

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 485**

51 Int. Cl.:

A61B 5/25 (2011.01)

A61N 1/36 (2006.01)

A61N 1/05 (2006.01)

A61B 5/021 (2006.01)

A61B 5/024 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2018 PCT/GB2018/053729**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019 WO19122906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2018 E 18829947 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3727569**

54 Título: **Tratamiento de afecciones médicas agudas**

30 Prioridad:

20.12.2017 US 201762608405 P

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

20.11.2024

73 Titular/es:

**GALVANI BIOELECTRONICS LIMITED (100.0%)
GSK Medicines Research Centre, Gunnels Wood
Road
Stevenage SG1 2NY, GB**

72 Inventor/es:

**CHEW, DANIEL JOHN;
DONEGA, MATTEO y
GUPTA, ISHA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 988 485 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

Tratamiento de afecciones médicas agudas

5 **CAMPO TÉCNICO**

Esta invención se refiere a un sistema para estimular la actividad neuronal de un nervio que irriga el bazo para tratar una afección médica aguda.

10 **ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA**

15 Las afecciones médicas agudas, como se mencionan en la presente, se refieren a un deterioro rápido del estado fisiológico de un sujeto que puede poner en peligro su vida si no se trata. Los ejemplos incluyen traumatismos, sepsis, hemorragias, hemofilia grave, episodios graves de lupus, episodios graves de Crohn, rechazo de aoinjerto/autoinjerto, anafilaxia y shock endotóxico. Por lo tanto, estos sujetos requieren atención médica urgente para aliviar el sufrimiento y minimizar el riesgo de morbilidad y mortalidad. Los tratamientos de las afecciones médicas agudas varían según la enfermedad y, dependiendo de la gravedad de la afección, a menudo estos tratamientos no tienen éxito.

20 Por el contrario, las enfermedades crónicas son aquellas que se caracterizan por un curso clínico prolongado durante el cual se producen pocos cambios o una lenta progresión de la patología subyacente. Por ejemplo, la artritis (por ejemplo, la artritis reumatoide), la pancreatitis crónica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la insuficiencia cardíaca crónica. Sin embargo, los sujetos con afecciones crónicas pueden sufrir exacerbaciones agudas del proceso de la enfermedad subyacente, lo que suele denominarse episodios agudos-crónicos. La distinción entre enfermedades agudas y crónicas es bien conocida en la técnica.

30 El bazo contiene la mitad de la población de monocitos del cuerpo, lo que convierte a este órgano en el principal contribuyente en la inflamación, en particular en respuesta al shock endotoxémico [1]. El bazo está innervado por diferentes ramas nerviosas, y se ha propuesto que la innervación esplénica es simpática en un 98% (revisado en [2]). La estimulación eléctrica de los nervios esplénicos se asocia con respuestas vasculares del bazo [3]. Se ha sugerido que la estimulación eléctrica de los nervios esplénicos puede ser útil para tratar afecciones asociadas a respuestas inmunitarias e inflamatorias crónicas, por ejemplo, véanse las referencias [4,5,6,7]. Sin embargo, no se han investigado los efectos prosupervivencia de la estimulación del nervio esplénico en condiciones médicas agudas. El documento US 2005/075702 A1 analiza la estimulación de una o más neuronas del sistema nervioso simpático, incluyendo el nervio esplénico, para atenuar una respuesta inmunitaria, incluyendo una respuesta inmunitaria inflamatoria. También se analizan dispositivos y sistemas para estimular el sistema nervioso simpático para atenuar una respuesta inmunitaria. Los dispositivos analizados incluyen generadores de pulsos y bombas de fármacos. Se describen sistemas que opcionalmente tienen uno o más sensores e instrucciones para el operador. En ejemplos específicos, se demuestra que la estimulación del nervio esplénico de cerdos con un generador de pulsos es segura y eficaz para atenuar una respuesta inmunitaria inducida por lipopolisacáridos. El sistema nervioso simpático puede estimularse eléctricamente con, por ejemplo, un generador de pulsos. En una realización, la estimulación del sistema nervioso simpático incluye la estimulación del nervio esplénico. La FIG. 16 de la US 2005/075702 A1 es una fotografía del electrodo de manguito usado para estimular el nervio esplénico en una realización. Los párrafos [0042] a [0048] de la US 2005/075702 A1 analizan la atenuación de una respuesta inmunitaria y enumeran una serie de ejemplos de una respuesta inmunitaria.

Hay una necesidad de identificar nuevas y mejores maneras de tratar las enfermedades agudas.

50 **SUMARIO DE LA INVENCION**

Los inventores demuestran por primera vez que la neuromodulación de los nervios que irrigan el bazo, en particular los nervios que rodean la arteria esplénica (denominados en la presente nervios arteriales esplénicos), aumentó la supervivencia de los animales en un modelo de choque endotoxémico (LPS). En particular, los inventores descubrieron que la estimulación eléctrica de los nervios esplénicos estabilizaba la presión arterial, que disminuye drásticamente en los animales tratados con LPS, y reducía la reducción máxima de la presión arterial. Por lo tanto, la estimulación de la actividad neuronal de los nervios esplénicos proporciona una forma de tratar afecciones médicas agudas, en particular afecciones potencialmente mortales, como las que presentan cambios fisiológicos asociados al shock y disfunción cardiovascular (por ejemplo, traumatismos, hemorragias y shock séptico). Esto sería especialmente útil como tratamiento único, por ejemplo en entornos clínicos agudos.

60 La invención proporciona un sistema de acuerdo con la reivindicación 1. Las características opcionales se exponen en las reivindicaciones dependientes. La siguiente divulgación describe métodos, métodos implementados por ordenador, ordenadores, señales, formas de onda, partículas cargadas y nervios modificados; estos aspectos no se reivindican, sino que se describen porque son útiles para comprender mejor el sistema de la invención. Además, se pretende que el sistema de la invención pueda por lo menos a) implementar dichos métodos, b) ser usado en

conjunción con, o incluir, dicho ordenador, c) producir dichas señales, formas de onda y partículas, y d) ser usado para modificar dichos nervios.

Por tanto, la divulgación proporciona un método para tratar una afección médica aguda, como trauma, hemorragia o choque séptico, el método comprendiendo aplicar una señal eléctrica para estimular la actividad neuronal de un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio se asocia con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), de tal manera que la señal eléctrica produce una mejora en un parámetro fisiológico indicativo del tratamiento de una afección médica aguda, en donde la mejora en el parámetro fisiológico es cualquiera del grupo que consiste en: el restablecimiento de la temperatura corporal entre 36 grados Celsius (°C) y 38°C, el restablecimiento de la frecuencia cardíaca entre 60-100 bpm, el restablecimiento de la presión arterial sistémica entre 90/60 mmHg y 150/90mmHg, el restablecimiento de la presión venosa sistémica entre aproximadamente 5 mmHg en la aurícula derecha y aproximadamente 8 mmHg en la aurícula izquierda, restablecimiento de la presión venosa central en el intervalo de aproximadamente 3-8 mmHg, restablecimiento de la presión pulmonar a aproximadamente 15 mmHg, restablecimiento de la frecuencia respiratoria entre 8-14 respiraciones por minuto, aumento de la saturación de oxígeno a $\geq 94\%$, un aumento de la presión parcial arterial de oxígeno a 12-15 kPa, restablecimiento de la presión parcial arterial de dióxido de carbono a 4,4-6,1 kPa, una reducción de la sensación de dolor, el restablecimiento de la producción de orina a $\geq 0,5$ ml/kg/hora, el aumento del nivel de consciencia, una reducción del nivel de lactato, un cambio en el nivel de glucosa en sangre, un cambio en el nivel de déficit de bases en sangre y un cambio en el nivel de pH arterial.

La divulgación también proporciona un método para tratar una afección médica aguda, como un trauma, hemorragia o choque séptico, el método comprendiendo aplicar una señal eléctrica para estimular la actividad neuronal de un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio se asocia con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), de tal manera que la señal eléctrica produce una mejora en un parámetro fisiológico indicativo del tratamiento de una afección médica aguda, en donde la mejora en el parámetro fisiológico es cualquiera del grupo que consiste en: el restablecimiento de los valores fisiológicos de la presión arterial sistémica entre 90/60 mmHg y 150/90 mmHg y el restablecimiento de la presión venosa sistémica en el intervalo de 3-8 mmHg, el restablecimiento de la presión pulmonar a aproximadamente 15 mmHg, el restablecimiento de niveles más bajos de resistencia vascular pulmonar a la vez que aumenta la resistencia vascular sistémica y aumenta la presión de enclavamiento capilar pulmonar, la reducción de niveles elevados de lipasas, la reducción de niveles elevados de amilasas.

La invención también proporciona un sistema para estimular la actividad neuronal de un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), para tratar una afección médica aguda. El sistema comprende por lo menos un electrodo en contacto de señalización con el nervio, y por lo menos un controlador acoplado eléctricamente al por lo menos un electrodo. El por lo menos un controlador configurado para controlar el funcionamiento del por lo menos un electrodo para aplicar una señal eléctrica al nervio. La señal eléctrica está configurada de tal manera que produce una mejora en un parámetro fisiológico indicativo del tratamiento de la afección médica aguda. La señal eléctrica tiene una forma de onda que comprende uno o más trenes de pulsos y en donde la densidad de carga por fase aplicada al nervio por la señal eléctrica está entre $5\mu\text{C}$ y $1300\mu\text{C}$ por cm^2 por fase. La mejora del parámetro fisiológico es cualquiera del grupo que consiste en: el restablecimiento de la temperatura corporal a entre 36°C y 38°C, el restablecimiento de la frecuencia cardíaca a entre 60-100 bpm, el restablecimiento de la presión arterial sistémica a entre 90/60 mmHg y 150/90mmHg, el restablecimiento de la presión venosa sistémica a aproximadamente 5 mmHg en la aurícula derecha y 8 mmHg en la aurícula izquierda, restablecimiento de la presión venosa central al intervalo de aproximadamente 3 - 8 mmHg, el restablecimiento de la presión pulmonar a aproximadamente 15 mmHg, restablecimiento de la frecuencia respiratoria a aproximadamente 8-14 respiraciones por minuto, un aumento de la saturación de oxígeno a $\geq 94\%$, un aumento de la presión parcial arterial de oxígeno a 12-15 kPa, restablecimiento de la presión parcial arterial de dióxido de carbono a 4,4-6,1 kPa, una reducción de la sensación de dolor, el restablecimiento de la producción de orina a $\geq 0,5$ ml/kg/hora, aumento del nivel de consciencia, una reducción del nivel de lactato, un cambio en el nivel de glucosa en sangre, un cambio en el nivel de déficit de bases en sangre y un cambio en el nivel de pH arterial.

La divulgación también proporciona un método implementado por ordenador para tratar una afección médica aguda en un sujeto. El método comprende controlar el funcionamiento de por lo menos un electrodo del sistema de la invención para aplicar una señal a un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), para estimular la actividad neuronal, de tal manera que la actividad neuronal del nervio se estimula reversiblemente.

La divulgación también proporciona un ordenador que comprende un procesador y un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio que contiene un programa de ordenador ejecutable que comprende partes de código que, cuando se cargan y se ejecutan en el procesador, hacen que el procesador: aplique una señal eléctrica para estimular la actividad neuronal de un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), de tal manera que la señal eléctrica produce una mejora en un parámetro fisiológico indicativo del tratamiento de una afección médica aguda.

La divulgación también proporciona una señal eléctrica neuroestimuladora para su uso en un método de tratamiento de una afección médica aguda, en donde la señal eléctrica es cualquier señal eléctrica descrita en la

presente.

La divulgación también proporciona una forma de onda eléctrica para su uso en un método de tratamiento de una afección médica aguda, en donde la forma de onda eléctrica provoca la despolarización reversible de la membrana nerviosa de un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), de tal manera que se genera un potencial de acción *de novo* en el nervio.

La divulgación también proporciona una partícula cargada para su uso en un método de tratamiento de una afección médica aguda, en donde la partícula cargada provoca la despolarización reversible de la membrana nerviosa de un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), de tal manera que se genera un potencial de acción *de novo* en el nervio modificado.

La divulgación también proporciona un nervio modificado con el que la interfaz neuronal del sistema de la invención está en contacto de señalización, en donde el nervio irriga al bazo y está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), en donde el por lo menos un electrodo está en contacto de señalización con el nervio y por lo tanto el nervio puede distinguirse del nervio en su estado natural, y en donde el nervio se encuentra en un sujeto que tiene una afección médica aguda.

La divulgación también proporciona un nervio modificado que puede obtenerse mediante la estimulación de la actividad neuronal de un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular, preferiblemente un nervio arterial esplénico, de acuerdo con un método de la invención.

La divulgación también proporciona un método para controlar un sistema de la invención que está en contacto de señalización con un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), que comprende un paso de enviar instrucciones de control al sistema, en respuesta a las cuales el sistema aplica una señal al nervio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Nervios que irrigan el bazo

La inervación del bazo es principalmente simpática o noradrenérgica, y es probable que las neuronas peptídicas representen la mayor parte de las neuronas restantes. El bazo humano está inervado principalmente por el plexo esplénico que rodea la arteria esplénica. La arteria esplénica está cubierta de tejido nervioso, que deriva del plexo celíaco y continúa con la arteria esplénica hasta el bazo como plexo esplénico. El plexo esplénico se introduce en el bazo en el hilio, donde la arteria esplénica diverge en ramas terminales y el plexo esplénico continúa con estas ramas en el parénquima del bazo.

El plexo esplénico incluye varios fascículos nerviosos que circunvalan la arteria esplénica principal desde la arteria celíaca hasta el bazo, y cada fascículo nervioso comprende un pequeño haz de fibras nerviosas. Un fascículo nervioso (o conocido como fascículo nervioso periarterial) que circunvala el nervio esplénico se denomina en la presente nervio arterial esplénico.

La invención implica aplicar una señal eléctrica a un nervio que irriga el bazo, modulando de este modo su actividad neuronal, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular. Preferiblemente, el nervio es un nervio arterial esplénico.

En algunas realizaciones, el nervio es un nervio simpático.

En algunas realizaciones, la invención puede implicar la aplicación de una señal a un nervio arterial esplénico. En otras realizaciones, la invención puede implicar una pluralidad (es decir, un haz) de nervios arteriales esplénicos.

En otras realizaciones, la invención puede implicar aplicar una señal eléctrica por lo menos a un nervio arterial esplénico y a la arteria esplénica. En otras realizaciones, la invención puede incluir aplicar una señal eléctrica a todos los nervios arteriales esplénicos y a la arteria esplénica.

Estimulación de un nervio que irriga el bazo

La invención implica aplicar una señal eléctrica a un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico) para estimular la actividad neuronal en el nervio. La estimulación se refiere a donde se está aumentando la actividad de señalización en por lo menos una parte del nervio en comparación con la actividad neuronal de referencia en esa parte del nervio, donde la actividad neuronal de referencia es la actividad de señalización del nervio en el sujeto antes de cualquier intervención. Dicho de otro modo, la estimulación da como resultado la creación de actividad neuronal que aumenta la actividad neuronal total en esa parte del nervio.

La "actividad neuronal" de un nervio se refiere a la actividad de señalización del nervio, por ejemplo la amplitud, frecuencia y/o patrón de los potenciales de acción en el nervio. El término "patrón", como se usa en la presente en el contexto de los potenciales de acción en el nervio, se pretende que incluya uno o más de: potencial o potenciales de campo local, potencial o potenciales de acción compuestos, potencial o potenciales de acción agregados, y también magnitudes, frecuencias, áreas bajo la curva y otros patrones de potenciales de acción en el nervio o subgrupos (por ejemplo, fascículos) de neuronas en el mismo.

La estimulación típicamente implica un aumento de la actividad neuronal, por ejemplo, la generación de potenciales de acción más allá del punto de estimulación en por lo menos una parte del nervio. En cualquier punto a lo largo del axón, un nervio en funcionamiento tendrá una distribución de iones de potasio y sodio a través de la membrana nerviosa. La distribución en un punto a lo largo del axón determina el potencial eléctrico de membrana del axón en ese punto, que a su vez influye en la distribución de iones de potasio y sodio en un punto adyacente, que a su vez determina el potencial eléctrico de membrana del axón en ese punto, y así sucesivamente. Se trata de un nervio que funciona en su estado normal, en el que los potenciales de acción se propagan de un punto a un punto adyacente a lo largo del axón, y que puede observarse mediante experimentación convencional.

Una manera de caracterizar una estimulación de la actividad neuronal es una distribución de iones de potasio y sodio en uno o más puntos del axón, que se crea no en virtud del potencial eléctrico de membrana en un punto o puntos adyacentes del nervio como resultado de un potencial de acción en propagación, sino en virtud de la aplicación de un campo eléctrico externo temporal. El campo eléctrico externo temporal modifica artificialmente la distribución de los iones de potasio y sodio dentro de un punto en el nervio, provocando una despolarización de la membrana nerviosa que de otro modo no se produciría. La despolarización de la membrana nerviosa provocada por el campo eléctrico externo temporal genera un potencial de acción de novo a través de ese punto. Se trata de un nervio que funciona en un estado alterado, lo que puede observarse por una distribución de iones de potasio y sodio en un punto del axón (el punto que ha sido estimulado) que tiene un potencial eléctrico de membrana que no está influido ni determinado por el potencial eléctrico de membrana de un punto adyacente.

Por tanto se entiende que la estimulación de la actividad neuronal es la actividad neuronal creciente que continua más allá del punto de aplicación de la señal. Por tanto, el nervio en el punto de aplicación de la señal se modifica en el sentido de que la membrana nerviosa se despolariza reversiblemente mediante un campo eléctrico, de manera que se genera un potencial de acción de novo que se propaga a través del nervio modificado. Por lo tanto, el nervio en el punto de aplicación de la señal se modifica en el sentido de que se genera un potencial de acción de novo.

Cuando la señal es una señal eléctrica, la estimulación se basa en la influencia de corrientes eléctricas (por ejemplo, partículas cargadas, que pueden ser uno o más electrones en un electrodo en contacto de señalización con el nervio, o uno o más iones fuera del nervio o dentro del nervio, por ejemplo) sobre la distribución de iones a través de la membrana nerviosa.

La estimulación de la actividad neuronal abarca la estimulación completa de la actividad neuronal en el nervio, es decir, las realizaciones en las que la actividad neuronal total aumenta en todo el nervio.

La estimulación de la actividad neuronal puede ser parcial. La estimulación parcial puede ser tal que aumente parcialmente la actividad de señalización total de todo el nervio, o que aumente totalmente la actividad de señalización total de un subconjunto de fibras nerviosas del nervio (es decir, que no haya actividad neuronal en ese subconjunto de fibras del nervio), o que la señalización total de un subconjunto de fibras nerviosas del nervio aumente parcialmente en comparación con la actividad neuronal de referencia en ese subconjunto de fibras del nervio. Por ejemplo, un aumento de la actividad neuronal del $\leq 5\%$, $\leq 10\%$, $\leq 15\%$, $\leq 20\%$, $\leq 25\%$, $\leq 30\%$, $\leq 35\%$, $\leq 40\%$, $\leq 45\%$, $\leq 50\%$, $\leq 60\%$, $\leq 70\%$, $\leq 80\%$, $\leq 90\%$ o $\leq 95\%$, o un aumento de la actividad neuronal en un subconjunto de fibras nerviosas del nervio. La actividad neuronal puede medirse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por el número de potenciales de acción que se propagan a través del axón y/o la amplitud del potencial de campo local que refleja la actividad sumada de los potenciales de acción.

Una ventaja de la invención es que la estimulación de la actividad neuronal es reversible. Por lo tanto, la modulación de la actividad neuronal no es permanente. Por ejemplo, tras el cese de la aplicación de una señal, la actividad neuronal en el nervio vuelve sustancialmente a la actividad neuronal de referencia en el plazo de 1-60 segundos, o en el plazo de 1-60 minutos, o en el plazo de 1-24 horas (por ejemplo, en el plazo de 1-12 horas, 1-6 horas, 1-4 horas, 1-2 horas), o en el plazo de 1-7 días (por ejemplo, 1-4 días, 1-2 días). En algunos casos de estimulación reversible, la actividad neuronal vuelve sustancialmente a la actividad neuronal de referencia. Es decir, la actividad neuronal después del cese de la aplicación de una señal es sustancialmente la misma que la actividad neuronal antes de que se aplicó una señal. Por lo tanto, el nervio o la parte del nervio ha recuperado su capacidad fisiológica normal de propagar potenciales de acción.

En otras realizaciones, la estimulación de la actividad neuronal puede ser sustancialmente persistente. Como se usa en la presente, por "persistente" se entiende que la actividad neuronal tiene un efecto prolongado. Por ejemplo,

después de cesar la aplicación de una señal, la actividad neuronal en el nervio sigue siendo sustancialmente la misma que cuando se aplicaba la señal, es decir, la actividad neuronal durante y después de la aplicación de la señal es sustancialmente la misma. Se prefiere la modulación reversible.

5 **Aplicación en terapia**

La invención es útil en el tratamiento de afecciones médicas agudas, y en particular, la invención puede usarse como una opción de intervención como último recurso. La invención es particularmente útil para tratar enfermedades potencialmente mortales, como las que tienen cambios fisiológicos asociados al shock y la disfunción cardiovascular.

Ejemplos de estas afecciones son los traumatismos, las hemorragias y el shock.

Los traumatismos incluyen, por ejemplo, lesiones físicas provocadas por una fuente externa, como traumatismos contusos (incluyendo colisiones de vehículos de motor, caídas, lesiones en la cabeza, laceraciones), traumatismos penetrantes (como cortes, puñaladas, empalamientos), lesiones por explosión, quemaduras (provocadas por calor, frío, electricidad, productos químicos, fricción o radiación) y combinaciones de los mismos.

La hemorragia es una pérdida de sangre del sistema circulatorio. La hemorragia incluye, por ejemplo, hematemesis (vómitos de sangre fresca), hemoptisis (tos con sangre de los pulmones), hematuria, hemorragia cerebral, hemorragia pulmonar, hemorragia posparto y hemorragias gastrointestinales. La hemorragia puede ser el resultado, por ejemplo, de una lesión traumática o de una enfermedad subyacente. La hemorragia también incluye la hemorragia interoperatoria y la hemorragia postoperatoria.

El shock incluye, por ejemplo, el shock séptico, el shock anafiláctico, el síndrome de shock tóxico, el shock cardiogénico, el shock hipovolémico y el shock neurogénico. La invención es particularmente útil en el tratamiento del shock séptico.

La invención es de particular interés en relación con traumatismos, shock séptico, hemorragias, hemofilia grave, episodios graves de lupus, episodios de Crohn grave, rechazo de aloinjerto/injerto, anafilaxia y shock endotóxico.

El tratamiento de la afección puede evaluarse de varias maneras, pero típicamente implica determinar una mejora en uno o más parámetros fisiológicos del sujeto. Como se usa en la presente, se entiende que una "mejora de un parámetro fisiológico determinado" significa que, para cualquier parámetro fisiológico dado, una mejora es un cambio en el valor de ese parámetro en el sujeto hacia el valor normal o el intervalo normal para ese valor, es decir, hacia el valor esperado en un sujeto sano.

Como se usa en la presente, se entiende que "empeoramiento de un parámetro fisiológico determinado" significa que, para cualquier parámetro fisiológico dado, el empeoramiento es un cambio en el valor de ese parámetro en el sujeto que se aleja del valor normal o del intervalo normal para ese valor, es decir, que se aleja del valor esperado en un sujeto sano.

Por ejemplo, una enfermedad aguda puede ir acompañada de una bajada de presión arterial, mareos o aturdimiento, erupción cutánea, náuseas, dolor muscular, dificultad para respirar, oliguria, dolor muscular y piel fría, húmeda y pálida o moteada.

Los signos vitales del organismo son especialmente útiles para evaluar las afecciones médicas agudas, ya que son signos que indican el estado de las funciones vitales (de mantenimiento de la vida) del organismo. Un signo vital puede ser uno o más del grupo que consiste en la presión arterial sistémica, la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, la saturación de oxígeno y la sensación de dolor.

Otros parámetros fisiológicos útiles pueden ser la presión venosa sistémica, la presión arterial pulmonar (también denominada en la presente presión pulmonar), la producción de orina horaria, el nivel de consciencia, la presión parcial arterial de oxígeno y la presión parcial arterial de dióxido de carbono.

Cualquiera o una combinación de los parámetros fisiológicos pueden ser útiles con la invención.

En un sujeto que tiene una afección médica aguda, una mejora de un parámetro fisiológico indicativa del tratamiento de la afección médica aguda puede (dependiendo de los valores anormales que presente el sujeto) ser uno o más del grupo que consiste en: el restablecimiento de la temperatura corporal a entre 36°C y 38°C, el restablecimiento de la frecuencia cardíaca a 60-100 bpm, el restablecimiento de la presión arterial sistémica a entre 90/60 mmHg y 150/90mmHg, el restablecimiento de la presión venosa sistémica a aproximadamente 5 mmHg en la aurícula derecha y aproximadamente 8 mmHg en la aurícula izquierda, restablecimiento de la presión venosa central en el intervalo de aproximadamente 3 - 8 mmHg, restablecimiento de la presión pulmonar a aproximadamente 15

mmHg, restablecimiento de la frecuencia respiratoria a 8 - 14 respiraciones por minuto, un aumento de la saturación de oxígeno a $\geq 94\%$, un aumento de la presión parcial arterial de oxígeno de 12 - 15 kPa, restablecimiento de la presión parcial arterial de dióxido de carbono a 4,4-6,1 kPa, una reducción de la sensación de dolor, el restablecimiento de la producción de orina a $\geq 0,5$ ml/kg/hora, el aumento del nivel de consciencia, una reducción del nivel de lactato, un cambio en el nivel de glucosa en sangre, un cambio en el nivel de déficit de bases en sangre y un cambio en el nivel de pH arterial. Es posible que la invención no provoque un cambio en todos estos parámetros fisiológicos.

La invención tiene por objeto restablecer la presión arterial (por ejemplo, la presión arterial sistémica, la presión venosa sistémica, la presión venosa central y la presión pulmonar) al intervalo normal. Como sabrán los expertos en la técnica, cuando se habla de presión sanguínea en la técnica, generalmente se hace referencia a la presión arterial en la circulación sistémica (es decir, la presión arterial sistémica), a menos que se especifique lo contrario. La presión arterial sistémica normal se considera entre 90/60mmHg y 120/80mmHg. Los valores de presión arterial sistémica por debajo de este intervalo pueden indicar que el individuo sufre un shock. La invención tiene por objeto restablecer la presión arterial sistémica al intervalo normal. Por lo tanto, cuando un sujeto sufre un shock, la invención pretende aumentar la presión arterial sistémica.

También puede ser útil con la invención determinar la presión venosa sistémica, la presión venosa central y la presión pulmonar. La determinación de estas presiones requiere habitualmente herramientas invasivas, como un catéter. Sin embargo, la presión pulmonar puede determinarse usando mediciones por ultrasonidos, por ejemplo, del diámetro de la vena cava inferior y la presión aparente de llenado cardíaco. El intervalo normal de la presión venosa sistémica en un adulto sano habitualmente es de 5 mmHg en la aurícula derecha y 8 mmHg en la aurícula izquierda. Se considera que el intervalo normal de la presión venosa central en un adulto sano se encuentra en el intervalo de aproximadamente 3 - 8 mmHg. El intervalo normal de la presión pulmonar en un adulto sano es habitualmente de aproximadamente 15 mmHg en reposo.

La invención también tiene por objeto restablecer la temperatura corporal a intervalo normal, es decir, entre 36° C y 38° C.

Normalmente se considera que la frecuencia cardíaca es de 60-100 bpm, pero en afecciones médicas agudas, la frecuencia cardíaca típicamente aumenta. El objetivo de la invención es restablecer la frecuencia cardíaca al intervalo normal, es decir, reducir la frecuencia cardíaca.

La frecuencia respiratoria normal es de 8-14 respiraciones por minuto, y la invención tiene por objeto restablecer la frecuencia respiratoria al intervalo normal.

Los individuos sanos a nivel del mar habitualmente presentan valores de saturación de oxígeno (SO₂) entre el 96% y el 99%, y habitualmente están por encima del 94%. Si el nivel es inferior al 90%, se considera bajo, lo que provoca hipoxemia. Los niveles de oxígeno en sangre por debajo del 80% pueden comprometer la función de órganos como el cerebro y el corazón. Unos niveles de oxígeno bajos y continuados pueden provocar una parada respiratoria o cardíaca. La saturación de oxígeno se mide comúnmente usando pulsioximetría.

El intervalo normal de presión parcial arterial de oxígeno en un individuo sano suele ser de 12-15 kPa. El intervalo normal de presión parcial arterial de dióxido de carbono suele ser de 4,4-6,1 kPa. La invención tiene por objeto restaurar la presión parcial arterial de oxígeno y la presión parcial arterial de dióxido de carbono al intervalo normal.

La producción de orina normal de un adulto es de 0,5-1ml/kg/hora. Esto equivale aproximadamente a 30-60 ml por hora en un adulto de tamaño medio. La invención tiene por objeto restablecer la producción de orina al intervalo normal.

Otros parámetros fisiológicos útiles para la invención pueden incluir el nivel de lactato, la glucosa en sangre, el déficit de bases en sangre y el pH arterial. Estos parámetros pueden determinarse mediante análisis bioquímicos.

Los expertos en la técnica apreciarán los métodos adecuados para determinar el valor de cualquier parámetro.

Los expertos en la técnica apreciarán que no es necesario que el valor de referencia para cualquier parámetro fisiológico en un sujeto sea un valor fijo o específico, sino que puede fluctuar dentro de un intervalo normal o puede ser un valor medio con error e intervalos de confianza asociados. Por ejemplo, los intervalos normales de las constantes vitales de una persona varían con la edad, el peso, el sexo y el estado general de salud. Los métodos adecuados para determinar los valores de referencia son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente, un parámetro fisiológico se determina en un sujeto cuando se determina el valor de dicho parámetro mostrado por el sujeto en el momento de la detección. Un detector (por ejemplo, un subsistema sensor fisiológico, un módulo de procesamiento de datos fisiológicos, un sensor fisiológico, etc.) es cualquier elemento capaz de realizar dicha determinación. La detección de cualquiera de los parámetros fisiológicos puede realizarse

antes, durante y/o después de la modulación de la actividad neuronal en el nervio simpático de acuerdo con la invención. La detección puede realizarse manualmente por un humano (por ejemplo, un practicante clínico o cuidador), con o sin el uso de un dispositivo, como un instrumento, que no forma parte del sistema de la invención, o un detector que forma parte del sistema de la invención. Cuando se usa un dispositivo o un detector, la detección puede realizarse de manera autónoma.

Por tanto, en ciertas realizaciones, la invención comprende además un paso de determinar uno o más parámetros fisiológicos del sujeto, en donde la señal se aplica únicamente cuando el parámetro fisiológico determinado alcanza o supera un valor umbral predefinido. En tales realizaciones en las que se determina más de un parámetro fisiológico del sujeto, la señal puede aplicarse cuando cualquiera de los parámetros fisiológicos determinados alcanza o supera su valor umbral, alternativamente sólo cuando todos los parámetros fisiológicos determinados alcanzan o superan sus valores umbral. En ciertas realizaciones en las que la señal es aplicada por un sistema de la invención, el sistema comprende además por lo menos un detector configurado para determinar el uno o más parámetros fisiológicos del sujeto.

En ciertas realizaciones de la invención, el uno o más parámetros fisiológicos detectados son uno o más del grupo que consiste en la presión arterial (por ejemplo, presión arterial sistémica, presión venosa sistémica y presión pulmonar), la temperatura corporal, la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, la saturación de oxígeno, la sensación de dolor, la producción de orina por hora, el nivel de conciencia, o el nivel de lactato, la glucosa en sangre, el déficit de bases en sangre y/o pH arterial. Se apreciará que dos parámetros fisiológicos cualesquiera pueden determinarse en realizaciones paralelas, el controlador se acopla detecta el patrón de tolerancia de potenciales de acción en el sujeto.

Por ejemplo, al abordar la gravedad del shock y la respuesta a una intervención médica para el shock, un factor importante es la perfusión tisular, que puede aumentar durante los episodios de shock. La perfusión tisular puede asociarse a una disminución de la presión sanguínea y a una serie de otros cambios en los parámetros fisiológicos, incluyendo el nivel de lactato y, en menor medida, el déficit de bases y el pH arterial, que algunas realizaciones de la invención intentan restablecer a niveles normales, como se ha descrito anteriormente.

Un valor umbral predefinido para un parámetro fisiológico es el valor mínimo (o máximo) para ese parámetro que debe presentar un sujeto o sujetos antes de que se aplique la intervención especificada. Para cualquier parámetro dado, el valor umbral puede definirse como un valor indicativo de un estado patológico o de un estado de enfermedad. El valor umbral puede definirse como un valor indicativo del inicio de un estado patológico o de un estado de enfermedad. Por tanto, dependiendo del valor umbral predefinido, la invención puede usarse como tratamiento. Alternativamente, el valor umbral puede definirse como un valor indicativo de un estado fisiológico del sujeto (que el sujeto está, por ejemplo, dormido, postprandial o haciendo ejercicio). Los valores apropiados para cualquier parámetro fisiológico dado serían simplemente determinados por los expertos en la técnica (por ejemplo, con referencia a los estándares médicos de la práctica).

Dicho valor umbral para un parámetro fisiológico dado se supera si el valor mostrado por el sujeto está más allá del valor umbral, es decir, el valor mostrado se aleja más del valor normal o saludable para ese parámetro fisiológico que el valor umbral predefinido.

Un sujeto de la invención puede, además de recibir neuromodulación de un nervio esplénico de acuerdo con la invención, recibir tratamientos y/o medicamentos para la afección. Por ejemplo, el sujeto puede recibir fluidos administrados en una vena, antibióticos (por ejemplo penicilina, cefalosporina, tetraciclina, macrólido o fluoroquinolonas) administrados en una vena, un medicamento que aumente la presión sanguínea y/o el flujo sanguíneo a los tejidos y órganos, cirugía para extirpar la fuente de la infección (como un absceso) y cualquier tejido que haya sido gravemente dañado por la infección, oxígeno administrado a través de una máscara facial, una cánula en la nariz o un tubo introducido por la garganta hasta la tráquea conectado a un respirador (ventilador) si existe una dificultad grave para respirar.

El sujeto puede recibir un medicamento antiinflamatorio (que habitualmente continuará el medicamento que estaba tomando antes de la inserción del sistema de la invención). Estos medicamentos incluyen antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), esteroides, 5ASA, fármacos antiinflamatorios modificadores de la enfermedad (DMARD) como azatioprina, metotrexato y ciclosporina, fármacos biológicos como infliximab y adalimumab, y los nuevos DMARD orales como los inhibidores de Jak.

Por tanto, la invención proporciona el uso de estos tratamientos y/o medicamentos en combinación con un sistema de la invención.

Formas adecuadas de una señal eléctrica

La invención usa una señal eléctrica aplicada a través de por lo menos un electrodo que se coloca en contacto de señalización con un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por

ejemplo, un nervio arterial esplénico). Como se usa en la presente, "contacto de señalización" es cuando se recibe en el nervio por lo menos parte de la señal eléctrica aplicada a través del por lo menos un electrodo.

5 La señal eléctrica proporciona preferiblemente un único tratamiento, por ejemplo en entornos clínicos agudos. Esto no quiere decir que la señal eléctrica sólo se aplique una vez. Durante el tratamiento único, la señal eléctrica puede aplicarse al nervio de manera continua o periódica. Preferiblemente, la señal eléctrica se aplica al nervio hasta que se produce una mejora en un parámetro fisiológico del sujeto.

10 Las señales eléctricas aplicadas de acuerdo con la invención son idealmente no destructivas. Como se usa en la presente, una "señal no destructiva" es una señal que, cuando se aplica, no daña irreversiblemente la capacidad de conducción de señales neuronal subyacente del nervio. Es decir, la aplicación de una señal no destructiva mantiene la capacidad del nervio o de las fibras del mismo, o de otro tejido nervioso al que se aplica la señal, de conducir potenciales de acción cuando cesa la aplicación de la señal, incluso si dicha conducción se estimula artificialmente en la práctica como resultado de la aplicación de la señal no destructiva.

15 Las señales eléctricas aplicadas de acuerdo con la invención pueden ser un voltaje o una forma de onda de corriente.

20 La señal eléctrica puede caracterizarse por uno o más parámetros de señal eléctrica. Los parámetros de la señal eléctrica incluyen la forma de onda, la frecuencia y la amplitud.

25 Alternativa o adicionalmente, la señal eléctrica puede caracterizarse por el patrón de aplicación de la señal eléctrica al nervio. El patrón de aplicación se refiere al momento de la aplicación de la señal eléctrica al nervio. El patrón de aplicación puede ser continuo o periódico. El patrón de aplicación puede incluir una duración establecida para la aplicación de la señal.

30 Aplicación continua se refiere a cuando la señal eléctrica se aplica al nervio de manera continua. En las realizaciones en las que la señal eléctrica es una serie de pulsos, los espacios entre esos pulsos (es decir, entre la anchura del pulso y la duración de la fase) no significan que la señal no se aplique de manera continua. La aplicación periódica se refiere a cuando la señal eléctrica se aplica al nervio siguiendo un patrón repetitivo (por ejemplo, un patrón de encendido y apagado).

Forma de onda

35 La modulación (por ejemplo, la estimulación) de un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado a un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), puede lograrse usando señales eléctricas que sirven para reproducir la actividad neuronal normal del nervio. La forma de onda de la señal eléctrica comprende uno o más trenes de pulsos. La forma de onda de la señal eléctrica puede comprender trenes de pulsos con pulsos cuadrados, en diente de sierra, sinusoidales, triangulares, trapezoidales, cuasitrapezoidales o complejos. En otras realizaciones, la forma de onda puede ser una forma de onda cuadrada, sinusoidal, triangular, trapezoidal, cuasitrapezoidal o compleja.

La forma de onda puede ser una forma de onda de amplitud constante.

45 La señal puede ser bifásica. El término "bifásica" se refiere a una señal que aplica al nervio a lo largo del tiempo tanto una carga positiva como negativa.

50 La señal puede ser simétrica o asimétrica. Una señal simétrica es una señal en la que la forma de onda cuando se aplica una carga positiva al nervio es simétrica a la forma de onda cuando se aplica una carga negativa al nervio. Una señal asimétrica es una señal en la que la forma de onda cuando se aplica una carga positiva al nervio no es simétrica a la forma de onda cuando se aplica una carga negativa al nervio.

