

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 172**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2019 PCT/EP2019/060305**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2019 WO19206869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2019 E 19719491 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2023 EP 3784115**

54 Título: **Un método de evaluación de oscilaciones de microcirculación y dispositivo para el mismo**

30 Prioridad:

26.04.2018 EP 18461551

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

04.04.2024

73 Titular/es:

**ANGIONICA SP. Z O.O. (100.0%)
Ul. Stefana Zeromskiego 116/A-24
90-924 Łódz, PL**

72 Inventor/es:

**GEBICKI, JERZY y
MARCINEK, ANDRZEJ**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 964 172 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un método de evaluación de oscilaciones de microcirculación y dispositivo para el mismo

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método de evaluación de oscilaciones de microcirculación (movimiento de flujo) y a un sistema o dispositivo para la evaluación de oscilaciones de microcirculación.

10 Técnica anterior

El fenómeno natural y espontáneo observado en las redes vasculares tanto in vitro como in vivo se denomina vasomotilidad, es decir oscilaciones rítmicas del tono vascular que se generan dentro de una pared vascular. La vasomotilidad es causada por cambios locales en las constricciones y dilataciones del músculo liso y no es una consecuencia de los latidos del corazón, la respiración o la entrada neuronal (H. Nillson et al., Vasomotion: Mechanisms and Physiological Importance, Molecular Interventions, marzo de 2003, volumen 3, Número 2, págs. 79-89). La vasomotilidad es responsable de las variaciones rítmicas (oscilaciones) de la presión y el flujo sanguíneo, también llamada movimiento de flujo.

20 El documento EP2713860A2 divulga un método para evaluar la función del endotelio vascular en un sujeto humano que comprende monitorizar los cambios en la intensidad de señal de fluorescencia de NADH de las células del tejido de la piel de una extremidad superior de dicho sujeto en función del tiempo, en donde dichos cambios resultan de hiperemia reactiva provocada por el bloqueo y liberación del flujo sanguíneo en el mismo miembro superior de dicho sujeto. Un sistema para evaluar la función del endotelio vascular en un sujeto
25 humano comprende un medio para iluminar la piel de una extremidad superior de dicho sujeto con luz excitante, un medio para medir la intensidad de la señal de fluorescencia emitida desde la piel y registrar cambios de dicha intensidad de la señal de fluorescencia a lo largo del tiempo; y un medio de restricción para bloquear y liberar el flujo sanguíneo en el miembro superior de dicho sujeto.

30 En su nota, Piotrowski et al. (Nota: Fluorescencia cutánea mediada por flujo: una nueva técnica para la evaluación de la microcirculación cutánea, Rev. Sci. Instrum. 87, 036111 (2016)) describe una técnica recientemente desarrollada para la evaluación de la microcirculación cutánea. La técnica denominada Fluorescencia cutánea mediada por flujo (FMSF) se basa en la monitorización de la intensidad de fluorescencia de NADH emitida por las células de tejido cutáneo de un antebrazo. Los cambios en la intensidad de
35 fluorescencia en función del tiempo en respuesta al bloqueo y la liberación del flujo sanguíneo en el antebrazo se utilizan como medida del transporte de oxígeno con la sangre al tejido, lo que se correlaciona directamente con el estado de la microcirculación cutánea. Los resultados preliminares recopilados de voluntarios sanos y pacientes que experimentan problemas cardiovasculares graves indicaron la utilidad de la técnica FMSF para la evaluación de perturbaciones relacionadas con la salud en la microcirculación cutánea. Tarnawska et al. en su estudio (A pilot study with flow mediated skin fluorescence: A novel device to assess microvascular
40 endothelial function in coronary artery disease, Cardiology Journal, vol. 25, n.º 1, 27 de febrero de 2018, p. 120-127) evaluaron la función endotelial microvascular en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias (EAC) mediante fluorescencia cutánea mediada por flujo (FMSF), basada en mediciones de la intensidad de fluorescencia de la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) durante la oclusión de la arteria braquial (respuesta isquémica [IR máx]) e inmediatamente después de la oclusión (respuesta hiperémica [FC máx]). Además, se midieron los niveles plasmáticos de dimetilarginina asimétrica (ADMA) y endotelina-1 (ET-1) para evaluar la asociación entre los marcadores bioquímicos y la función microvascular evaluada in vivo por FMSF. El estudio demostró que la fluorescencia de NADH medida por el dispositivo FMSF en pacientes con EAC se asociaba con marcadores endoteliales plasmáticos establecidos, y que tanto la
45 respuesta isquémica como la hiperémica se atenúan en pacientes con enfermedad avanzada y diabetes.

50 La microcirculación es la parte del sistema circulatorio que tiene una función fisiológica muy importante. Los vasos de microcirculación garantizan un intercambio de gases, metabolitos y elementos del sistema inmunitario limitado por una difusión eficiente entre la sangre y el espacio acuoso extravascular, así como una regulación
55 eficiente humoral y térmica.

La microcirculación se estudia principalmente en humanos a nivel de la piel, es decir, como una microcirculación cutánea. Aunque los movimientos rítmicos de la pared vascular y los cambios del flujo sanguíneo provocados por ellos se observan en todo el lecho vascular, su visualización y registro son
60 especialmente fáciles en la vasculatura de la piel. La vasomotilidad de microcirculación cutánea es la variación rítmica del diámetro de microvasos cutáneos y es responsable de las oscilaciones del flujo sanguíneo microcirculatorio cutáneo, es decir, el movimiento del flujo sanguíneo cutáneo. El deterioro funcional (disfunción) de la función microcirculatoria de muchas regiones, tejidos y órganos, incluida la alteración de las oscilaciones naturales y espontáneas del flujo sanguíneo, desempeña un papel muy importante en la fisiopatología de muchas enfermedades, especialmente las vasculares y la hipertensión. Dado que el deterioro
65 de la microcirculación cutánea refleja los deterioros de otras regiones, el análisis de las oscilaciones del flujo

sanguíneo microcirculatorio o del movimiento del flujo sanguíneo cutáneo tiene un valor diagnóstico.

El flujo sanguíneo microcirculatorio se ha investigado hasta ahora indirectamente en seres humanos a nivel de la piel mediante flujometría/fluximetría láser Doppler (LDF) y análisis espectral de Fourier (transformada) de la señal LDF de la piel a partir de variaciones de flujo en el dominio de tiempo en el espectro de frecuencias. (M. Rossi, Diagnostic values of skin vasomotion investigation in vascular diseases, Advances in Biomedical Research, in Proc. International Conference on Medical Physiology, págs. 374-380, 2010). La evaluación de la función microcirculatoria por LDF se realiza tanto en condiciones de reposo como durante cambios de flujo inducidos por isquemia, calentamiento o administración de sustancias vasoactivas.

