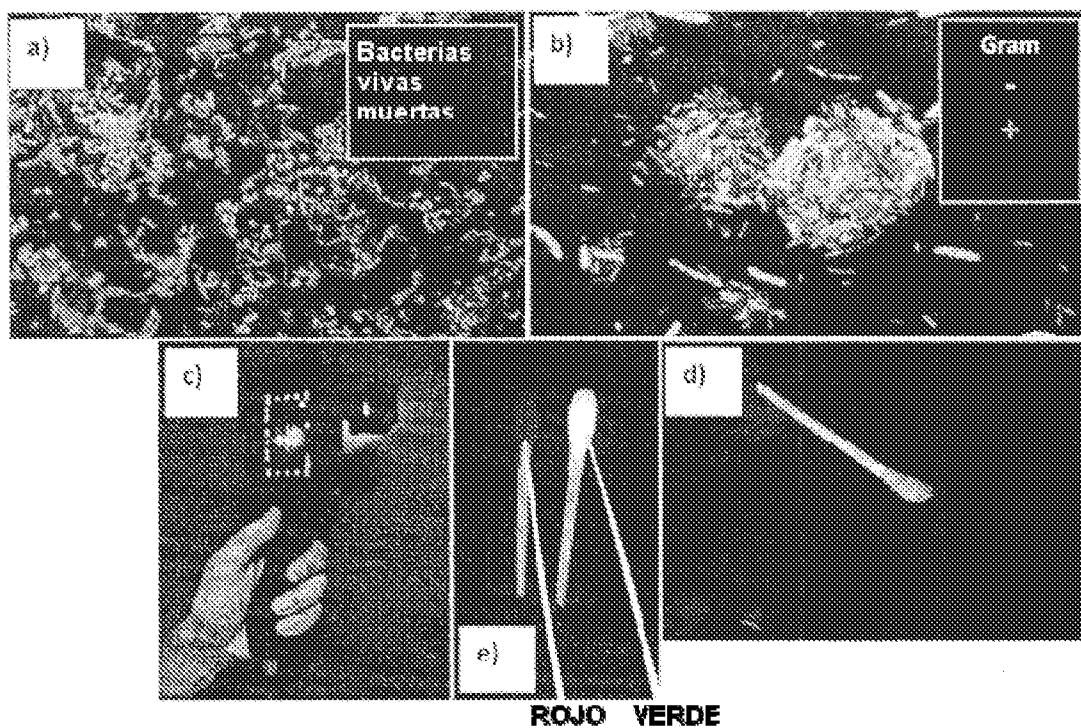


Figura 24O

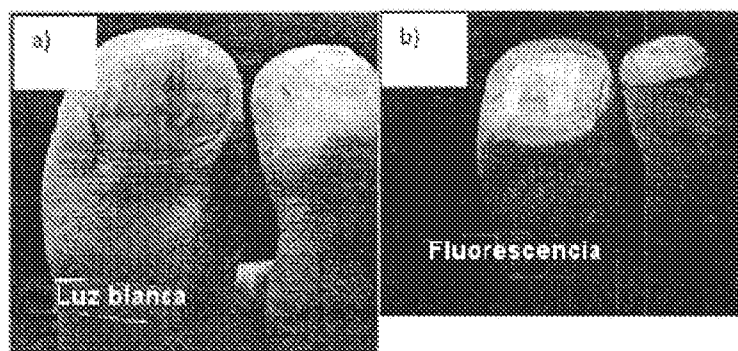


Figura 24P