55 La señal puede ser de carga equilibrada. Una señal de carga equilibrada se refiere a una señal que, durante un período de la señal, aplica cantidades iguales (o aproximadas) de carga positiva y negativa al nervio.

Amplitud

60 A efectos de la invención, la amplitud se denomina en la presente en términos de densidad de carga por fase. La carga por fase aplicada al nervio por la señal eléctrica se define como la integral de la corriente sobre una fase (por ejemplo, sobre una fase del pulso bifásico en el caso de un pulso bifásico de carga equilibrada). Por tanto, la densidad de carga por fase aplicada al nervio por la señal eléctrica es la carga por fase por unidad de área de contacto entre por lo menos un electrodo y el nervio, y también la integral de la densidad de corriente sobre una fase de la forma de onda de la señal. Dicho de otro modo, la densidad de carga por fase aplicada al nervio por la señal eléctrica es la carga por fase aplicada al nervio por la señal eléctrica dividida por el área de contacto entre por lo menos un electrodo (generalmente el cátodo) y el nervio.

La densidad de carga por fase requerida por la invención representa la cantidad de energía requerida para estimular la actividad neuronal en un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado a un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico) para mejorar un parámetro fisiológico.

Los inventores descubrieron que la densidad de carga por fase necesaria para estimular la actividad neuronal en un nervio arterial esplénico porcino se encuentra entre 5 μC y 150 μC por cm^2 por fase o, en algunos casos, entre 5 μC y 180 μC por cm^2 por fase usando un manguito extravascular (los valores pueden verse ligeramente afectados por el diseño de los electrodos). Por ejemplo, la densidad de carga por fase aplicada por la señal eléctrica puede ser ≤ 10 μC por cm^2 por fase, ≤ 15 μC por cm^2 por fase, ≤ 20 μC por cm^2 por fase, ≤ 25 μC por cm^2 por fase, ≤ 30 μC por cm^2 por fase, ≤ 40 μC por cm^2 por fase, ≤ 50 μC por cm^2 por fase, ≤ 75 μC por cm^2 por fase, ≤ 100 μC por cm^2 por fase, ≤ 125 μC por cm^2 por fase, ≤ 150 μC por cm^2 por fase, o ≤ 180 μC por cm^2 por fase. Adicional o alternativamente, la densidad de carga por fase aplicada por la señal eléctrica puede ser ≥ 5 μC por cm^2 por fase, ≥ 10 μC por cm^2 por fase, ≥ 15 μC por cm^2 por fase, ≥ 20 μC por cm^2 por fase, ≥ 25 μC por cm^2 por fase, ≥ 30 μC por cm^2 por fase, ≥ 40 μC por cm^2 por fase, ≥ 50 μC por cm^2 por fase, ≥ 75 μC por cm^2 por fase, ≥ 100 μC por cm^2 por fase, ≥ 125 μC por cm^2 por fase, o ≥ 150 μC por cm^2 por fase. También es posible cualquier combinación de los límites superiores e inferiores anteriores.

Los inventores descubrieron además que la estimación indicada de densidad de carga por fase requerida para estimular la actividad neuronal en un nervio arterial esplénico humano se encuentra entre aproximadamente 70-1300 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$. Por ejemplo, la densidad de carga por fase aplicada por la señal eléctrica puede ser ≤ 80 μC por cm^2 por fase, ≤ 140 μC por cm^2 por fase, ≤ 170 μC por cm^2 por fase, ≤ 230 μC por cm^2 por fase, ≤ 250 μC por cm^2 por fase, ≤ 300 μC por cm^2 por fase, ≤ 350 μC por cm^2 por fase, ≤ 400 μC por cm^2 por fase, ≤ 450 μC por cm^2 por fase, ≤ 500 μC por cm^2 por fase, ≤ 1100 μC por cm^2 por fase, o ≤ 1300 μC por cm^2 por fase. Adicional o alternativamente, la densidad de carga por fase aplicada por la señal eléctrica puede ser ≥ 70 μC por cm^2 por fase, ≥ 140 μC por cm^2 por fase, ≥ 170 μC por cm^2 por fase, ≥ 230 μC por cm^2 por fase, ≥ 250 μC por cm^2 por fase, ≥ 300 μC por cm^2 por fase, ≥ 350 μC por cm^2 por fase, ≥ 400 μC por cm^2 por fase, ≥ 450 μC por cm^2 por fase, ≥ 500 μC por cm^2 por fase, ≥ 1100 μC por cm^2 por fase, o ≥ 1300 μC por cm^2 por fase. También es posible cualquier combinación de los límites superiores e inferiores anteriores.

La carga total aplicada al nervio por la señal eléctrica en cualquier periodo de tiempo dado es el resultado de la densidad de carga por fase de la señal, además de la frecuencia de la señal, el patrón de aplicación de la señal y el área en contacto entre por lo menos un electrodo y el nervio. La frecuencia de la señal, el patrón de aplicación de la señal y el área de contacto entre por lo menos un electrodo y el nervio se analizan más adelante.

Los expertos apreciarán que la amplitud de la señal eléctrica aplicada requerida para lograr la estimulación pretendida de la actividad neuronal dependerá de la posición del electrodo y de las características electrofisiológicas asociadas (por ejemplo, la impedancia). Está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica el determinar la amplitud de corriente adecuada para lograr la modulación pretendida de la actividad neuronal en un sujeto dado.

Por supuesto, en la técnica se entiende que la señal eléctrica aplicada al nervio debe estar dentro de los márgenes de seguridad clínica (por ejemplo, adecuada para mantener la función de señalización del nervio, adecuada para mantener la integridad del nervio y adecuada para mantener la seguridad del sujeto). Los parámetros eléctricos dentro del margen de seguridad clínica se determinarían típicamente mediante estudios preclínicos.

Aplicación periódica

La aplicación periódica se refiere a la aplicación de la señal eléctrica al nervio siguiendo un patrón repetitivo. El patrón repetitivo preferido es un patrón de encendido-apagado, en el que la señal se aplica durante una primera duración, denominada en la presente duración de "encendido", luego se detiene durante una segunda duración, denominada en la presente duración de "apagado", luego se aplica de nuevo durante la primera duración, luego se detiene de nuevo durante la segunda duración, etc.

El patrón periódico de encendido y apagado puede tener una duración de encendido de entre 0,1 y 10 s y una duración de apagado de entre 0,5 y 30 s. Por ejemplo, la duración de encendido (referida como el tiempo durante el cual se suministran al nervio pulsos a una cierta frecuencia y amplitud) puede ser de $\leq 0,2$ s, $\leq 0,5$ s, ≤ 1 s, ≤ 2 s, ≤ 5 s, o ≤ 10 s. Alternativa o adicionalmente, la duración de encendido puede ser de $\geq 0,1$ s, $\geq 0,2$ s, $\geq 0,5$ s, 1 s, ≥ 2 s, o ≥ 5 s. También es posible cualquier combinación de los límites superiores e inferiores anteriores para la duración de encendido. Por ejemplo, la duración de apagado (referida al tiempo entre periodos de encendido, durante el cual no se suministran pulsos al nervio) puede ser de ≤ 1 s, ≤ 3 s, ≤ 5 s, ≤ 10 s, ≤ 15 s, ≤ 20 s, ≤ 25 s, o ≤ 30 s. Alternativa o adicionalmente, la duración de apagado puede ser de $\geq 0,5$ s, ≥ 1 s, ≥ 2 s, ≥ 5 s, ≥ 10 s, ≥ 15 s, ≥ 20 s, o ≤ 25 s. También es posible cualquier combinación de los límites superiores e inferiores anteriores para la duración de apagado.

La aplicación periódica también puede denominarse aplicación con ciclo de trabajo. Un ciclo de trabajo representa el porcentaje de tiempo que se aplica la señal al nervio durante un ciclo del patrón periódico. Por ejemplo,

un ciclo de trabajo del 20% puede representar un patrón periódico que tiene una duración de encendido de 2 s, y una duración de apagado de 10 s. Alternativamente, un ciclo de trabajo del 20% puede representar un patrón periódico que tiene una duración de encendido de 1 s, y una duración de apagado de 5 s. En otras palabras, la aplicación periódica también puede denominarse estimulación de patrón encendido-apagado, o estimulación de ráfaga.

5 Los ciclos de trabajo adecuados para la presente invención están comprendidos entre el 0,1% y el 100%.

Duración

10 La señal se aplica durante una duración particular, durante la cual la señal puede aplicarse de forma periódica o continua. Un practicante clínico puede determinar la duración o ésta puede estar preestablecida.

15 Un practicante clínico puede hacer que la señal deje de aplicarse durante la duración en respuesta a un parámetro fisiológico del sujeto. Preferiblemente, la señal eléctrica se aplica al nervio hasta que se produce una mejora en un parámetro fisiológico del sujeto.

En algunos ejemplos, la duración puede ser de ≤ 1 min, ≤ 5 min, ≤ 10 min, ≤ 30 min, o ≤ 1 hora. Adicional o alternativamente, la duración puede ser ≥ 1 min, ≥ 5 min, ≥ 10 min, o ≥ 30 min.

Frecuencia

20 La frecuencia se define como el recíproco de la duración de fase de la forma de onda eléctrica (es decir, $1/\text{fase}$).

25 Los inventores han descubierto frecuencias preferidas para estimular un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico). En particular, los inventores han descubierto frecuencias preferidas para las realizaciones en las que la señal eléctrica se aplica periódicamente y para las realizaciones en las que la señal eléctrica se aplica continuamente.

30 Como se ha señalado anteriormente, las realizaciones en las que la señal eléctrica se aplica periódicamente y las realizaciones en las que la señal eléctrica se aplica de manera continua proporcionan diferentes funciones usando diferentes parámetros de estimulación. Una estimulación continua puede usarse para inducir cambios en el flujo sanguíneo dentro de la vasculatura esplénica que pueden detectarse y usarse en la mesa de operaciones o perquirúrgicamente como indicador de la colocación con éxito de los electrodos y/o la determinación de la amplitud; y puede usarse una estimulación periódica como paradigma de tratamiento preferido, mediante el cual dicho cambio de flujo sanguíneo y/u otros posibles efectos cardiovasculares sistémicos se minimizan o evitan a la vez que se mantiene la eficacia como tratamiento.

40 En las realizaciones en las que la señal eléctrica se aplica periódicamente, la señal eléctrica tiene una frecuencia de ≤ 300 Hz, preferiblemente ≤ 50 Hz, más preferiblemente ≤ 10 Hz. Por ejemplo, la frecuencia de la señal eléctrica puede ser de ≤ 50 Hz, ≤ 100 Hz, ≤ 150 Hz, ≤ 200 Hz, ≤ 250 Hz o ≤ 300 Hz. En otros ejemplos, la frecuencia de la señal eléctrica puede ser de ≤ 10 Hz, ≤ 15 Hz, ≤ 20 Hz, ≤ 25 Hz, ≤ 30 Hz, ≤ 35 Hz, ≤ 40 Hz, ≤ 45 Hz o ≤ 50 Hz. En otros ejemplos, la frecuencia puede ser de ≤ 1 Hz, ≤ 2 Hz, ≤ 5 Hz, o ≤ 10 Hz. Adicional o alternativamente, la frecuencia de la señal eléctrica puede ser de ≥ 10 Hz, ≥ 15 Hz, ≥ 20 Hz, ≥ 25 Hz, ≥ 30 Hz, ≥ 35 Hz, ≥ 40 Hz, ≥ 45 Hz, o ≥ 50 Hz. En otros ejemplos, la frecuencia de la señal eléctrica puede ser de $\geq 0,1$ Hz, $\geq 0,2$ Hz, $\geq 0,5$ Hz, ≥ 1 Hz, ≥ 2 Hz, o ≥ 5 Hz. También es posible cualquier combinación de los límites superiores e inferiores anteriores.

50 En las realizaciones en las que la señal eléctrica se aplica de manera continua, la señal eléctrica tiene una frecuencia de ≤ 50 Hz, preferiblemente ≤ 10 Hz, más preferiblemente ≤ 2 Hz, incluso más preferiblemente ≤ 1 Hz. Por ejemplo, la frecuencia puede ser de ≤ 1 Hz, ≤ 2 Hz, ≤ 5 Hz, o ≤ 10 Hz. En otros ejemplos, la frecuencia puede ser de $\leq 0,1$ Hz, $\leq 0,2$ Hz, $\leq 0,3$ Hz, $\leq 0,4$ Hz, $\leq 0,5$ Hz, $\leq 0,6$ Hz, $\leq 0,7$ Hz, $\leq 0,8$ Hz, o $\leq 0,9$ Hz. Adicional o alternativamente, la frecuencia de la señal eléctrica puede ser de $\geq 0,1$ Hz, $\geq 0,2$ Hz, $\geq 0,5$ Hz, ≥ 1 Hz, ≥ 2 Hz, o ≥ 5 Hz. También es posible cualquier combinación de los límites superiores e inferiores anteriores.

55 Cuando la forma de onda de la señal comprende un tren de pulsos, éstos se aplican al nervio a intervalos de acuerdo con las frecuencias mencionadas anteriormente. Por ejemplo, una frecuencia de 50 Hz da como resultado que se apliquen al nervio 50 pulsos por segundo.

Diseño de electrodos e interfaces neuronales

60 La señal eléctrica se aplica a un nervio que irriga el bazo, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular (por ejemplo, un nervio arterial esplénico), a través de por lo menos un electrodo en contacto de señalización con el nervio. El por lo menos un electrodo puede colocarse en una interfaz neuronal.

65 En algunas realizaciones, el electrodo y/o la interfaz neuronal están configurados para su colocación

alrededor de por lo menos un nervio arterial esplénico y/o alrededor de la arteria esplénica. En tales realizaciones, la interfaz neuronal puede ser una interfaz de tipo manguito, pero pueden usarse otras interfaces que circunvalen parcial o totalmente el nervio.

5 En otras realizaciones, la interfaz neuronal 10 está configurada para su colocación en el por lo menos un nervio arterial esplénico y/o en la arteria esplénica. En tales realizaciones, la interfaz neuronal 10 puede ser una interfaz de tipo parche o clip.

10 En otras realizaciones, la interfaz neuronal 10 está configurada para su colocación en la arteria esplénica. En tales realizaciones, la interfaz neuronal puede ser un catéter o una interfaz de tipo sonda.

En otras realizaciones, la interfaz neuronal 10 está configurada para su colocación en por lo menos un nervio arterial esplénico. En tales realizaciones, la interfaz neuronal puede ser una interfaz de tipo alfiler.

15 La interfaz neuronal comprende por lo menos un electrodo. Los electrodos pueden estar fabricados o recubiertos parcial o totalmente con un material de alta capacidad de carga, como negro de platino, óxido de iridio, nitruro de titanio, tántalo, poli(etilendioxitiofeno) y combinaciones adecuadas de los mismos.

20 El por lo menos un electrodo puede ser un electrodo de interfaz plano que es flexible, para circunvalar el nervio, y/o la arteria esplénica cuando la interfaz neuronal 10 está asegurada sobre el nervio. Sin embargo, también son adecuados para su uso en la invención otros tipos de electrodos.

25 Otros tipos de electrodos adecuados para la presente invención son los electrodos de manguito (por ejemplo, manguito en espiral, manguito helicoidal o interfaz plana); electrodos de hemimanguito; una malla, una guía lineal con forma de varilla, una guía tipo paleta o electrodos de contacto de disco (incluyendo los electrodos de contacto multidisco); electrodos de gancho; electrodos de cabestrillo; electrodos intrafasciculares; electrodos de succión de vidrio; electrodo de paleta; y electrodos cilíndricos percutáneos.

30 El por lo menos un electrodo puede comprender un primer electrodo 11 y un segundo electrodo 12, denominado en la presente configuración de electrodo bipolar. La FIG. 1 muestra un diagrama esquemático de una configuración de electrodo bipolar ejemplar en donde los electrodos se colocan en contacto de señalización con por lo menos un nervio arterial esplénico y/o arteria esplénica. Como se explica en otra parte de la presente, puede conseguirse un contacto de señalización adecuado colocando los electrodos alrededor (es decir, rodeando parcial o completamente) el nervio y/o la arteria, sobre el nervio y/o la arteria, o en el nervio esplénico, o en la arteria.

35 Como se muestra en la Figura 1, el primer electrodo 11 y el segundo electrodo 12 están situados a lo largo del eje longitudinal del nervio. Puede aplicarse una señal eléctrica a los electrodos de tal manera que el primer electrodo 11 sea un ánodo y el segundo electrodo 12 sea un cátodo. Alternativamente, el primer electrodo 11 puede ser un cátodo y el segundo electrodo 12 un ánodo.

40 En otras realizaciones, el por lo menos un electrodo puede comprender un primer electrodo, un segundo electrodo y un tercer electrodo, denominado en la presente configuración de electrodo tripolar. Al igual que en la configuración bipolar, el primer, el segundo y el tercer electrodos pueden situarse a lo largo del eje longitudinal del nervio y, en un ejemplo, el segundo electrodo puede situarse entre el primer electrodo 11 y el tercer electrodo 13.

45 Los electrodos pueden estar, por lo menos en parte, aislados entre sí por un material biocompatible no conductor. Con este fin, una interfaz neuronal puede comprender un material biocompatible no conductor espaciado transversalmente a lo largo del nervio cuando el dispositivo está en uso.

50 Los inventores han descubierto tamaños de electrodos preferidos para aplicar una señal eléctrica por lo menos a un nervio arterial esplénico. El área de superficie total de los electrodos puede ser de 0,1-0,3 mm². Preferiblemente, la superficie total de los electrodos es menor de 0,2 cm².

55 En las configuraciones de electrodos preferidas, la anchura de cada uno del primer electrodo 11 y el segundo electrodo 12 puede estar comprendida entre 1 y 4 mm. Por ejemplo, la anchura puede estar comprendida entre 1 mm y 3 mm, o entre 2 mm y 4 mm, o entre 2 mm y 3 mm.

Controlador

60 En referencia a la Figura 1, el sistema de la invención 50, que puede comprender una interfaz neuronal, puede comprender también por lo menos un controlador, por ejemplo un microprocesador 60, que está acoplado eléctricamente con el por lo menos un electrodo de la interfaz neuronal 10 y está configurado para controlar el funcionamiento del por lo menos un electrodo. El por lo menos un controlador puede ser responsable de activar el inicio y/o el final de las señales enviadas al nervio por el al menos un electrodo. Opcionalmente, el por lo menos un controlador también puede ser responsable de generar y/o controlar los parámetros de la señal.

65

El por lo menos un controlador puede estar configurado para funcionar en bucle abierto, en donde una señal predefinida (como se ha descrito anteriormente) se suministra al nervio con un disparador externo.

5 El por lo menos un controlador se construye preferiblemente de manera que genere, en uso, una señal preconfigurada y/o seleccionable por el operador que sea independiente de cualquier entrada del sistema 50. La señal preconfigurada y/o seleccionable por el operador puede ser cualquiera de las señales eléctricas descritas anteriormente. En otras realizaciones, el por lo menos un controlador responde a una señal externa, preferiblemente información (por ejemplo, datos) relativa a uno o más parámetros fisiológicos del sujeto, pero dentro de los límites de las señales descritas anteriormente.

10 El por lo menos un controlador puede ser un microprocesador 60 del sistema 50, adecuado para ser implantado en el sujeto.

15 Alternativa o adicionalmente, el por lo menos un controlador puede ser un controlador externo al sujeto.

El por lo menos un controlador puede activarse tras la recepción de una señal generada por un operador, como un médico o el sujeto en el que está implantado el dispositivo 106. Con este fin, el sistema 50 puede comprender adicionalmente un sistema externo 80 que comprenda un controlador 101. A continuación con referencia a la FIG. 2 se describe un ejemplo de tal sistema.

20 El sistema externo 80 del sistema más amplio 100 es externo al sistema 50 y externo al sujeto, y comprende el controlador 101. El controlador 101 puede usarse para controlar y/o alimentar externamente el sistema 50. Con este fin, el controlador 101 puede comprender una unidad de alimentación 102 y/o una unidad de programación 103. El sistema externo 80 puede comprender además una antena de transmisión de potencia 104 y una antena de transmisión de datos 105, como se describe más adelante.

25 El por lo menos un controlador, incluyendo el microprocesador 60 y el controlador 101, puede ser un procesador conectado a una memoria (es decir, un medio de almacenamiento legible por ordenador no transitorio) que lleva un programa de ordenador ejecutable que comprende partes de código que, cuando se cargan y se ejecutan en el procesador, hacen que el procesador controle por lo menos el funcionamiento del por lo menos un electrodo. Por controlar el funcionamiento se entiende que el por lo menos un controlador hace que el por lo menos un electrodo aplique una señal eléctrica al nervio usando cualquiera de los parámetros de señal y patrones de aplicación descritos anteriormente.

35 *Sistema de estimulación neuronal*

Además de la interfaz neuronal 10 y el por lo menos un controlador 60, el sistema 50 puede comprender un generador de señales 113 que está configurado para suministrar la señal eléctrica descrita anteriormente al por lo menos un electrodo en respuesta a una operación de control del por lo menos un controlador. El generador de señales puede comprender por lo menos una fuente de corriente o voltaje.

40 El generador de señales 113 puede estar acoplado eléctricamente al por lo menos a un controlador y al por lo menos a un electrodo. En algunas realizaciones, por lo menos un electrodo puede estar acoplado al generador de señales 113 a través de cables eléctricos 107. En algunas realizaciones, los cables eléctricos pueden estar acoplados a los interconectores descritos anteriormente. Alternativamente, el generador de señales 113 puede estar integrado directamente con el por lo menos un electrodo sin cables. En cualquier caso, el sistema 50 puede comprender un dispositivo 106, que puede insertarse en el sujeto, y que puede comprender circuitos de salida de bloqueo de corriente continua (o circuitos de salida de bloqueo de corriente alterna), opcionalmente basados en condensadores y/o inductores, en todos los canales de salida (por ejemplo, salidas al por lo menos un electrodo, o sensor fisiológico 111).

45 Además de la interfaz neuronal 10, el por lo menos un electrodo, el por lo menos un controlador y el generador de señales 113, el sistema 50 puede comprender uno o más de los siguientes componentes: transceptor insertable 110; fuente de alimentación 112; memoria 114 (también denominada dispositivo de almacenamiento legible por ordenador no transitorio); sensor fisiológico 111; y módulo de procesamiento de datos fisiológicos 115. El sensor fisiológico 111 y el módulo de procesamiento de datos fisiológicos 115 se denominan en la presente detector.

50 Los varios componentes del sistema 50 forman parte preferiblemente de un único dispositivo físico, ya sea compartiendo una carcasa común o siendo una colección físicamente separada de componentes interconectados conectados por cables eléctricos, como se muestra en la Figura 2. Sin embargo, como alternativa, la invención puede usar un sistema en el que los componentes estén separados físicamente y se comuniquen de manera inalámbrica. Por tanto, por ejemplo, el por lo menos un electrodo y el dispositivo insertable (por ejemplo, el dispositivo insertable 106) pueden formar parte de un dispositivo unitario, o juntos pueden formar un sistema (por ejemplo, el sistema 50). En ambos casos, también pueden estar presentes componentes adicionales para formar un sistema más amplio (por ejemplo, el sistema 100).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, en el dispositivo insertable 106 pueden estar contenidos uno o más de los siguientes componentes: fuente de alimentación 112; memoria 114; y un módulo de procesamiento de datos fisiológicos 115.

La fuente de alimentación 112 puede comprender una fuente de corriente y/o una fuente de voltaje para proporcionar la energía para el generador de señales 113. La fuente de alimentación 112 también puede proporcionar energía para los demás componentes del dispositivo insertable 106 y/o del sistema 50, tales como el microprocesador 60, la memoria 114 y el transceptor insertable 110. La fuente de alimentación 112 puede comprender una batería, la batería puede ser recargable.

Se apreciará que la disponibilidad de energía es limitada en los dispositivos insertables, y la invención se ha concebido teniendo en cuenta esta limitación. El dispositivo insertable 106 y/o el sistema 50 pueden alimentarse mediante alimentación inductiva o mediante una fuente de energía recargable.

La memoria 114 puede almacenar datos de potencia y datos relativos a uno o más parámetros fisiológicos. Por ejemplo, la memoria 114 puede almacenar datos pertenecientes a una o más señales indicativas de uno o más parámetros fisiológicos detectados por el detector (por ejemplo, a través del sensor fisiológico 111, y/o uno o más parámetros fisiológicos correspondientes determinados a través del módulo de procesamiento de datos fisiológicos 115). Además o alternativamente, la memoria 114 puede almacenar datos de potencia y datos relativos al uno o más parámetros fisiológicos del sistema externo 80 a través del transceptor insertable 110. Con este fin, el transceptor insertable 110 puede formar parte de un subsistema de comunicación del sistema más amplio 100, como se explica más adelante.

El módulo de procesamiento de datos fisiológicos 115 está configurado para procesar una o más señales indicativas de uno o más parámetros fisiológicos detectados por el sensor fisiológico 111, para determinar uno o más parámetros fisiológicos correspondientes. El módulo de procesamiento de datos fisiológicos 115 puede estar configurado para reducir el tamaño de los datos correspondientes a uno o más parámetros fisiológicos para su almacenamiento en la memoria 114 y/o para su transmisión al sistema externo a través del transceptor insertable 110. El transceptor insertable 110 puede comprender una o más antenas. El transceptor insertable 100 puede usar cualquier proceso de señalización adecuado, como RF, inalámbrico, infrarrojo, y demás, para transmitir señales fuera del cuerpo, por ejemplo al sistema más amplio 100 del que es parte el sistema 50.

Alternativa o adicionalmente, el módulo de procesamiento de datos fisiológicos 115 puede estar configurado para procesar las señales indicativas de uno o más parámetros fisiológicos y/o procesar el uno o más parámetros fisiológicos determinados para determinar la evolución de la enfermedad en el sujeto.

El módulo de procesamiento de datos fisiológicos 115 y el por lo menos un sensor fisiológico 111 pueden formar un subsistema de sensor fisiológico, también conocido en la presente como detector, ya sea como parte del sistema 50, parte del dispositivo insertable 106, o externo al sistema.

Puede haber por lo menos un detector configurado para detectar uno o más parámetros fisiológicos relacionados con el tratamiento. Por ejemplo, el detector puede estar configurado para detectar la concentración de biomoléculas usando sensores bioquímicos eléctricos, de RF u ópticos (visibles, infrarrojos).

La memoria 114 puede almacenar datos fisiológicos relativos a los niveles normales de uno o más parámetros fisiológicos. Los datos pueden ser específicos del sujeto en el que se inserta el sistema 50, y obtenerse a partir de diversas pruebas conocidas en la técnica. Tras la recepción de la señal indicativa de un parámetro fisiológico recibida del sensor fisiológico 111, o bien periódicamente o a petición del sensor fisiológico 111, el procesador de datos fisiológicos 115 puede comparar el parámetro fisiológico determinado a partir de la señal recibida del sensor fisiológico 111 con los datos relativos a un nivel normal del parámetro fisiológico almacenado en la memoria 114, y determinar si las señales recibidas son indicativas de insuficiencia o exceso de un parámetro fisiológico particular, y por lo tanto indicativas de la evolución de la enfermedad en el sujeto.

El microprocesador 60 puede activarse tras recibir una señal generada por un operador (por ejemplo, un médico o el sujeto en el que está insertado el sistema 50). A tal fin, el sistema 50 puede formar parte de un sistema más amplio 100 que comprende el sistema externo 80 y el controlador 101, como se describe más adelante.

Más allá del sistema de estimulación neuronal

El sistema de estimulación neuronal 50 puede formar parte de un sistema más amplio 100 que incluye una serie de subsistemas, por ejemplo el sistema externo 80, véase la Figura 2. El sistema externo 80 puede usarse para alimentar y programar el sistema de estimulación neuronal 50 a través de la piel humana y los tejidos subyacentes.

El subsistema externo 80 puede comprender, además del controlador 101, uno o más de: una unidad de

alimentación 102, para recargar de forma inalámbrica la batería de la fuente de alimentación 112 usada para alimentar el dispositivo insertable 106; y, una unidad de programación 103 configurada para comunicarse con el transceptor insertable 110. La unidad de programación 103 y el transceptor insertable 110 pueden formar un subsistema de comunicaciones. En algunas realizaciones, la unidad de alimentación 102 se aloja junto con la unidad de programación 103. En otras realizaciones, pueden alojarse en dispositivos separados.

El subsistema externo 80 también puede comprender uno o más de: antena de transmisión de potencia 104; y antena de transmisión de datos 105. La antena de transmisión de potencia 104 puede estar configurada para transmitir un campo electromagnético a baja frecuencia (por ejemplo, de 30 kHz a 10 MHz). La antena de transmisión de datos 105 puede configurarse para transmitir datos para programar o reprogramar el dispositivo insertable 106, y puede usarse además de la antena de transmisión de potencia 104 para transmitir un campo electromagnético a alta frecuencia (por ejemplo, de 1 MHz a 10 GHz). La por lo menos una antena del transceptor insertable 110 puede estar configurada para recibir energía del campo electromagnético externo generado por la antena de transmisión de energía 104, que puede usarse para cargar la batería recargable de la fuente de energía 112.

La antena de transmisión de potencia 104, la antena de transmisión de datos 105 y la por lo menos una antena del transceptor insertable 110 tienen ciertas características, como una frecuencia de resonancia y un factor de calidad (Q). Una implementación de la antena o antenas es una bobina de alambre con o sin núcleo de ferrita que forma un inductor con una inductancia definida. Este inductor puede acoplarse con un condensador resonante y una pérdida resistiva para formar el circuito resonante. La frecuencia se ajusta para que coincida con la del campo electromagnético generado por la antena de transmisión de potencia 105. Una segunda antena de las por lo menos una antena del transceptor insertable 110 puede usarse en el sistema 50 para la recepción y transmisión de datos desde/hacia el sistema externo 80. Si en el sistema 50 se usa más de una antena, estas antenas se rotan 30 grados entre sí para lograr un mejor grado de eficacia de transferencia de potencia durante una ligera desalineación con la antena de transmisión de potencia 104.

El sistema externo 80 puede comprender uno o más sensores fisiológicos llevados en el cuerpo externos 121 (no mostrados) para detectar señales indicativas de uno o más parámetros fisiológicos. Las señales pueden transmitirse al sistema 50 a través de por lo menos una antena del transceptor insertable 110. Alternativa o adicionalmente, las señales pueden transmitirse al sistema externo 50 y luego al sistema 50 a través de la por lo menos una antena del transceptor insertable 110.

Por ejemplo, en una realización particular, un detector externo al dispositivo insertable puede incluir un monitor de flujo sanguíneo no invasivo, como un flujómetro ultrasónico y/o un monitor de presión sanguínea no invasivo, y determinar cambios en los parámetros fisiológicos, en particular los parámetros fisiológicos descritos anteriormente.

El sistema 100 puede incluir una función de protección de seguridad que interrumpe la estimulación eléctrica del nervio en los siguientes casos ejemplares: funcionamiento anormal del sistema 50 (por ejemplo, sobretensión); lectura anómala de un sensor fisiológico insertado 111 (por ejemplo, aumento de la temperatura de más de 2 grados centígrados o impedancia eléctrica excesivamente alta o baja en la interfaz electrodo-tejido); lectura anómala de un sensor fisiológico llevado en el cuerpo externo 121 (no mostrado); o respuesta anormal a la estimulación detectada por un operador (por ejemplo, un médico o el sujeto). La función de precaución de seguridad puede implementarse a través del controlador 101 y comunicarse al sistema 50, o internamente dentro del sistema 50.

El sistema externo 80 puede comprender un accionador 120 (no mostrado) que, tras ser presionado por un operador (por ejemplo, un médico o el sujeto), emitirá una señal, a través del controlador 101 y el subsistema de comunicación respectivo, para activar el microprocesador 60 del sistema 50 para que emita una señal al nervio mediante el por lo menos un electrodo.

El sistema externo 80 puede comprender una pantalla 109 para que el microcontrolador 60 o el controlador 101 alerte al operador (por ejemplo, un médico o el sujeto) de un estado del sistema o del sujeto. La pantalla 109 puede ser un monitor como un monitor LED, o puede ser un indicador visual como un LED.

El sistema 100 de la invención, incluyendo el sistema externo 80, pero en particular el sistema 50, está hecho preferiblemente de o recubierto con un material bioestable y biocompatible. Esto significa que el sistema está protegido frente a daños debidos a la exposición a los tejidos del cuerpo y también minimiza el riesgo de que el sistema provoque una reacción desfavorable del huésped (que en última instancia podría provocar rechazo). Lo ideal sería que el material usado para elaborar o recubrir el sistema fuera resistente a la formación de biopelículas. Los materiales adecuados incluyen, entre otros, polímeros de poli(p-xilileno) (conocidos como parileno) y politetrafluoroetileno.

El dispositivo insertable 106 de la invención pesará generalmente menos de 50 g.

General

Los métodos descritos en la presente pueden realizarse mediante software en formato legible por máquina en un medio de almacenamiento tangible, por ejemplo, en forma de un programa informático que comprenda medios de código de programa informático adaptados para realizar todos los pasos de cualquiera de los métodos descritos en la presente cuando el programa se ejecuta en un ordenador y donde el programa informático puede estar incorporado en un medio legible por ordenador. Ejemplos de medios de almacenamiento tangibles (o no transitorios) incluyen discos, unidades de memoria USB, tarjetas de memoria, etc. y no incluyen señales propagadas. El software puede ser adecuado para su ejecución en un procesador paralelo o en un procesador en serie, de tal manera que los pasos del método puedan llevarse a cabo en cualquier orden adecuado, o simultáneamente. Se reconoce que el firmware y el software pueden ser mercancías valiosas y negociables por separado. Se pretende abarcar el software, que se ejecuta o controla hardware "tonto" o estándar, para llevar a cabo las funciones deseadas. También incluye el software que "describe" o define la configuración del hardware, como el software HDL (lenguaje de descripción de hardware), que se usa para diseñar chips de silicio o para configurar chips programables universales para que lleven a cabo las funciones deseadas.

Los expertos en la técnica se darán cuenta de que los dispositivos de almacenamiento utilizados para almacenar las instrucciones de programa pueden distribuirse a través de una red. Por ejemplo, un ordenador remoto puede almacenar un ejemplo del proceso descrito como software. Un ordenador local o terminal puede acceder al ordenador remoto y descargar una parte o la totalidad del software para ejecutar el programa. Alternativamente, el ordenador local puede descargar partes del software según sea necesario, o ejecutar algunas instrucciones del software en el terminal local y otras en el ordenador remoto (o red de ordenadores). Los expertos en la técnica también se darán cuenta de que, mediante la utilización de técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, todas o parte de las instrucciones del software pueden ser ejecutadas por un circuito dedicado, como un DSP, una matriz lógica programable o similar.

A menos que se indique lo contrario, cada realización descrita en la presente puede combinarse con otra realización descrita en la presente. El término "que comprende" abarca tanto "que incluye" como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X+Y.

Se entenderá que los beneficios y ventajas descritos anteriormente pueden referirse a una realización o pueden referirse a varias realizaciones. Las realizaciones no se limitan a aquellas que resuelven alguno o todos los problemas mencionados o aquellas que tienen alguno o todos los beneficios y ventajas mencionados.

Se entenderá que la descripción anterior de una realización preferida se da sólo a modo de ejemplo y que los expertos en la técnica pueden realizar varias modificaciones. Aunque se han descrito anteriormente varias realizaciones con un cierto grado de particularidad, o con referencia a una o más realizaciones individuales, los expertos en la técnica podrían hacer numerosas modificaciones a las realizaciones divulgadas sin apartarse del alcance de esta invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las realizaciones de la invención se describirán, a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes dibujos, en los que:

La Figura 1 ilustra un sistema de estimulación neuronal.

La Figura 2 ilustra un sistema más amplio que incluye el sistema de estimulación neuronal.

La Figura 3 es una ilustración esquemática del abdomen izquierdo porcino en la que se destacan las características anatómicas del plexo esplénico (bazo, nervios, arterias y venas). Se muestra la ubicación para la colocación del manguito durante los experimentos de estimulación periarterial del nervio esplénico (SpN). Los nervios se representan en negro y las arterias y venas en gris.

La Figura 4 muestra el análisis anatómico e histológico del SpN a lo largo de la SpA (arteria esplénica) principal y de las arterias epiploica y gástrica corta. La Figura 4A es una representación esquemática de la neuroanatomía esplénica resaltando (líneas discontinuas) las regiones donde se realizó el análisis histológico. Las Figuras 4B a 4D muestran secciones del SpN a diferentes niveles, arteria esplénica principal (Figura 4B), arterias gástrica corta (SG) (Figura 4C) y arteria gastroepiploica (GEP) (Figura 4D), teñidas con H&E. Los nervios de las Figuras 4C y 4D se indican con puntas de flecha. En la Figura 4D, el inserto muestra una imagen a gran aumento de un fascículo nervioso. La Figura 4E muestra un diagrama de cajas que informa de la cuantificación del número de fascículos del SpN en diferentes localizaciones (panel superior) y la distribución del diámetro medio de los mismos fascículos en las diferentes localizaciones (panel inferior). La figura 4F muestra el número de fascículos en diferentes localizaciones y su diámetro medio relativo.

La Figura 5 muestra la caracterización histológica y electrofisiológica de un nervio esplénico porcino. La Figura 5A

es una microfotografía de una sección semifina (0,5 μm de grosor) de la SpA/SpN teñida con azul de toluidina. En la imagen no pueden observarse axones mielinizados. Figura 5B Trazos representativos del potencial de acción compuesto evocado (eCAP) registrado a partir de fascículos del nervio esplénico periarterial diseccionados de la arteria al estimular a 1 Hz con un manguito periarterial (alrededor de todo el plexo SpN) o con un pequeño manguito alrededor de unos pocos fascículos del haz del SpN. Los trazos son la media de 10 respuestas. La Figura 5C muestra la variedad de velocidades de conducción de los diferentes componentes del eCAP. Las Figuras 5D y 5E muestran la curva de fuerza-duración del SpN obtenida estimulando todo el plexo (Figura 5D) o unos pocos fascículos diseccionados (Figura 5E). Los gráficos muestran también la densidad de carga relativa para obtener el eCAP umbral a diferentes amplitudes de estimulación. Todas las estimulaciones se realizaron a 1 Hz para limitar la ralentización de la conducción del potencial de acción indicada por la estimulación en el nervio.