Otros métodos ópticos como la fotopleletismografía (PPG), la oximetría de pulso y la espectroscopia de reflexión difusa se basan en la absorción de sangre y la reflexión de la luz por la sangre para estimar el volumen sanguíneo y la saturación de oxígeno. No dan información sobre el flujo sanguíneo.

El método LDF es prácticamente el único método existente de investigación no invasiva de la microcirculación y se basa en la utilización del desplazamiento Doppler que surge cuando la luz láser es dispersada por un glóbulo rojo que se mueve en los microvasos. Sin embargo, tiene ciertas desventajas, es decir, alto coste, incertidumbre y variabilidad de las mediciones obtenidas, y comparaciones intra- e interindividuales problemáticas.

Se necesita un método de prueba que permita investigar y evaluar la función de movimiento de flujo (oscilaciones) de la microcirculación y detectar cualquier disfunción en una fase temprana del deterioro para identificar a los pacientes para pruebas de diagnóstico adicionales más detalladas y complicadas y/o para intervención profiláctica o terapéutica para mejorar la función.

Existe la necesidad de proporcionar una prueba no invasiva para investigar y evaluar la función de movimiento de flujo (oscilaciones) de la microcirculación que sea fiable, fácil de realizar y económica, y capaz de una estandarización objetiva y, por lo tanto, aplicable para pruebas en grandes poblaciones de pacientes, por ejemplo con fines de detección.

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

Ahora se ha descubierto que la medición de la fluorescencia de NADH de la piel en condiciones de reposo, es decir, sin ningún bloqueo mecánico, físico o farmacológico ni liberación del flujo sanguíneo, se puede utilizar con éxito para la evaluación de las oscilaciones espontáneas de la microcirculación cutánea (movimiento de flujo).

Compendio de la invención

La invención proporciona un método de evaluación de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea y un método de determinación de un parámetro para la evaluación de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea, así como un dispositivo o sistema para el mismo, comprendiendo el método:

- iluminación de una ubicación seleccionada en la piel sin vello de un sujeto humano en una condición de reposo estable sin ningún bloqueo del flujo sanguíneo con luz excitante capaz de inducir una señal de fluorescencia de NADH en la piel durante un periodo de tiempo;

- simultáneamente con dicha iluminación, detectar, medir y registrar en función del tiempo una señal de fluorescencia de NADH inducida emitida desde dicha ubicación seleccionada para obtener el curso temporal de la intensidad de señal de fluorescencia de NADH en dicho periodo de tiempo; y

- etapas implementadas por ordenador de:

- ajuste de una línea de base alrededor de la cual la señal de fluorescencia de NADH oscila según dicho curso temporal de la intensidad de señal de fluorescencia de NADH; y

- determinación de un error cuadrático medio de la desviación de la señal de fluorescencia de NADH desde la línea de base ajustada como parámetro de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea.

La definición de un parámetro de evaluación en el método de la invención como el error cuadrático medio de la desviación de la señal de fluorescencia de NADH de la línea de base ajustada hace que este parámetro sea objetivo, independiente del operador y específico del paciente resultado de la prueba. Esta característica del

parámetro permite su fácil estandarización.

El curso temporal de la señal de intensidad de fluorescencia de NADH permite obtener datos importantes para el análisis de disfunciones de la microcirculación.

5

Breve descripción de las figuras del dibujo

Las Figs. 1 a 4 muestran cursos temporales registrados de fluorescencia de NADH cutánea mediada por flujo y líneas de base ajustadas en sujetos humanos aparentemente sanos: voluntarios.

10

Las Figs. 5 a 10 muestran cursos temporales registrados de fluorescencia de NADH cutánea mediada por flujo y líneas de base ajustadas en pacientes.

Descripción detallada de la invención

15

La presente invención proporciona un método de evaluación de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea en un sujeto humano, comprendiendo el método:

20

- iluminación de una ubicación seleccionada en la piel sin vello de un sujeto humano en una condición de reposo estable sin ningún bloqueo o estimulación del flujo sanguíneo con luz excitante capaz de inducir una señal de fluorescencia de NADH en la piel durante un periodo de tiempo;

25

- simultáneamente con dicha iluminación, detectar, medir y registrar en función del tiempo una señal de fluorescencia de NADH inducida emitida desde dicha ubicación seleccionada para obtener el curso temporal de la intensidad de señal de fluorescencia en dicho periodo de tiempo; y

30

- etapas implementadas por ordenador de:

- ajuste de una línea de base alrededor de la cual la señal de fluorescencia de NADH oscila según dicho curso temporal de la intensidad de señal de fluorescencia; y

35

- determinación de un error cuadrático medio de la desviación de la señal de fluorescencia de NADH desde la línea de base ajustada como parámetro de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea.

La presente invención proporciona también un método de determinación de un parámetro de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea en un sujeto humano, comprendiendo el método:

40

- iluminación de una ubicación seleccionada en la piel sin vello de un sujeto humano en una condición de reposo estable sin ningún bloqueo o estimulación del flujo sanguíneo con luz excitante capaz de inducir una señal de fluorescencia de NADH en la piel durante un periodo de tiempo;

45

- simultáneamente con dicha iluminación, detectar, medir y registrar en función del tiempo una señal de fluorescencia de NADH inducida emitida desde dicha ubicación seleccionada para obtener el curso temporal de la intensidad de señal de fluorescencia en dicho periodo de tiempo; y

50

- etapas implementadas por ordenador de:

- ajuste de una línea de base alrededor de la cual la señal de fluorescencia de NADH oscila según dicho curso temporal de la intensidad de señal de fluorescencia; y

55

- determinación de un error cuadrático medio de la desviación de la señal de fluorescencia de NADH desde la línea de base ajustada como parámetro de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea.

60

El método de la invención utiliza la denominada fluorescencia cutánea mediada por flujo. El método se conoce, por ejemplo, por Hellman et al., *Microvascular Research* 113 (2017), 60-84; Piotrowski et al. *Review of Scientific Instruments*, AIP, Melville, Nueva York, EE. UU., vol. 87, n.º 3 (2016); Tarnawska et al., *Cardiology Journal*, vol. 25., n.º 2 (2018), 120-127; y WO2012/164494 en la aplicación para la determinación de ciertos parámetros cuantitativos de cambios en la señal de fluorescencia de NADH cutánea mediados por el bloqueo (isquemia) y luego liberación (hiperemia) del flujo sanguíneo en la arteria. Las respuestas isquémicas (bajo flujo) e hiperémicas (alto flujo) brindan información sobre el estado del endotelio vascular. Se obtuvieron diferentes respuestas isquémicas e hiperémicas entre sujetos sanos y pacientes con enfermedad cardiovascular (EAC), una población con disfunción microvascular bien caracterizada. En el método anterior no se consideraron ni determinaron las oscilaciones del curso temporal de la fluorescencia de NADH cutánea.

65

Las oscilaciones del curso temporal de la fluorescencia de NADH cutánea en el método de la invención reflejan las oscilaciones del flujo sanguíneo microcirculatorio cutáneo.