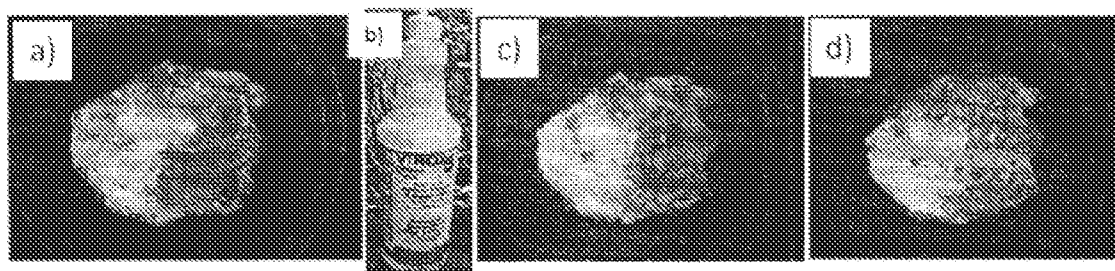


Figura 24Q

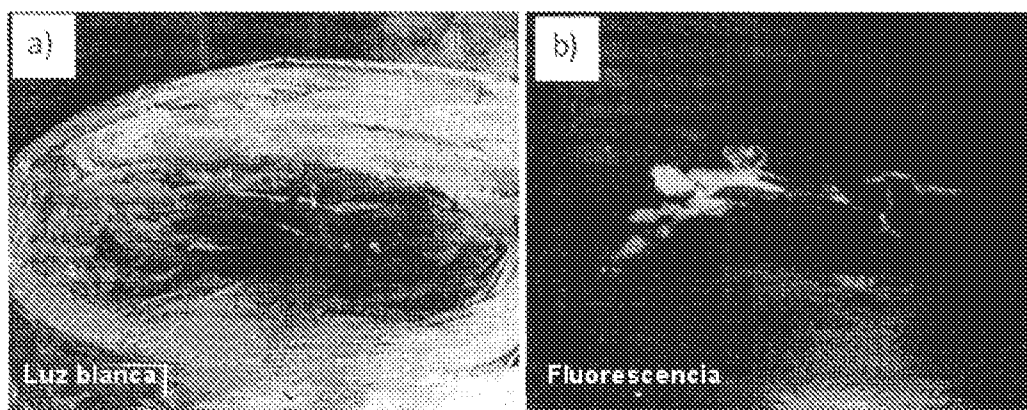


Figura 24R