La Figura 6 muestra los cambios transitorios en mSpA BF, mSpV BF, sMABP y HR que dependen de la intensidad de la estimulación provocada por la estimulación SpN. La Figura 6A muestra el cambio medio ($n=8$) en el mSpA BF (de -30 a +180 s, con respecto al inicio de la estimulación) durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos cuadrados simétricos, 400 μs PW a 10 Hz) del plexo SpN a diferentes amplitudes de corriente (entre 3,5 y 20 mA). La Figura 6B muestra la reducción máxima en mSpA BF alcanzada durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos cuadrados simétricos, 400 μs PW a 10 Hz) del plexo SpN a diferentes amplitudes de corriente. Cada línea representa un animal probado. La Figura 6C muestra la media ($n\geq 3$) de la reducción máxima de mSpA BF alcanzada durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 400 μs o 200 μs PW a 10 Hz) del plexo SpN a diferentes amplitudes de corriente y con dos PW diferentes: 400 (círculos negros) y 200 (cuadrados negros) μs . La Figura 6D muestra el cambio en mSpV BF (de -30 a +180 s, con respecto al inicio de la estimulación) durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 400 μs PW a 10 Hz) del plexo SpN con diferentes amplitudes de corriente (entre 3,5 y 12 mA). La Figura 6E muestra el cambio medio ($n=3$) en sMABP y HR (de -30 a +180 s, con respecto al inicio de la estimulación) durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 400 μs PW a 10 Hz) del plexo SpN a diferentes amplitudes de corriente (entre 3,5 y 20 mA). Las Figuras 6F y 6G resumen los cambios máximos medios ($n=3$) en mSpA BF, sMABP, HR y RR durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 400 μs PW a 10 Hz) del plexo SpN (Figura 6F) o de algunos fascículos diseccionados del SpN (Figura 6G) a diferentes amplitudes de corriente. Ambos gráficos muestran la amplitud (medida como área bajo la curva de la respuesta) del eCAP registrada (expresada como % sobre la respuesta máxima). Los cambios de SpA BF se expresan como reducción máxima respecto al valor de referencia en %, los cambios de HR se expresan como latidos por minuto (bpm), los cambios de sMABP se expresan como mmHg, los cambios de RR se expresan como respiraciones por minuto (bpm). Los dos gráficos también informan de la densidad de carga por fase con respecto a la amplitud de estimulación usada.

La Figura 7 muestra que los cambios en mSpA BF, mSpV BF, sMABP y HR durante la estimulación SpN fueron dependientes de la frecuencia. La Figura 7A muestra el cambio medio ($n=3$) en mSpA BF (de -30 a +180 s, con respecto a la estimulación) durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 400 μs PW a aproximadamente 36,9 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$) del plexo SpN a diferentes frecuencias (entre 0,25 y 100 Hz). La Figura 7B muestra la media ($n=3$) de la reducción máxima en mSpA BF observada durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 400 μs PW a aproximadamente 36,9 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$) del plexo SpN a diferentes frecuencias (entre 0,25 y 100 Hz). En las Figura 7C a 7D, los gráficos muestran los cambios en mSpV BF, sMABP, HR (expresados como % sobre el valor de referencia previo a la estimulación) durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 400 μs PW a aproximadamente 36,9 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$) del plexo SpN a diferentes frecuencias (entre 0,25 y 100 Hz). Los datos de la Figura 7A se expresan como media \pm d.e. En las Figuras 7A y 7C a 7D, el recuadro representa la ventana temporal de estimulación.

La Figura 8 muestra los efectos locales y sistémicos de unos pocos fascículos SpN diseccionados a diferentes frecuencias. En particular, la Figura 6 muestra un registro experimental representativo de los cambios locales y sistémicos asociados a la estimulación de unos pocos fascículos de SpN diseccionados de la arteria con diferentes frecuencias. Se muestran los datos de HR, sMABP, entrada de estimulación, eCAP, SpA BF bruta y mSpA BF de un experimento representativo en el que la frecuencia varía de 3 a 300 Hz.

La Figura 9 muestra los cambios en el flujo sanguíneo de la SpA monitorizados mediante ultrasonografía esplénica intraoperatoria. Las imágenes de la Figura 7 se obtuvieron de dos animales diferentes durante la estimulación del SpN. Obsérvese la reducción del trazado Doppler durante la estimulación (paneles centrales) frente a la estimulación previa y posterior (paneles superior e inferior, respectivamente).

La Figura 10 muestra que la estimulación de SpN promovió la supervivencia. La Figura 10A es un gráfico de Kaplan-Meier que ilustra las diferencias en el tiempo de supervivencia hasta el punto final predeterminado a las 2 horas de la inyección *in vivo* de LPS. La Figura 10B es un gráfico de cajas que ilustra la presión arterial media registrada más baja (MABP; calculada como % del valor de referencia) 30 minutos después de la inyección de LPS. Se muestra una diferencia significativa entre el grupo SpN-T y el simulado; $P = 0,0296$. Las Figuras 10C y 10D son diagramas de caja que ilustran las concentraciones de TNF α (Figura 10C) e IL-6 (Figura 10D) a las 0,5 horas de la inyección de LPS *in vivo*. Se muestra una diferencia significativa entre los grupos de SpN-T y de SpN-P; $P = 0,0117$. También se muestra una diferencia significativa entre los grupos de SpN-T y el simulado; $P = 0,0043$.

La Figura 11 muestra que la estimulación del SpN promovió la supervivencia de manera similar a la Figura 10, pero con datos adicionales. La Figura 11A es un gráfico de Kaplan-Meier que ilustra las diferencias en el tiempo de supervivencia hasta el punto final predeterminado a las 2 horas después de la inyección de LPS. La Figura 11B es un diagrama de cajas que ilustra la presión arterial media registrada más baja (MABP; calculada como % del valor de referencia) 30 minutos después de la inyección de LPS. Se muestra una diferencia significativa entre el grupo de SpN2S y el simulado. Las Figuras 11C y 11D son diagramas de caja que ilustran las concentraciones de TNFA (Figura 11C) e IL-6 (Figura 11D) a las 0,5 horas de la inyección de LPS.

La Figura 12 muestra que la estimulación del SpN provoca una estabilización en los cambios cardiovasculares inducidos por LPS. (A y B) Trazos representativos de los cambios de MABP, dABP, sABP, HR, mCVP, ET CO₂, SpA mBF a lo largo del tiempo a partir del valor de referencia (media de 10 min antes de la inyección de LPS) en un animal simulado (A) o estimulado en el nervio esplénico (B). Los cambios inducidos por el LPS en mCVP, HR y ABP son menores en el animal estimulado. MABP = presión arterial media; dABP = presión arterial diastólica; sABP = presión arterial sistólica; HR = frecuencia cardíaca; mCVP = presión venosa central media; ET CO₂ = volumen de CO₂ tidal final; SpA mBF = flujo sanguíneo medio de la arteria esplénica.

La Figura 13 muestra que la estimulación del SpN provoca una estabilización en los cambios cardiovasculares inducidos por LPS. (A) La estimulación provoca una reducción de la resistencia vascular pulmonar en comparación con el valor de referencia (antes de la inyección de LPS). En los animales simulados (no estimulados) sometidos a la inyección de LPS, la PVS aumenta tras la inyección de LPS. (B) La estimulación provoca un mayor aumento de la SVR en comparación con el animal simulado, después de la administración de LPS. (C) La estimulación provoca un mayor aumento de la PCWP en comparación con los animales simulados, después de la inyección de LPS. PVS = resistencia vascular pulmonar; SVR = resistencia vascular sistémica; PCWP = presión de enclavamiento capilar pulmonar.

La Figura 14 muestra que la estimulación del SpN reduce el aumento de las lipasas sistémicas inducido por el LPS en comparación con los animales simulados (no estimulados).

La Figura 15 muestra que el nervio esplénico humano es un plexo de fascículos periarteriales que contienen axones de conducción lenta. La Figura 13 incluye las siguientes subsecciones: A) Haz neurovascular esplénico humano (NVB) que contiene la SpA, el SpN, tejido conectivo, secciones de páncreas y ganglios linfáticos recién aislados de un donante. Se colocaron dos electrodos de manguito pequeños (650 μ m de diámetro) en unos pocos fascículos diseccionados seleccionados. El esquema de la preparación indica la posición (a y b) de los manguitos de estimulación y registro. Las líneas de puntos indican las zonas en las que se tomaron las secciones mostradas en B y C; (B) Sección del NVB humano teñida con hematoxilina y eosina (H&E). Los fascículos de SpN están rodeados con círculos; (C) Sección de los fascículos estimulados que se aislaron para el estudio electrofisiológico. La sección se tiñó con H&E y muestra los fascículos nerviosos (rodeados con círculo) y el tejido adiposo/conectivo; (D) eCAP registrado cuando se aplica estimulación monopolar monofásica del SpN humano a 1 Hz y 400 μ s PW antes (panel superior) y después (panel inferior) de aplastar el nervio entre el manguito de estimulación y el de registro. El recuadro de la izquierda indica el artefacto de estimulación, mientras que el más grande de la derecha indica la zona en la que debería observarse el eCAP, con las flechas indicando el eCAP; (E) Curva de reclutamiento del SpN humano cuantificando la amplitud del eCAP (expresada como % de la respuesta máxima) frente a la amplitud de estimulación. Cada punto representa la amplitud media de 8 pulsos monopulares monofásicos consecutivos administrados a 1 Hz y 400 μ s PW; (F) Velocidades de conducción de todos los componentes del eCAP registrados en el SpN humano, porcino (cerdo) y de rata; (G) Relación fuerza-duración (círculos negros) del SpN humano obtenida estimulando los fascículos diseccionados. Los datos representan la corriente mínima necesaria para desencadenar un eCAP detectable en los diferentes PW probados. Los gráficos también muestran la densidad de carga correspondiente (triángulos negros) de las diferentes estimulaciones (referidas al eje Y derecho). Se trazaron curvas de regresión por mínimos cuadrados frente a los datos de fuerza-duración y densidad de carga. y (H) Densidades de carga necesarias para estimular el SpN de las tres especies diferentes a diferentes PW. Los datos se ajustaron con regresiones lineales. Barras de escala: B=2 mm; C=100 μ m.

La Figura 16 muestra A) Ejemplo de una muestra esplénica humana con sutura indicando el extremo proximal próximo al celíaco, B) Representación conceptual del corte del tejido en bloques para histología, C) Portaobjetos teñido con hematoxilina y eosina (H&E) de uno de los bloques, y D) metodología para las estimaciones histomorfométricas.

La Figura 17 muestra (izquierda) el diámetro del fascículo, (centro) la extensión del fascículo alrededor de la adventicia (pared arterial esplénica externa) para las partes proximal, media y distal del haz neurovascular esplénico (NVB), y (derecha) el porcentaje de fascículos frente a la distancia desde la adventicia.

La Figura 18 muestra datos in vivo de la estimulación del haz neurovascular esplénico porcino; (A) curva de reclutamiento de la población, (B) curva fuerza-duración.

La Figura 19 muestra (A) Curva de reclutamiento a partir de la modelización in-silico en porcinos con el eje x que representa las estimaciones de inyección de carga en pulsos de 400 us, (B) lo mismo con el eje x reflejando la amplitud de estimulación, (C) Curva de reclutamiento a partir de la modelización in-silico en humanos con el eje x representando las estimaciones de inyección de carga en pulsos de 400 us (azul) y 1 ms (rojo), (D) lo mismo con el eje x reflejando la amplitud de estimulación (mA).

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Estudio 1: Caracterización de los nervios arteriales esplénicos

Materiales y métodos

Se realizaron estudios anatómicos macroscópicos del bazo y los órganos relacionados en 12 cadáveres de cerdos hembra (de 22 a 120 kg de peso corporal) en el plazo de 1 hora desde la eutanasia. Se realizaron las siguientes mediciones; longitud y anchura del bazo; longitud de la arteria celíaca (desde la aorta hasta la ramificación en las arterias gástrica izquierda y esplénica); longitud de la arteria esplénica (SpA) (desde la ramificación de la arteria celíaca hasta la entrada en el parénquima esplénico); diámetro de la SpA medido 1 cm distal a la arteria celíaca y en el hilio esplénico; distancia del páncreas al bazo; distancia del páncreas a los ganglios linfáticos esplénicos. También se registraron el número y el curso de las ramificaciones vagales abdominales, el ganglio celíaco, los nervios esplácnicos y los nervios esplénicos. Las SpA con nervios esplénicos asociados se procesaron para histología con hematoxilina y eosina (H&E).

Se recogió el bazo con vasculatura e inervación intactas de 12 cadáveres de cerdo hembra (peso corporal 22 kg, n=6; peso corporal 45 kg, n=6). Todos los tejidos se recogieron en el plazo de 1 hora desde la eutanasia y se fijaron inmediatamente en formol neutro al 10%. Se seccionó la SpA con una red neuronal perivascular intacta cada 5 mm desde el origen en la bifurcación de la arteria celíaca hasta el hilio esplénico. Esto dio como resultado 5 secciones, definidas como la bifurcación; la SpA proximal; la SpA media; la SpA distal y la localización del hilio. La sección proximal de la SpA corresponde a la ubicación del manguito en el siguiente estudio de estimulación eléctrica analizado anteriormente.

En cada una de estas cinco localizaciones se procesaron secciones para la tinción rutinaria con H&E. También se procesaron las secciones de SpA proximal, media y distal para inmunohistoquímica y para corte semidelgado y tinción con tetróxido de osmio y azul de toluidina.

Se adquirieron imágenes digitales de las secciones teñidas con H&E con un aumento de 2x y se usó el software adecuado (Image J 1.50i) para el análisis histomorfométrico, como se detalla a continuación. Después de seleccionar manualmente cada fascículo nervioso individual usando la función de gestión de ROI, se contó el número de fascículos nerviosos periarteriales y se evaluó el tamaño de los fascículos midiendo el diámetro mínimo de Feret (μm).

Se calculó el área nerviosa total (en μm^2) y se cuantificó la distribución periarterial de los fascículos evaluando el porcentaje de la circunferencia arterial en el que se identificaron fascículos, definiendo la distribución de 360 grados como el 100%. La distancia desde cada fascículo a la pared arterial externa se midió trazando la línea perpendicular más corta posible desde cada fascículo a la pared arterial. Se midieron los diámetros externo e interno de la arteria esplénica en las localizaciones proximal, media y distal de la SpA.

Para evaluar el fenotipo neuronal se usó una tinción doble con tirosina hidroxilasa (TH) y acetilcolina transferasa (ChAT). Mediante contratinción con neurofilamento 200 (NF200) y la tinción nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), los nervios doblemente positivos para NF200-TH se consideraron simpáticos, mientras que los doblemente positivos para NF200-ChAT se consideraron parasimpáticos. Para determinar la proporción de nervios eferentes frente a los aferentes, las mismas localizaciones se tiñeron doblemente con el marcador eferente TH y el marcador aferente péptido relacionado con el gen de la calcitonina (GCRP). Se capturaron aleatoriamente dos imágenes digitales diferentes de cada nervio con un aumento de 20x y se generaron composiciones pseudocoloreadas usando el software adecuado (AxioVision LE64).

La mielinización de los axones del SpN se evaluó mediante tinción inmunofluorescente, así como a partir de secciones semidelgadas. Diferentes partes de la SpA y del SpN se tiñeron con anticuerpos contra Neurofilamento y β -III Tubulina y Proteína Básica de la Mielina (MBP). Se generaron imágenes compuestas pseudocoloreadas usando el software adecuado, como se ha descrito anteriormente. Las secciones semidelgadas se tiñeron con osmio y azul de toluidina. Se adquirieron imágenes digitales con un aumento de 100x y se contó manualmente el número de axones mielinizados y no mielinizados en un área de $100 \times 100 \mu\text{m}$. Este procedimiento se repitió 3 veces por nervio, y se usó la media de los mismos para análisis posteriores. También se usó este procedimiento para obtener la densidad axónica (número de axones/ mm^2).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con software estadístico comercialmente disponible (JMP Pro

13.0.0). Debido a la distribución no normal, todas las mediciones histomorfológicas se compararon entre los distintos tamaños de cerdo y localizaciones de SpA usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. La significancia estadística se definió como $P < 0,05$.

5 Resultados

Las estructuras neurovasculares entran y salen del bazo únicamente a lo largo de la superficie visceral. Específicamente, la primera rama abdominal principal de la aorta, la arteria celíaca, se divide en la arteria hepática, la SpA y la LGA (Figura 3). La SpA se introduce en el bazo por el hilio, que está situado a unos pocos centímetros distal de la base esplénica. En el hilio, la SpA se bifurca inmediatamente en una rama dorsal que discurre hacia la base esplénica y una rama ventral que discurre a lo largo de la superficie visceral hacia el ápex esplénico. La arteria gastroepiploica izquierda nace de esta rama ventral de la SpA aproximadamente en la transición entre el 1/3 medio y distal del bazo.

En la base esplénica, la rama dorsal de la SpA se divide en varias arterias más pequeñas identificadas como arterias gástricas cortas, que se dirigen hacia la curvatura mayor del estómago. Aunque estas arterias se consideran ramas terminales de la SpA, son capaces de proporcionar un suministro sanguíneo colateral al bazo mediante anastomosis con ramas de la LGA y las arterias gastroepiploicas izquierdas. La SpV discurre paralela a la SpA a lo largo de la superficie visceral del bazo, desde el ápex hasta el hilio. Después de dejar el hilio esplénico, la SpV discurre estrechamente adherida a la SpA durante una corta distancia hasta que se desplaza en dirección medial para drenar en la vena porta hepática, que a su vez drena en la vena cava caudal. Esto deja un pequeño espacio en el que discurren la arteria y la vena separadas por unos milímetros de tejido blando. Esta zona, que se encuentra inmediatamente distal a la bifurcación de la arteria celíaca en la SpA y la LGA, se ha identificado como el punto de interfase óptimo para los siguientes estudios funcionales. En esta localización, el diámetro de la SpA es de 1,5-3 mm en el animal de 30 kg; de 2-4 mm en el animal de 60 kg y de 5-8 mm en el animal de 110 kg.

El SpN consiste en un plexo de fibras que discurren a lo largo de la SpA hacia el hilio esplénico. Es difícil establecer el origen de estos nervios, aunque pueden observarse fibras que surgen del GC que está situado inmediatamente caudal a la bifurcación de la arteria celíaca en la SpA y la LGA. Los datos de estudios anteriores realizados principalmente en roedores, establecieron que la mayor parte del SpN se origina en los ganglios celíacos y suprarrenales. Esto aún no se ha demostrado en especies animales de gran tamaño.

En especies de roedores, se han descrito otros nervios que inervan el bazo además del SpN periarterial; más específicamente, se ha descrito un nervio apical dentro del ligamento gastroesplénico de ratas y ratones. Se trata de un nervio simpático (TH+) que posiblemente se origina en los nervios simpáticos paravertebrales, y discurre hacia el ápex del bazo dentro del ligamento gastroesplénico.

Todas las mediciones histológicas se presentan en la Tabla 1. La distancia SpN-SpA fue la única medición significativamente mayor en los cerdos de 45 kg frente a los de 22 kg (en las localizaciones SpA media y distal; $P < 0,001$); por lo tanto, para todas las demás medidas, se combinaron los datos de todos los cerdos para el análisis estadístico. Hubo una reducción en el número de fascículos nerviosos periarteriales a lo largo de la SpA de proximal a distal; hubo un número estadísticamente significativo de fascículos en la bifurcación frente a todas las demás localizaciones ($P < 0,0001$). En el hilio esplénico, los fascículos nerviosos eran significativamente mayores que en las demás localizaciones ($P < 0,0001$). El diámetro externo de la SpA fue significativamente mayor en la localización proximal de la SpA que en las localizaciones media y distal de la SpA ($P = 0,0162$ y $P = 0,0158$, respectivamente). La distancia SpN/SpA también disminuyó de proximal a distal; en los cerdos de 45 kg, la distancia fue significativamente mayor en la bifurcación frente a todas las demás localizaciones ($P < 0,001$). También en los cerdos de 45 kg, la distancia SpN/SpA fue significativamente mayor en el Hilio que en las localizaciones SpA proximal, media y distal ($P < 0,008$).

La distribución del SpN circunferencial fue significativamente más alta en la localización de la SpA proximal que en las localizaciones de la SpA media y distal ($P = 0,02$ y $P = 0,15$, respectivamente). Además, los fascículos estaban distribuidos de manera más uniforme alrededor de la SpA en la localización proximal, mientras que en las localizaciones media y distal de la SpA, el patrón de distribución era más bimodal, con una agrupación de fascículos en lados opuestos de la arteria.

En el cerdo, los nervios se encuentran a lo largo de las arterias gástrica corta y gastroepiploica dentro del ligamento gastroesplénico (Figura 4). Estos nervios parecen ser una continuación del plexo del SpN periarterial principal y se dirigen hacia (o desde) el estómago. En esta localización se realizó un análisis inmunohistoquímico y se descubrió que el SpN en cualquier localización es TH+ y ChAT-. Curiosamente, a lo largo del plexo nervioso principal del SpA se identificaron fibras nerviosas positivas para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), usado comúnmente como marcador neuronal aferente.

El número de fascículos nerviosos y el tamaño de los fascículos observados en estas dos regiones es mucho menor en comparación con los observados a lo largo de la SpA principal. En las Figuras 4E y 4F se muestra la cuantificación del número y diámetro relativo de los fascículos nerviosos a lo largo de la SpA principal y a lo largo de

las otras ubicaciones anatómicas diferentes en cerdos de granja de 45-50 Kg.

Tabla 1: Mediciones histológicas de SpN y SpA en 12 cerdas hembra.

		Ubicación				
		Bifurcación	SpA proximal	SpA media	SpA distal	Hilio
Distancia SpN-SpA ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	22 kg, n = 6	N / A	437,5 \pm 344,3	180,3 \pm 111,6	161,4 \pm 105,4	N / A
	45 kg, n = 6	1185 \pm 616,2*	476,9 \pm 334,1	284,6 \pm 166,4 [‡]	382,9 \pm 247,4 [‡]	592,7 \pm 354,2
Número medio de fascículos \pm SD		105,8 \pm 32,7*	41,6 \pm 16,5	29,5 \pm 5,1	27,7 \pm 5,6	23,8 \pm 1,4
Diámetro medio de Feret (μm) \pm SD		144,8 \pm 100,6	160,3 \pm 108,0	142,8 \pm 89,7	157,7 \pm 98,7	228,2 \pm 157,9*
Diámetro interno de SpA (μm) \pm SD		1020,0 \pm 440,2	1163,8 \pm 351,9	904,2 \pm 304,1	690,7 \pm 201,6	
SpA Diámetro externo (μm) \pm SD		2020,7 \pm 560,0	2255,4 \pm 479 ^Δ	1791,6 \pm 386,8	1574,2 \pm 296,9	
Distribución circunferencial neuronal (% \pm SD)			93,6 \pm 9,8 ^Δ	76,6 \pm 19,0	73,8 \pm 16,1	

* Significativamente mayor en los cerdos de 45 kg que en los de 22 kg. [‡] Significativamente diferente de todas las demás localizaciones. ^Δ Significativamente diferente de la SpA media y distal. Significancia P < 0,05. N/A: No disponible

Análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos adicionales demostraron que el SpN está compuesto por >99,9% de fibras no mielinizadas. De hecho, la tinción con azul de toluidina de secciones semifinas no mostró axones mielinizados. En consonancia con esto, la tinción para la proteína básica de la mielina (MBP) reveló un número muy pequeño de axones positivos (<0,01%). Ambas técnicas de evaluación de la mielinización revelaron una ausencia casi completa de mielina en las secciones investigadas del SpN, como se ilustra en la Figura 5.

Análisis

El análisis histológico realizado aquí demostró que el SpN constituye un plexo neurovascular a lo largo de la SpA principal, así como de arterias gástricas y gastroepiloicas cortas. El número de fascículos es inesperadamente elevado. Considerando el tamaño medio de un axón de SpN (aprox. 2 μm de diámetro) es posible calcular que el plexo del SpN debe contener (como máximo) un total de unos 150K axones a nivel de la SpA principal (sección media). Parte de estos axones inervarán el endotelio de la SpA y parte de estos axones entrarán en el bazo y formarán conexiones sinápticas con músculos lisos o células inmunes a nivel de la zona marginal entre la pulpa blanca y roja así como dentro de la pulpa blanca como se ha descrito previamente en otras especies [23,24,25,26,27]. El número de axones parece elevado si se considera que el nervio vago humano (que tiene el mismo tamaño que el nervio vago porcino), que se dirige a varios órganos del cuerpo, se supone que contiene aproximadamente 100 k axones. El elevado número de axones en el SpN podría estar relacionado con el tamaño del bazo en el cerdo, que tiene un volumen aproximadamente 2-3 veces mayor que el bazo humano, y la longitud de la arteria que se supone que inerva el SpN. El número de fascículos y axones en el SpN humano podría ser diferente.

También se cree que el bazo de los cerdos (y de otros mamíferos, como los perros) contiene una mayor proporción de células musculares lisas en comparación con el bazo humano [28]. Sin embargo, varios trabajos han demostrado también que el bazo humano es capaz de contraerse en condiciones de estrés, como la apnea y el ejercicio físico [29,30].

La organización vascular de la arteria y la vena esplénicas es ligeramente diferente entre los cerdos y los humanos. En el cerdo, la SpA y la SpV discurren en estrecha aproximación hacia y desde el bazo. Además, la SpV y la SpA no presentan asas o circunvoluciones como los observados en los humanos. Por lo tanto, sólo un segmento corto (de aproximadamente 1-1,5 cm) de la SpA, cercano al punto de trifurcación de la arteria celíaca, se separa mejor de la SpV. Este segmento de la arteria se eligió como mejor punto de intervención en los estudios de estimulación mencionados anteriormente. El acceso al haz neurovascular en esta localización es, de hecho, más seguro, reduciendo por tanto las posibilidades de dañar los nervios, así como la arteria y la vena, durante las disecciones.

Estudio 2: Estimulación eléctrica del nervio arterial esplénico

Materiales y métodos

Para la caracterización histológica y electrofisiológica del nervio esplénico se usaron un total de 8 cerdos (peso corporal entre 40-50 Kg).

El día del experimento, se sedó al animal con ketamina (1,5 mg/kg) y midazolam (0,5 mg/kg) administrados mediante inyección intramuscular. Se colocó un catéter intravenoso en una vena auricular y se indujo la anestesia mediante propofol (2 mg/Kg) administrado por vía intravenosa. Se colocó un tubo endotraqueal, y la anestesia se mantuvo con sevoflurano inhalado combinado con infusión a velocidad continua (CRI) de fentanilo (0,2 µg/Kg/min).

Después de la inducción de la anestesia general, se colocó al animal en decúbito dorsal para la colocación de catéteres yugulares bilaterales y un catéter arterial femoral bajo guía ultrasonográfica. Los animales que se sometieron a implantación de manguito SpN se colocaron en decúbito lateral derecho.

El enfoque quirúrgico para la implantación del manguito SpN fue el siguiente. Se apoyó la unión toracolumbar y se elevó ligeramente usando un saco de arena. Después de la preparación quirúrgica adecuada (recorte y lavado aséptico con gluconato de clorhexidina y alcohol), se cubrió asépticamente el costado izquierdo exponiendo una zona de 20x25 cm centrada en la penúltima costilla. Se hizo una incisión cutánea de 15 cm en el penúltimo espacio intercostal usando un electrocauterio monopolar. Se continuó la incisión a través de los tejidos subcutáneos y la musculatura intercostal hasta exponer el peritoneo. Se colocaron dos retractores costales Finochietto retroperitoneales, teniendo cuidado de enganchar las costillas. Durante los minutos siguientes, los retractores se abrieron gradualmente, con lo que quedó expuesto el abdomen lateral izquierdo, que medía aproximadamente 10x8 cm. Las hojas de los retractores se cubrieron con esponjas de gasa empapadas en carboximetilcelulosa (CMC). Se practicó una incisión longitudinal en el peritoneo y se suturó a la piel (Vicryl 2-0; patrón de sutura entrelazada de Ford) que cubriría las hojas de los retractores para minimizar el riesgo de desgarros esplénicos durante la manipulación. Usando una manipulación digital cuidadosa, se exteriorizó el bazo y se identificó la arteria esplénica (SpA) a lo largo de su superficie visceral. En la parte media del bazo, proximal a la SpA que se ramifica en la arteria gastroepiploica izquierda, se diseccionó cuidadosamente un segmento corto de la SpA libre del tejido blando circundante para colocar una sonda de flujo ultrasónico de 1 mm (Transonic). Después de la colocación de la sonda, el bazo se recolocó en el abdomen.

Mediante una ligera rotación de la base visceral esplénica hacia el operador, y ejerciendo una suave tracción ventral sobre el bazo, se seccionó el ligamento gastroesplénico en el hilio esplénico usando unas tijeras de Metzemaum, exponiendo la SpA. Se siguió la arteria en dirección dorsal hasta su origen (es decir, la bifurcación de la arteria celíaca en la arteria gástrica izquierda (LGA) y la SpA). Inmediatamente distal a esta bifurcación, se aisló circunferencialmente mediante disección roma usando unas tijeras de Metzemaum un segmento de aproximadamente 1 cm de la SpA con la red periarterial del SpN intacta. Se insertó una pinza de arteria Mixter curva bajo la arteria de caudal a craneal, agarrando un colgajo del manguito CorTec de 2,5 mm de diámetro introducido en el campo quirúrgico usando pinzas de microdisección rectas. El manguito se colocó alrededor de la SpA y la red periarterial intacta de SpN invirtiendo el movimiento de las pinzas Mixter, teniendo cuidado de poner los dos colgajos del manguito una vez colocados correctamente. A continuación se liberó la tensión sobre el bazo y la arteria. Se comprobaron las lecturas del flujo sanguíneo de la SpA la spV (vena esplénica) y, por último, se cerraron parcialmente los retractores costales y se cubrió la incisión expuesta con esponjas de gasa empapadas en solución salina.

También se llevaron a cabo experimentos electrofisiológicos. Éstos generalmente implicaban la disección y la colocación de un manguito (usando un manguito CorTec bipolar o tripolar de 500 µm de diámetro) en uno o varios fascículos discretos del SpN unos pocos centímetros distales (más cerca del bazo) al manguito de estimulación para permitir el registro del potencial de acción compuesto evocado (eCAP) durante la estimulación de todo el plexo del SpN o de unos pocos fascículos (véase la Figura 5). Asimismo, se realizaron diferentes combinaciones de bloqueo de la señalización neuronal (por ejemplo, usando administración tópica de anestesia local o transección del fascículo del SpN), tanto en sentido ascendente como en sentido descendente del sitio de estimulación.

Los eCAP registrados se amplificaron y filtraron (100-1000 Hz) usando un amplificador de CA de microelectrodos de 2 canales 1800 (sistema A-M). La actividad nerviosa se monitorizó continuamente usando un osciloscopio y se registró en un ordenador usando un sistema de adquisición PowerLab de 16 canales (AD Instruments) y el software LabChart 8 usando una frecuencia de muestreo de 20 kHz. En general, los eCAP se promediaron (8-10 pulsos) y se cuantificó el pico a pico o el área bajo la curva (AUC) de la respuesta promediada. La velocidad de conducción de los componentes eCAP del SpN se calculó a partir de la distancia entre el sitio de estimulación y el de registro y la latencia de la señal eCAP.

Durante toda la cirugía se monitorizaron el electrocardiograma (ECG), la frecuencia cardíaca (HR), la presión arterial, la frecuencia respiratoria (RR), la pulsioximetría, la capnografía y la espirometría. La temperatura corporal se registró continuamente con una sonda intranasal. Se analizaron los gases de la sangre arterial durante todo el experimento para monitorizar los niveles de pH, glucosa, pO₂ y pCO₂, K⁺. Todos los parámetros fisiológicos, así como el nivel de sevoflurano usado, se registraron (cada 5-10 minutos) en la hoja de registro. Los datos fisiológicos también se digitalizaron usando el sistema de adquisición Powerlab y el software LabChart. En general, todos los parámetros se muestrearon a una frecuencia de entre 0,1 y 2 kHz.

La profundidad de la anestesia se evaluó mediante el reflejo palpebral, el reflejo corneal, la posición medioventral del globo ocular y el tono mandibular.

Además, se usaron parámetros fisiológicos y un sistema de monitorización del índice biespectral (niveles entre 30 y 60) para ajustar los niveles anestésicos. En algunos casos, se usaron bolos de propofol.

5 En algunos casos se usó la ultrasonografía intraoperatoria del bazo para monitorizar en tiempo real los cambios del flujo sanguíneo de la SpA durante la estimulación del SpN. Para este procedimiento se usó una sonda intraoperatoria (transductor lineal intraoperatorio iL2L-RS de 4-10 MHz, huella de 29x10 mm, campo de visión de 25 mm; GE Vivid-i).

10 Los cambios en el flujo sanguíneo de la SpA se evaluaron mediante Doppler color y trazado espectral de onda continua. Después de la identificación mediante Doppler color de la SpA dentro del parénquima esplénico 2-3 cm distal al hilio esplénico, se obtuvo un trazado espectral de onda continua del flujo de la SpA dirigiendo los cursores de ventana al centro de la luz de la SpA. Después de obtener una señal representativa, la sonda ultrasonográfica y la ventana de cursores se dejaron en posición mientras se iniciaba la estimulación del SpN.

15 Todos los análisis estadísticos se realizaron con software estadístico comercialmente disponible (JMP Pro 13.0.0 o GraphPad Prism 5.0).

20 Resultados

El registro del eCAP generado durante la estimulación del SpN, ya sea de todo el plexo del SpN con el manguito periarterial, o la estimulación de unos pocos fascículos con un manguito más pequeño, generó un eCAP con una latencia específica dependiente de la distancia entre los sitios de estimulación y registro (Figura 5B). En la Figura 5C se muestra el intervalo de velocidades de conducción de los diferentes componentes del eCAP. La estimulación de todo el plexo o de unos pocos fascículos generó un eCAP con una velocidad media inferior a 1 m/s (Figura 5C). Esta velocidad de conducción está en consonancia con los descubrimientos histológicos en los datos de caracterización a continuación que describen el SpN como un nervio no mielinizado. En las Figuras 5D y 5E (respectivamente) se muestra la relación entre la amplitud de la corriente y la duración del pulso necesario para provocar un eCAP estimulando todo el plexo o unos pocos fascículos. Al estimular todo el plexo con un manguito periarterial, el umbral de la respuesta nerviosa se situó entre 7,692 y 15,58 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$. Al estimular unos pocos fascículos diseccionados con un manguito más pequeño, el umbral se situó entre 5,796 y 11,594 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$. En ambos casos, el valor umbral de la densidad de corriente para el registro de eCAP fue menor con una anchura de pulso (PW) más corta.

35 La estimulación bifásica del SpN durante 1 minuto a 10 Hz y 400 μs PW por encima de un umbral de corriente específico provocó sistemáticamente una reducción transitoria del flujo sanguíneo dentro de la SpA distal, medida mediante una sonda de flujo perivascular. Había una clara relación de respuesta a la dosis entre la corriente suministrada y la reducción del flujo: cuanto mayor era la amplitud, mayor era la reducción observada del flujo sanguíneo (Figura 6A). El umbral de cambio del flujo sanguíneo, definido como un cambio del 5% en el flujo sanguíneo medio de la SpA (mSpA BF) en comparación con el valor de referencia previo a la estimulación, se observó a alrededor de 4,5 mA (con una amplitud de pulso de 400 μs) y a alrededor de 12 mA (con una amplitud de pulso de 200 μs) (Figuras 6B y 6C). Al calcular la densidad de carga por fase del umbral para provocar cambios en el flujo sanguíneo, el valor fue muy similar: alrededor de 13,8 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$ a 400 μs y 18,46 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$ a 200 μs . La estimulación con 12 mA y 400 μs PW (36,9 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$) provocó una reducción media máxima del BF en la SpA de alrededor del 40% con respecto a los valores de referencia.

45 Paralelamente, se registró el flujo sanguíneo dentro de la SpV usando una sonda de flujo Doppler colocada en la base esplénica, donde la vena sale del hilio esplénico. Curiosamente, la estimulación (pulsos bifásicos simétricos, 400, 10 Hz durante 1 minuto) provocó un aumento del flujo sanguíneo medio de la SpV (mSpV BF) que dependía de la amplitud de la corriente. La estimulación con 12 mA y 400 μs PW (36,9 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$) provocó un aumento máximo de aproximadamente el 200% en comparación con el mSpV BF de referencia. La reducción transitoria del mSpA BF también se acompañó de un aumento transitorio de la presión arterial media sistémica (sMABP). Este aumento (de media entre 1-6 mmHg) con respecto al valor de referencia se correlacionó de nuevo con la intensidad de la estimulación (Figura 6E). Se observaron cambios consistentes en la sMABP con estimulaciones que provocaban una caída del 20-30% en el flujo de la SpA. Por el contrario, la HR sólo se vio afectada mínimamente (cambios <3 bpm, ya sea aumento o disminución), pero de manera más consistente sólo con amplitudes de estimulación elevadas (>45 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$ provocando cambios de 3-10 bpm) (Figura 6G). La estimulación del SpN no afectó a la frecuencia respiratoria (RR) en las condiciones probadas.

60 Los cambios observados en mSpA BF, sMABP, HR, RR durante una estimulación de 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 10 Hz, 400 μs PW) a diferentes amplitudes de corriente (1-50 mA, correspondientes a 3,076-153,8 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$) se resumen en la Figura 6F. En la Figura 6F se puede observar cómo la magnitud de estos cambios se correlacionó con el registro de un eCAP (línea negra y círculos) del SpN. Cuanto mayor era el número de fibras reclutadas (medido como % de eCAP sobre la respuesta máxima registrada) más fuerte era la reducción del mSpA BF y los otros cambios asociados.

65

La estimulación directa de haces discretos de SpN diseccionados de la SpA (usando un manguito de 500 μm de diámetro) evocó cambios similares en el mSpA BF, la sMABP y la HR. Estos cambios, que se produjeron durante 1 minuto (pulsos bifásicos simétricos, 1 Hz, 400 μs PW) y diferentes amplitudes de corriente (0,1-2,5 mA, correspondientes a 3,86-96,61 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$), se resumen en la Figura 6G. Incluso en este caso, los cambios asociados dependían de la proporción de fibras (eCAP mostrada en negro) reclutadas por la estimulación. El eCAP máximo (y, por tanto, los cambios máximos) se obtuvo a aproximadamente 153 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$ al estimular todo el plexo y a aproximadamente 70 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$. La magnitud de los cambios al estimular pocos fascículos fue menor que la obtenida al estimular todo el plexo, como era de esperar ya que el número total de fibras estimuladas fue menor y la frecuencia fue menor.