5 Los datos obtenidos en el método de la invención se pueden utilizar en el diagnóstico temprano de la disfunción de microcirculación.

10 El método de la invención comprende la iluminación de una superficie de piel sin pelo de un sujeto humano en una ubicación seleccionada. Dicha superficie de piel sin pelo significa, entre otras cosas, la superficie de la extremidad superior del sujeto, tal como el antebrazo, la mano o un dedo, preferiblemente el antebrazo. Una superficie de piel sin pelos de este tipo incluye también la superficie de la extremidad inferior, como por ejemplo los muslos y los pies. Una superficie de piel sin pelos de este tipo incluye también, por ejemplo, la zona de la frente.

15 Sin embargo, como el método requiere la medición de la señal de fluorescencia cutánea en condiciones de reposo y en estado de inmovilidad estable de un paciente, la ubicación de iluminación más preferida es el antebrazo, ya que permite que el paciente esté sentado cómodamente e inmóvil durante la prueba.

20 La iluminación en una ubicación seleccionada debe entenderse como iluminación en donde los medios de iluminación se dirigen a una única posición/ubicación en la superficie de la piel y no se mueven intencionalmente con respecto a esta posición/ubicación.

25 Un experto apreciará que la señal de fluorescencia cutánea mediada por flujo se emite desde la piel cuando la piel se ilumina con luz excitante y durante dicha iluminación.

Debe entenderse que cualquier mención en esta memoria a una señal de fluorescencia se relaciona con la señal de fluorescencia de NADH emitida por la piel de un sujeto.

30 Un experto apreciará que la luz excitante capaz de inducir fluorescencia de NADH tendrá la longitud de onda en el intervalo UV absorbida por NADH. El NADH absorbe luz en casi todo el espectro UVA en el intervalo de 300 a 400 nm y en respuesta a la iluminación emite luz fluorescente en el intervalo de 400 nm a 600 nm, con un máximo en aproximadamente 460 nm.

35 Preferiblemente, la luz excitante tendrá una longitud de onda de aproximadamente 350 a 360 nm, especialmente 360 nm.

Preferiblemente, la luz fluorescente emitida se detectará y medirá en una longitud de onda en el intervalo de 420 nm a 480 nm, especialmente aproximadamente 460 nm.

40 El periodo de tiempo durante el que se realiza la detección, medición y registro de la señal de fluorescencia es el periodo que permite obtener una evaluación suficiente de los cambios de fluorescencia para el ajuste de una línea de base implementado por ordenador. Dicho periodo de tiempo suficiente generalmente debería ser de al menos un minuto, tal como de 1 a 5 minutos, tal como 1, 2, 3, 4 o 5 minutos. El periodo de medición puede ser superior a 5 minutos, como por ejemplo hasta 10 minutos.

45 Preferiblemente, los resultados de la medición se normalizan con respecto al valor medio de la señal de fluorescencia en el periodo central de medición.

50 Debe entenderse que para realizar las etapas implementadas por ordenador como se define anteriormente se utiliza un programa informático. Es ventajoso rechazar la sección inicial de la medición. Por ejemplo, si el periodo de medición es de 5 minutos, entonces se rechaza la sección inicial de 1 minuto y se toma el periodo de medición que comprende del segundo al quinto minuto, inclusive, para ajustar la línea de base y determinar el error cuadrático medio.

55 Debe entenderse que la línea de base ajustada alrededor de la que oscila la señal de fluorescencia de NADH es una línea generada/creada artificialmente. El ajuste de una línea de base alrededor de la que oscila la señal de fluorescencia de NADH se puede realizar utilizando el método de regresión polinómica.

60 Sobre la base de los cursos de fluorescencia cutánea mediada por flujo recopilados para el grupo de pacientes y un grupo de control, se ha descubierto que una línea de base alrededor de la que oscila la señal de fluorescencia no es horizontal y puede ser ascendente, descendente, ascendente llegando a meseta, descendente llegando a meseta, parabólica, etc., uno.

65 Preferiblemente, sobre la base de dichos cursos de una línea de base, se utiliza un método de regresión polinómica de segundo orden para ajustar la línea de base, ya que tiene el mejor ajuste a los cambios en el curso de la señal de fluorescencia no relacionados con las oscilaciones del flujo sanguíneo.

Un polinomio, preferiblemente un polinomio de segundo orden, se ajusta a puntos experimentales utilizando el método de regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Tal ajuste es único, como resultado de la solución del sistema de ecuaciones. La parábola es un sistema de 3 ecuaciones que permiten encontrar parámetros únicos de la ecuación $y = \text{intercepto} + B1*x + B2*x^2$.

En el método de mínimos cuadrados, el mejor ajuste se considera aquel en donde la suma de los cuadrados de las desviaciones del punto experimental de la función polinómica, es decir, $SSE = \sum(y_i - Y_i)^2$ (suma residual de los cuadrados) es mínimo (y_i - puntos experimentales, Y_i - puntos correspondientes en la curva ajustada). Al mismo tiempo, el valor SSE es la medida del error de ajuste (desviación de los puntos de la relación polinómica). En el caso del análisis de oscilaciones, la desviación de la señal de fluorescencia se puede utilizar como evaluación de la medida de oscilaciones; un parámetro que es el resultado objetivo y específico del paciente de la prueba.

En el análisis estadístico, la desviación al cuadrado (suma residual de cuadrados) se puede normalizar con respecto al número de puntos experimentales analizados (el tiempo de medición de las oscilaciones tomadas para el análisis). Es decir, se calcula el error cuadrático medio.

El error cuadrático medio se define como:

$$MSE = SSE/(n-m),$$

donde

SSE es la suma residual de cuadrados

n es el número de puntos de medición tomados para el análisis (depende del intervalo de tiempo y la frecuencia de muestreo),

m es el número de parámetros de regresión que describen el polinomio (3 en el caso de un polinomio de segundo orden).

MSE es un estimador insesgado de la desviación de los puntos/señales de la relación polinómica. Esto permite comparar los resultados obtenidos de la observación de oscilaciones en diferentes intervalos de tiempo.

Definir el parámetro de oscilaciones como MSE lo hace objetivo, independiente del operador, característico de un paciente y su prueba con el método de fluorescencia cutánea mediada por flujo.

Los presentes inventores han optado por llamar al parámetro así definido en las pruebas descritas en los Ejemplos que siguen un índice Flowmotion. Sin embargo, no es limitativo ya que se le puede dar cualquier otro nombre.

La presente invención proporciona también un dispositivo o sistema para realizar el método de la invención como se define anteriormente.