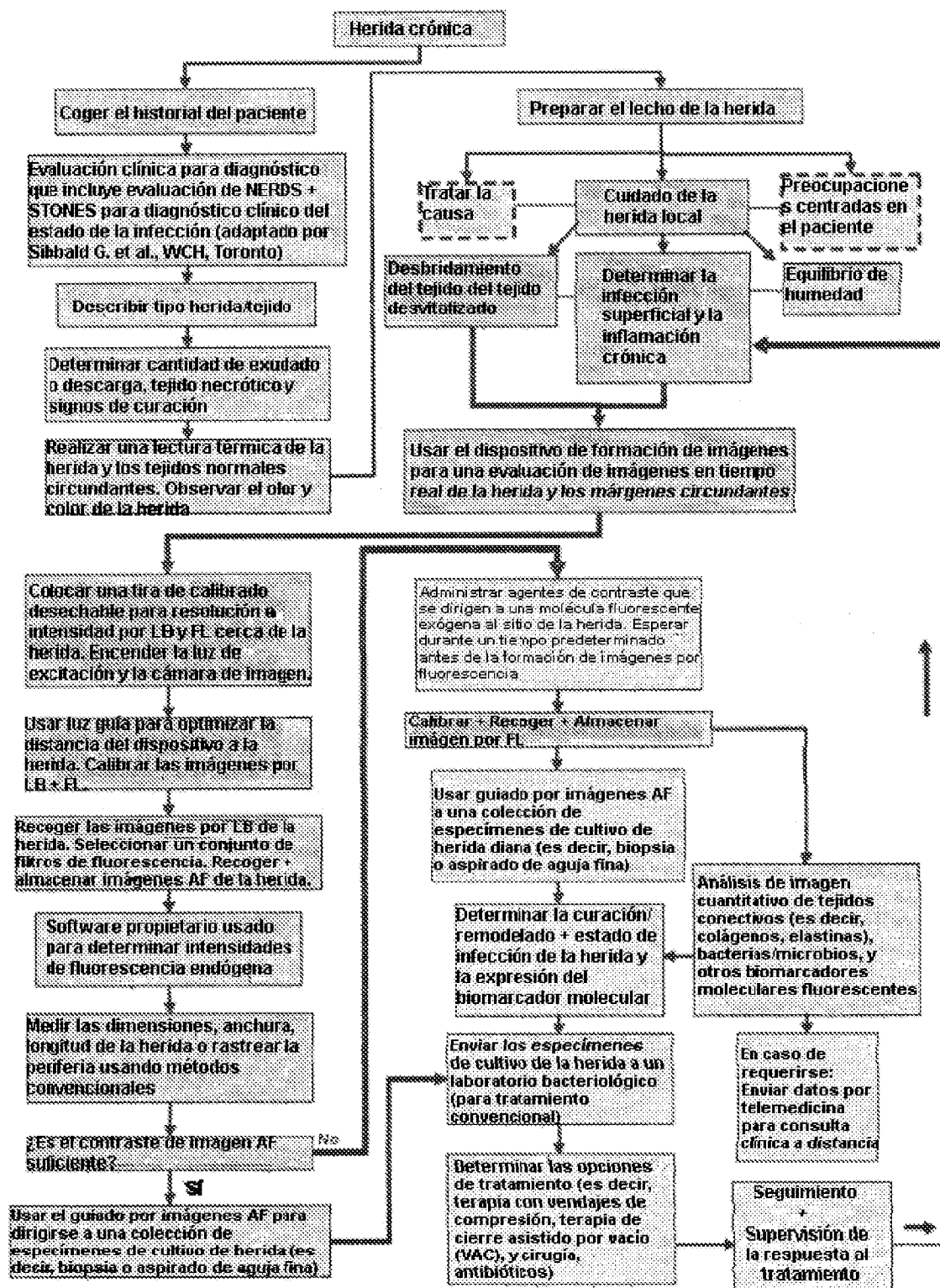


Figura 25

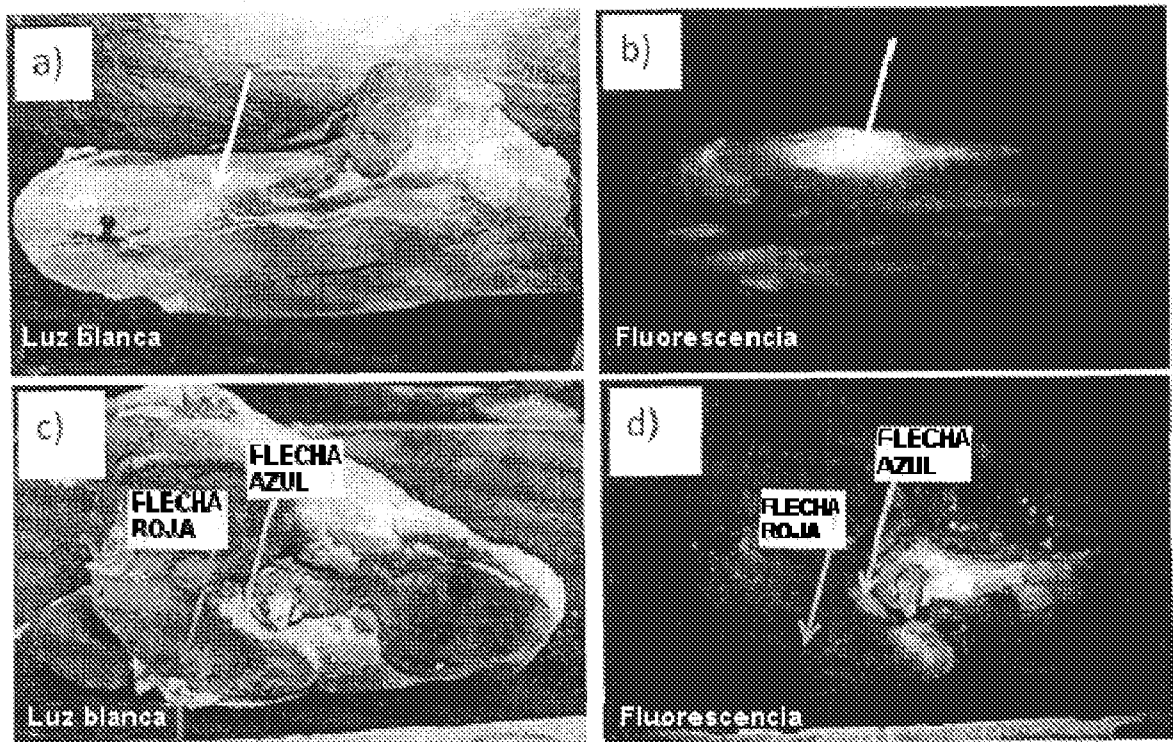


Figura 26