Los cambios del flujo sanguíneo en la mSpA también se vieron afectados por diferentes frecuencias de estimulación. Al estimular (pulsos bifásicos simétricos, 400 μs PW durante 1 minuto a unos 36,9 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$) a diferentes frecuencias (entre 0,25 y 100 Hz), 30-50 Hz provocaron de manera fiable la mayor reducción del flujo sanguíneo en la SpA (Figura 7A). Por encima de 50 Hz (entre 70 y 100 Hz), la reducción del BF fue de hecho menor, en el intervalo de las reducciones obtenidas con una estimulación de 10 Hz (Figura 7B). También se observó que los cambios en la mSpV BF, la sMABP y la HR dependían de la frecuencia de la estimulación aplicada. Los efectos más fuertes se observaron de nuevo entre 30 y 50 Hz (Figuras 7C a 7D).

Esto se observó una vez más cuando se estimulaba al máximo (alrededor de 70 $\mu\text{C}/\text{cm}^2/\text{fase}$) sólo unos pocos fascículos diseccionados de la arteria. A frecuencias más bajas (1 Hz y menores) se produjo una mayor reducción del mSpA BF, debido al mayor reclutamiento de fibras nerviosas en comparación con la amplitud de estimulación utilizada para todo el plexo durante el análisis de frecuencias. Sin embargo, la reducción máxima se observó entre 30-50 Hz (Figura 8).

Para confirmar adicionalmente que los cambios observados en el SpA BF se debían a la activación neuronal directa (y no a la estimulación de los músculos lisos), se aplicó lidocaína (solución de clorhidrato de lidocaína al 2%) localmente alrededor del manguito de SpN implantado (ya fuera el manguito periarterial o el manguito de los fascículos diseccionados). La lidocaína es un bloqueador específico de los canales rápidos de Na^+ activados por voltaje. La lidocaína fue capaz de bloquear los cambios en el SpA BF. Además, la oclusión mecánica de la SpA, capaz de reducir el BF hasta un 80%, no provocó ningún cambio en sMABP o HR. Además, la transección del extremo central del SpN (proximal al manguito) no abolió los efectos de la estimulación sobre el flujo sanguíneo de SpA, la sMABP y la HR. Tampoco la transección del SpN dentro de los segmentos GEP y SG evitó estos cambios. Curiosamente, todos estos efectos sólo se suprimieron cuando se cortó el extremo periférico del SpN (distal al manguito). Todos estos datos sugieren que los cambios en el SpA BF y el SpV BF estaban impulsados por las neuronas y relacionados con la constricción de la SpA, así como con la contracción de la cápsula del bazo. Por otro lado, los cambios en la sMABP y la HR probablemente no se debieron a la activación de una vía neuronal hacia el cerebro, sino al aumento del flujo de salida de sangre del bazo hacia el corazón.

En unos pocos animales, los cambios en el flujo sanguíneo de la SpA durante la estimulación también se monitorizaron usando ultrasonografía intraoperatoria en el hilio esplénico. Después de identificar la SpA mediante Doppler color, se monitorizó el cambio en el BF como señal Doppler, como se muestra en la Figura 9. Durante la estimulación a 10 Hz se pudo observar fácilmente una reducción del BF, como indicaba el cambio de amplitud y forma de los trazos de flujo.

Análisis

La estimulación del nervio esplénico se asoció a cambios locales transitorios en el mSpA BF y el mSpV BF, así como a contracción esplénica. Estos cambios se debieron a la activación directa del SpN, más que a la estimulación directa de los músculos lisos de la SpA. La contracción esplénica durante la estimulación del SpN se ha descrito anteriormente también en otras especies [16]. El cambio observado en el mSpA BF fue muy consistente entre animales. La variación se debió probablemente principalmente al diferente ajuste del manguito alrededor del plexo del SpN en los distintos animales. Los cambios en el SpA BF pudieron monitorizarse fácilmente mediante ultrasonidos no invasivos y, por lo tanto, podrían usarse como marcador para evaluar la estimulación eficaz del SpN también en un entorno clínico.

Se demostró que los cambios transitorios observados durante la estimulación del SpN dependían de la amplitud y la frecuencia. Durante un minuto de estimulación a diferentes amplitudes de corriente, la mayor reducción del mSpA BF se observó a la amplitud de corriente más alta probada, que también correspondía al pico del eCAP registrada. Esto era cierto cuando se estimulaba todo el plexo del SpN (con un manguito periarterial) o cuando se estimulaban sólo unos pocos fascículos colocados dentro de un manguito más pequeño. La diferencia en la densidad de carga total necesaria para obtener la máxima eCAP del plexo del SpN y de los fascículos del SpN podría explicarse por la cobertura parcial del plexo con el manguito de 2,5 mm usado. De hecho, en la mayoría de los cerdos este manguito sólo proporcionó una cobertura circunferencial de 270-300 grados. Cuando se usó un manguito con sólo unos pocos fascículos del SpN diseccionados de la arteria, la cobertura fue casi total. Por lo tanto, para limitar la

densidad de carga necesaria para obtener un reclutamiento óptimo de los fascículos del SpN, será necesaria una cobertura circunferencial óptima de la arteria.

Los cambios más fuertes (en mSpA BF y sMABP) se observaron a frecuencias comprendidas entre 30 y 50 Hz. Aunque el número total de pulsos administrados podría ser un factor importante a la hora de determinar la magnitud de estos cambios, es cierto que cuando se comparan los cambios que se producen con el mismo número de pulsos administrados a diferentes frecuencias, el intervalo de 30-50 Hz sigue provocando los cambios más fuertes. Esto podría explicarse con los datos informados con anterioridad que muestran que la máxima liberación de NA del bazo del gato se observó a 30 Hz [17,18]. La mayor liberación de NA podría explicar la mayor magnitud de los cambios observados en este intervalo de estimulación.

Estudio 3: Efectos de la electroestimulación en un modelo animal in vivo de LPS

Materiales y métodos

Animales

Para esta sección del estudio se usaron un total de 18 cerdos (sobre los 38 iniciales) (edad/peso). No se excluyó a ninguno de estos 18 cerdos del análisis.

Diseño general

Tres horas después de las estimulaciones iniciales realizadas como parte de otro objetivo del estudio, 18 animales recibieron una inyección intravenosa de 2,5 µg/kg de endotoxina (lipopolisacáridos purificados de la membrana celular de *Escherichia coli* O111:B4; Sigma Aldrich), administrada durante un periodo de 5 minutos. Esta dosis se seleccionó tras una revisión exhaustiva de la bibliografía disponible y de experiencias personales. Esta dosis se eligió para provocar un tipo de modelo de shock séptico. Los animales que recibieron estimulación del SpN 3 horas antes de la inyección de LPS se dividieron en 2 grupos: los de SpNS no recibieron ninguna estimulación adicional, mientras que los de SpN2S recibieron una segunda estimulación del SpN durante la inyección de LPS.

Los parámetros de estimulación incluyen una duración de 1 minuto, con pulsos simétricos cuadrados, bifásicos, de carga equilibrada a 10 Hz, con una duración de pulso de 400 µs y una amplitud de corriente correspondiente a una densidad de carga por fase de 30 a 90 µC/Cm²/fase. La estimulación se aplicó una vez y se repitió una segunda vez 3 horas más tarde en el momento en que se inyectó LPS in vivo.

Se recogió sangre venosa periférica inmediatamente antes de la inyección de LPS (valor de referencia) y, a continuación, cada media hora hasta 2 horas después de la inyección. Al final de este intervalo de tiempo, los cerdos se sacrificaron o se usaron para otras pruebas electrofisiológicas finales. Para todos estos puntos temporales, se realizaron análisis de citoquinas (TNFα e IL-6) y análisis hematológicos y bioquímicos rutinarios. El suero se diluyó 1:10 para los análisis de citoquinas.

En los animales en los que la inyección de LPS provocó cambios clínicos en la presión arterial sistémica y/o la función cardíaca, se administraron terapias clínicas estándar como vasopresina (inyecciones en bolo de 2,5 IU administradas i.v. y repetidas según fuera necesario) y fármacos antiarrítmicos (lidocaína; 2mg/kg i.v. y/o atropina; 40µg/kg; i.v.) a discreción del anestesiista. Los animales se sacrificaron cuando la presión arterial sistémica media no pudo mantenerse >40 mm Hg, o cuando el animal completó el criterio de valoración predeterminado.

Análisis estadísticos

Todos los análisis se realizaron con software estadístico comercialmente disponible (JMP Pro 13.0.0). Se inspeccionaron visualmente las variables continuas en busca de normalidad y valores atípicos. Cuando se identificaron valores atípicos, se realizaron pruebas estadísticas incluyendo y excluyendo estos animales como se indica en la sección de resultados.

Los cambios en los niveles de citoquinas y leucocitos se calcularon como porcentaje de las muestras de referencia recogidas inmediatamente antes de la inyección de LPS. Los niveles de citoquinas y leucocitos se analizaron posteriormente usando un modelo mixto con el grupo de estimulación, el tiempo y el grupo de estimulación*tiempo como efectos fijos, y el animal como efecto aleatorio. Para el análisis post hoc se usaron pruebas t de Student por pares. Las diferencias en el tiempo de supervivencia entre los grupos de estimulación se analizaron usando la prueba de Rangos Logarítmicos y se representaron en un gráfico de Kaplan Meier. Se compararon los niveles de citoquinas, leucocitos y electrolitos entre los distintos grupos de tratamiento a los 30 minutos de la inyección de LPS mediante un análisis ANOVA de dos vías con análisis Post Hoc de la prueba t de Student de todos los pares; esta prueba también se usó para comparar la reducción máxima de la presión arterial media entre los grupos. La significancia estadística se definió como $P < 0,05$.

Resultados

Supervivencia

5 La administración de una dosis elevada de LPS provocó un cambio rápido de la presión arterial sistémica en el plazo de los 5-10 minutos posteriores a la administración del LPS. En los animales simulados (no estimulados) estos cambios fueron más fuertes y rápidos. Muchos animales necesitaron intervenciones (por ejemplo, inyección de vasopresina) para mantener niveles seguros de presión arterial (ABP media > 40 mmHg). Sin embargo, en la mayoría de los animales la intervención no fue suficiente para restablecer niveles seguros de ABP y los animales requirieron eutanasia. Además, unos pocos animales mostraron taquiarritmia y taquicardia grave. Los animales estimulados (especialmente los que recibieron 2 estimulaciones del nervio esplénico) mostraron cambios de menor magnitud y una respuesta cardiovascular más estable. En la tabla 2 se resumen los eventos registrados después de la administración de LPS en animales estimulados y simulados.

15 La Tabla 2 describe los cambios cardiovasculares después de la administración de LPS. La tabla muestra los cambios en la presión arterial media (MABP) observados en los animales después de la administración de LPS, y el tratamiento administrado a cerdos individuales. El tiempo representa el tiempo después de la inyección de LPS. MASS = masaje torácico externo (cardíaco); VAS = administración de vasopresina (2,5 µg/kg i.v.); ATR = administración de atropina; LID = administración de lidocaína; Time Eut = tiempo (minutos) desde la administración del LPS hasta la eutanasia; el criterio de valoración predeterminado fue a los 120 minutos.

Tabla 2.

Grupo	Cerdo Nº	Cambios en MABP	Anomalías cardíacas	MASS	VAS	ATR	LID	Tiempo Eut
Simulado	1	Hipotensión grave a los 10 min	Taquicardia grave	20 min	20 min			30 min
	2	Hipotensión grave a los 10 min	Taquicardia grave	20 min	10 min			20 min
	3	Hipotensión moderada a los 20 min Hipotensión grave a los 80 min	Taquiarritmia	-	20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 min.			80 min
	4	Hipotensión grave a los 10 min	-	-	10 min	20 min	20 min	30 min
	5	Hipotensión grave a los 10 min	Taquiarritmia	20 min	10, 20 min	20 min		25 min
	6	Hipotensión moderada a los 90 min	Taquicardia grave	-	90 min			120 min
SpNS	1	Hipotensión moderada a los 100 min	Taquiarritmia	-	100 min		100	120 min
	2	-	-	-	-	-	-	120 min
	3	Hipotensión a los 20 min	-	-	20 min	-	-	120 min
	4	Hipotensión grave a los 20 min	-	-	20 min	-	-	30 min
	5	Hipotensión grave a los 20 min	-	-	20 min	-	-	40 min
	6	-	-	-	-	-	-	120 min
SpN2S	1	Hipotensión moderada a los 20 min; Normotensión a los 60 min	-	-	20, 30 min	-	-	120 min
	2	-	-	-	-	-	-	120 min
	3	-	-	-	-	-	-	120 min
	4	-	-	-	-	-	-	120 min
	5	Hipotensión grave a los 20 min	Taquiarritmia	30 min	20 min	30 min	30 min	40 min
	6	-	-	-	-	-	-	120 min

55 En la Figura 10A y en la Figura 11A se muestra la tasa de supervivencia a las 2 horas después de la inyección. Hubo una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de supervivencia entre el SpN-T frente a Simulado (P =

0,0194). Brevemente, la inyección de LPS provocó un compromiso cardiovascular grave en un plazo de 10-20 minutos en 5/6 animales simulados, lo que hizo necesaria la eutanasia (MAP < 40 mm Hg a pesar del tratamiento) antes de alcanzar el criterio de valoración predeterminado. Por el contrario, en 5/6 animales estimulados con SpN-T y 4/6 animales estimulados con SpN-P, los parámetros vitales, incluyendo la presión arterial media, se mantuvieron estables durante todo el periodo experimental; para estos grupos, la MAP a las 2 horas tras la inyección fue de $95,3 \pm 13,5$, $85,9 \pm 7,5$ y $86,8 \pm 9,7\%$ de los valores de referencia, respectivamente. De igual manera, hubo una diferencia estadísticamente significativa en la reducción máxima en MAP entre el grupo SpN-T frente al Simulado ($P = 0,0296$, Figura 10B y Figura 11B); la MAP media en el momento de la eutanasia fue del $87,1 \pm 23,5\%$ de los valores de referencia en el grupo SpN-T (tiempo medio de supervivencia $1,8 \pm 0,5$ horas tras la inyección); $62,7 \pm 33,0\%$ del valor de referencia en el grupo SpN-P (tiempo medio de supervivencia $1,4 \pm 0,8$ horas tras la inyección); y $48,6 \pm 37,9\%$ del valor de referencia en el grupo Simulado (tiempo medio de supervivencia $0,9 \pm 0,7$ horas tras la inyección).

Cuantificación de citoquinas: En todos los grupos, la inyección de LPS dio como resultado un aumento significativo de los niveles de TNF α en todas las muestras posteriores a la inyección en comparación con el valor de referencia ($P < 0,001$; Figura 10C a 10D y Figura 11C a 11D), la respuesta máxima observándose 1 hora después de la inyección. La IL-6 fue significativamente mayor a las 2 horas después de la inyección en comparación con el valor de referencia en todos los grupos ($P < 0,0001$).

Al comparar los niveles de citoquinas a las 0,5 horas tras la inyección, los niveles de TNF α , así como los de IL-6, no mostraron diferencias significativas entre los grupos simulado y estimulado (Figuras 10D, 11C y 11D).

Análisis

La administración de LPS *in vivo* para imitar una respuesta inflamatoria proporcionó un buen modelo para probar la eficacia del SpN. La administración de LPS ($2,5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal) en cerdos de 45-50 kg provocó una regulación por incremento de las citoquinas (TNF α e IL-6) en la sangre de todos los animales analizados. En particular, el TNF α alcanzó un valor máximo de aproximadamente $12 \text{ ng}/\text{ml}$ a la 1h después de la inyección mientras que la IL-6 recogió alrededor de $15 \text{ ng}/\text{ml}$ a las 2h después de LPS. El LPS también provocó cambios significativos en la composición de la sangre periférica, con una reducción de los linfocitos y neutrófilos circulantes (resultados no mostrados). De hecho, es probable que los glóbulos blancos abandonen la circulación para infiltrarse en tejidos y órganos durante la infección sistémica imitada por el LPS. También se observó un aumento significativo de la urea, la creatinina y la bilirrubina total en sangre, así como un aumento de la CK y la ALP a lo largo del tiempo después del LPS (resultados no mostrados). Todos estos cambios indicaban que el modelo era eficaz y reproducible entre animales.

Sorprendentemente, los animales simulados mostraron un fuerte descenso y muy rápido de la MABP sistémica aproximadamente a los 10-15 minutos después de la administración de LPS. Las reducciones de la MABP sistémica alcanzaron niveles que pondrían rápidamente en peligro la vida, por lo que se requirió la administración de vasopresina. Sin embargo, en la mayoría de los controles esto no fue suficiente para restaurar de manera estable una sMABP normal. Incluso cuando se realizaron inyecciones adicionales de vasopresina, tuvieron que sacrificarse 4/6 controles simulados a los 30 minutos de la inyección de LPS, ya que su sMABP no podía mantenerse por encima de 40 mmHg . A uno de los controles simulados se le practicó la eutanasia 110 minutos después de la inyección de LPS por la misma razón. En algunos casos también se observaron arritmias.

Por el contrario, la mayoría de los animales que fueron estimulados (a las -3h o a las -3h y 0h, con respecto al LPS) no mostraron cambios tan fuertes en la sMABP. La mayoría de ellos no requirió ninguna intervención farmacológica (es decir, vasopresina). Sin embargo, este efecto pro-supervivencia de la estimulación con SpN no podía explicarse por una disminución de la concentración de citoquinas inducida por LPS. De hecho, el TNF α y la IL-6, medidos 30 minutos después de la inyección de LPS, no se redujeron en los animales estimulados en comparación con los animales simulados. Por lo tanto, aunque este modelo demostró que la estimulación del SpN es capaz de modular la respuesta a un estímulo inflamatorio, esto no puede explicarse simplemente por una reducción de la respuesta inflamatoria. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que como la mayoría de los controles tuvieron que sacrificarse en el plazo de 30 minutos después de la administración de LPS, no se pudo realizar una comparación adicional de los niveles de citoquinas (a 1, 1,5 y 2h post LPS) entre los animales estimulados y los simulados. Por lo tanto, es posible que se haya observado una diferencia en los niveles de citoquinas en puntos temporales posteriores, donde el TNF α y la IL-6 alcanzan sus valores máximos.

Por lo tanto, los datos sugieren que el efecto pro-supervivencia se debió a la modulación de algunos otros mecanismos.

Sumario

En resumen, los inventores descubrieron que la estimulación neuronal de un nervio que irriga el bazo, y en particular, el nervio arterial esplénico, mostraba efectos pro-supervivencia en un modelo animal *in vivo* de LPS. Los inventores también descubrieron que la estimulación eléctrica de los nervios arteriales esplénicos estabilizaba la

presión sanguínea, que disminuye drásticamente en los animales tratados con LPS, y reducía la reducción máxima de la presión sanguínea. Por lo tanto, la estimulación de la actividad neuronal de los nervios esplénicos puede ser particularmente útil para el tratamiento de afecciones médicas agudas, como las afecciones potencialmente mortales que presentan cambios fisiológicos asociados con el shock y la disfunción cardiovascular (por ejemplo, traumatismos, hemorragias y shock séptico).

Estudio 4: Efectos de la electroestimulación en un modelo animal in vivo de LPS subletal

Materiales y métodos

Animales

Para esta sección del estudio se usaron un total de 8 hembras de cerdo Large white (60-70 Kg de peso corporal).

Diseño general

El día del estudio, un animal fue sedado con ketamina/midazolam. La anestesia intravenosa se indujo mediante la administración de propofol (2 mg/Kg) a través de un catéter colocado en una vena auricular (oreja). A continuación se introdujo un tubo endotraqueal en la tráquea con el propósito principal de establecer y mantener una vía aérea permeable y mantener la anestesia general usando sevoflurano transportado en una mezcla de oxígeno/aire. Después de la inducción de la anestesia general, se instrumentó al animal con catéteres invasivos en la arteria femoral y la vena yugular para monitorizar la presión sanguínea y suministrar líquidos y fármacos. A continuación, se colocó al animal en decúbito lateral derecho. Se usaron el reflejo palpebral, el reflejo corneal, la posición medioventral del globo ocular y el tono mandibular para monitorizar la profundidad estética. También se monitorizaron el nistagmo así como el lagrimeo como posibles signos de plano leve de la anestesia. Durante toda la cirugía se monitorizaron el electrocardiograma (ECG), la frecuencia cardíaca (HR), la frecuencia respiratoria (RR), la presión arterial sistémica (ABPA), la presión venosa central (CVP), la pulsioximetría, la capnografía, la espirometría y la temperatura corporal. También se instrumentó a los animales con un sistema de medición continua del gasto cardíaco (PICCO), así como con un catéter en la arteria pulmonar para medir el gasto cardíaco y la presión de enclavamiento pulmonar. Todos los parámetros fisiológicos, así como la fracción de sevoflurano inspirado, también se registraron (cada 5 minutos) en la hoja de registro, así como continuamente a través de un sistema de adquisición Powerlab y el software Labchart. Los animales fueron ventilados mecánicamente con presión positiva durante todo el procedimiento. A continuación, se accedió a la arteria y los nervios esplénicos mediante una laparotomía lateral. Se colocó un manguito a nivel de la arteria esplénica proximal para estimular los nervios esplénicos. La estimulación se aplicó durante 2 minutos a 10 Hz con un intervalo de amplitudes. Los animales simulados no recibieron ninguna estimulación. Quince minutos después de finalizar la estimulación, los animales recibieron una inyección intravenosa de 2,5 µg/kg de endotoxina (lipopolisacáridos purificados de la membrana celular de *Escherichia coli* O11LB4; Sigma Aldrich), administrada durante un periodo de 5 minutos. Esta dosis se eligió para provocar efectos cardiovasculares significativos sin shock en la ventana de 4-6 horas después de la administración de LPS. Aproximadamente 30 minutos después de la inyección de LPS se administró una segunda estimulación (o estimulación simulada).

Los parámetros de estimulación incluyen una duración de 1 minuto, con pulsos simétricos cuadrados, bifásicos, de carga equilibrada a 10 Hz, con una duración de pulso de 400 µs (por fase) y una amplitud de corriente correspondiente a una densidad de carga por fase entre 40 - 90 µC/cm².

Se recogió sangre venosa periférica inmediatamente antes de la inyección de LPS (valor de referencia) y, a continuación, cada media hora hasta 4 horas después de la inyección. Al final de este intervalo de tiempo, se sacrificó a los cerdos. Para todos estos puntos temporales, se realizaron análisis de citoquinas (TNFα e IL-6) y análisis hematológicos y bioquímicos rutinarios (incluyendo lipasas y amilasas).

El gasto cardíaco se midió de manera continua con el sistema PICCO y también antes de la inyección de LPS y a los 30 min después de LPS usando el catéter de la arteria pulmonar para obtener la presión de enclavamiento capilar pulmonar (PCWP).

Resultados

Efectos de la estimulación sobre los parámetros cardiovasculares

La administración de LPS provocó cambios significativos en la ABP, la CVP, la HRC y la ET CO₂. Curiosamente, los animales sometidos a estimulación eléctrica del nervio esplénico mostraron un cambio de menor magnitud en la ABP, la CVP y la HR (Figura 12 A y B).

La inyección de LPS también provocó un aumento significativo de la resistencia vascular pulmonar (PVR) 30 minutos después de la inyección de LPS. Sin embargo, cuando se estimuló a los animales se observó una

estabilización y reducción de la PVR (Figura 13A). Paralelamente, la estimulación provocó un aumento ligeramente mayor de la resistencia vascular sistémica (SVR) en comparación con los animales simulados (Figura 13B) y un aumento más fuerte de la PCWP (Figura 13C).

5 Por último, la inyección de LPS provocó un aumento significativo de los niveles circulantes de lipasas. Este aumento fue mucho menor en los animales estimulados con nervio esplénico (Figura 14).

Análisis

10 La estimulación del nervio esplénico en cerdos sometidos a endotoxemia (administración de dosis subletales de LPS sistémico) provocó una estabilización significativa de los cambios cardiovasculares desencadenados por el LPS. En particular, el aumento de la SVR y la reducción de la PVR podrían explicar la salida positiva en el modelo de shock séptico descrito anteriormente. Esto es paralelo a los cambios de menor magnitud en la CVP, ABP y HR después de la administración de LPS, así como a la reducción del aumento de lipasas inducido por LPS, lo que indica un menor nivel de daño orgánico y una mayor protección en comparación con los animales simulados.

DATOS HUMANOS

Estudio 5: Caracterización electrofisiológica de los nervios esplénicos humanos:

20

Materiales y métodos

Especímenes del SpN humanos

25

Se conservó un tejido fresco de un paciente donante que contenía el haz neurovascular esplénico NVB en una solución apta para trasplantes de órganos en hielo para su transporte. A su llegada, el espécimen se colocó en solución de Krebs enfriado con hielo bajo un microscopio de disección, y se separó con cuidado un mínimo de un fascículo discreto del SpN por muestra de la SpA y posteriormente se instrumentó con dos electrodos de manguito bipolares circunferenciales (0,65 mm de diámetro, 5,5 mm de longitud; CorTec GmbH) colocados aproximadamente a 30 10 mm de distancia, para evocar y registrar las CAP. La cobertura del electrodo de fascículo se estimó en un 100% en todos los implantes.

Registros

35

Se monitorizó continuamente la actividad nerviosa usando un osciloscopio, y se registró digitalmente mediante un sistema de adquisición digital 1401 y el software Spike2 (Cambridge Electronic Design Ltd), con la frecuencia de muestreo fijada en 20 kHz. Se promediaron los CAP evocados (8 pulsos) y se cuantificó la amplitud pico a pico de la respuesta promediada. La velocidad de conducción de los componentes de eCAP se calculó a partir de la distancia medida entre el sitio de estimulación y el sitio de grabación y la latencia de la señal de eCAP (medida desde el pico del artefacto de estimulación hasta el pico del eCAP).

40

Resultados

45

En comparación con las muestras porcinas, la SpA humana presentaba un curso más enrevesado, como se ha descrito anteriormente (Michels 1942). Además, el NVB esplénico estaba incrustado en grandes cantidades de tejido conjuntivo y grasa (Figura 15A), lo que dificultaba el registro de toda la circunferencia de la estructura. Sin embargo, usando un microscopio de disección, fueron visibles varios fascículos nerviosos y posteriormente se confirmaron como tales por secciones histológicas de los especímenes (Figura 15B). Después de instrumentar algunos de estos fascículos con electrodos de manguito de estimulación y registro (Figura 15A, imagen superior e inferior), la estimulación generó eCAP claros (Figura 15D, trazo superior). Para confirmar la validez del registro al final del experimento se aplastaron los fascículos entre los electrodos de estimulación y registro y se realizaron intentos para volver a registrar (Figura 15D, trazo inferior). Se obtuvieron curvas de reclutamiento típicas al aplicar estimulaciones con duraciones de pulso específicas (por ejemplo, 100, 200, 400, 800 y 1000 μ s; PW) y amplitud creciente (Figura 15E).

55

60

Las velocidades de conducción calculadas demostraron valores típicos para fibras no mielinizadas, donde el intervalo y la velocidad de conducción media fue de 0,49 m/s, en comparación con el SpN porcino (0,7 m/s) y de rata (0,72 m/s) (Figura 15F). Además, los registros de eCAP del SpN humano mostraron una relación fuerza-duración típica entre la amplitud de la corriente para el reclutamiento del nervio y la duración del pulso (Figura 15G). La regresión lineal del valor de densidad de carga calculado para el registro de umbral de eCAP mostró pendientes significativamente diferentes de cero ($P=0,0084$), con el PW más bajo (100 μ s) requiriendo 13,44 μ C/cm², y el PW más largo (2000 μ s) requiriendo 14,7 μ C/cm². Es importante destacar que la pendiente de la densidad de carga para los fascículos de SpN humanos resultó ser similar a la pendiente de la densidad de carga para los fascículos porcinos (Figura 15H). Además, el requisito de densidad de carga para la activación nerviosa de los fascículos humanos diseccionados fue aproximadamente 1,5-2 veces mayor que la densidad de carga requerida para la activación de los

65

fascículos del SpN porcinos en cualquier PW (Figura 15H).

Análisis

5 El SpN humano tiene características anatómicas, morfológicas y electrofisiológicas similares a las de otros mamíferos (porcinos y roedores). El SpN humano está compuesto por axones no mielinizados, como confirman las velocidades de conducción. Por lo tanto, cabe suponer que los parámetros de estimulación (frecuencia y forma de onda) optimizados en el cerdo también serán adecuados para el nervio esplénico humano. Sin embargo, los requisitos de carga deben calcularse a partir de todo el NVB.

10

Estudio 6: Caracterización histomorfométrica de la anatomía esplénica humana

15 El objetivo de este estudio era desarrollar una comprensión de la anatomía esplénica humana y estimar los valores aproximados del haz neurovascular esplénico (NVB) usando la histología (véase la Tabla 2). El estudio se realizó en tejido esplénico recibido de pacientes trasplantados. Se calcularon las estimaciones histomorfométricas del diámetro de la luz, la pared arterial, el diámetro del fascículo (diámetro medio de Feret) y la distancia aproximada de cada fascículo a la adventicia (pared arterial esplénica externa).

Materiales y métodos:

20

Se proporcionaron cinco NVB esplénicos humanos de pacientes trasplantados en el hospital de Addenbrooke, Cambridge, Reino Unido. El tejido se sumergió en formalina tamponada neutra (NBF) al 10% lo antes posible después de la escisión. Se tomaron fotografías del tejido y se usó una regla para las mediciones brutas (véase la Figura 16A). Las muestras se dividieron en bloques secuenciales de 0,5 cm - 1,5 cm para histología (véase la Figura 16B). Se conservó el tejido alrededor de la arteria para incluirlo en el bloque. Las secciones se incrustaron y seccionaron de tal manera que cada vez se tomara una muestra de la misma cara de cada bloque (es decir, proximal o distal al bazo). Las secciones tenían normalmente un grosor de 4-5 um y se tificaron con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) (véase la Figura 16C). Finalmente, un patólogo realizó una comprobación de la calidad del tejido y los portaobjetos se escanearon a x20. Cabe señalar que, según la bibliografía, se tiene en cuenta un 10% de la contracción del tejido. Sin embargo, el diámetro de la arteria es representativo de la presión cero. Se observó una gran cantidad de tejido adiposo en todas las muestras recibidas de pacientes trasplantados y los fascículos se encontraban enterrados en una gruesa capa de tejido adiposo.

25

30

Tabla 2. Intervalo estimado para el haz neurovascular esplénico humano (~7 mm a 10 mm)

35

Número de muestra	Diámetro de la luz	Pared de la luz + pared arterial	Contabilización de la contracción del tejido (+10%)	Intervalo de tejido extravascular (basado en el asa arterial esplénica media)	NVB total (*No tiene en cuenta la naturaleza pulsátil de la arteria)
Muestra 308B X91165	3,01 milímetros	5,02 milímetros	5,5 milímetros	3.5mm	9 milímetros
Muestra 359B X91252	3,92 milímetros	5,2 milímetros	5,72 milímetros	2,4 milímetros	8,12 milímetros
Muestra 377C X91287	3,3 milímetros	4,93 milímetros	5,42 milímetros	3,8 milímetros	9,2 milímetros
Muestra 380C X91291	2,76 milímetros	4,72 milímetros	5,192 milímetros	4.9mm	10 milímetros
Muestra 382B X91299	2.57mm	4 milímetros	4,4 milímetros	2,5 milímetros	6,9 milímetros

40

45

50

55

A efectos de cuantificación, el tejido esplénico se dividió en tres partes: proximal, medio y distal. Cada una de estas partes constaba de varias secciones. El extremo proximal está cerca del celiaco indicado con una sutura y un alfiler en la Figura 16A y el distal está cerca del bazo. Es poco probable que ambos sean el sitio de intervención para la colocación de la interfaz neuronal. La parte media con asas sería el sitio probable de intervención.

60

En resumen, como se muestra en la Figura 17, los diámetros de los fascículos se sitúan entre 20 y 400 um. En la extensión del fascículo, aproximadamente la mitad de las fibras nerviosas se encontraban en la región de 0-1 mm, el 30% en 1-2 mm, el 15% en 2-3 mm y el resto en la región de 3-4 mm aproximadamente.

65

Estudio 7: Requisitos de carga traslacional del haz neurovascular esplénico porcino al humano

Materiales y métodos:

5 Se crearon simulaciones informáticas de modelos de elementos finitos en 3D usando datos histológicos de la histología esplénica porcina y humana. Esta se componía esencialmente de arteria esplénica (luz + pared arterial) y tejido extravascular. El "tejido extravascular" se compone de "tejido adiposo" y "tejido conjuntivo", con nervios incrustados en el tejido. Para los porcinos, se usó un modelo con una división en el manguito Cortec (que representa el manguito in vivo). Para los modelos humanos, se usaron manguitos con estructura de tres brazos. El diámetro del manguito usado era de 9 mm.

10 Teniendo en cuenta las diferencias entre la histología porcina y la humana: los fascículos en porcino están distribuidos uniformemente alrededor de la arteria y están muy próximos, mientras que los fascículos en humanos parecen más dispersos; y b) la histología en porcino indica un tejido adiposo extravascular insignificante, a diferencia de cantidades sustanciales en humanos.

15 Para trasladar la estimación de los parámetros de estimulación de porcino a humano, el modelado se realizó en las dos fases siguientes:
Fase (a): Desarrollo de modelos 3D de elementos finitos (MEF) en la herramienta de simulación Sim4Life.

20 Se usó Sim4Life para desarrollar modelos representativos de nervios y arterias (sobre la base de la histología y la cuantificación de imágenes), manguitos y electrodos (especificaciones definidas por CAD) y campos de tensión en 3D.

25 Fase (b): Análisis de soluciones MEF en la misma herramienta. Se usó Sim4Life para interpolar el voltaje a lo largo de los axones usando el modelo de nervio de Sundt [31], y las simulaciones de los axones estimaron las curvas de fuerza-duración y reclutamiento de población.

Resultados

30 La Figura 18A representa los datos agudos in vivo del haz neurovascular esplénico porcino de cinco animales. El intervalo de los requisitos de carga de cinco animales se estima en aproximadamente 20-160 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ a <50 mA, 400 μs y 10 Hz. Para el tercer animal representado en gris, los requisitos de carga son de aproximadamente 100 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ a 30 mA, 400 μs y 10 Hz, lo que se correlaciona bien con los datos simulados in-silico (ver Figura 19A). Usando la correlación in-silico frente a in-vivo como una validación para el modelo computacional en porcino, los requisitos de carga se trasladaron al haz neurovascular esplénico humano usando secciones histológicas para dos anchos de pulso. Los datos se presentan en las Figuras 17C-D y en la Tabla 3.

Tabla 3: Estimaciones de carga para modelos humanos para dos anchos de pulso, es decir, pulsos de 400 μs y 1 ms

Ancho de pulso	Estimaciones de carga 400 μs ($\mu\text{C}/\text{fase}/\text{cm}^2$) (aprox.)	Estimaciones de carga 1000 μs ($\mu\text{C}/\text{fase}/\text{cm}^2$) (aprox.)
% reclutado		
Umbral	79	70
10	130	110
30	170	150
50	225	200
80	422,8	335
80-100	450-1300	350-1100

55 Se estima que los requisitos de carga en modelos agudos humanos para un reclutamiento del 100% pueden variar potencialmente entre aproximadamente 80-1300 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (usando anchos de pulso de 400 μs , área de superficie de 12 mm^2) y 70-1100 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (usando anchos de pulso de 1 ms). Aproximadamente el 70% del reclutamiento se indica por debajo de 350 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$. El reclutamiento adicional del 30% requiere un aumento exponencial de los requisitos de carga más allá de lo que probablemente se acomoda a un dispositivo implantable. Por ejemplo, puede verse que un reclutamiento del 100% puede variar potencialmente entre 70-1300 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$, entre 70-450 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ para un reclutamiento del 80%, entre 70-250 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ para un reclutamiento del 50%, y entre 70-170 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ para un reclutamiento del 30%.

Análisis

65 Las fibras nerviosas en los humanos están más dispersas en comparación con los porcinos. El intervalo de dispersión de los fascículos alrededor de la arteria esplénica, tal y como se indica por el perfil histológico, puede estar en el intervalo de aproximadamente 1-3 mm. Los datos histomorfométricos se usaron además para optimizar los

parámetros de estimulación y trasladar los requisitos de carga de los porcinos a los humanos usando herramientas de modelado informático. Usando el modelo de fibra c de Sundt, se indica que los requisitos de carga para los seres humanos se sitúan en un intervalo de aproximadamente 70-1000 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ para un reclutamiento del cien por cien.