El dispositivo o sistema para la evaluación de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea o la determinación de un parámetro de dicha función en un sujeto humano según la invención comprende:

- un medio para iluminación de la piel de dicho sujeto con luz excitante capaz de inducir una señal de fluorescencia de NADH;

- un medio para detectar y medir la señal de fluorescencia de NADH emitida desde la piel durante dicha iluminación;

- una unidad de procesamiento que se configura para realizar lo siguiente:

- recibir y registrar el curso de dicha señal de fluorescencia de NADH en el tiempo,

- ajustar una línea de base alrededor de la cual la señal de fluorescencia de NADH oscila según dicho curso temporal de la intensidad de señal de fluorescencia; y

- determinación de un error cuadrático medio de la desviación de la señal de fluorescencia de NADH desde la línea de base ajustada como parámetro de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea

y

- un medio para mostrar un resultado de la determinación de dicho parámetro de función oscilatoria.
- 5 El dispositivo o el sistema según la invención también puede comprender un medio para conectar una memoria portátil para recuperar y guardar dicho curso de la señal de fluorescencia en el tiempo para imprimirla y analizar su patrón.
- 10 Las técnicas para obtener, detectar, medir y registrar la señal de fluorescencia de NADH a partir de células de tejido (fluorimetría de NADH), así como fluorómetros, son como tales bien conocidas en la técnica y pueden usarse para realizar el método de la invención y en la dispositivo/sistema de la invención.
- 15 Dichos medios para iluminar, detectar, medir, registrar y realizar etapas implementadas por ordenador pueden integrarse en dicho fluorómetro.
- Dichos medios de iluminación serán una fuente de luz de excitación capaz de emitir luz UV en el intervalo absorbido por el NADH, es decir en el intervalo de longitud de onda de 300 a 400 nm.
- 20 Dicho medio para detectar será un detector de señal de fluorescencia al menos en el intervalo emitido por NADH, es decir en el intervalo de longitud de onda de 400 a 600 nm, preferiblemente de 420 nm a 480 nm, especialmente alrededor de 460 nm.
- 25 Dichos medios de iluminación y detección se combinan preferiblemente en un único cabezal de medición que se colocará en la ubicación seleccionada cerca de la piel del sujeto. Un cabezal de medición de este tipo tendrá también una ventana de medición y también puede comprender filtros de interferencias.
- Generalmente, existe una cierta flexibilidad en la configuración del dispositivo, siempre que se incluyan todos los elementos esenciales enumerados anteriormente.
- 30 Se pueden usar fuentes de luz convencionales de luz de excitación conocidas en la técnica, incluyendo lámpara espectral filtrada tal como lámpara de mercurio o xenón, diodo emisor de luz LED, diodo láser o láser pulsado. Una fuente de luz ventajosa es el diodo emisor de luz LED.
- 35 Se pueden utilizar detectores convencionales, tales como detector de fotodiodo, detector de fotodiodo rápido, tubo multiplicador de fotones, etc.
- 40 La luz excitante se puede llevar a la piel a través de la ventana del cabezal de medición colocado cerca de la piel, ya sea en contacto directo con la piel o muy cerca de la piel. La fluorescencia cutánea emitida se puede recoger a través de la misma ventana del cabezal de medición.
- 45 El cabezal de medición se puede conectar a la fuente de luz y al detector a través de la guía de luz o puede comprender tanto la fuente de luz como el detector en una sola disposición.
- Se puede utilizar cualquier guía de luz convencional para transportar luz de excitación y para recoger luz fluorescente, tal como fibras ópticas, opcionalmente en una carcasa flexible.
- 50 En una realización, la medición se realizará en un antebrazo o en el lado palmar de una mano y el cabezal de medición se unirá al soporte para colocar la mano o a la banda fijada en la mano.
- 55 En otra realización, la medición se realizará en el lado dorsal de una mano colocada sobre un soporte, tal como un trípode, y el cabezal de medición se fijará por encima de la mano.
- En otra realización, la medición se realizará en un dedo, mediante una copa, un aro o un manguito en el extremo del cabezal medidor, apretándose dicha copa, aro o manguito alrededor del dedo dependiendo del tamaño de este último.
- 60 En incluso otra realización, la medición se realizará de forma multipunto. Por ejemplo, se pueden llevar varias guías de luz a la banda montada alrededor de un antebrazo o un dedo.
- 60 Ejemplo
- 65 Se midió la fluorescencia de NADH de las células de la piel de la mano de un sujeto humano y los cambios de intensidad de esta fluorescencia en el tiempo.
- La medición se realizó utilizando un dispositivo prototipo equipado con un cabezal de medición que comprende un diodo emisor de luz LED, un detector de fotodiodo, filtros de interferencia en una disposición unida al

reposabrazos con la ventana óptica adecuada para medir la emisión desde la superficie de la piel.

La longitud de onda de la luz de excitación fue de 340 nm y la longitud de onda de la señal de emisión monitorizada fue de 460 nm.

5 Se recogió y registró durante 5 minutos la intensidad de una señal de fluorescencia de la mano del sujeto colocada libremente sobre un reposabrazos sin ninguna estimulación de la circulación.

10 Las mediciones se realizaron en voluntarios aparentemente sanos como control así como en el grupo de pacientes oncológicos. Se registró el curso de la señal de fluorescencia en el tiempo y se representó en función del tiempo.

15 Todos los resultados se normalizaron al valor medio de la señal entre 2 y 3 minutos de medición (periodo de medición central). Se calculó el valor medio de los resultados de este intervalo y luego las señales de fluorescencia en todo el intervalo de medición se dividieron por este valor medio. De esta manera se obtiene una presentación normalizada de los resultados (aproximadamente el valor 1), independientemente del nivel individual de fluorescencia de la piel de un sujeto determinado.

20 Para etapas adicionales se rechazaron los resultados durante el primer minuto de la medición. Se realizó el ajuste de una línea de base para los resultados normalizados y se determinaron los errores cuadráticos medios (también llamados aquí índice de movimiento de flujo índice FM_{index}) sobre la base de los resultados normalizados utilizando un programa informático.

25 Para obtener valores en el intervalo de unidades a cientos, los valores calculados de FM_{index} se multiplicaron por 10^6 ; los valores obtenidos se redondearon a decimales.

Los parámetros de la función oscilatoria se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

donde:

- 30 SSE - suma residual de cuadrados;
- MSE - error cuadrático medio = la suma residual de cuadrados dividida por el número de grados de libertad;
- 35 n - el número de puntos de medición que dependen de la frecuencia de muestreo: aquí cada 40 ms;
- m - el número de parámetros de regresión (aquí polinomio de segundo orden, es decir, $m = 3$)

40 Los resultados se presentan en la Tabla 1 (grupo control de voluntarios) y la Tabla 2 (pacientes oncológicos). Para algunos sujetos se realizaron varias mediciones repetidas y se determinaron los valores medios.