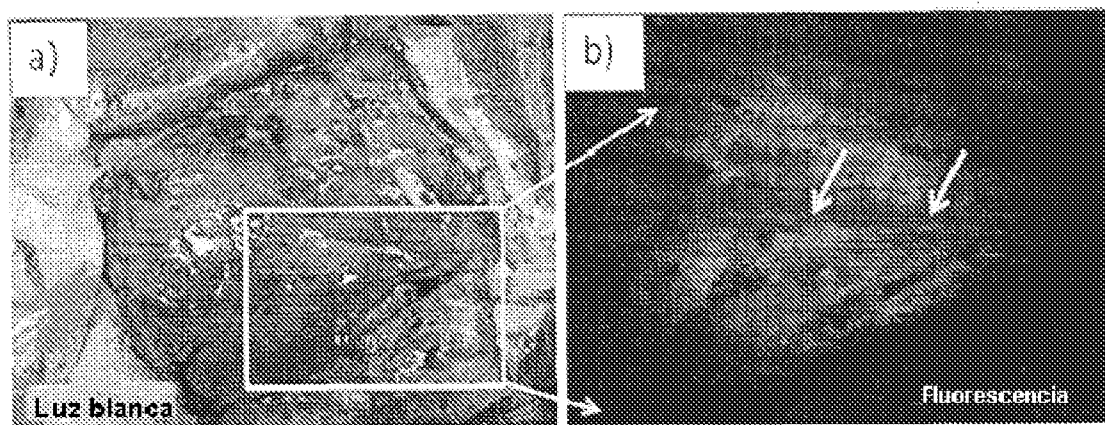


Figura 27

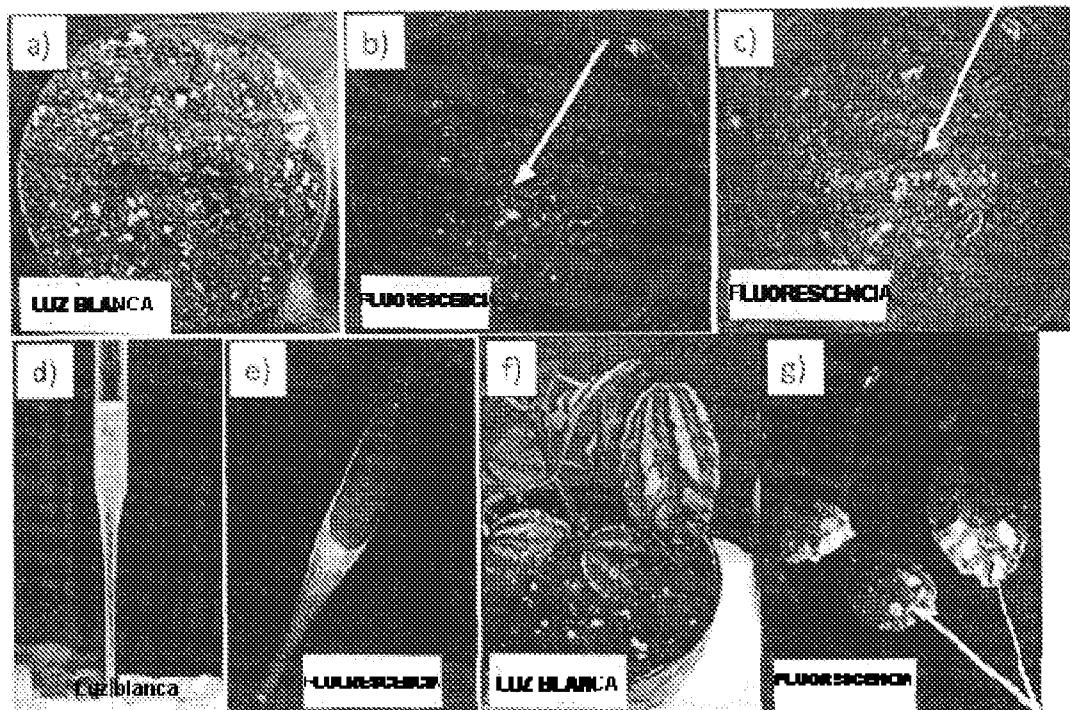


Figura 28