5 **REFERENCIAS**

[2] J. M. Huston et al., J Exp Med 203, 1623.
 [2] R. Medzhitov, Nature 454, 428-435 (24 July 2008).
 [3] Greenway et al., J. Physiol. (1968), 194, 421-433.
 10 [4] G. Vida, G. Pena, E. A. Deitch, L. Ulloa J Immunol 186, 4340.
 [5] US 2006/0287678.
 [6] US 2005/0075702.
 [7] US 20050075701.
 [8] F. Tischendorf F, Biol Lat 9:307-342, 1956.
 15 [9] M. Fillenz, Proc R Soc Lond B Biol Sci 174:459- 468, 1970.
 [10] I.G. Zelenova, Arkh Anat Gistol Embriol 60:88-90, 1971.
 [11] F.D. Reilly, Experientia 41:187-192, 1985.
 [12] D.L. Felten et al., J Neurosci Res 18:28-36, 118-121, 1987.
 [13] D. G. Onkar, J Morphol Sci 30:p. 16-20, 2013.
 20 [14] D. Bakovic et al., Clin Exp Pharmacol Physiol 32:944-951, 2005.
 [15] A. Lodin-Sundstrom, E. Schagatay, Aviat Space Environ Med 81:545-549, 2010.
 [16] Schafer, E. A. and Moore, B., J Physiol., 1896.
 [17] G. L. Brown, J. S. Gillespie JS, J Physiol, 138:81-102, 1957.
 [18] A.G. Garcia, et al., J Physiol, 261:301-317, 1976.
 25 [19] Sundt D, et al., Journal of neurophysiology. 114:3140-53, 2015.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (50) para estimular la actividad neuronal de un nervio que irriga el bazo para tratar una afección médica aguda, en donde el nervio está asociado con un haz neurovascular, preferiblemente un nervio arterial esplénico, el sistema comprendiendo:

por lo menos un electrodo (11, 12) en contacto de señalización con el nervio; y
 por lo menos un controlador (60) acoplado eléctricamente al por lo menos un electrodo, el por lo menos un controlador configurado para controlar el funcionamiento del por lo menos un electrodo para aplicar una señal eléctrica al nervio,
 en donde la señal eléctrica produce una mejora en un parámetro fisiológico indicativo del tratamiento de la afección médica aguda,
 en donde la señal eléctrica tiene una forma de onda que comprende uno o más trenes de pulsos,
 en donde la densidad de carga por fase aplicada al nervio por la señal eléctrica está comprendida entre 5 μC y 1300 μC por cm^2 por fase,
 en donde la mejora del parámetro fisiológico es una cualquiera del grupo que consiste en: el restablecimiento de la temperatura corporal a entre 36°C y 38°C, el restablecimiento de la frecuencia cardíaca a 60-100 bpm, el restablecimiento de la presión arterial sistémica a entre 90/60 mmHg y 150/90mmHg, el restablecimiento de la presión venosa sistémica a aproximadamente 5 mmHg en la aurícula derecha y aproximadamente 8 mmHg en la aurícula izquierda, el restablecimiento de la presión pulmonar a aproximadamente 15 mmHg, el restablecimiento de la presión venosa central en el intervalo de aproximadamente 3 a 8 mmHg, el restablecimiento de la frecuencia respiratoria a 8 - 14 respiraciones por minuto, un aumento de la saturación de oxígeno a $\geq 94\%$, un aumento de la presión parcial arterial de oxígeno a 12 - 15 kPa, el restablecimiento de la presión parcial arterial de dióxido de carbono a 4,4-6,1 kPa, una reducción de la sensación de dolor, el restablecimiento de la producción de orina a $\geq 0,5$ ml/kg/hora, un aumento del nivel de consciencia, una reducción del nivel de lactato, un cambio en el nivel de glucosa en sangre, un cambio en el nivel de déficit de bases en sangre y un cambio en el nivel de pH arterial, el restablecimiento de niveles más bajos de resistencia vascular pulmonar a la vez que se aumenta la resistencia vascular sistémica y se aumenta la presión de enclavamiento capilar pulmonar, la reducción de niveles altos de lipasas, la reducción de niveles altos de amilasas.

2. El sistema de la reivindicación 1, en donde la afección médica aguda son episodios graves de lupus, hemorragia o shock séptico.

3. El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además una interfaz neuronal, la interfaz neuronal comprendiendo el por lo menos un electrodo.

4. El sistema de la reivindicación 3, en donde la interfaz neuronal es adecuada para su colocación alrededor de por lo menos un nervio arterial esplénico.

5. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en donde la interfaz neuronal es adecuada para su colocación alrededor de la arteria esplénica.

6. El sistema de la reivindicación 3, en donde la interfaz neuronal es adecuada para su colocación en por lo menos un nervio arterial esplénico.

7. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde la interfaz neuronal es adecuada para su colocación en la arteria esplénica.

FIG. 1

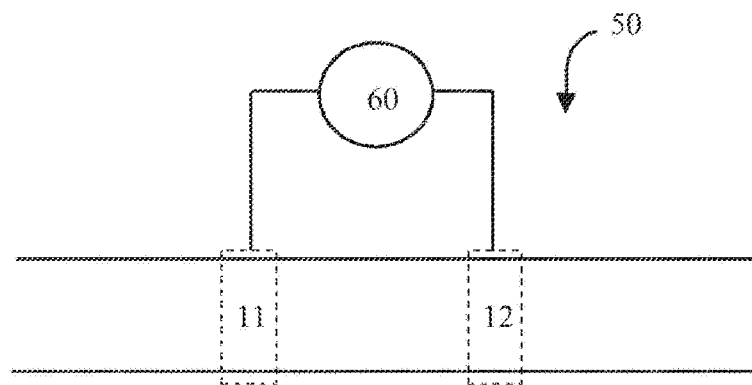


FIG. 2

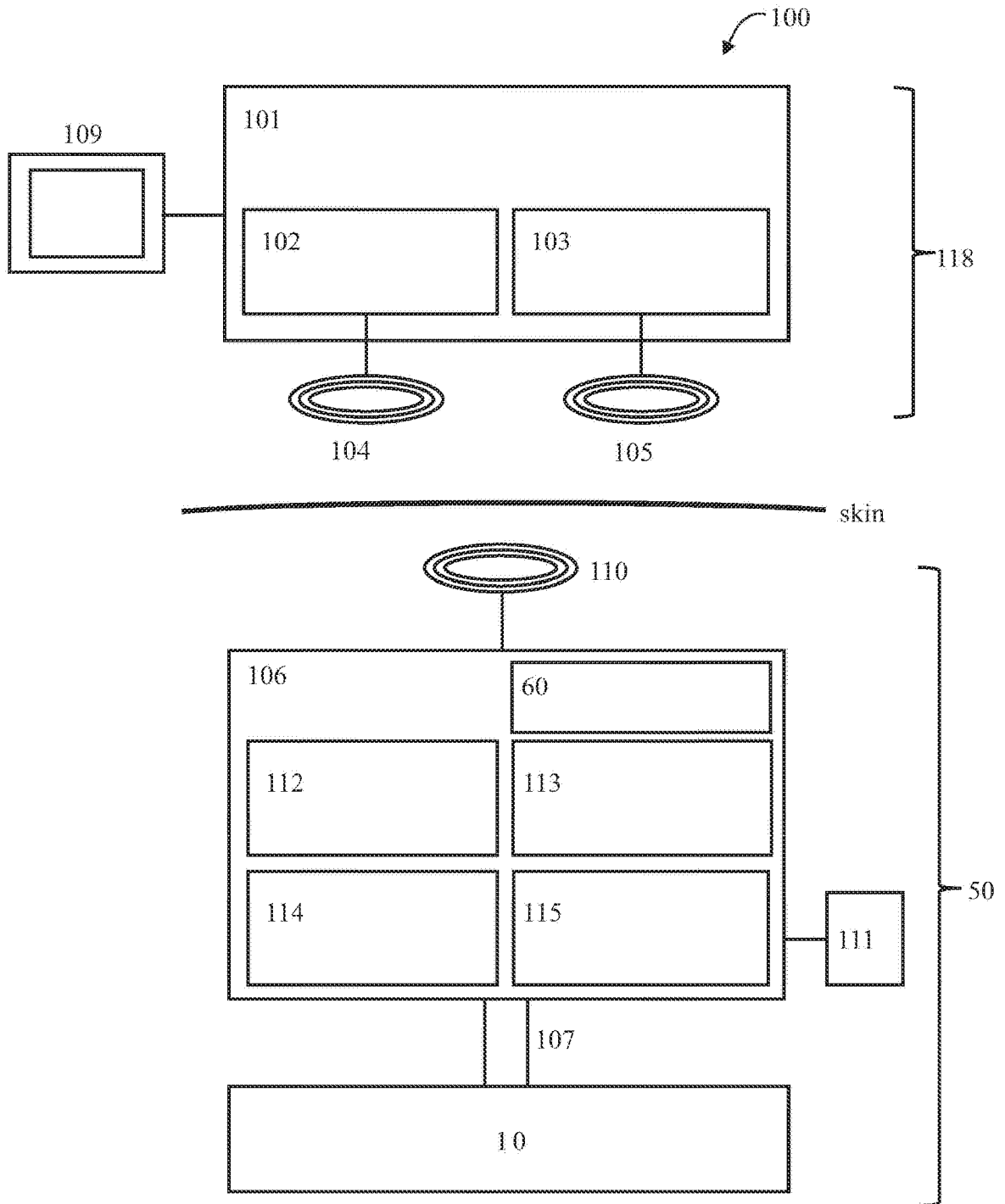


FIG. 3

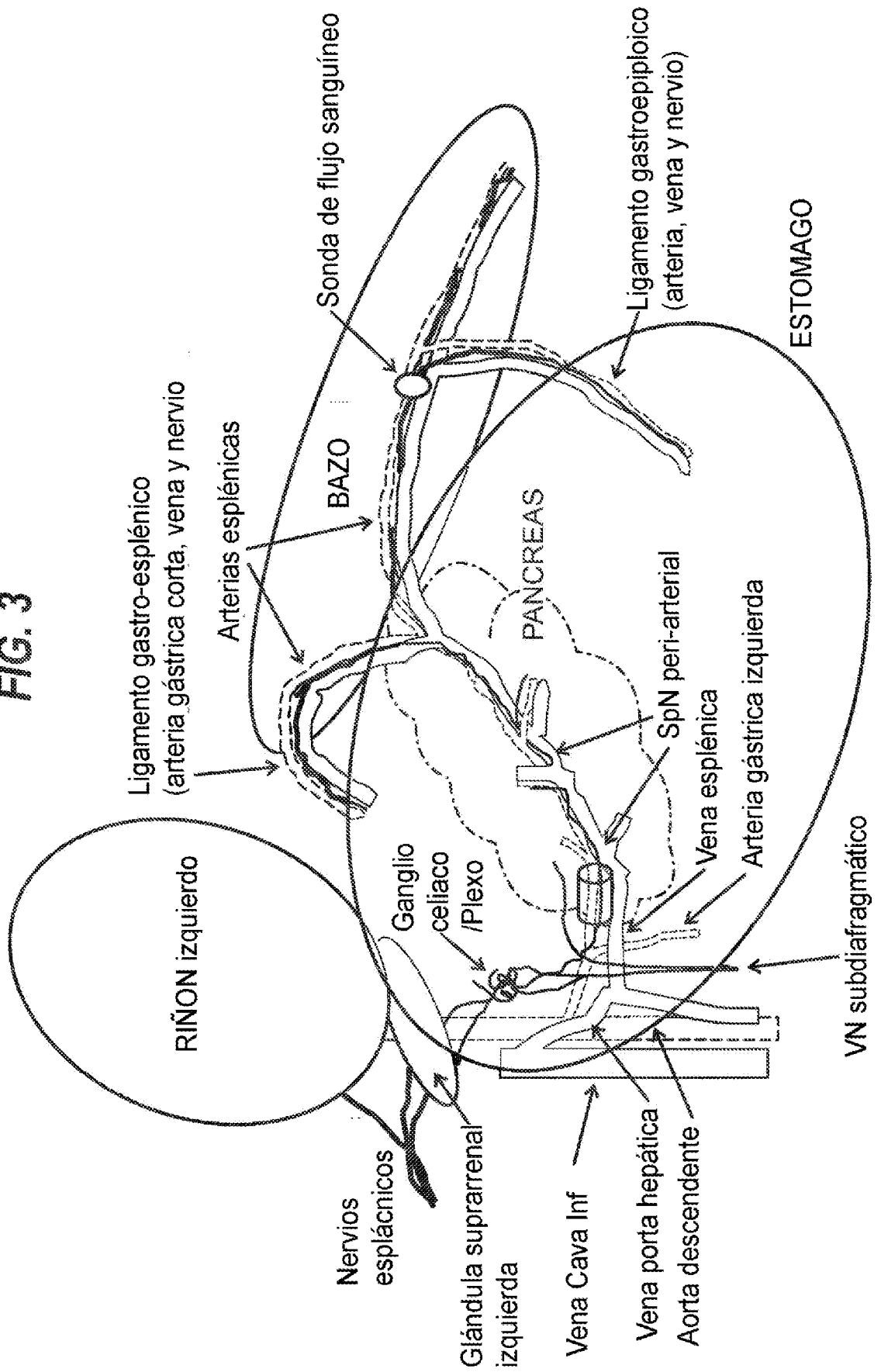


FIG. 4a

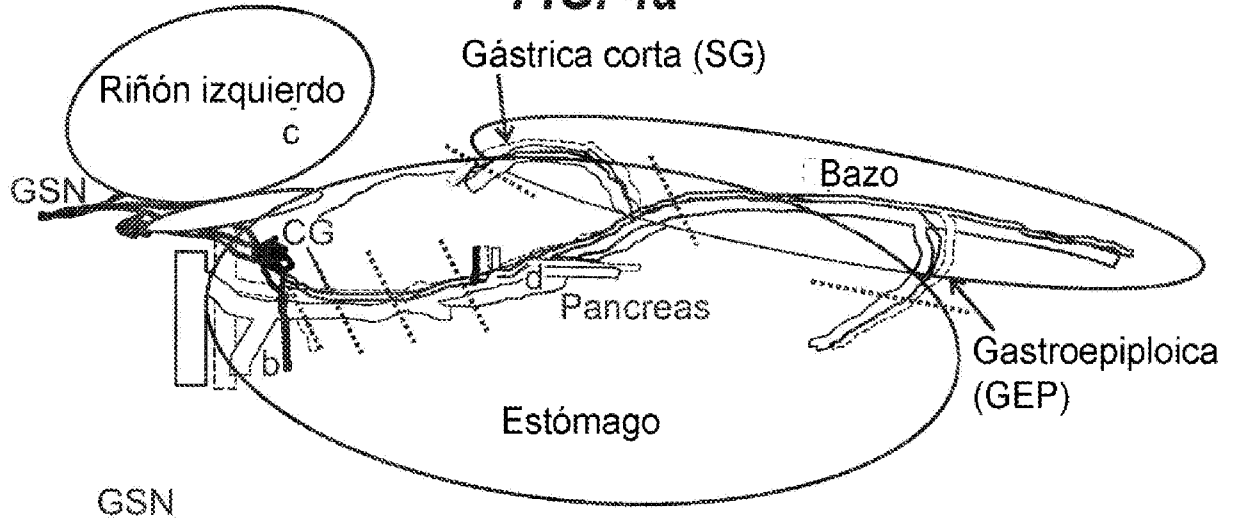


FIG. 4b

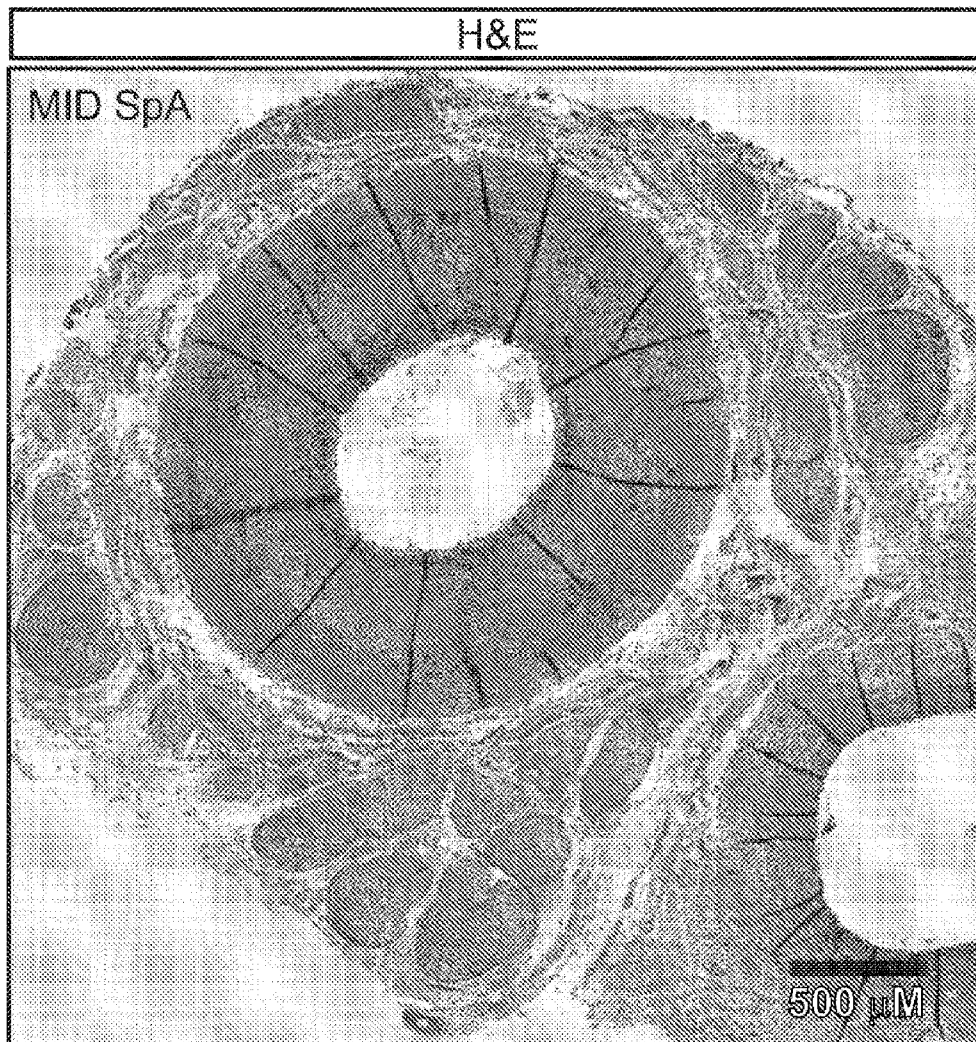


FIG. 4d

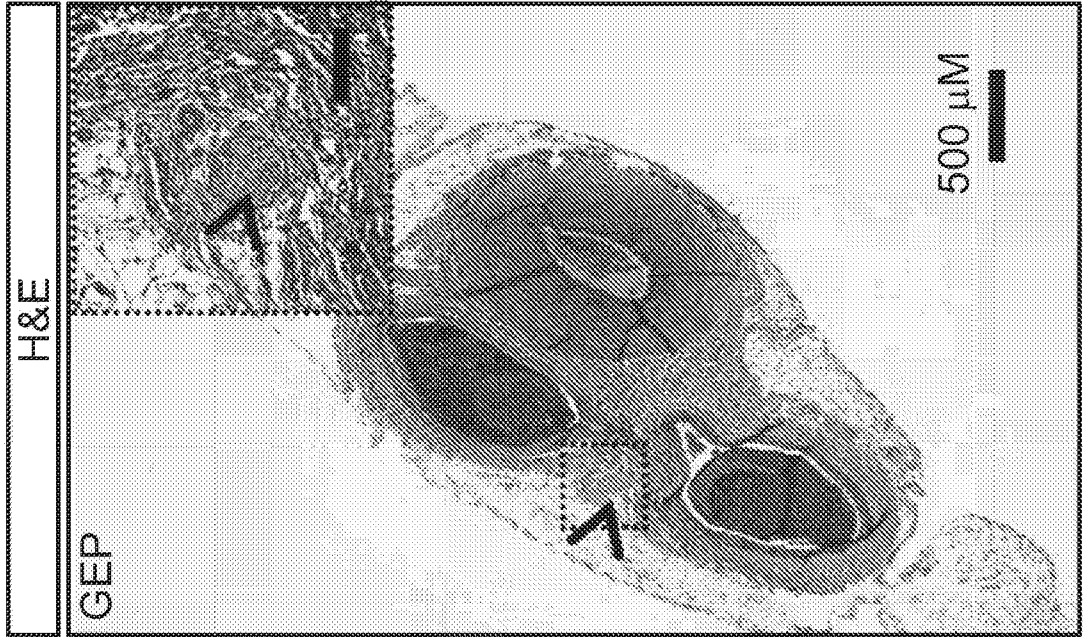
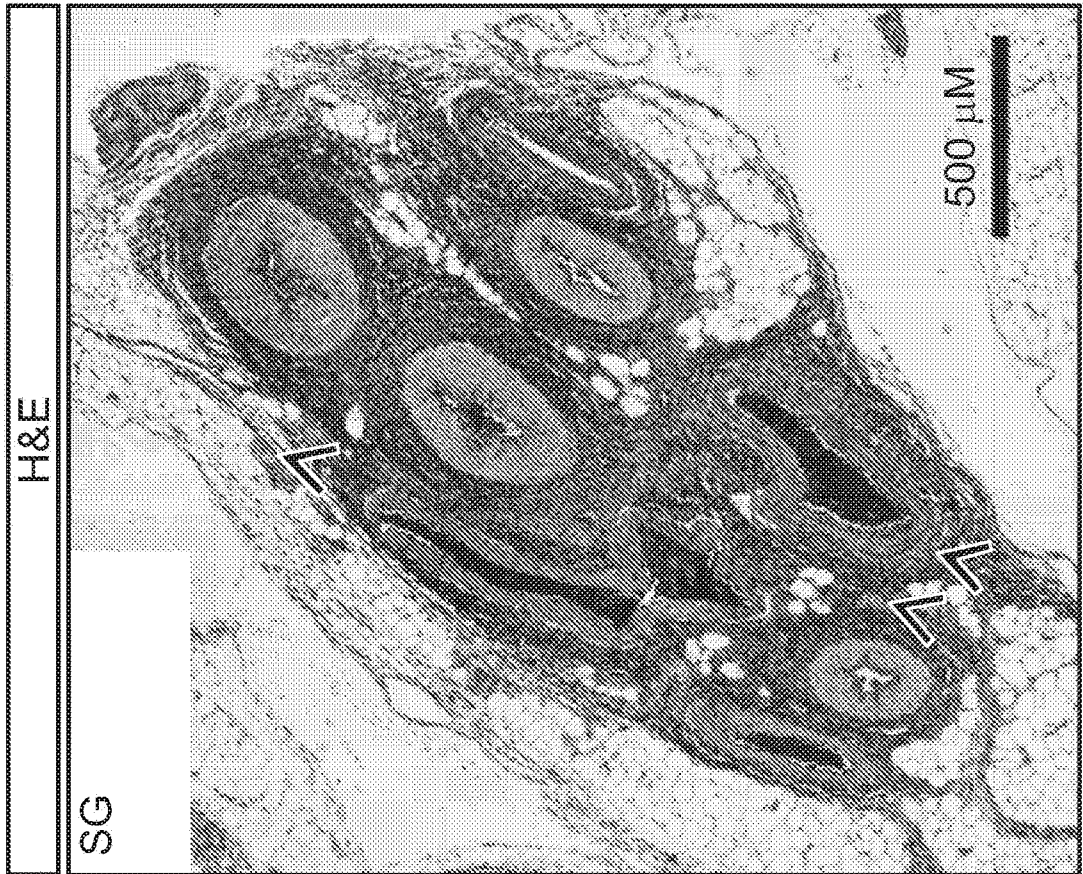


FIG. 4c



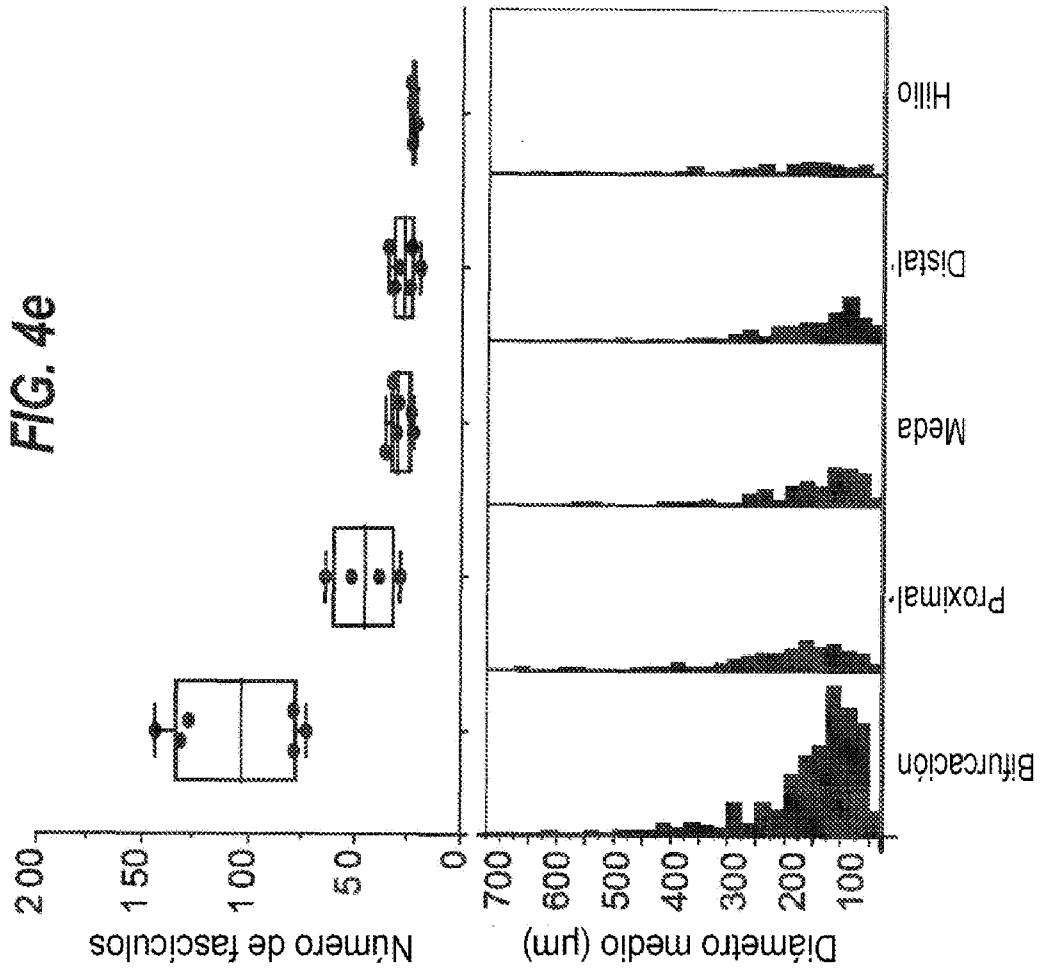
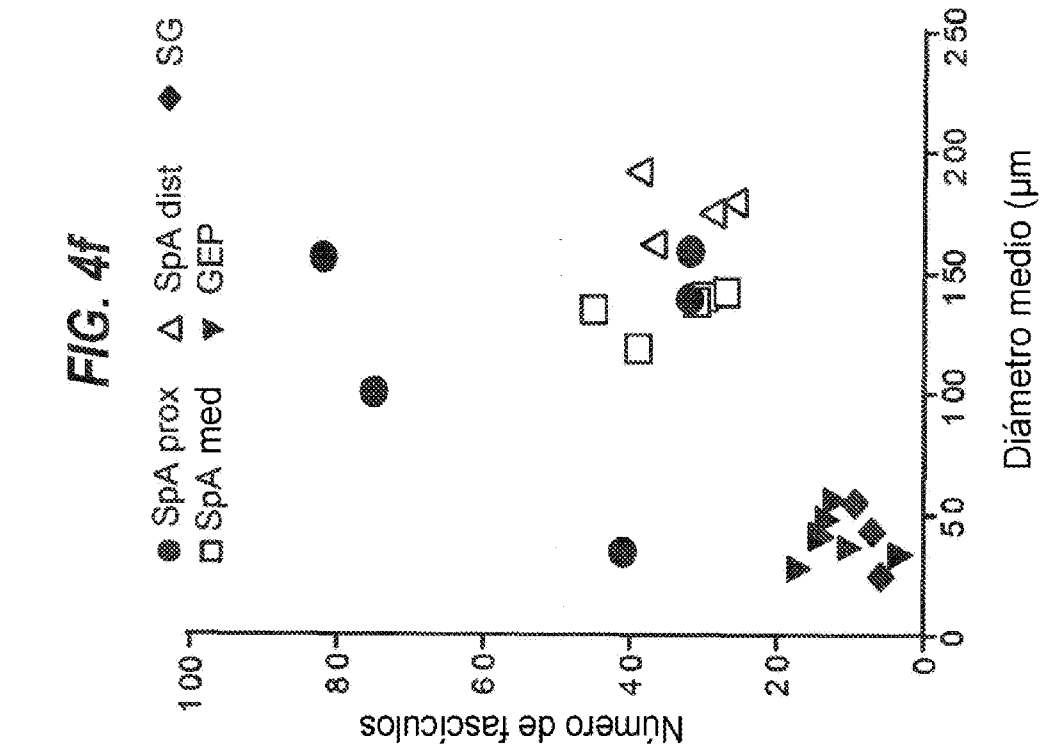