45 Además, en las Figuras 1 a 4 se trazaron y presentaron los cursos temporales de la señal de fluorescencia con líneas de base ajustadas alrededor de las que oscilaban las señales para los sujetos de control 1, 2, 3 y 4, y en las Figuras 5 a 10 para los pacientes L_1, L_2, L_1, L_2, H_1 y H_2, respectivamente

Tabla 1. Voluntarios sanos - grupo de control

Sujeto	FM_{index}							media
Control_1	121,6							121,6
Control_2	204,8	194,6	211,0	191,0	117,9	257,6	285,7	208,9
Control_3	128,2	138,6	63,1					110,0
Control_4	221,7	133,1	60,1	26,1	155,4			119,3
Control_5	96,1	134,7	286,1					172,3
Control_6	39,3	39,4	42,9					40,5
Control_7	53,7	82,2	52,2					62,7
Control_8	104,0							104,0

50 La media para todo el grupo fue 117,4.

ES 2 964 172 T3

Tabla 2. Pacientes oncológicos

Paciente	FM _{index}	Media
Pacientes con cáncer de intestino		
I_1	27,5	58,8
I_2	20,8	
I_3	122,0	
I_4	68,9	
I_5	10,7	
I_6	51,7	
I_7	110,1	
Pacientes con cáncer de pulmón		
L_1	12,7	21,5
L_2	5,8	
L_3	46,0	
Pacientes con cáncer de cabeza		
H_1	9,9	8,7
H_2	2,3	
H_3	3,5	
H_4	19,0	

Análisis estadístico: Distribución t de Student con dos muestras asumiendo varianzas desiguales.

5 La Variable 1 es la media del FM_{index} para el grupo de control, la Variable 2 es el FM_{index} para los grupos de pacientes.

1. Control versus pacientes con cáncer de intestino

	Variable 1	Variable 2
Media	117,4125	58,814286
Varianza	2935,36125	1919,2748
Observaciones	8	7
Diferencia de medias hipotética	0	
df	13	
t estadística	2,314305705	
P(T<=t) una cola	0,018822754	
T crítico de una cola	1,770933396	
P(T<=t) dos colas	0,037645507	
T Crítico de dos colas	2,160368656	

10 2. Control versus pacientes con cáncer de pulmón

	Variable 1	Variable 2
Media	117,4125	21,5
Varianza	2935,36125	462,09
Observaciones	8	3
Diferencia de medias hipotética	0	
df	9	
t estadística	4,202203933	
P(T<=t) una cola	0,001149589	
T crítico de una cola	1,833112933	

	Variable 1	Variable 2
P(T<=t) dos colas	0,002299178	
T Crítico de dos colas	2,262157163	

3. Control versus pacientes con cáncer de cabeza

	Variable 1	Variable 2
Media	117,4125	8,675
Varianza	2935,36125	58,509167
Observaciones	8	4
Diferencia de medias hipotética	0	
df	8	
t estadística	5,566792934	
P(T<=t) una cola	0,000265216	
T Crítico de dos colas	1,859548038	
P(T<=t) una cola	0,000530433	
T Crítico de dos colas	2,306004135	

- 5 A pesar del pequeño número de sujetos evaluados, prácticamente todos los análisis muestran diferencias estadísticamente significativas (disminución de las oscilaciones) con respecto al grupo de control. El método posee un potencial diagnóstico significativo.

REIVINDICACIONES

1. Un método de evaluación de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea, comprendiendo el método:
- 5 - iluminación de una ubicación seleccionada en la piel sin vello de un sujeto humano en una condición de reposo estable sin ningún bloqueo o estimulación del flujo sanguíneo con luz excitante capaz de inducir una señal de fluorescencia de NADH en la piel durante un periodo de tiempo;
 - 10 - simultáneamente con dicha iluminación, detectar, medir y registrar en función del tiempo la señal de fluorescencia de NADH inducida emitida desde dicha ubicación seleccionada para obtener el curso temporal de la intensidad de señal de fluorescencia de NADH en dicho periodo de tiempo; y
 - etapas implementadas por ordenador de:
 - 15 - ajuste de una línea de base alrededor de la cual la señal de fluorescencia de NADH oscila según dicho curso temporal de la señal de fluorescencia de NADH; y
 - determinación de un error cuadrático medio de la desviación de la señal de fluorescencia de NADH desde la línea de base ajustada como parámetro de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho ajuste de la línea de base se realiza utilizando el método de regresión polinómica.
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en donde se utiliza el método de regresión polinómica de segundo orden.
4. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde dicho ajuste se realiza utilizando el método de mínimos cuadrados.
- 30 5. El método de la reivindicación 1 en donde dicho periodo de tiempo es al menos 1 minuto.
6. El método de la reivindicación 1, en donde para dicho ajuste de la línea de base se rechaza un periodo inicial de medición.
- 35 7. Un dispositivo o sistema para la evaluación de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea, comprendiendo el dispositivo:
- 40 - un medio para iluminación de la piel de dicho sujeto con luz excitante capaz de inducir fluorescencia de NADH;
 - un medio para detectar y medir la señal de fluorescencia de NADH emitida desde la piel;
 - una unidad de procesamiento que se configura para realizar lo siguiente:
 - 45 - recibir y registrar el curso temporal de dicha intensidad de la señal de fluorescencia de NADH,
 - ajuste de una línea de base alrededor de la que oscila la señal de fluorescencia de NADH según dicho curso temporal de la señal de fluorescencia, y
 - 50 - determinación del error cuadrático medio de la desviación de la señal de fluorescencia de NADH desde la línea de base ajustada como parámetro de la función oscilatoria de la microcirculación cutánea,
- 55 Y
- un medio para mostrar un resultado de la determinación de dicho parámetro de función oscilatoria.
- 60 8. El dispositivo o sistema según la reivindicación 7, en donde dicho ajuste de la línea de base se realiza utilizando el método de regresión polinómica.
9. El dispositivo o sistema según la reivindicación 8, en donde se utiliza el método de regresión polinómica de segundo orden.
10. El dispositivo o sistema según la reivindicación 9, en donde se utiliza el método de mínimos cuadrados.