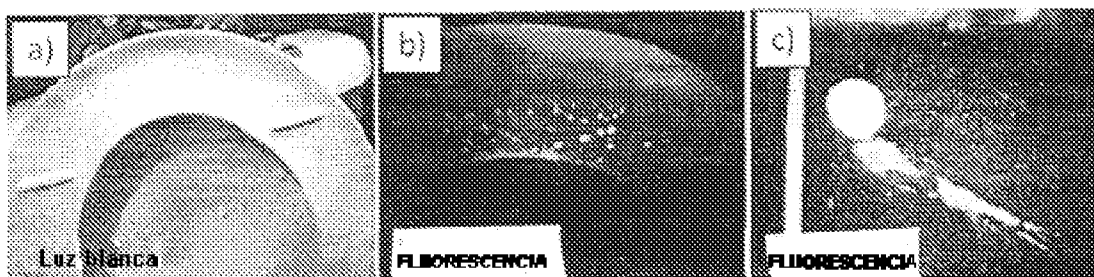


Figura 28B

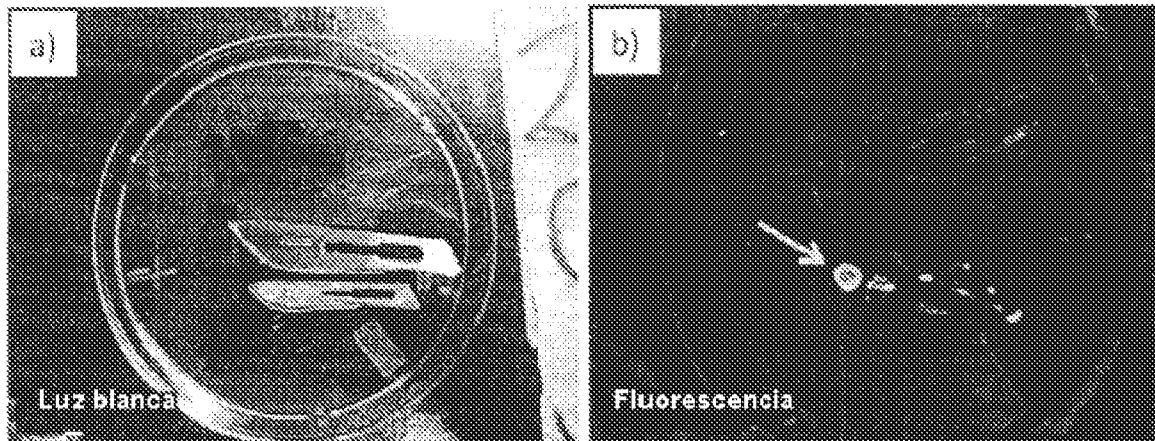


Figura 28C