FIG. 5a

Azul de toluidina

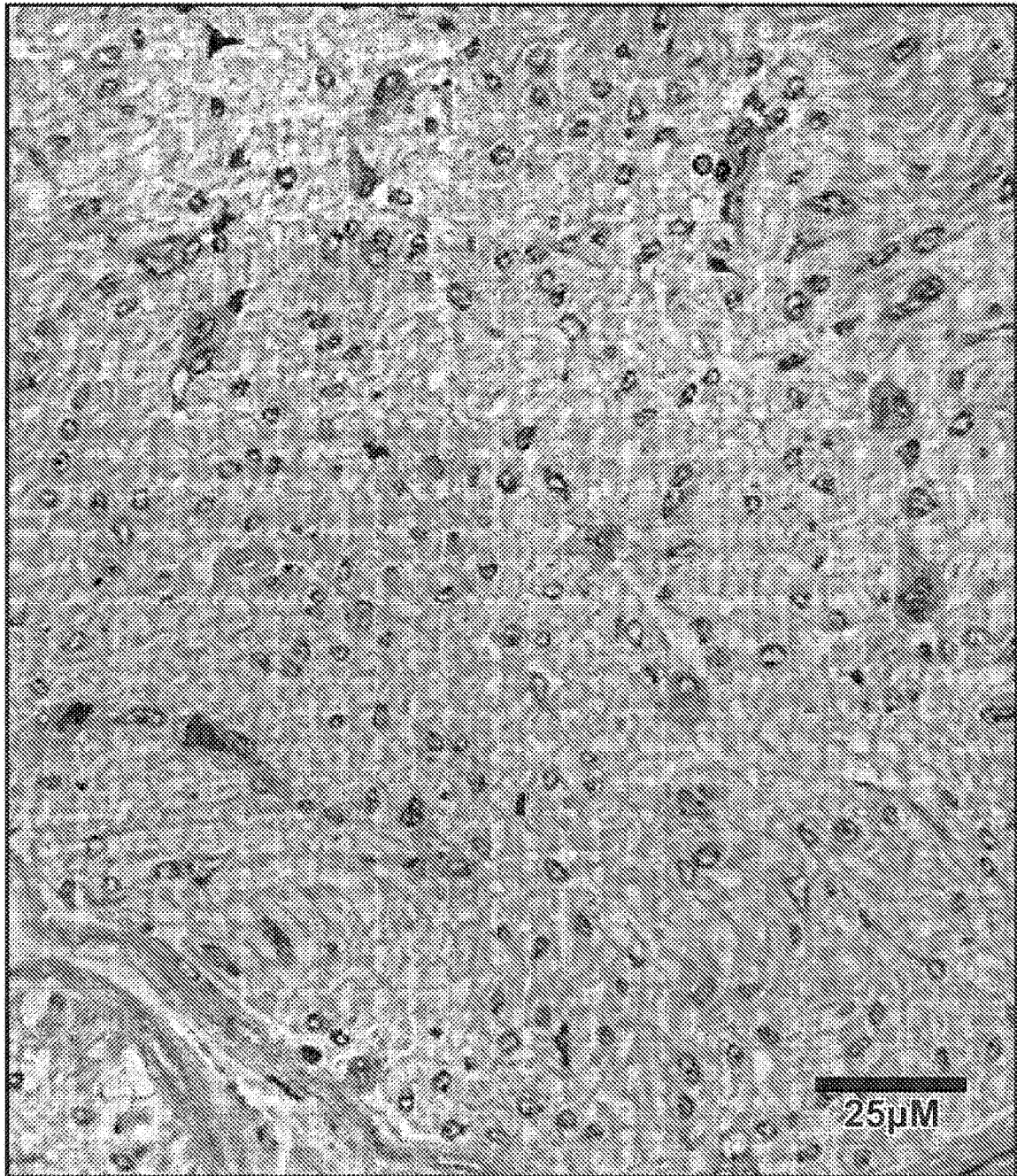


FIG. 5b

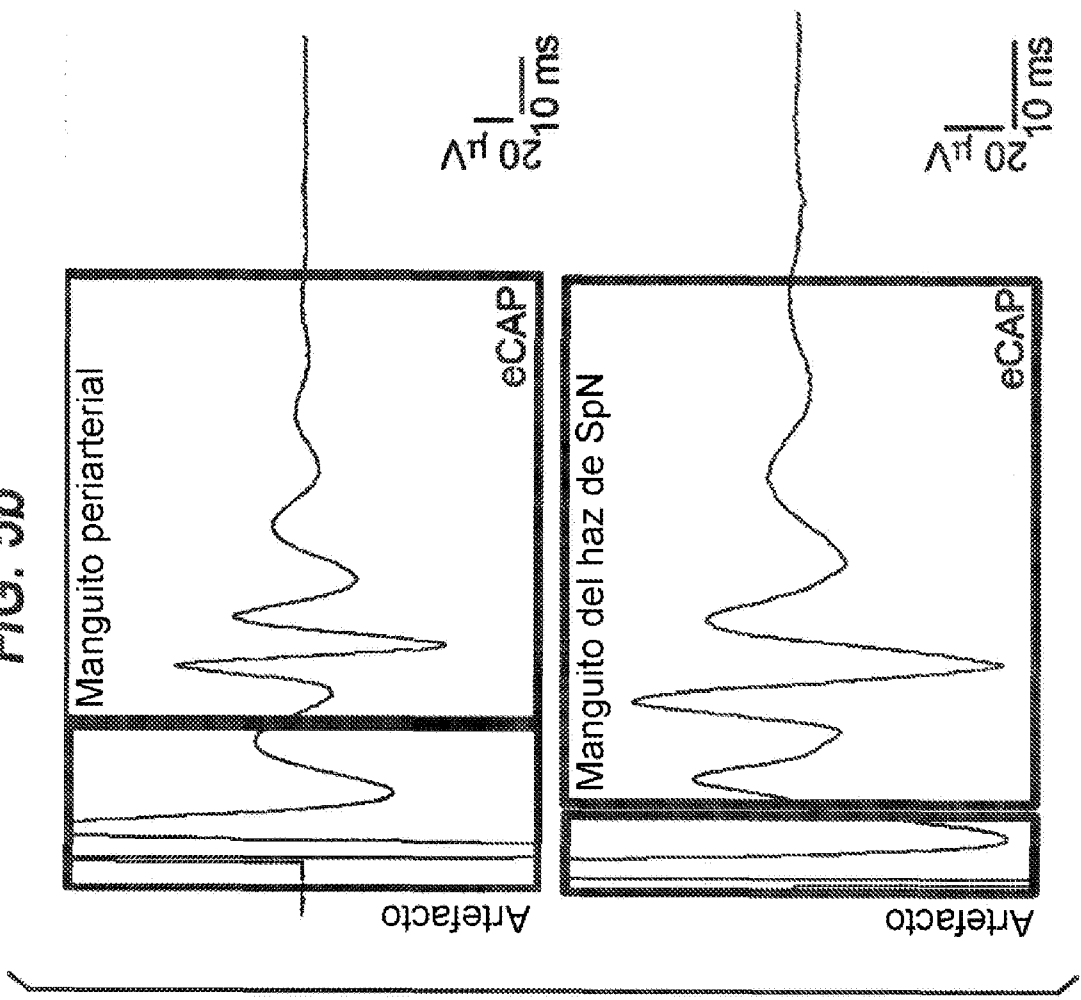


FIG. 5c

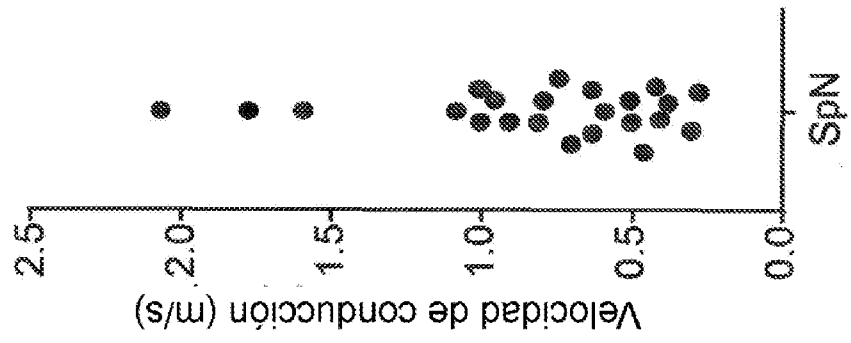


FIG. 5d

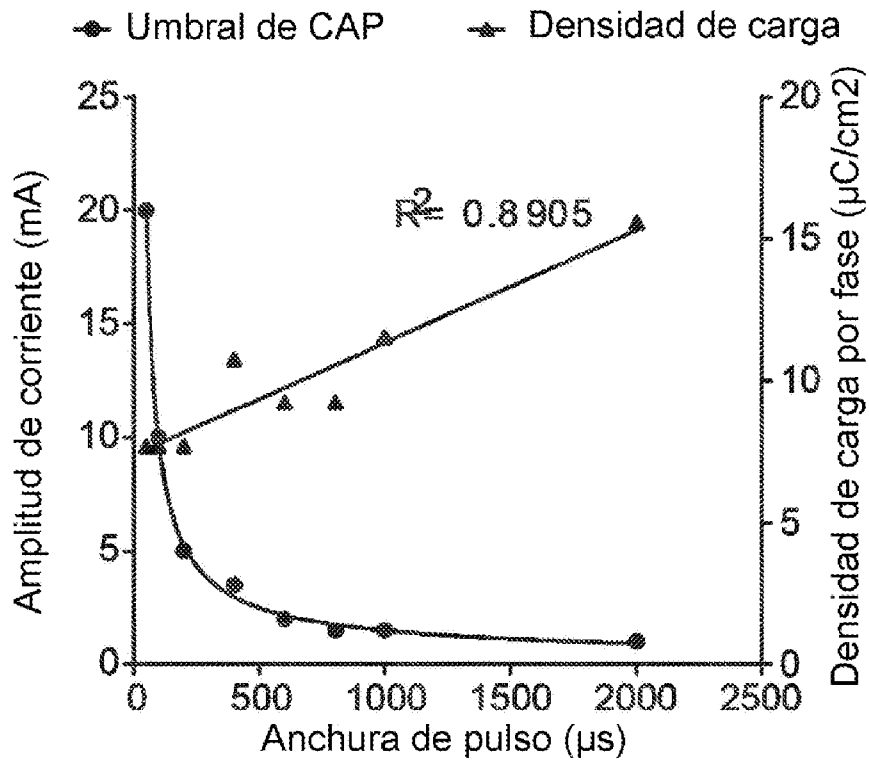


FIG. 5e

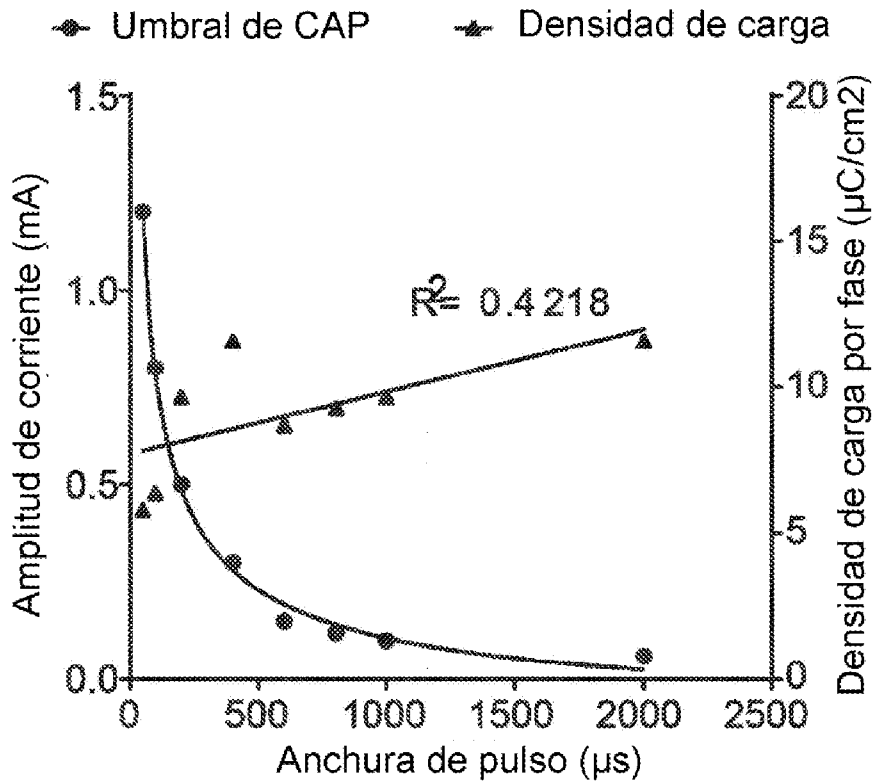
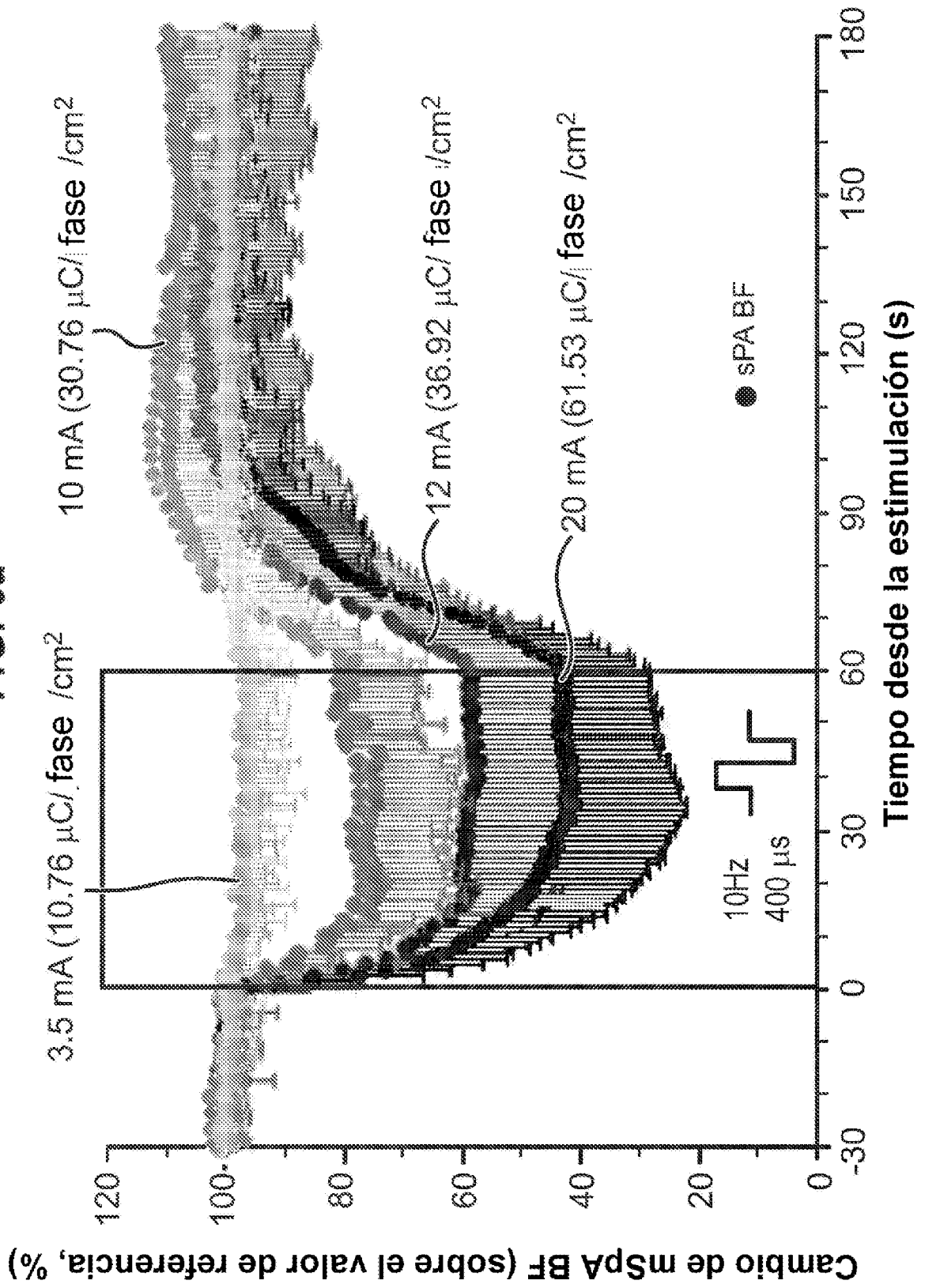
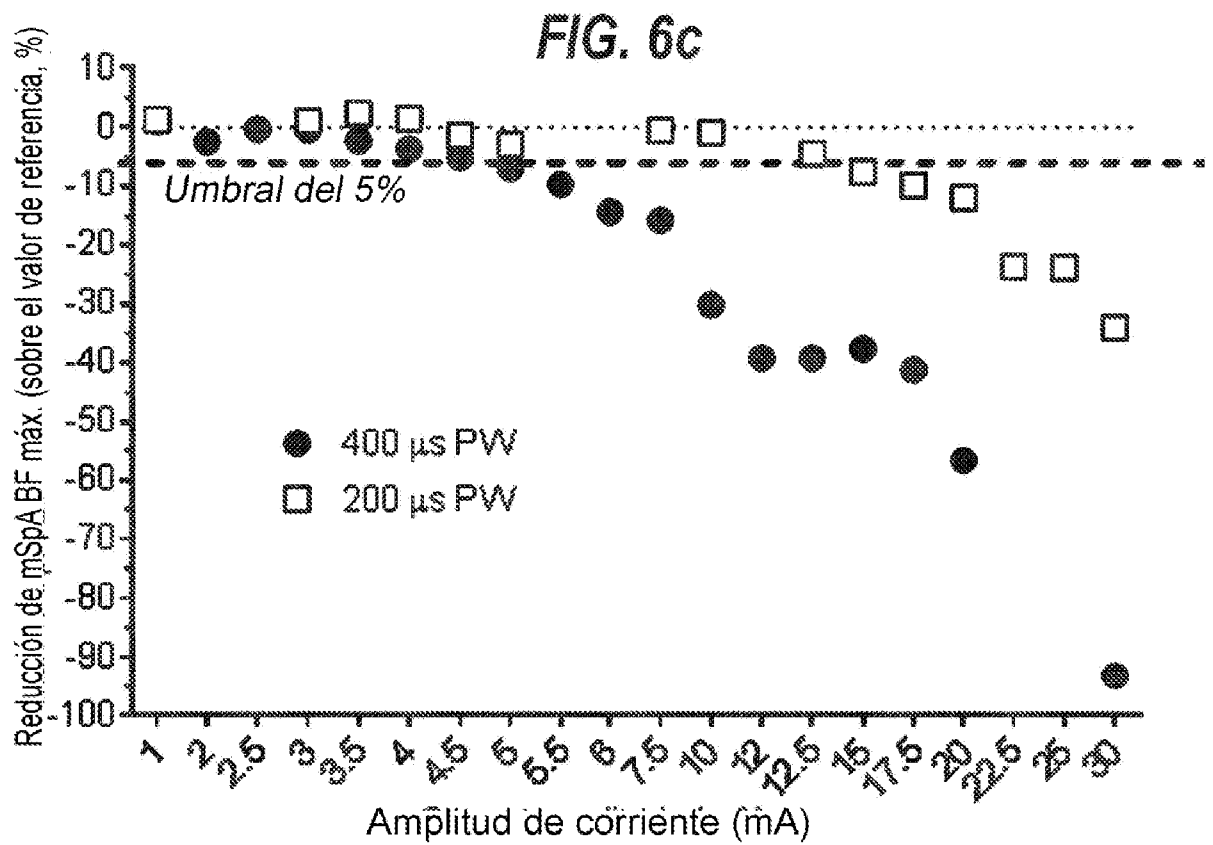
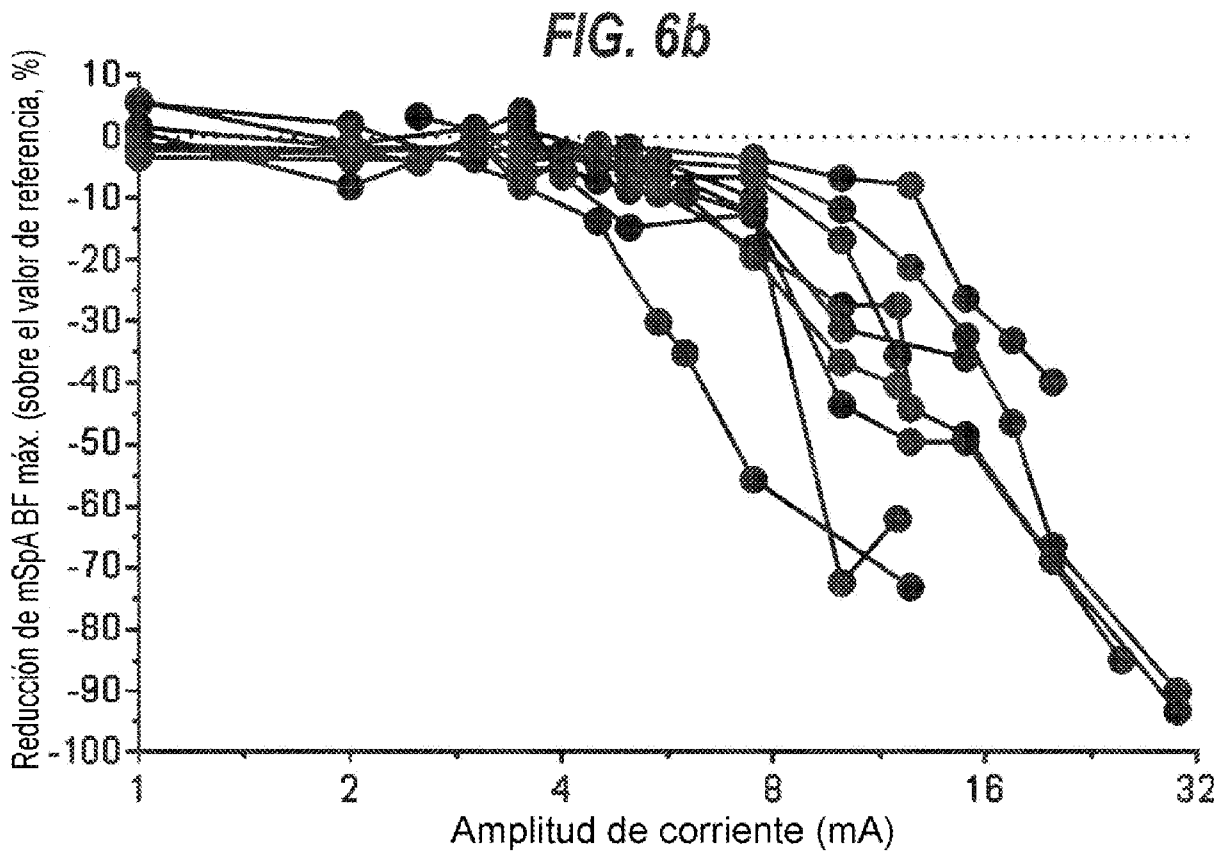
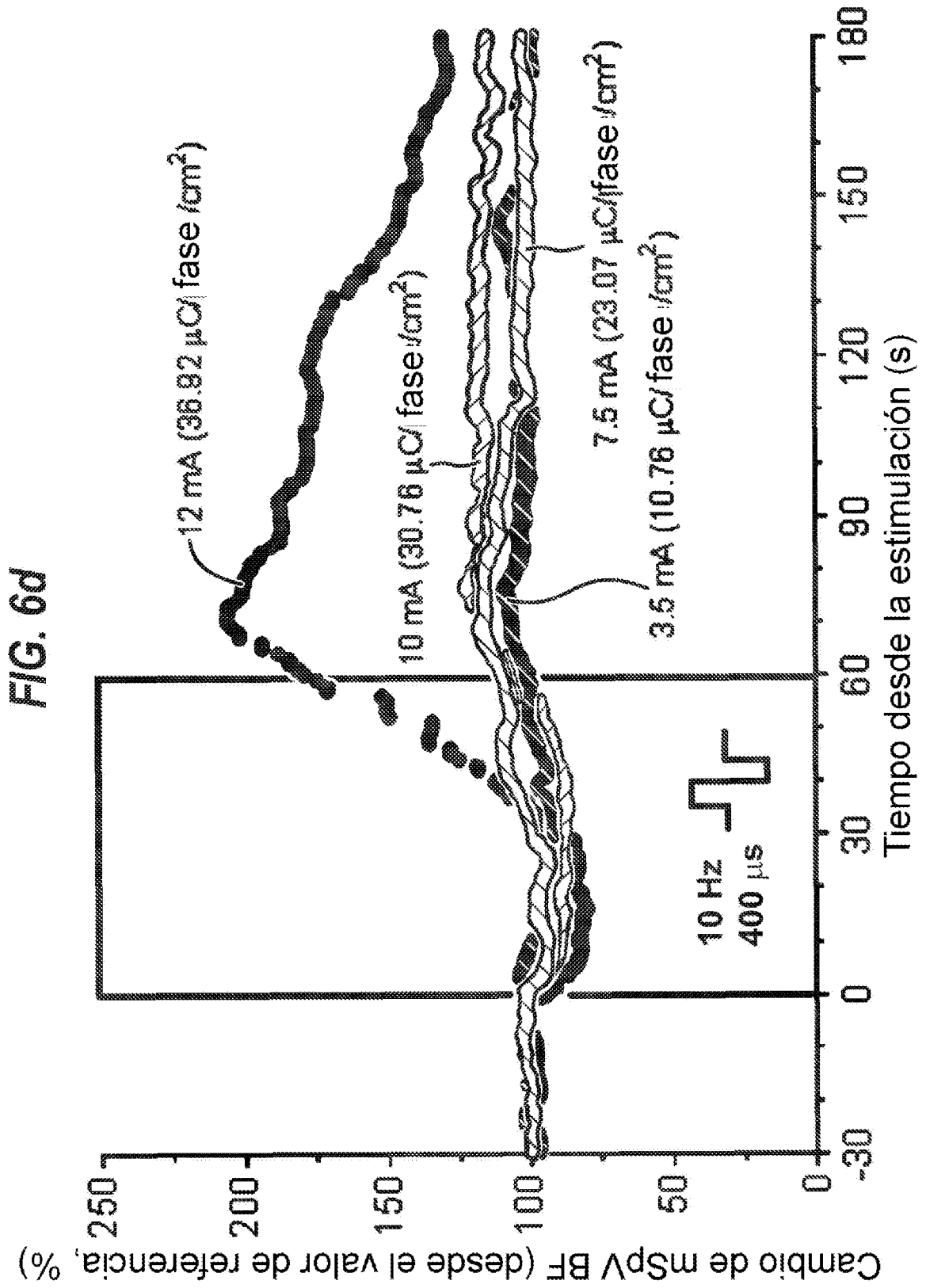
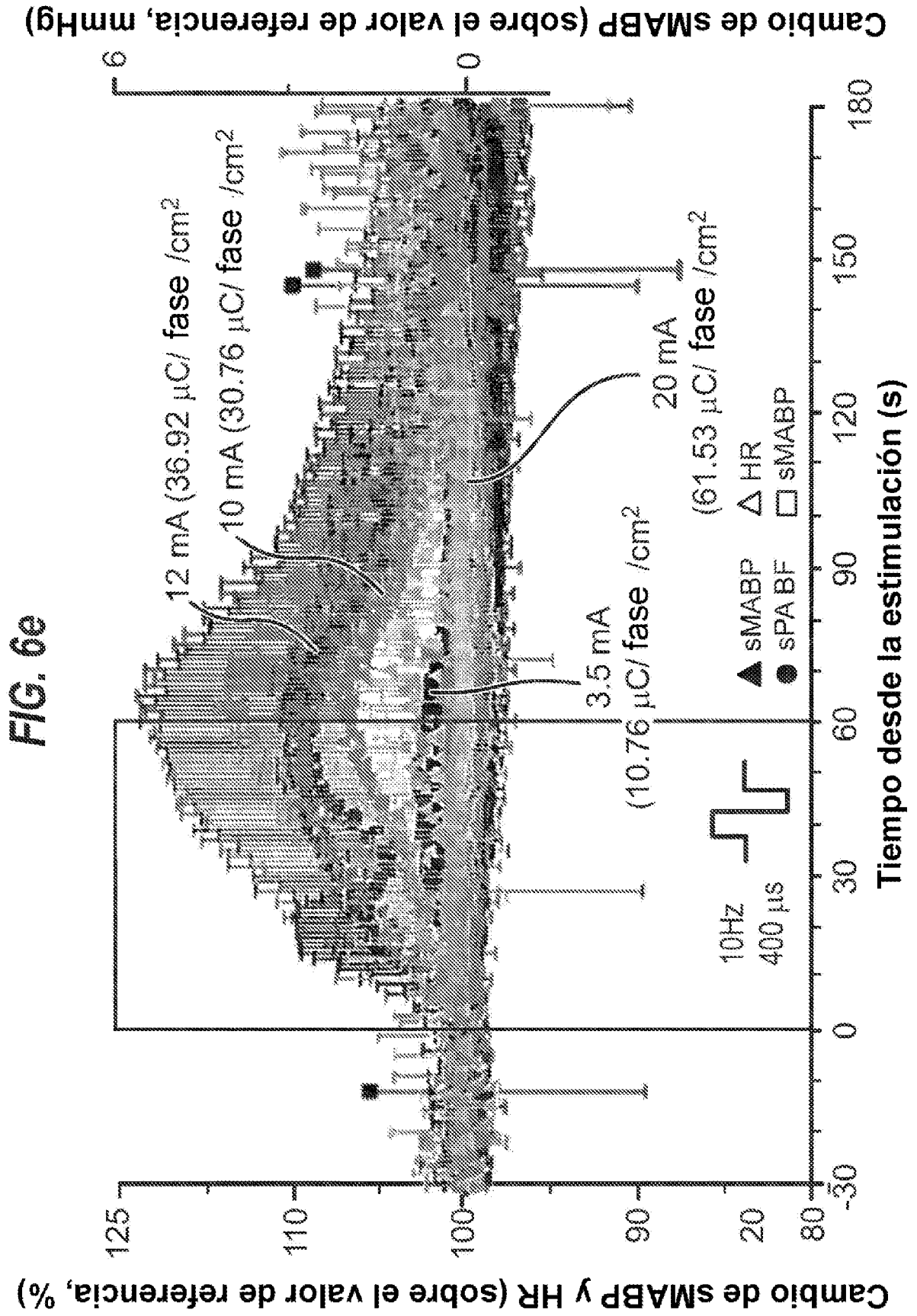


FIG. 6a









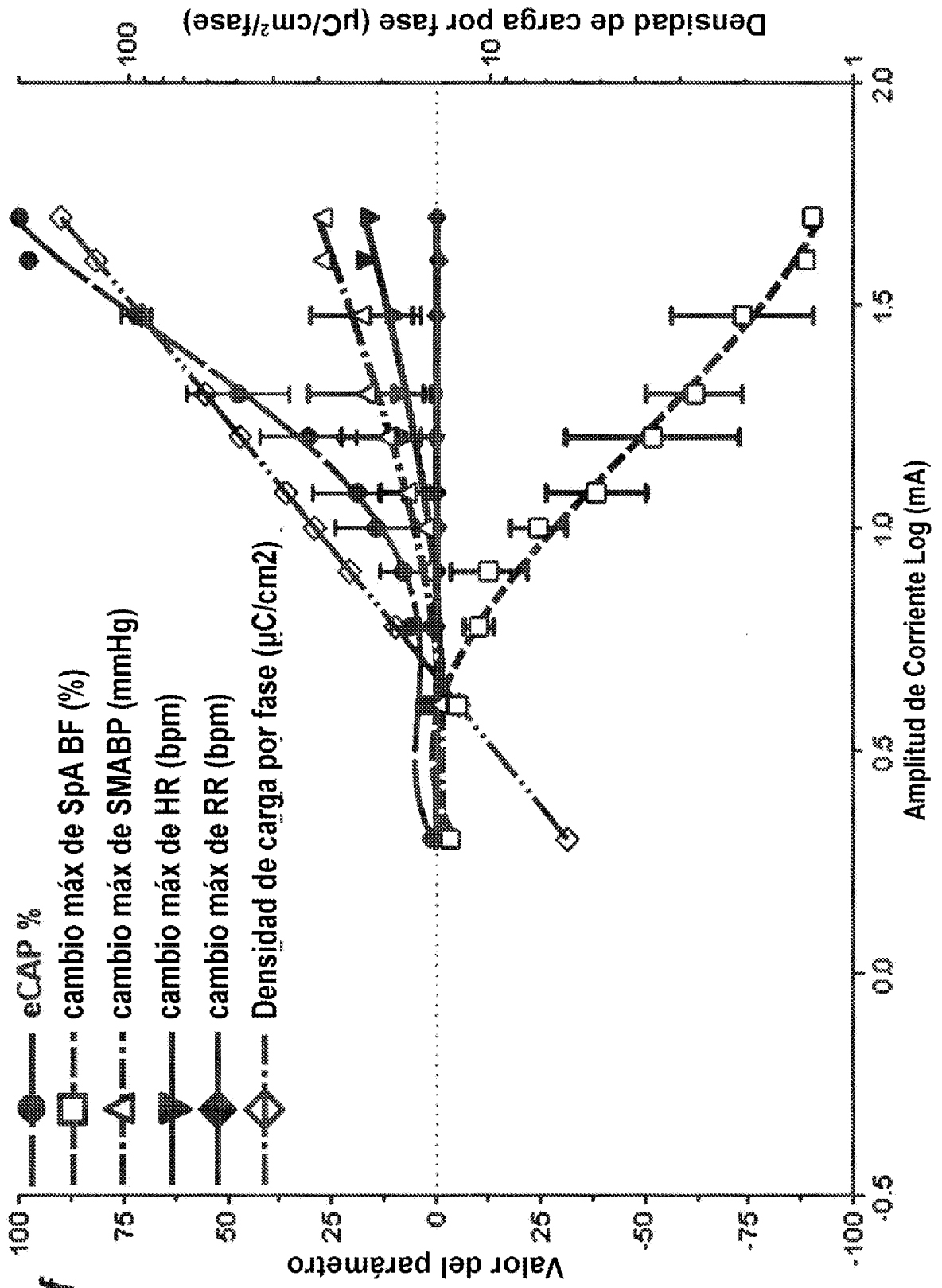


FIG. 6f

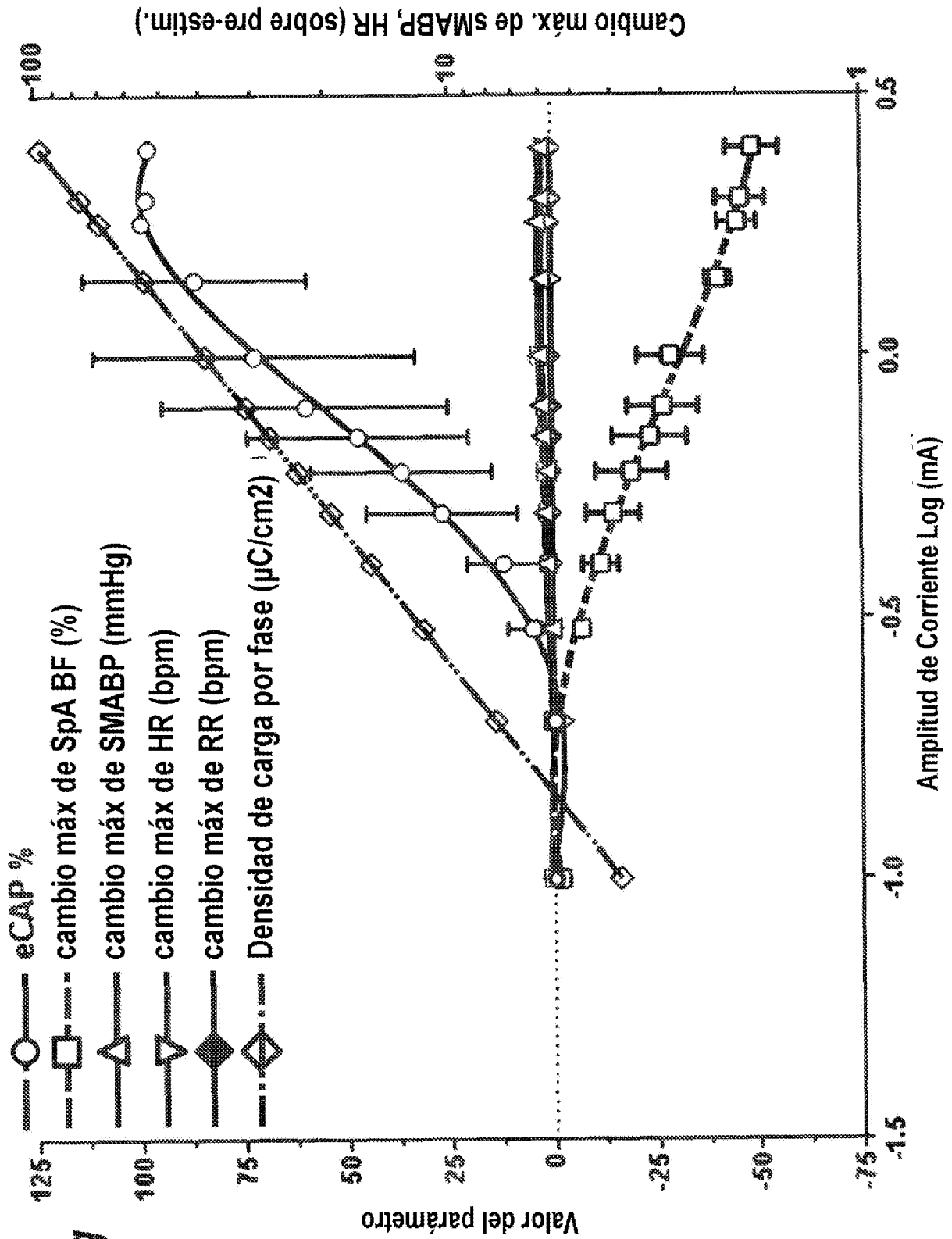


FIG. 6g

FIG. 7a

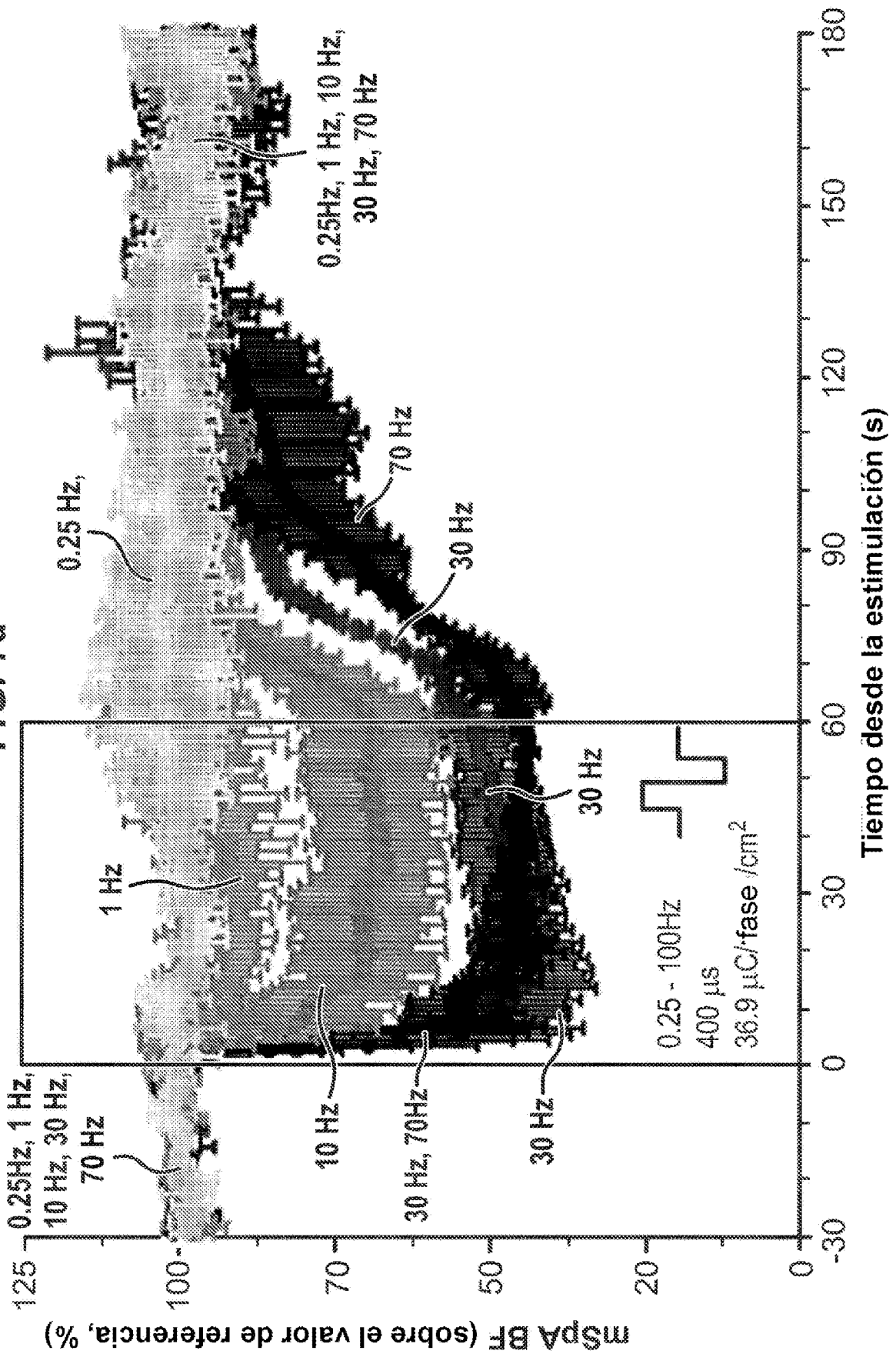
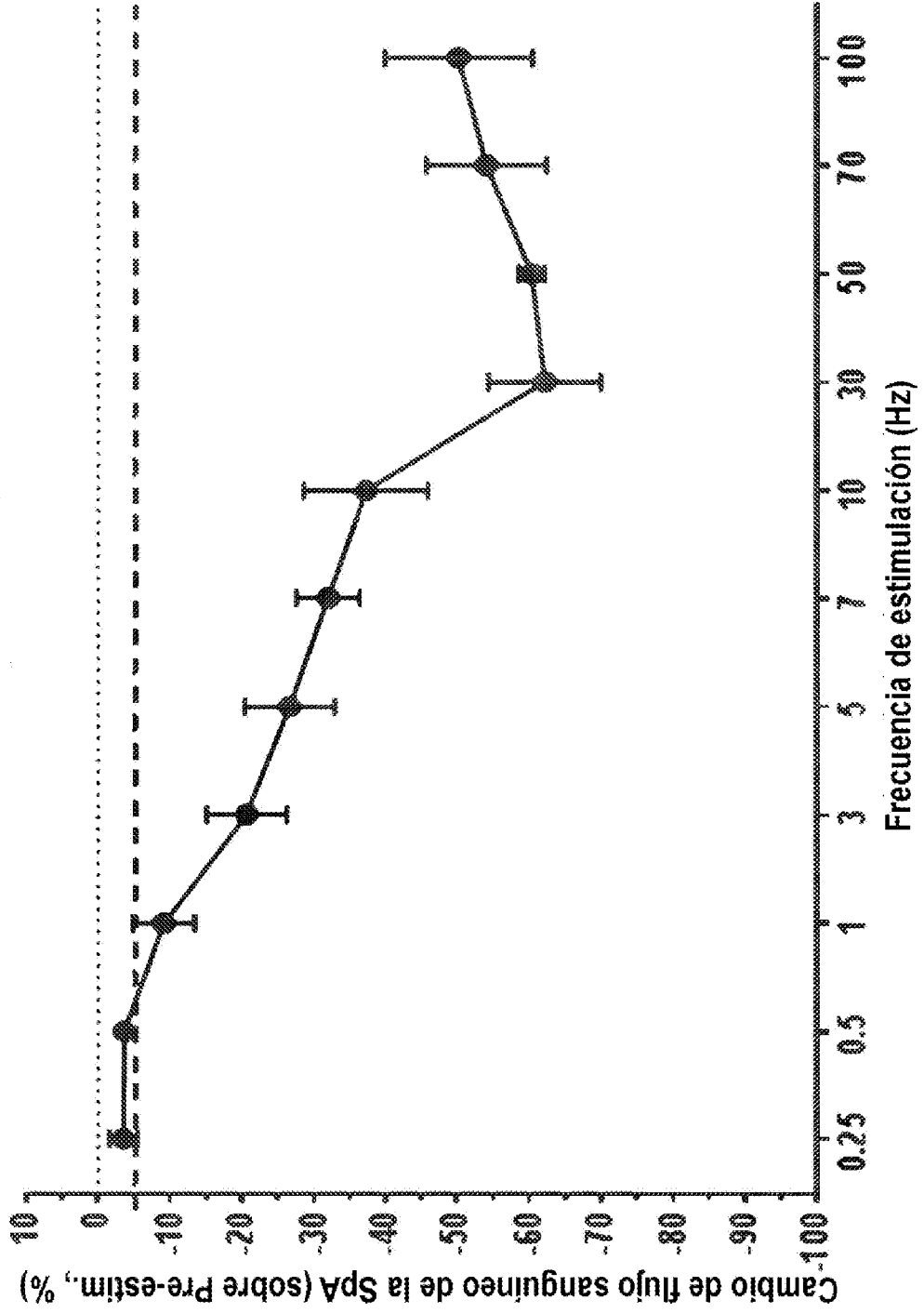


FIG. 7b



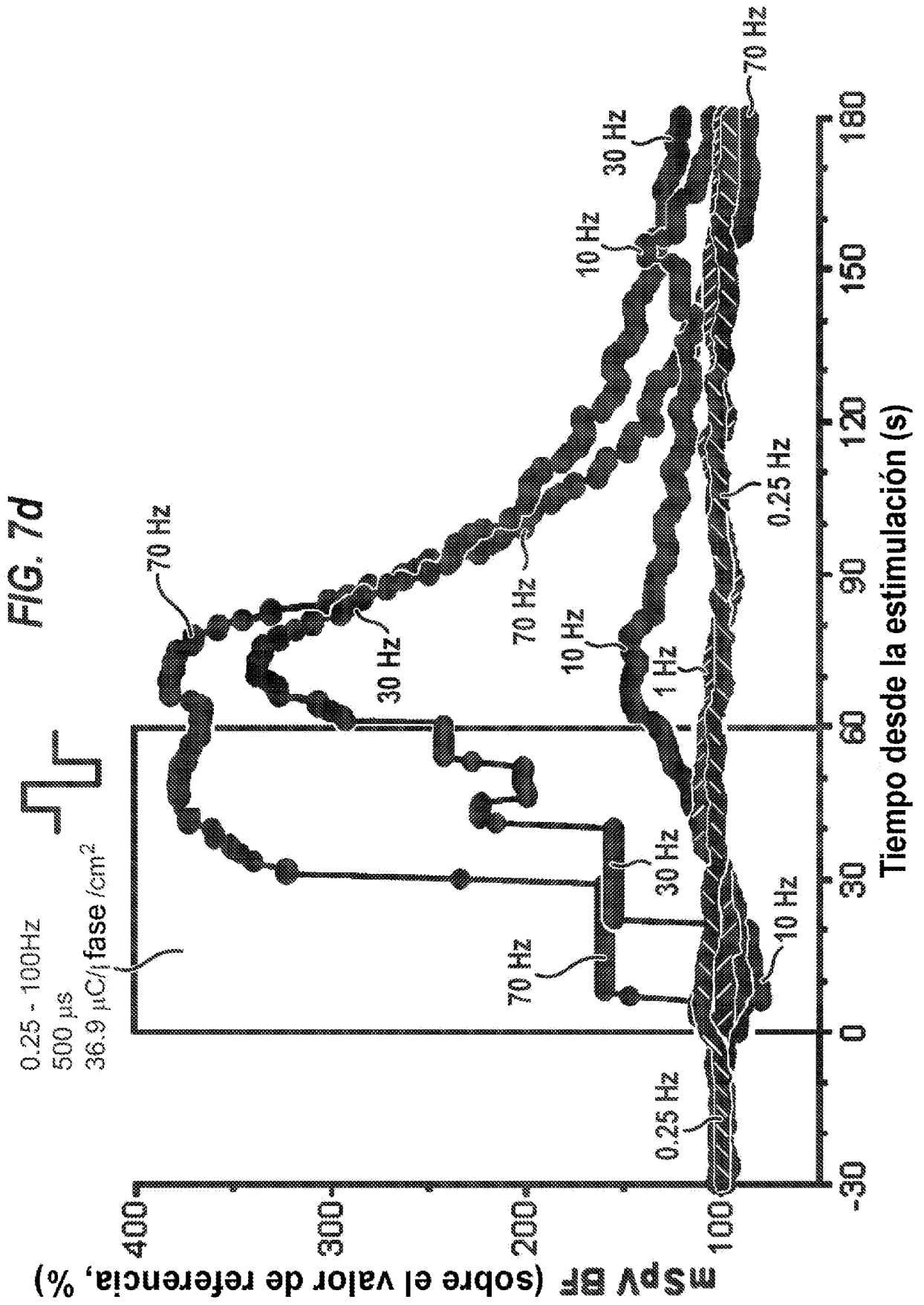
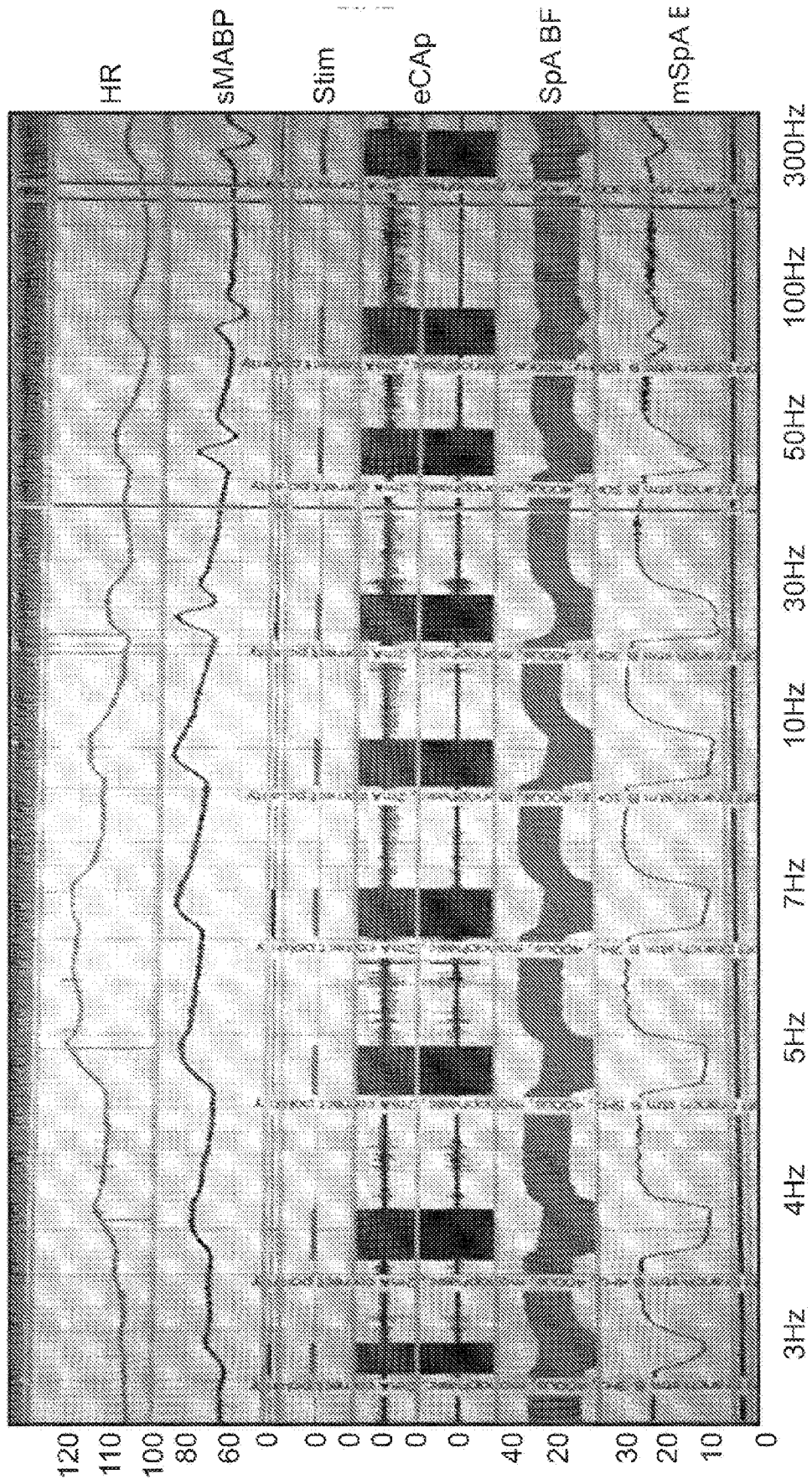