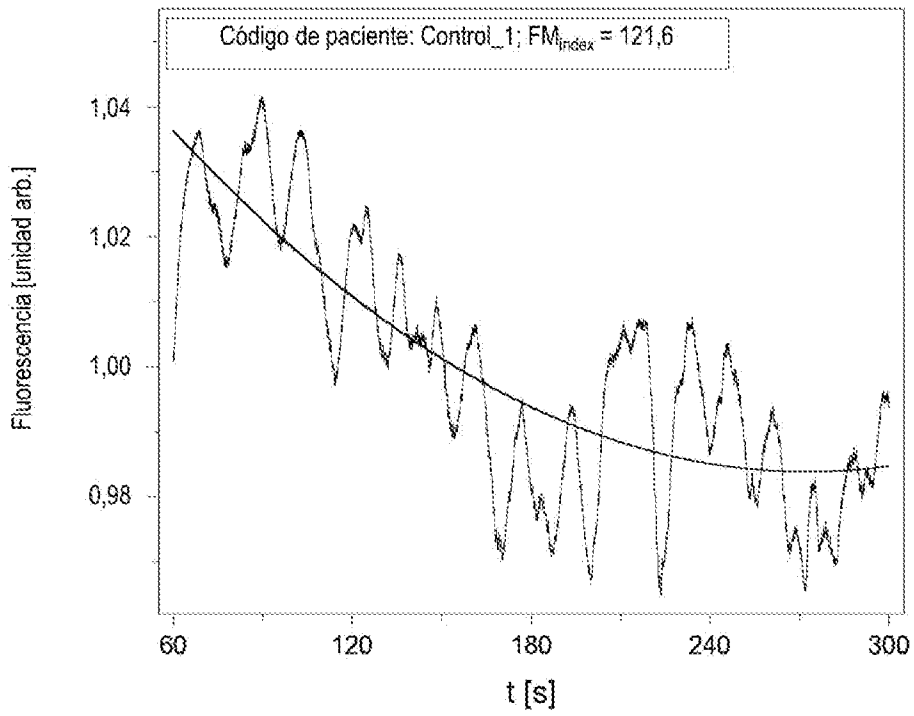


Fig. 1

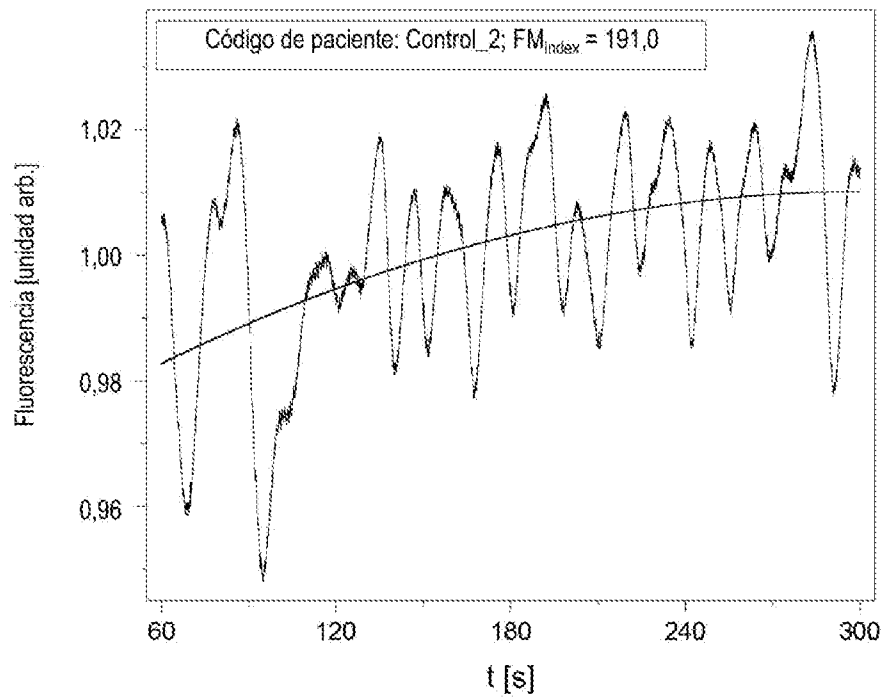


Fig.2

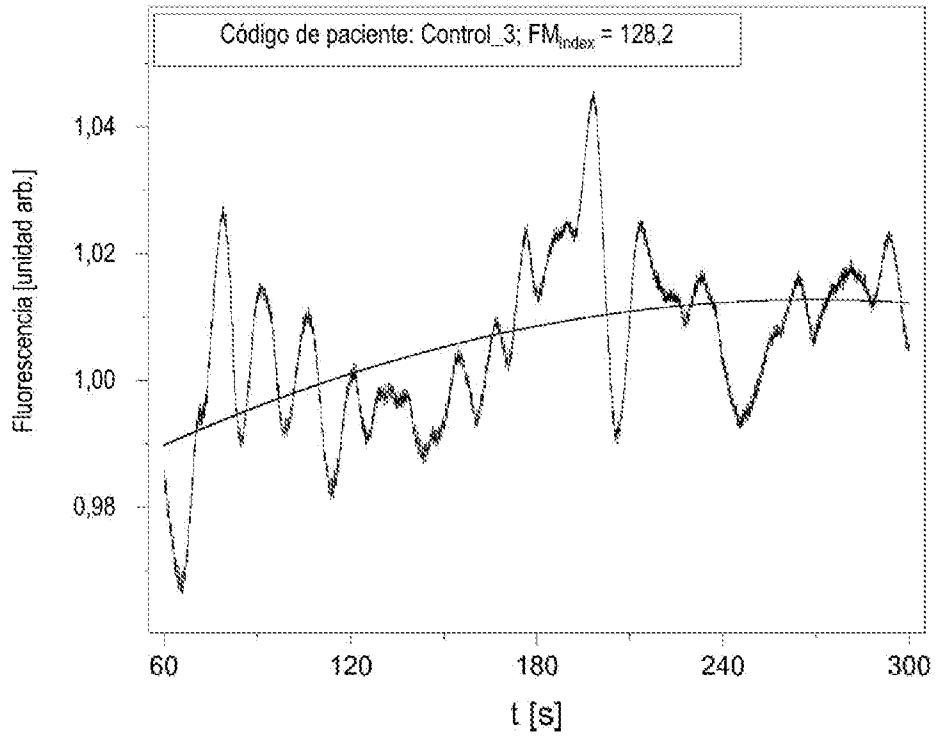


Fig. 3