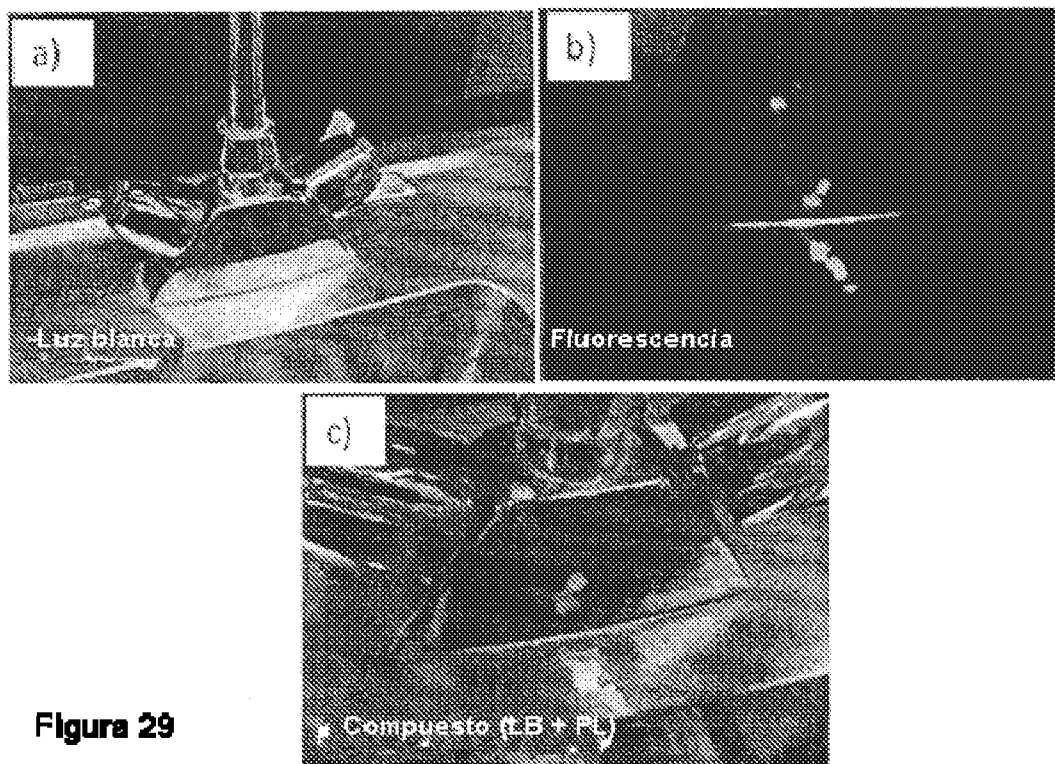


Figura 29

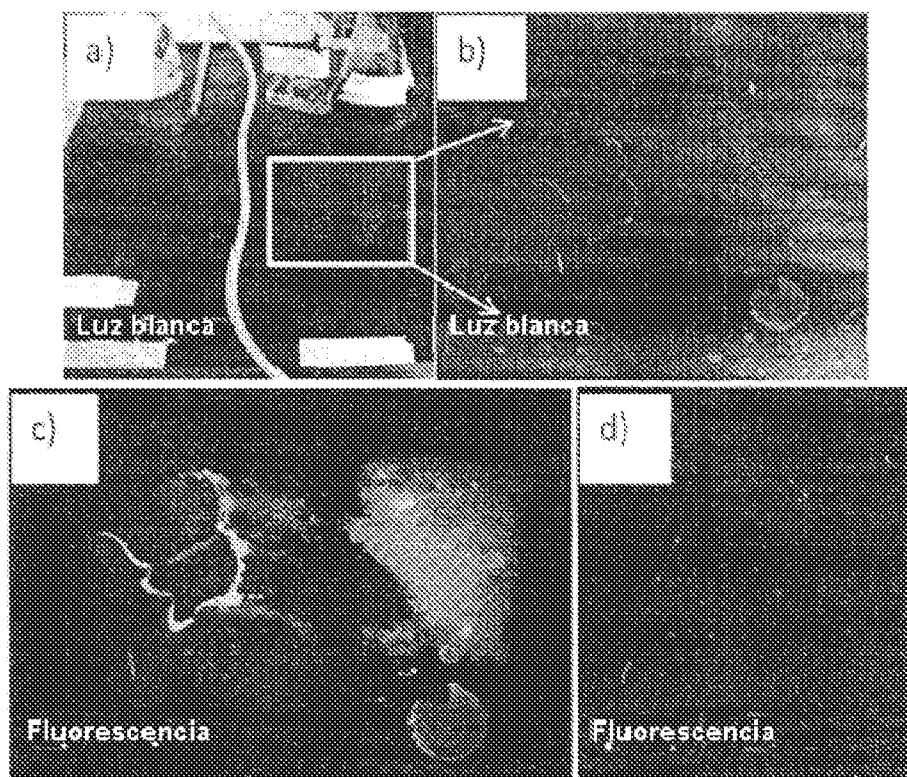


Figura 30