FIG. 8



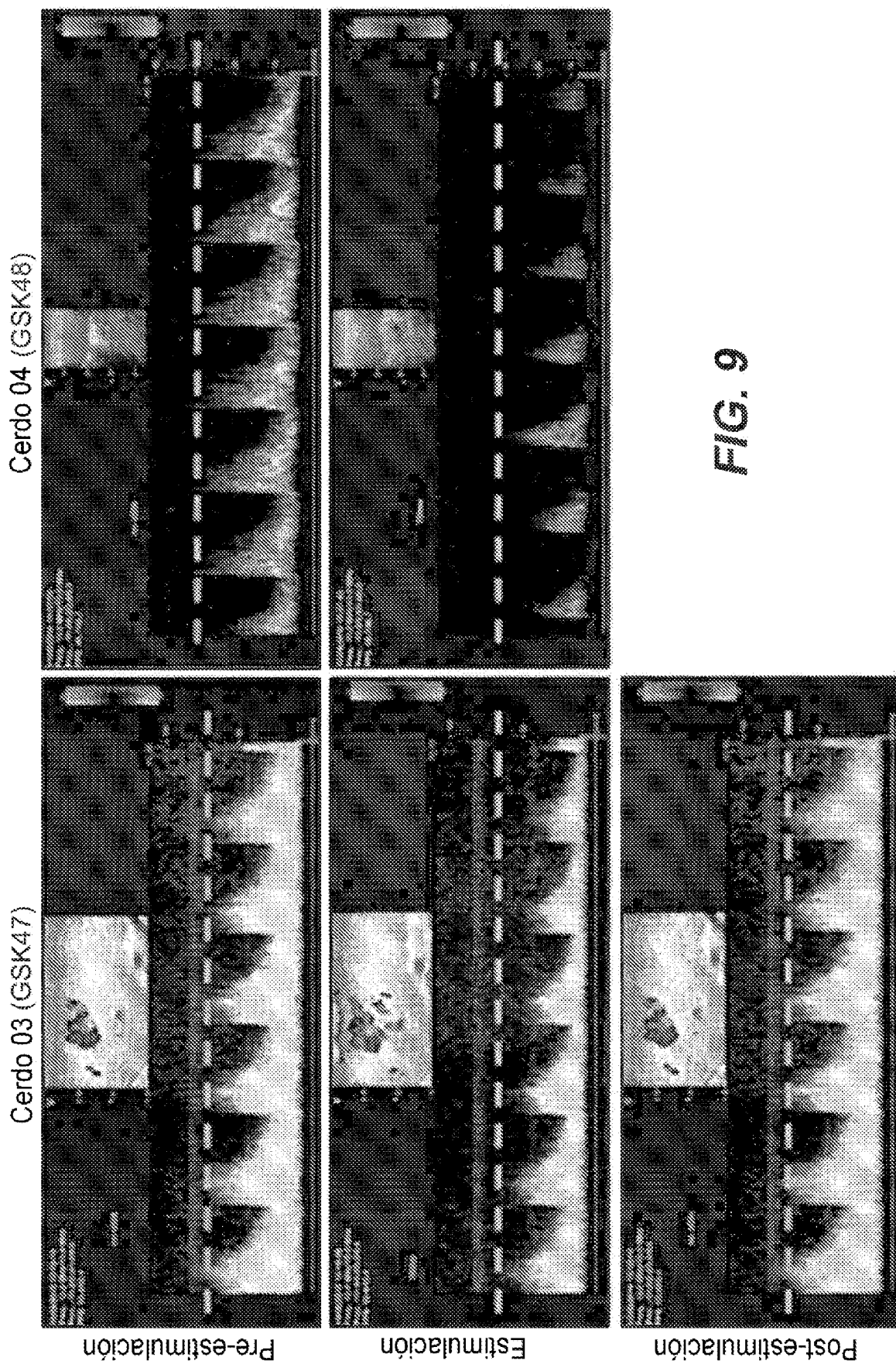


FIG. 10a

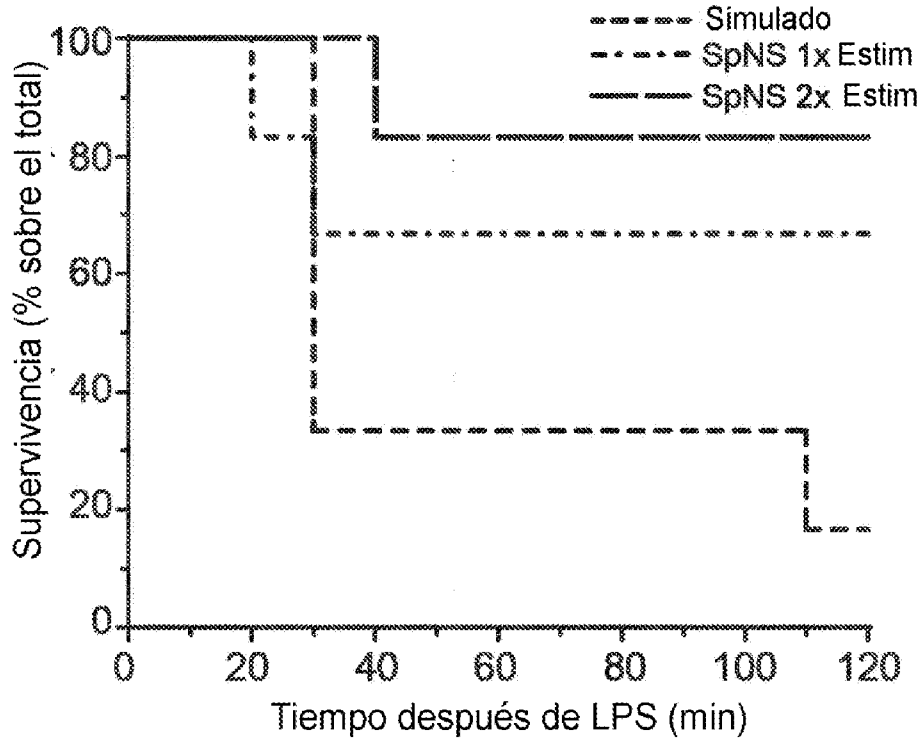


FIG. 10b

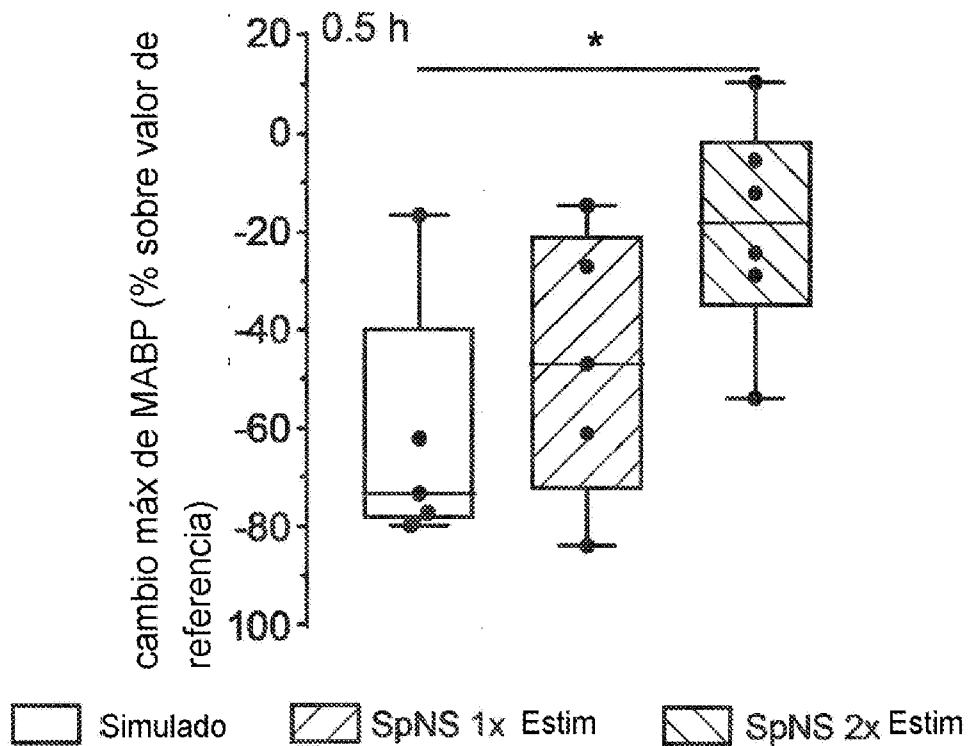


FIG. 10c

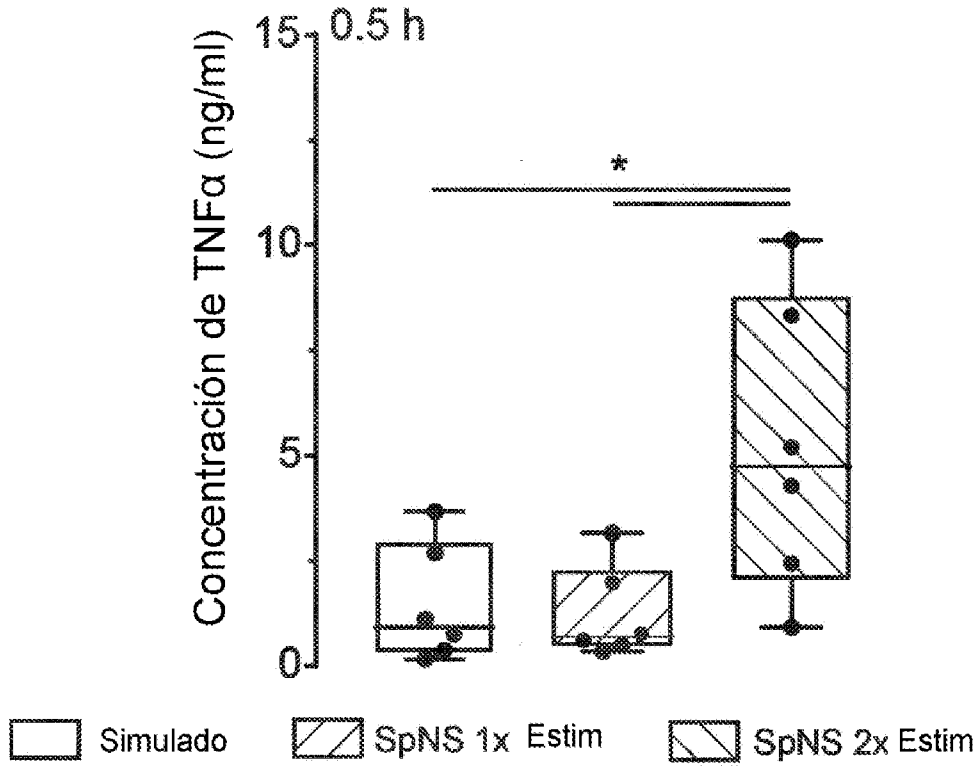


FIG. 10d

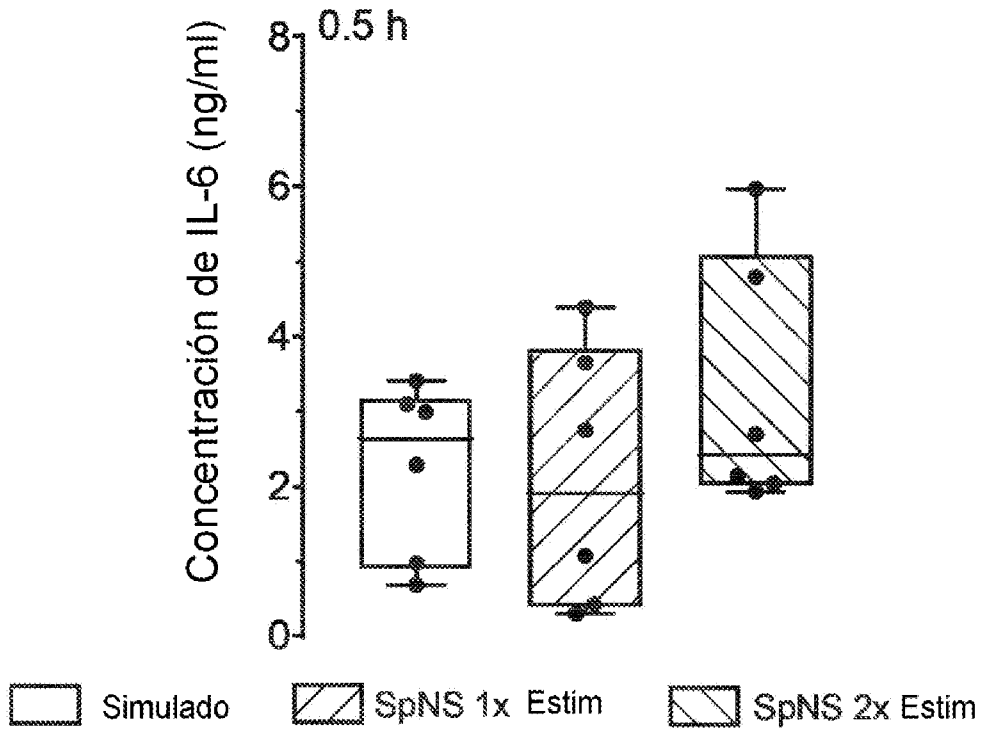


FIG. 11a

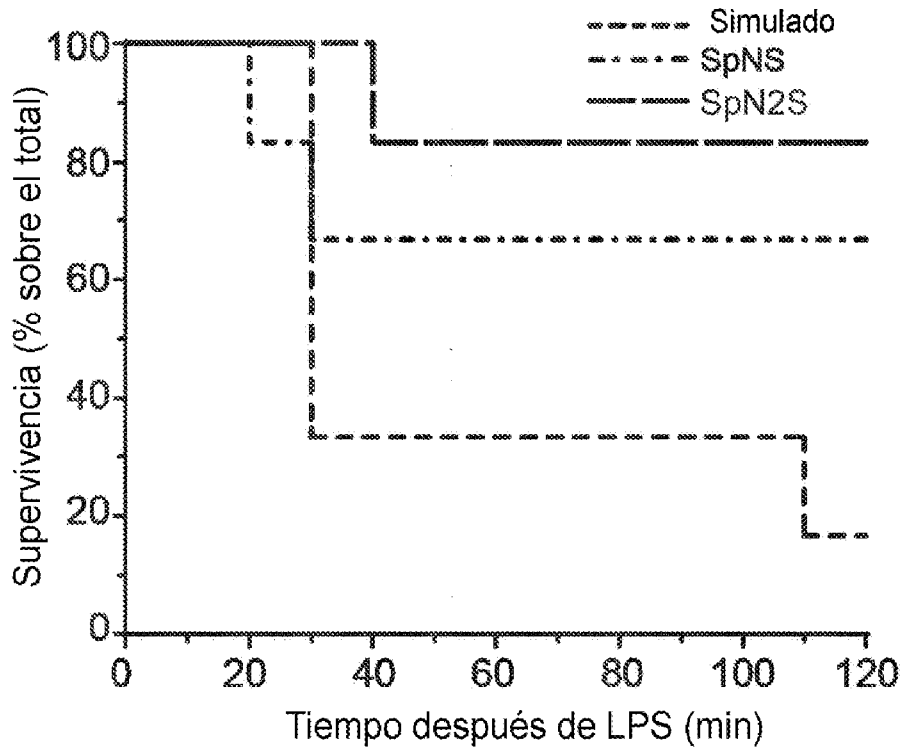


FIG. 11b

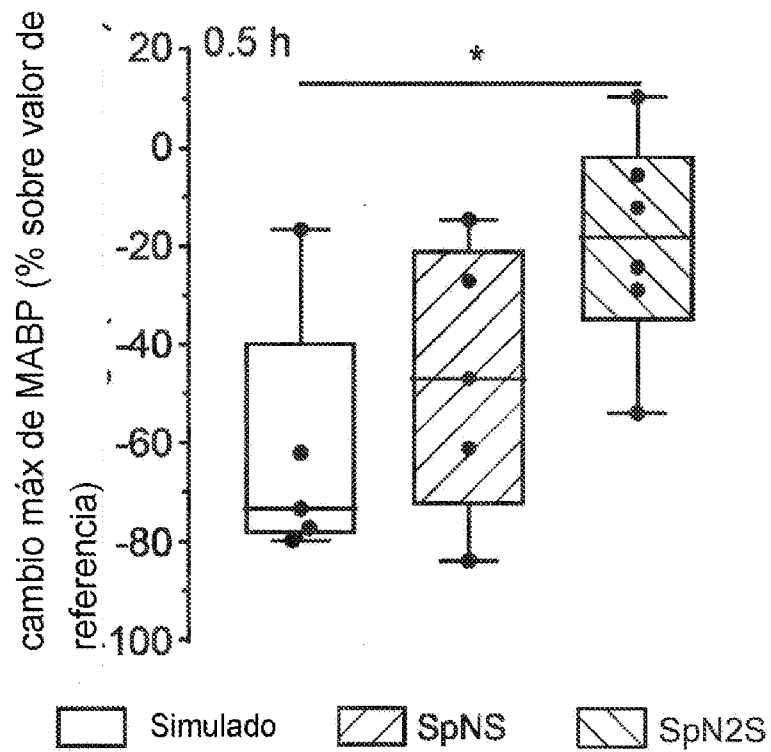


FIG. 11c

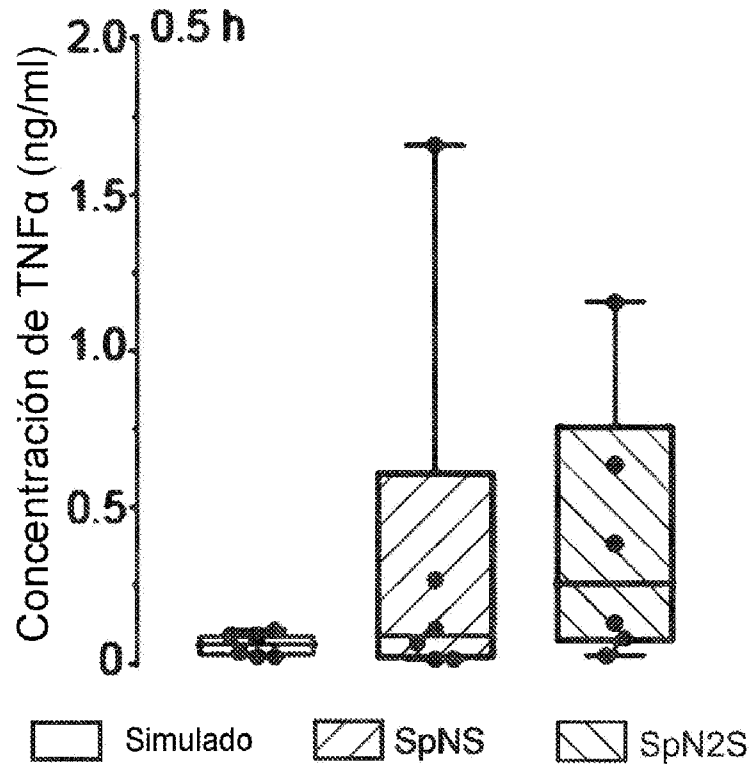


FIG. 11d

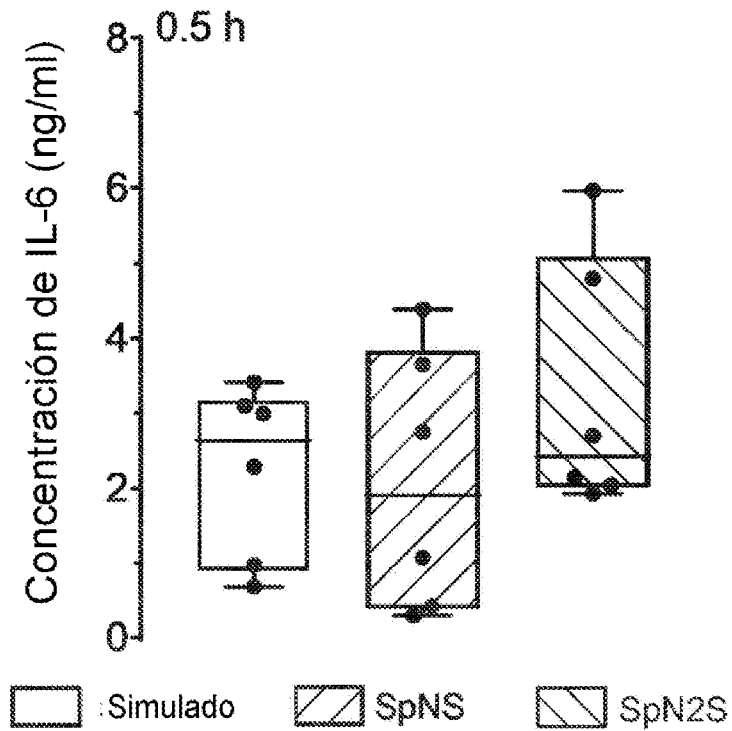


FIG. 12a
SIMULADO

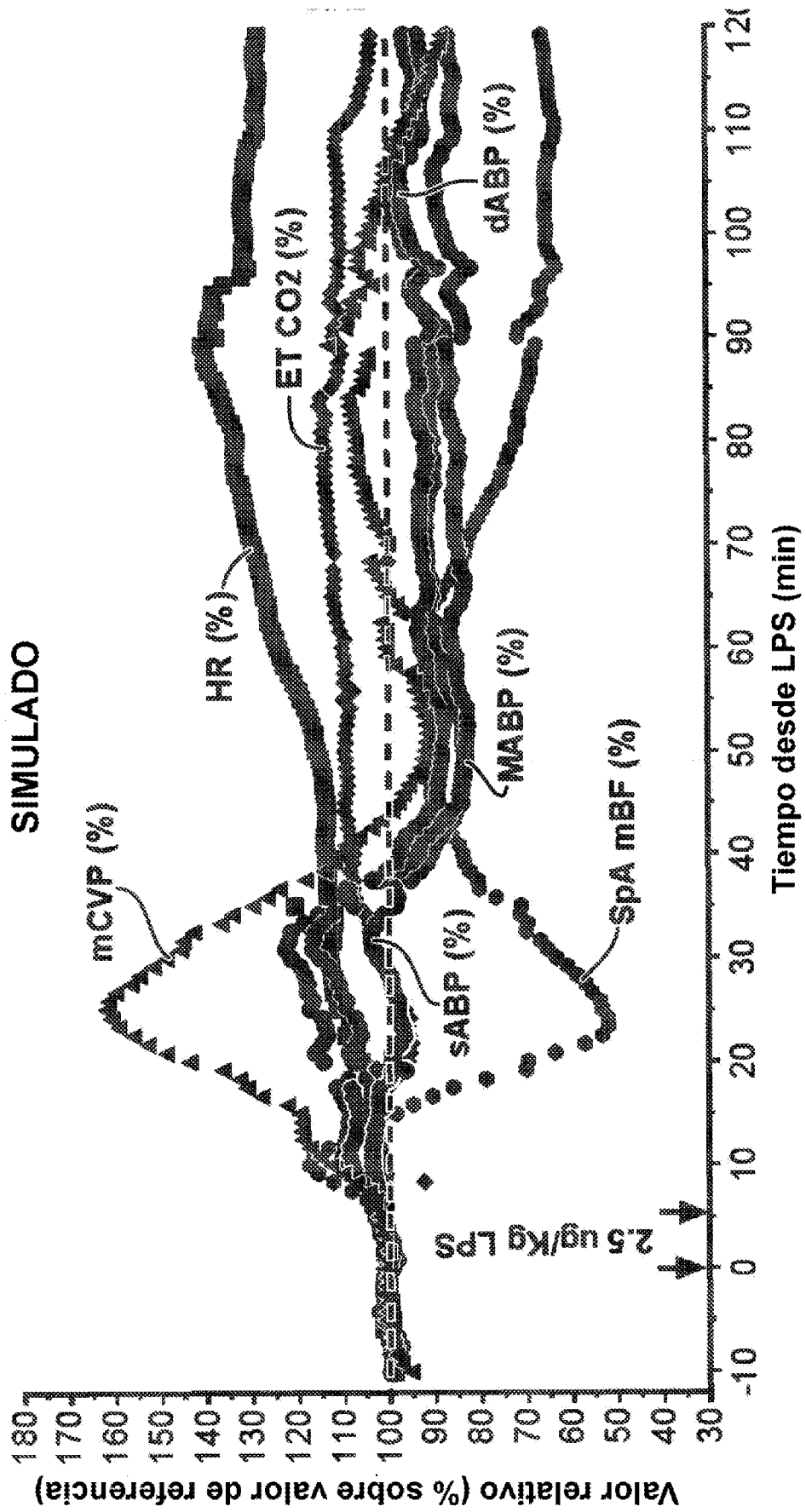


FIG. 12b

SpNS

2min SpN Estim

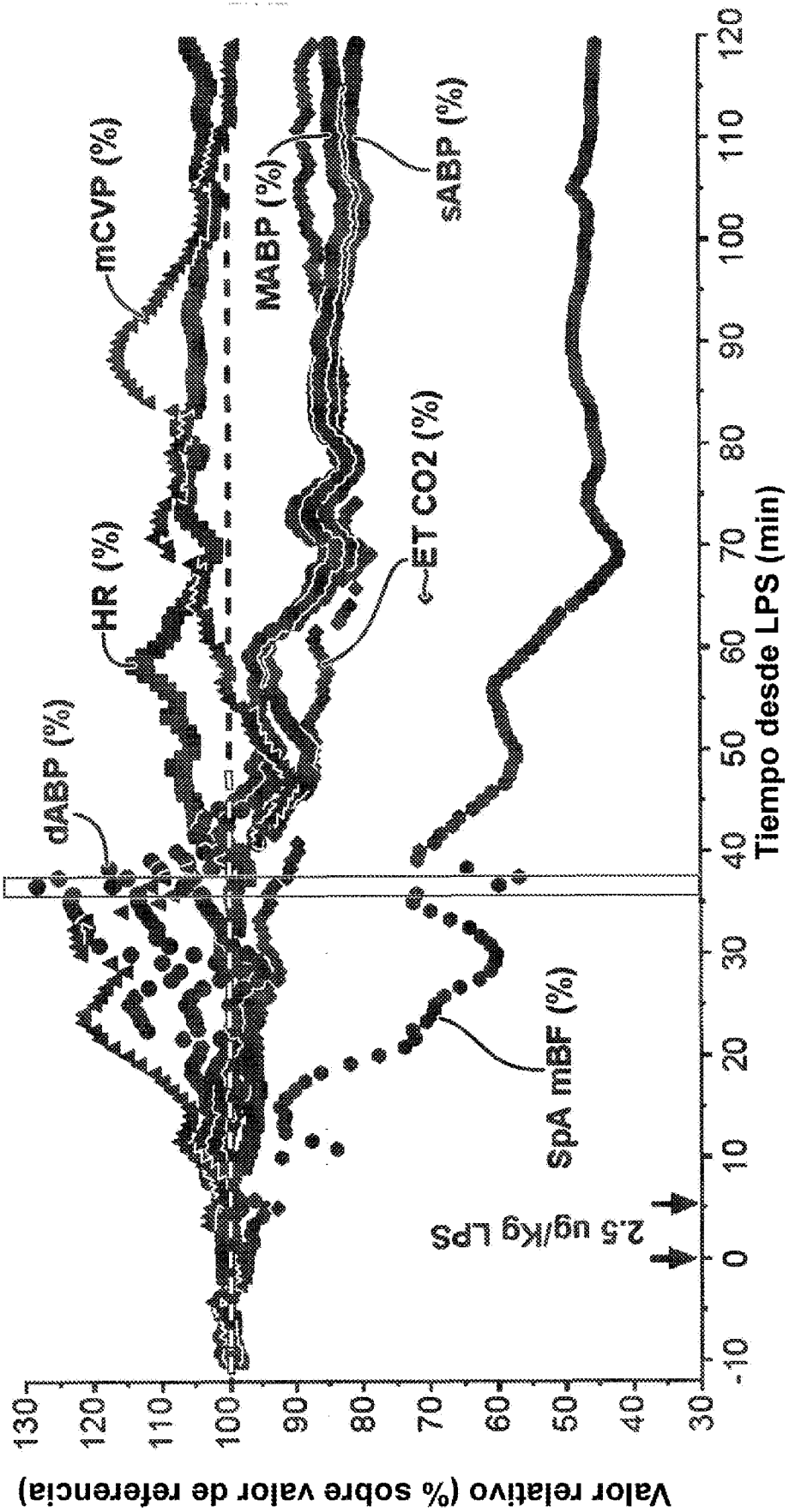


FIG. 13A

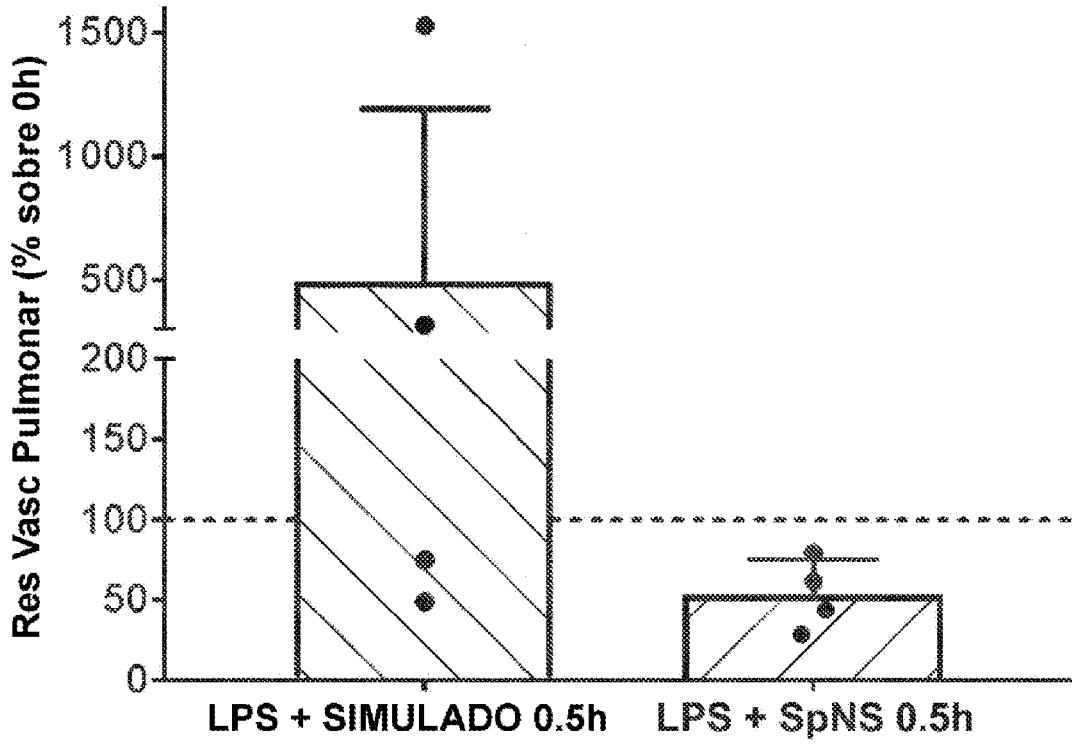


FIG. 13B

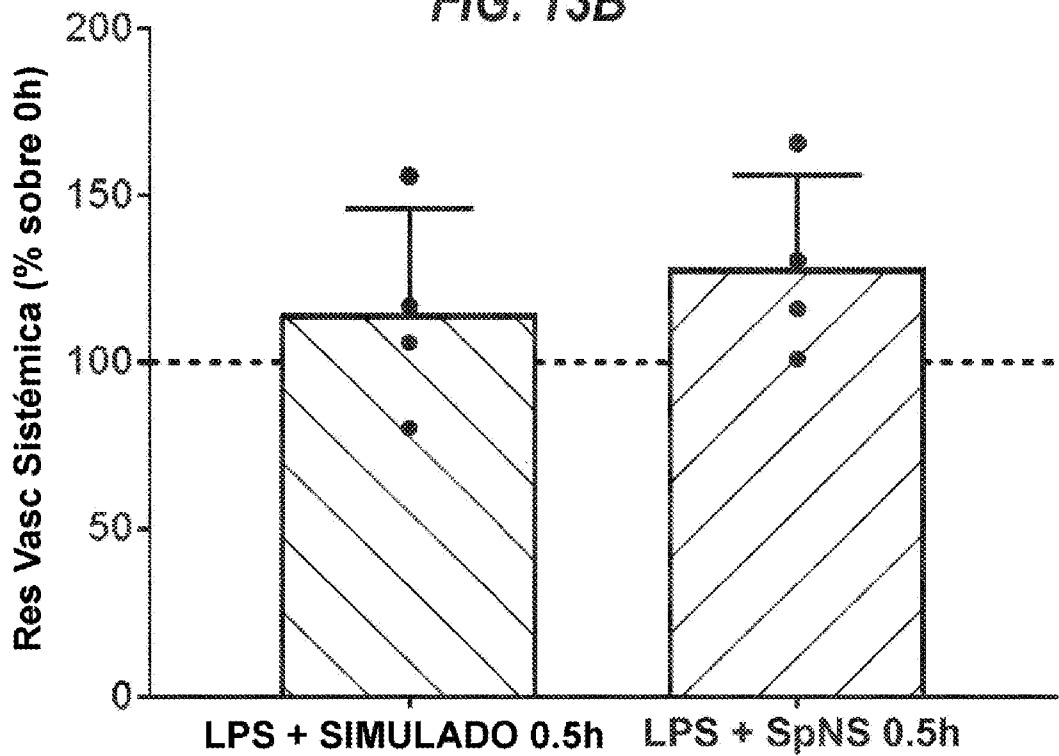


FIG. 13C

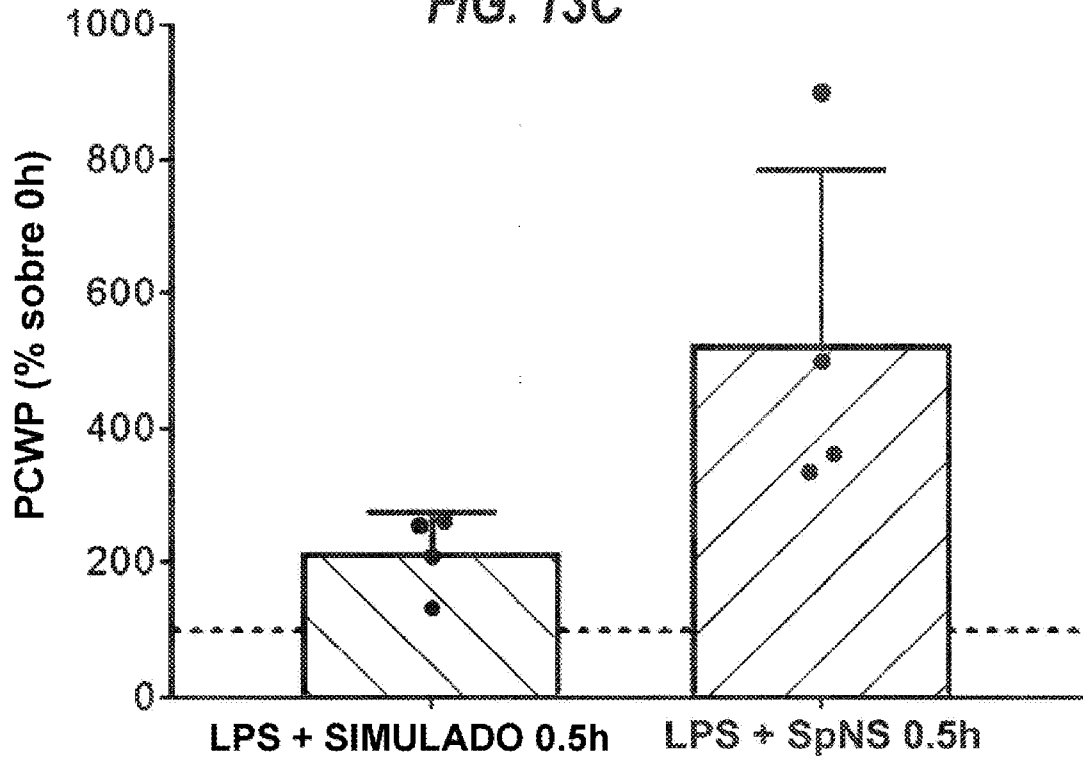
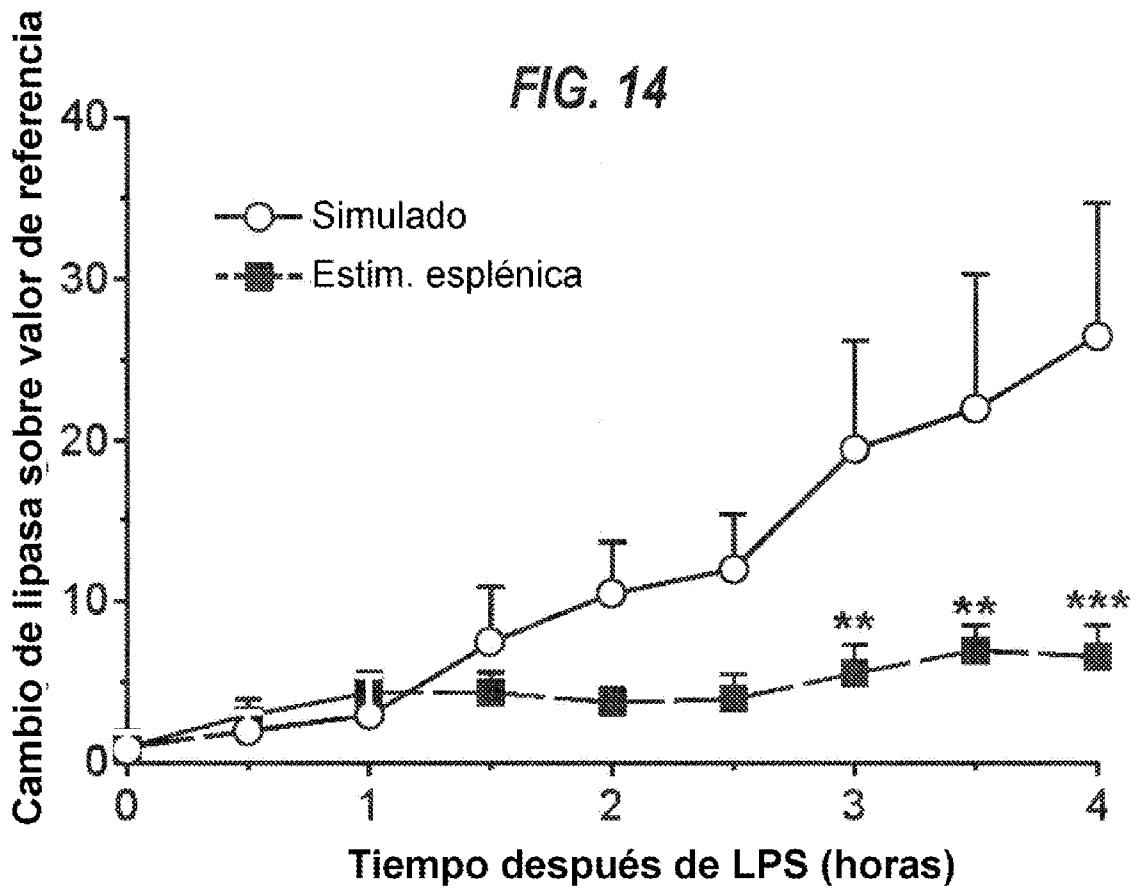