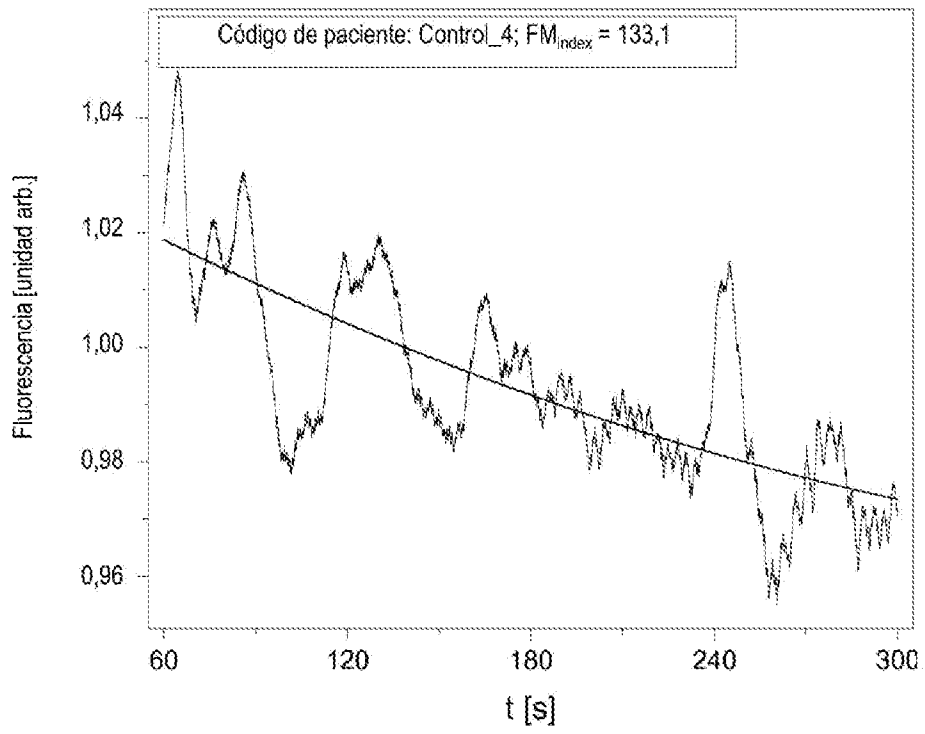


Fig. 4

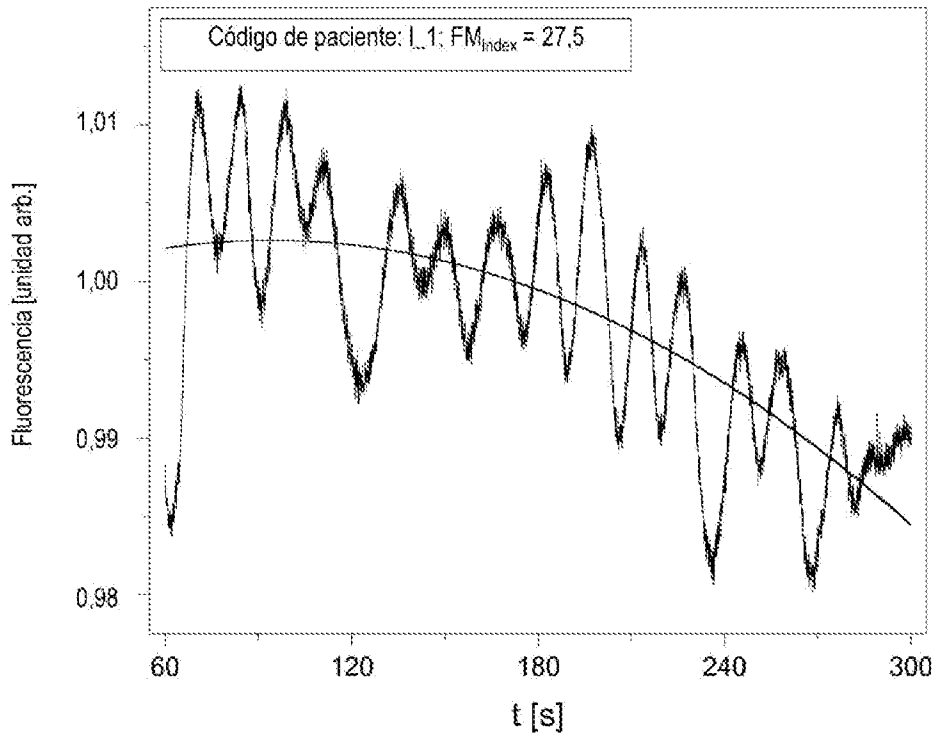


Fig. 5

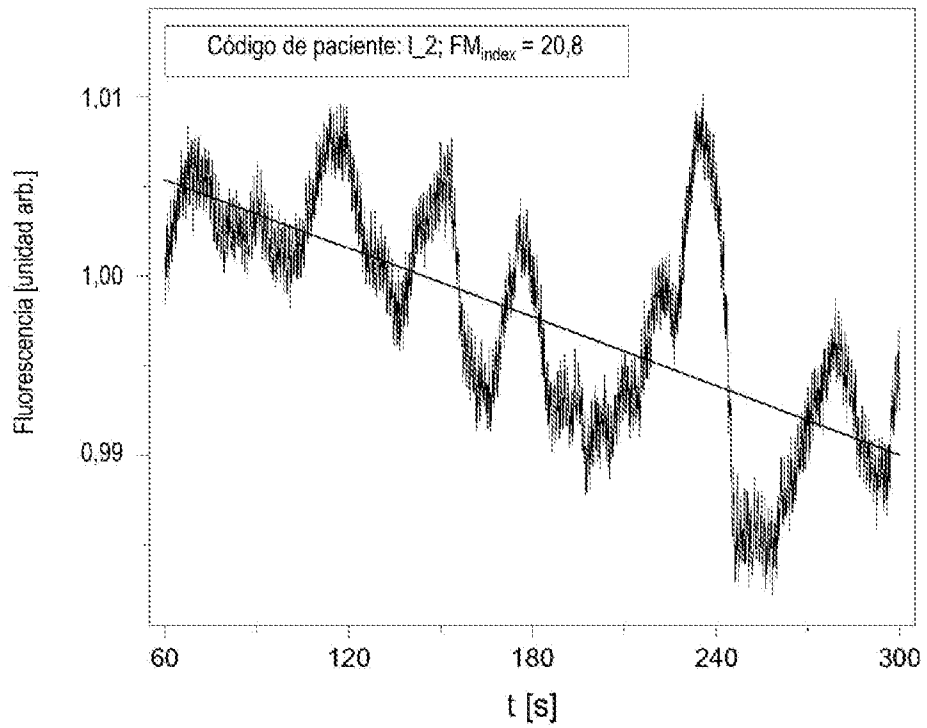


Fig. 6

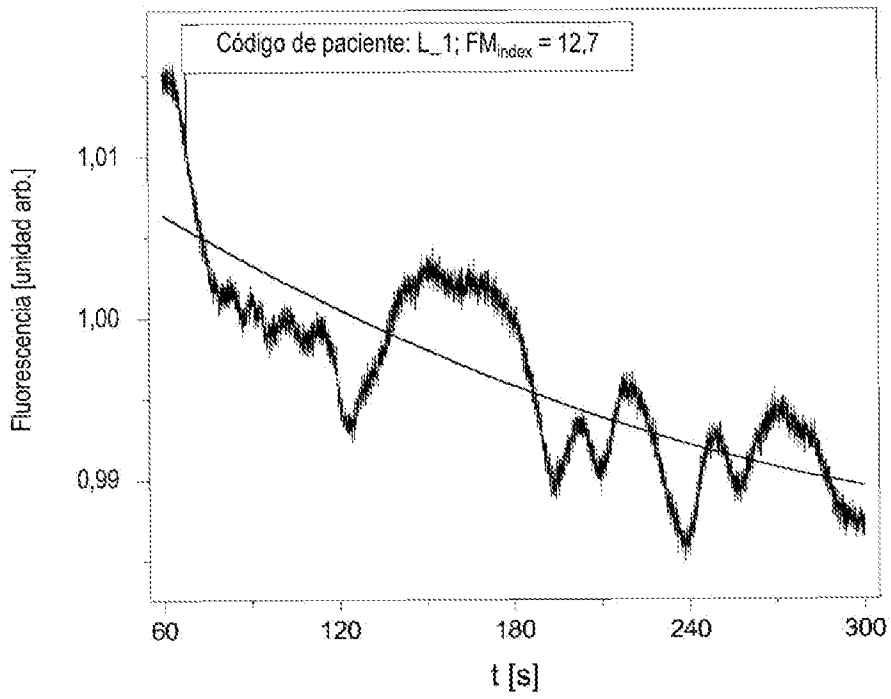