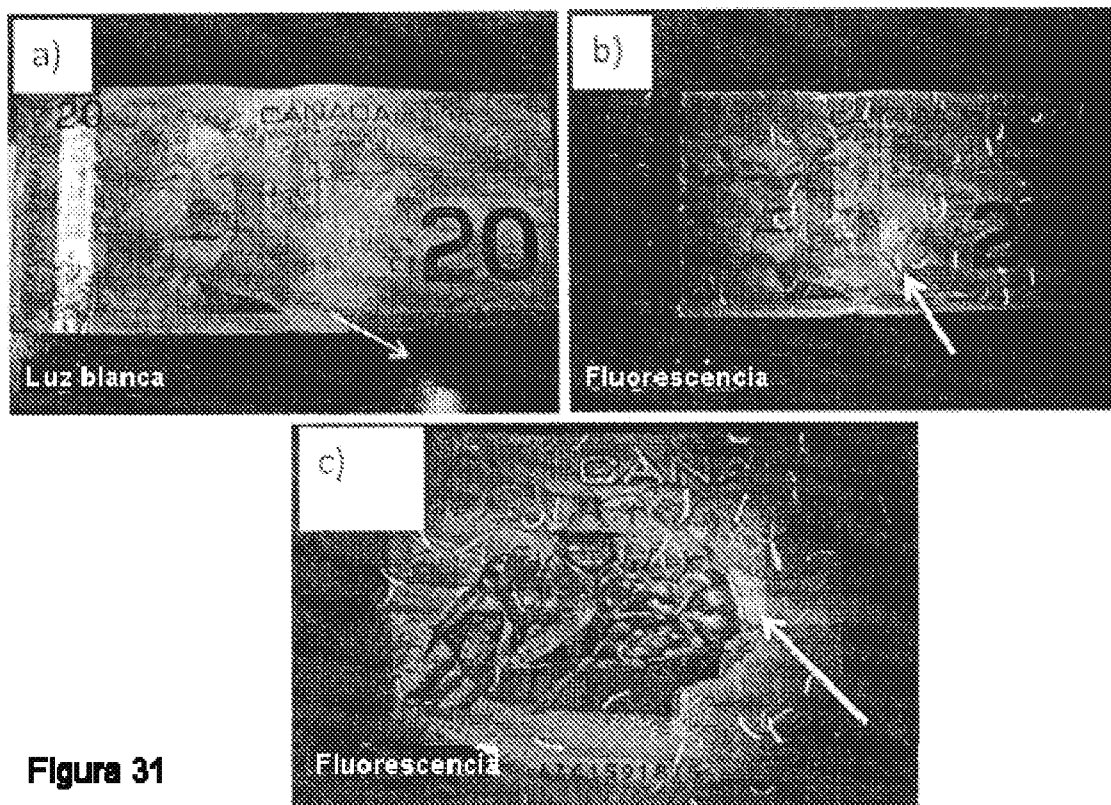


Figura 31

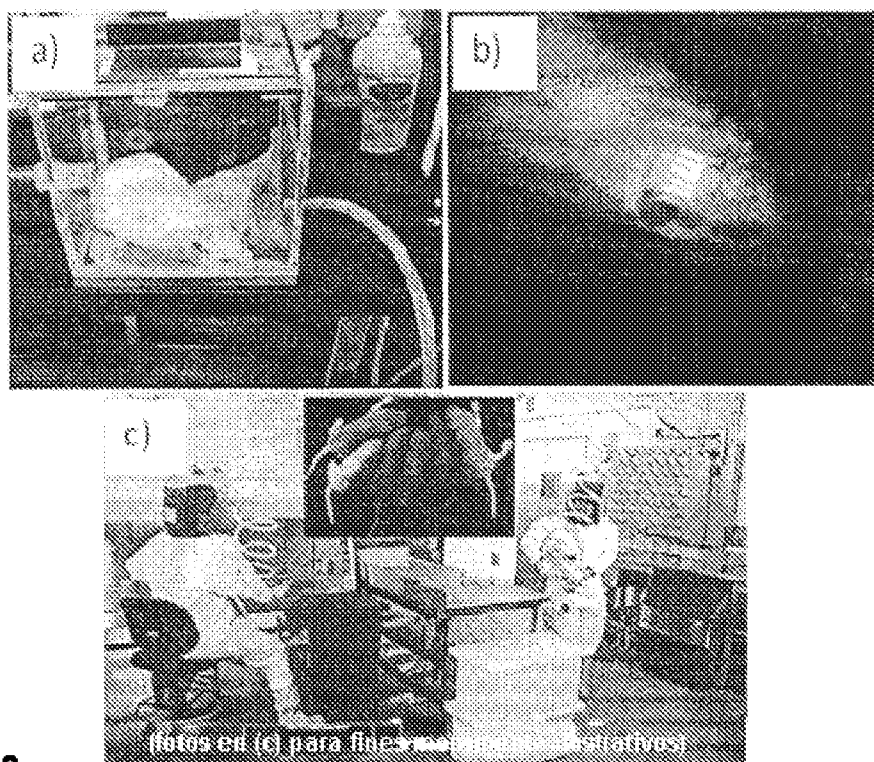


Figura 32