Fig. 7

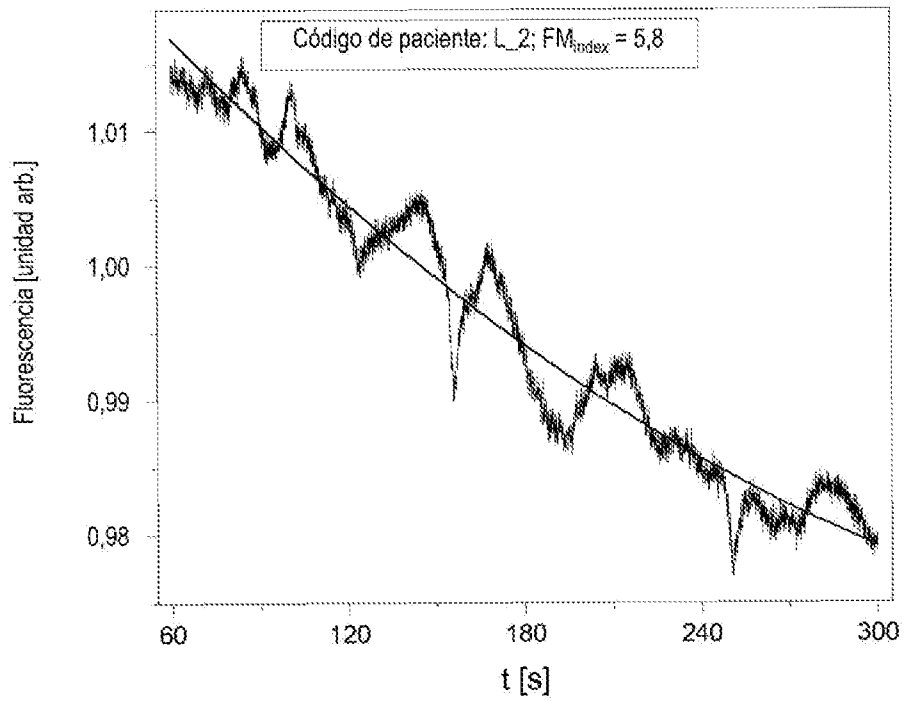


Fig. 8

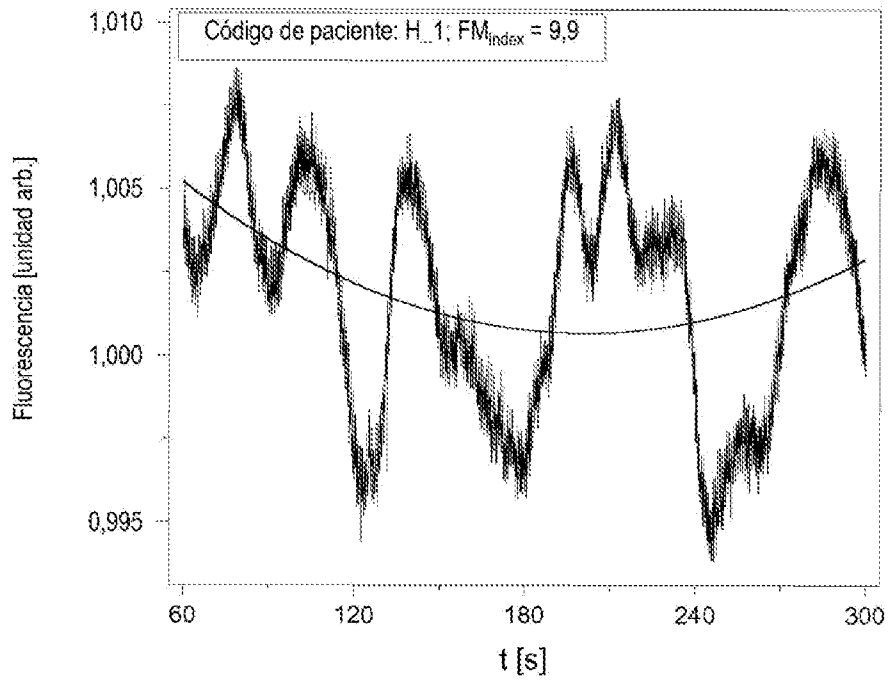


Fig. 9

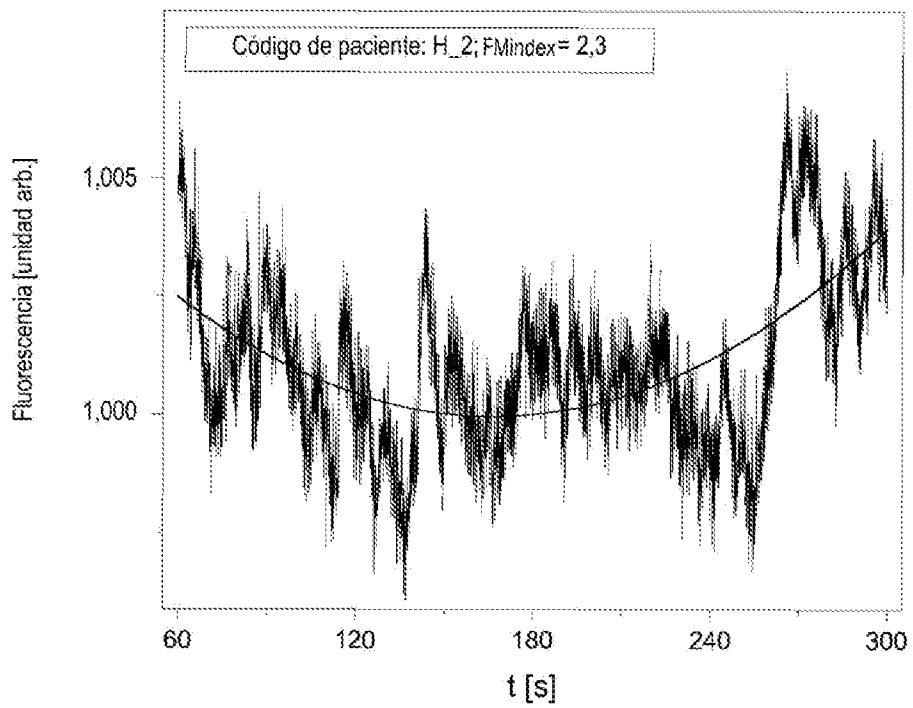


Fig. 10