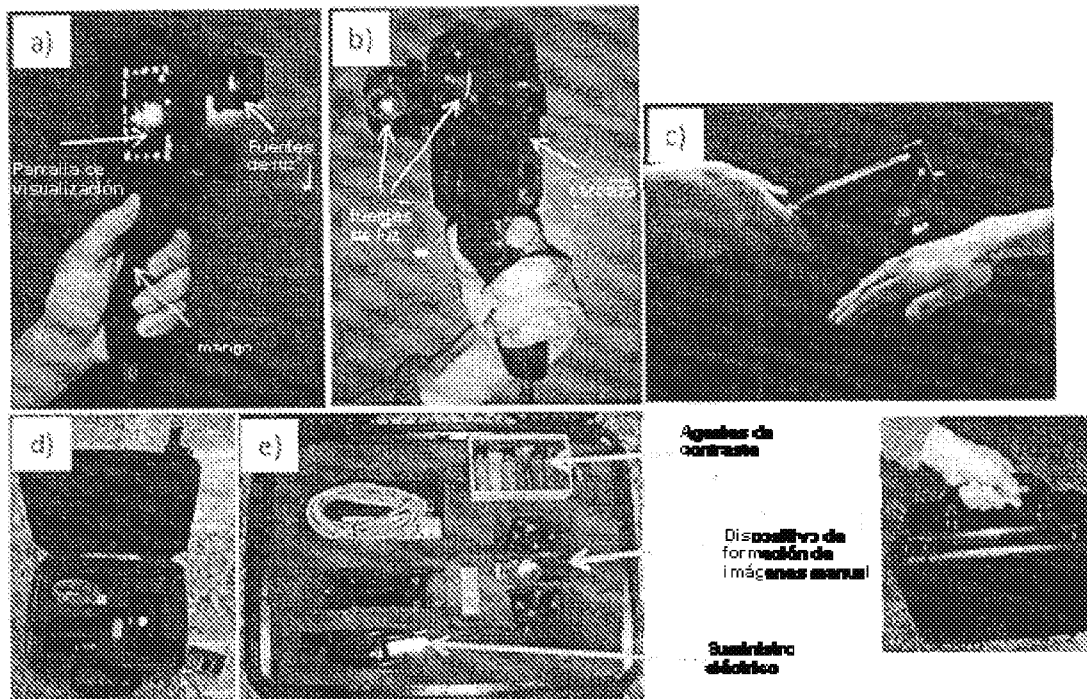


Figura 33

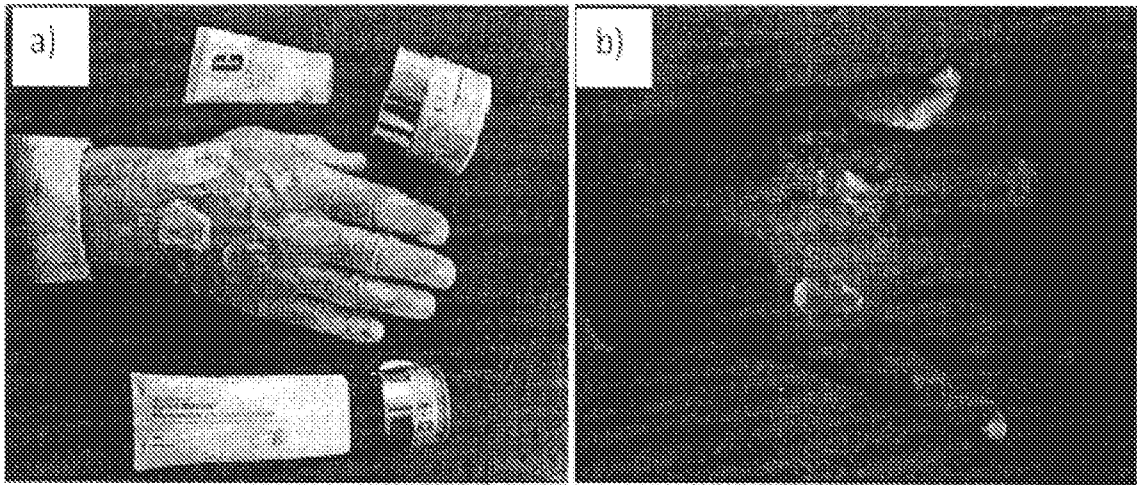


Figura 34