FIG. 14



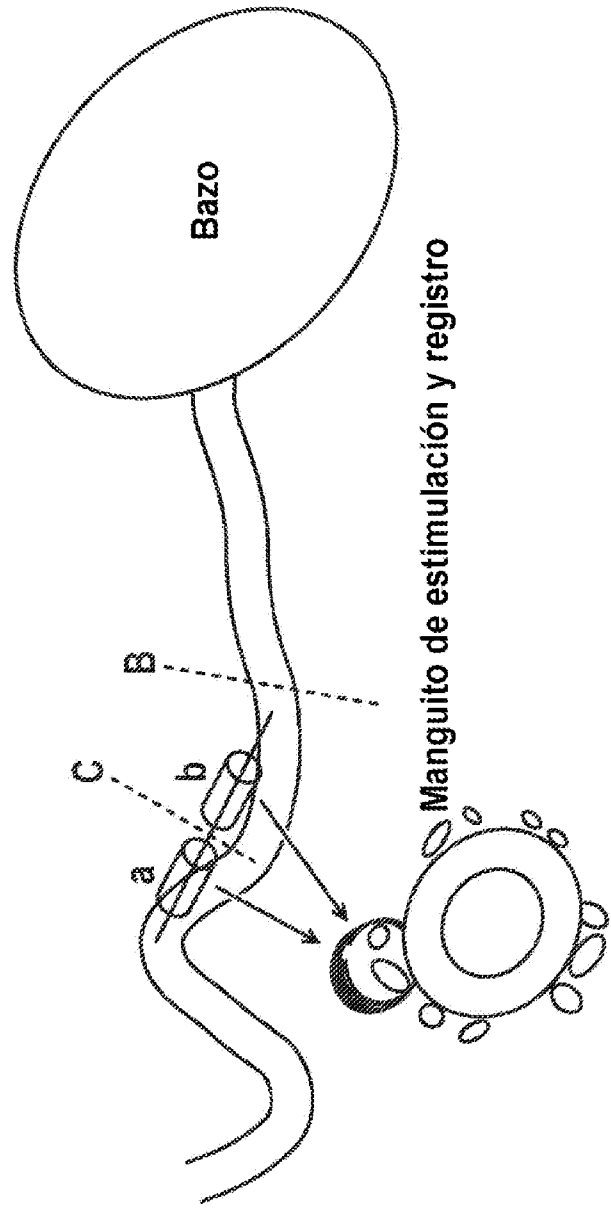


FIG. 15A

FIG. 15B

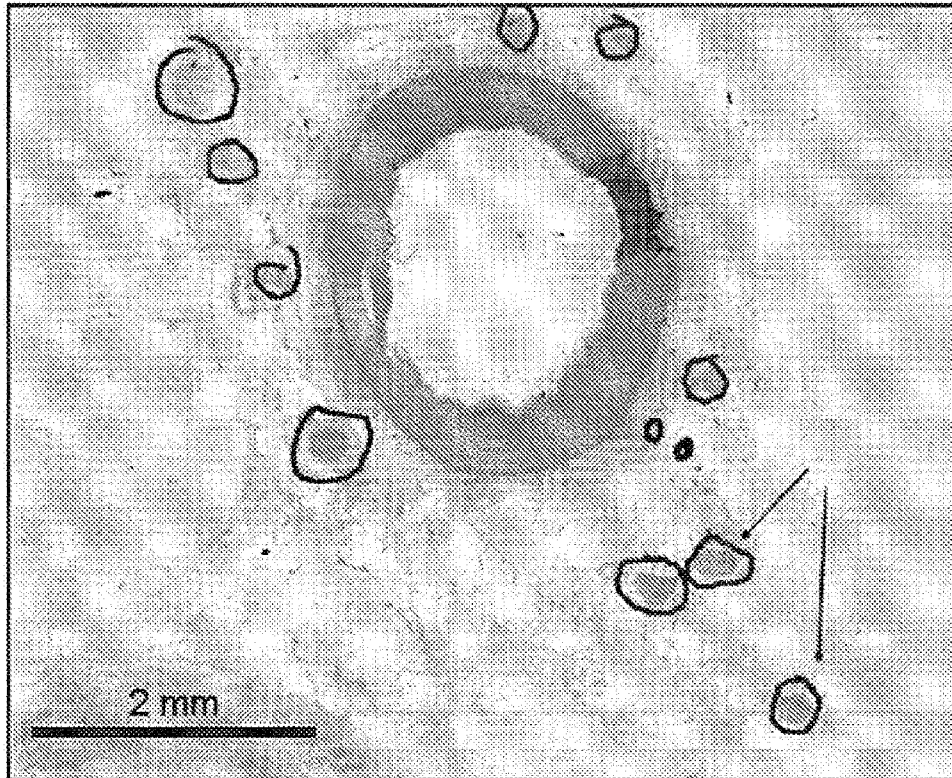


FIG. 15C



FIG. 15D

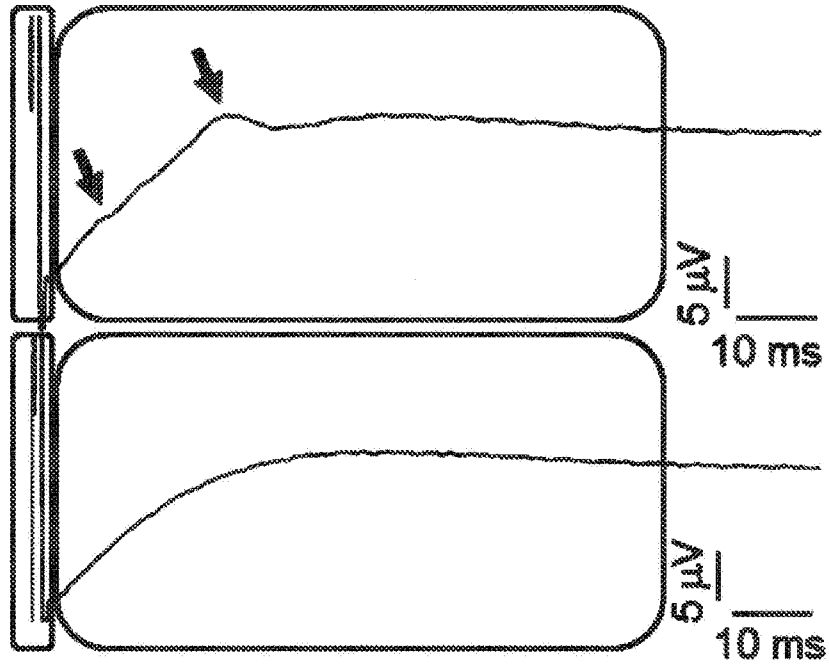


FIG. 15E

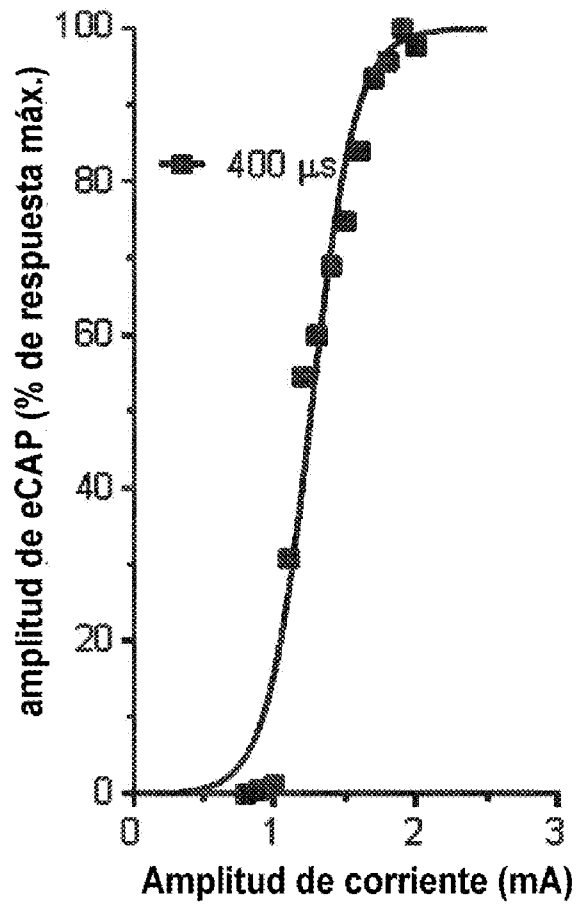


FIG. 15H

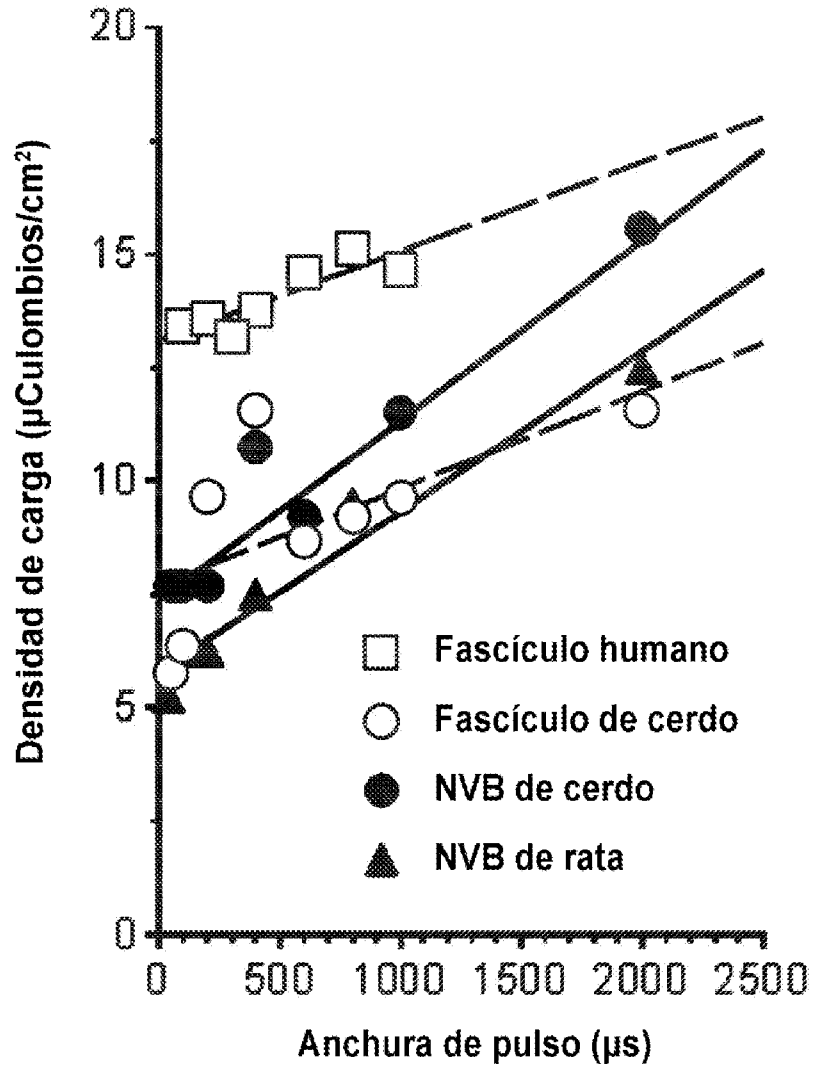


FIG. 16a

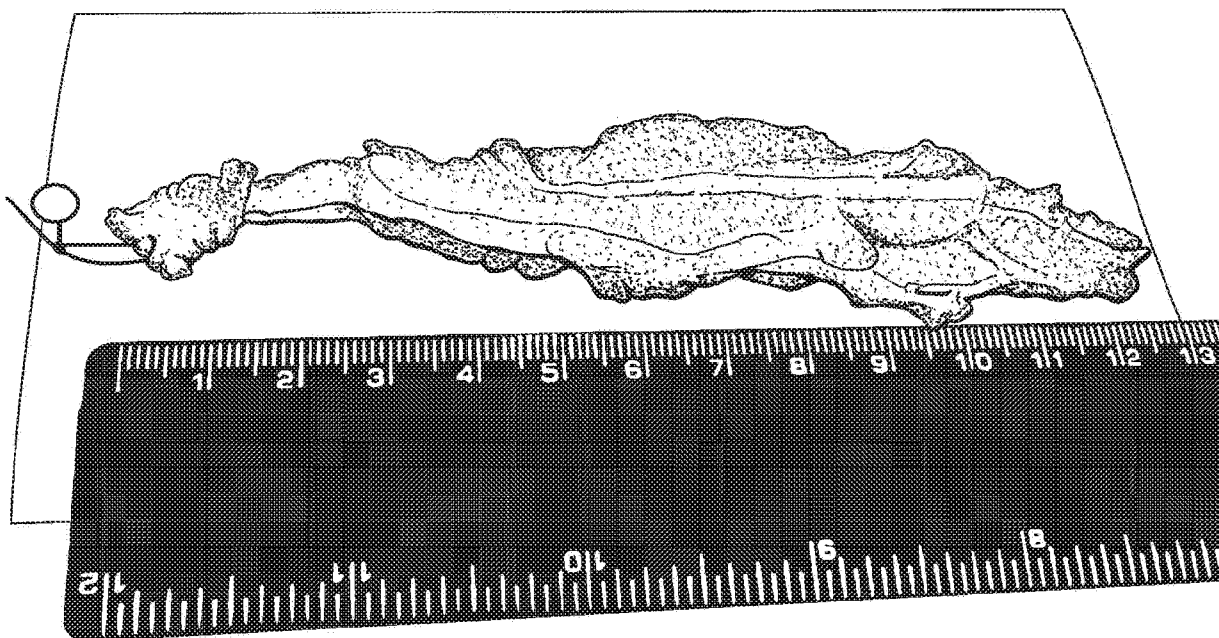


FIG. 16b

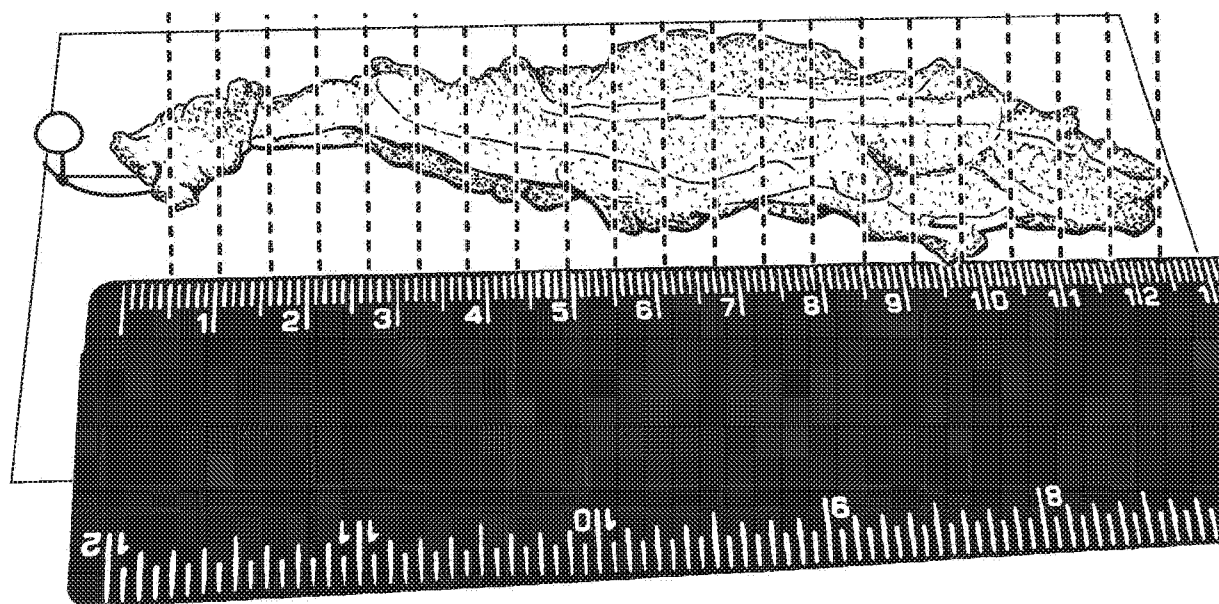


FIG. 16c

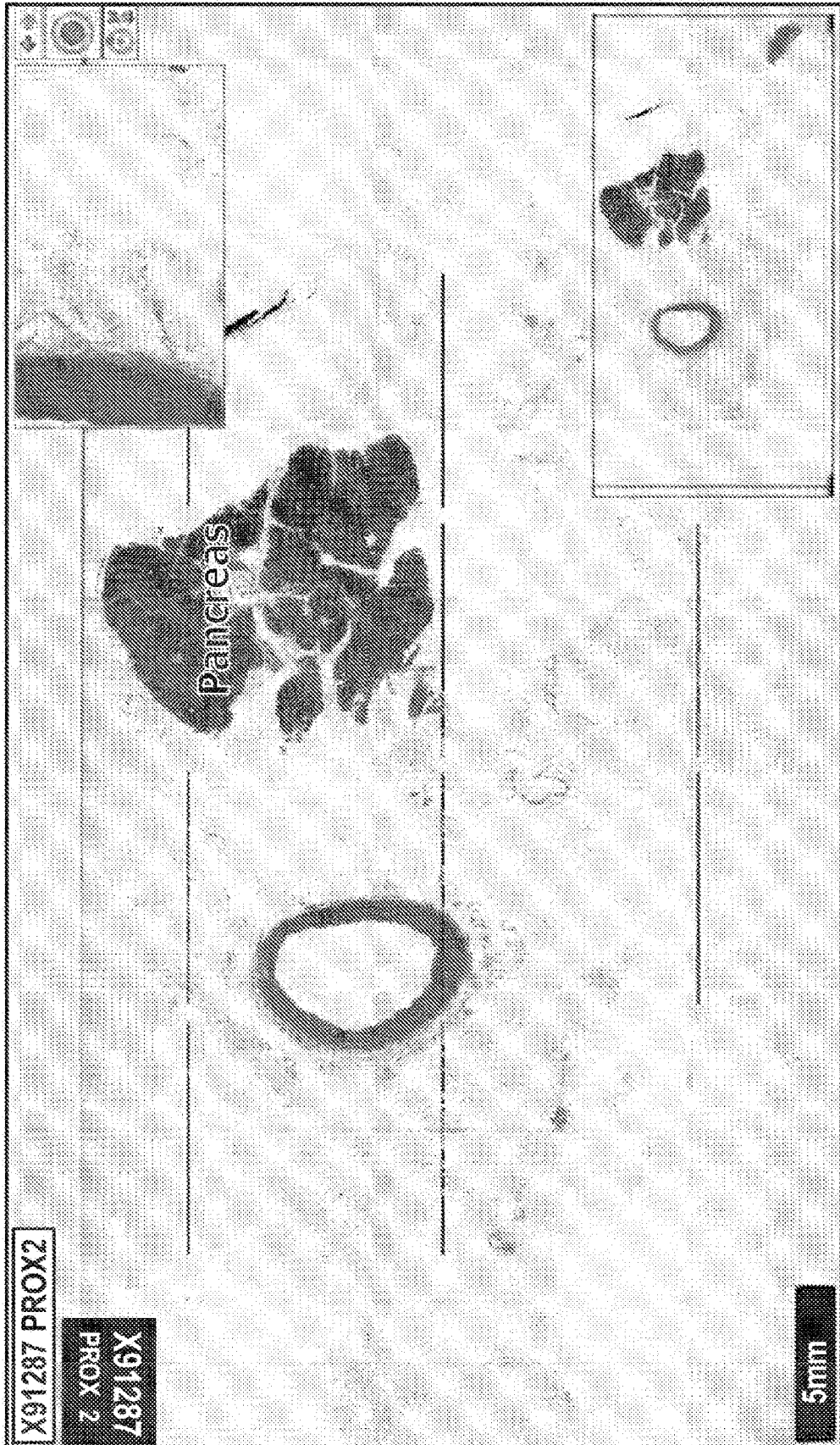
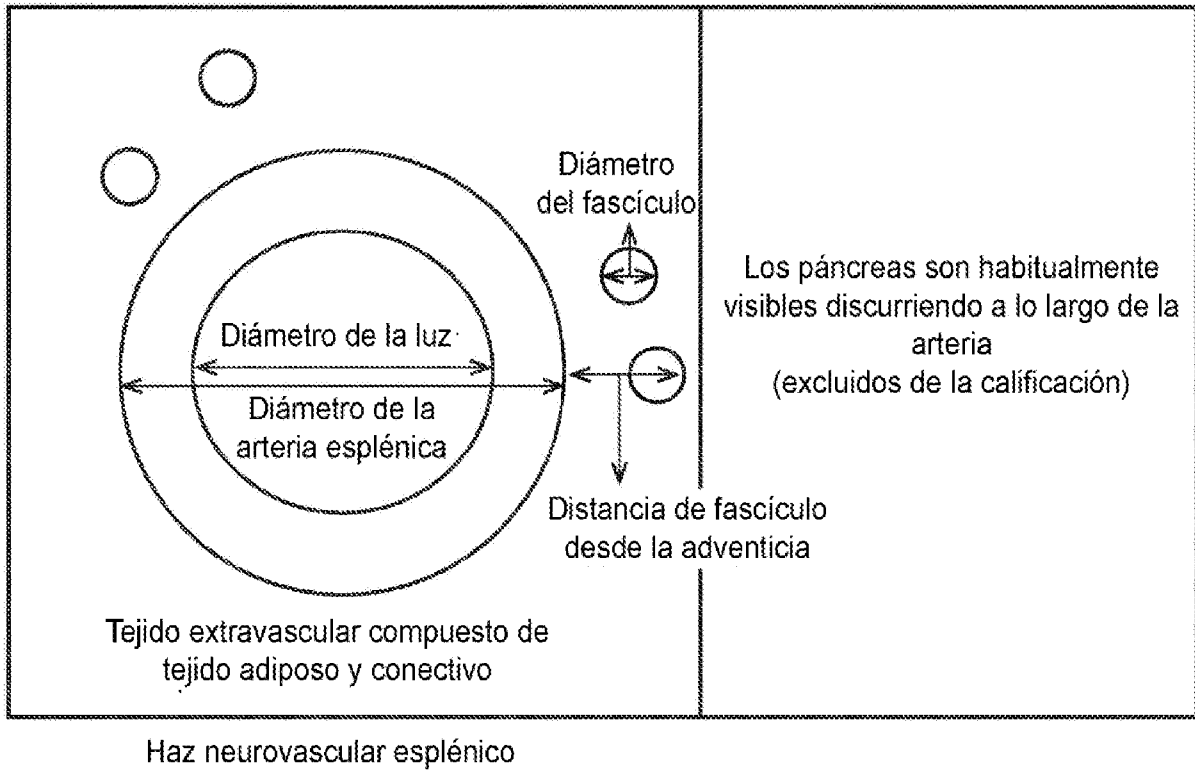


FIG. 16d



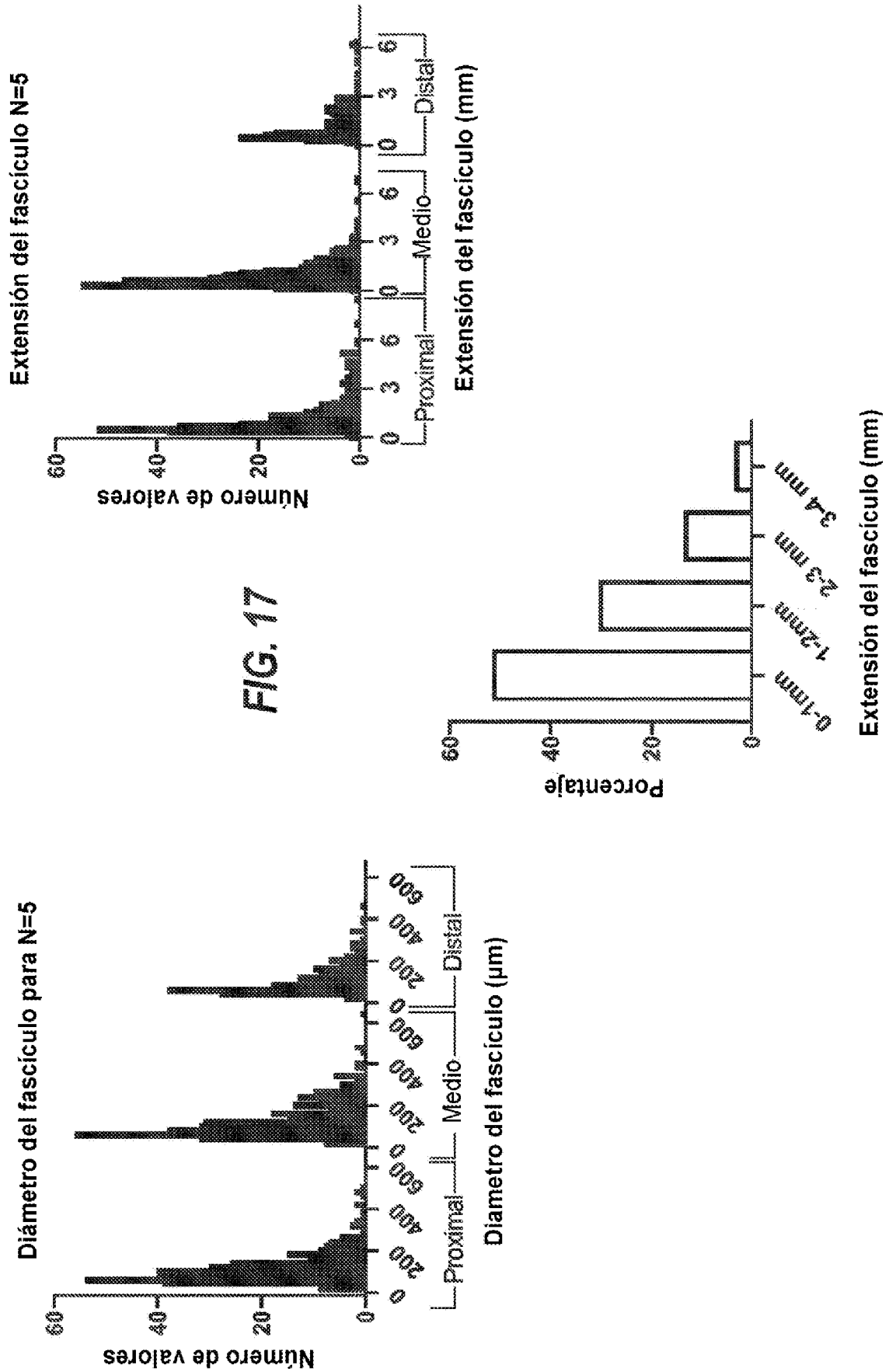


FIG. 18a

Estimulación aguda en el haz neurovascular esplénico
Curva de reclutamiento de población

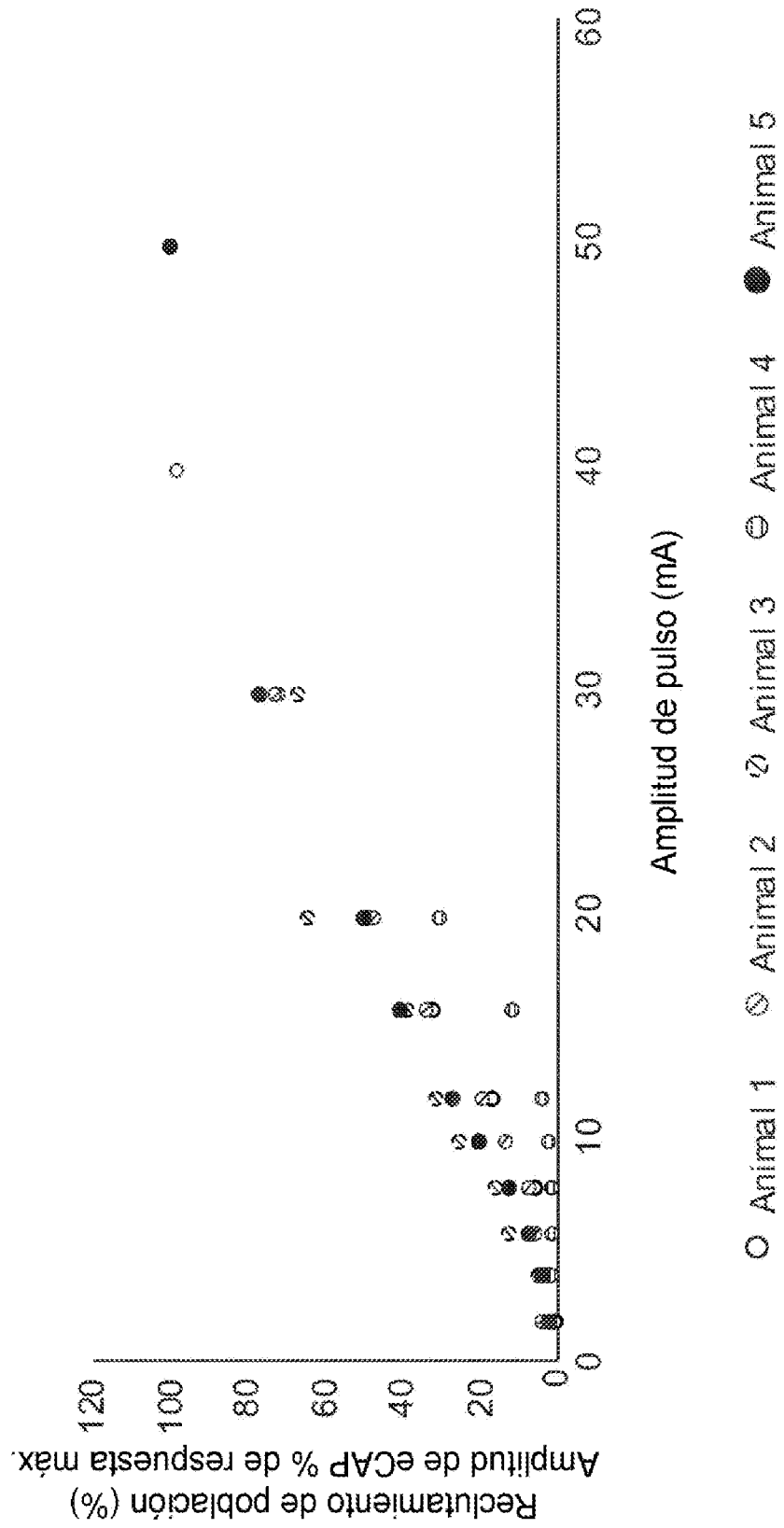


FIG. 18b

Estimulación aguda de haz neurovascular esplénico
Curva de fuerza - duración

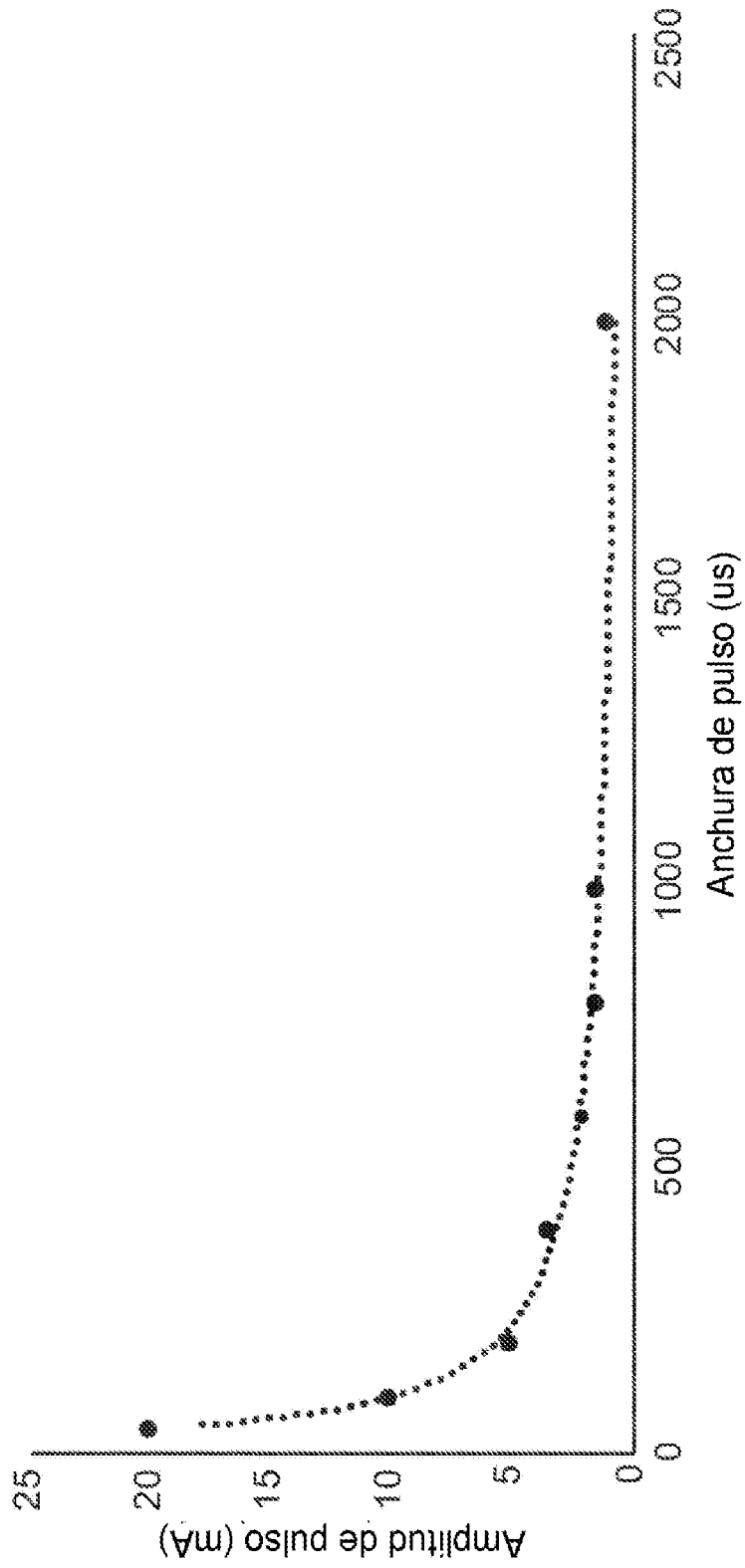


FIG. 19a

datos *in-silico* de modelos porcinos

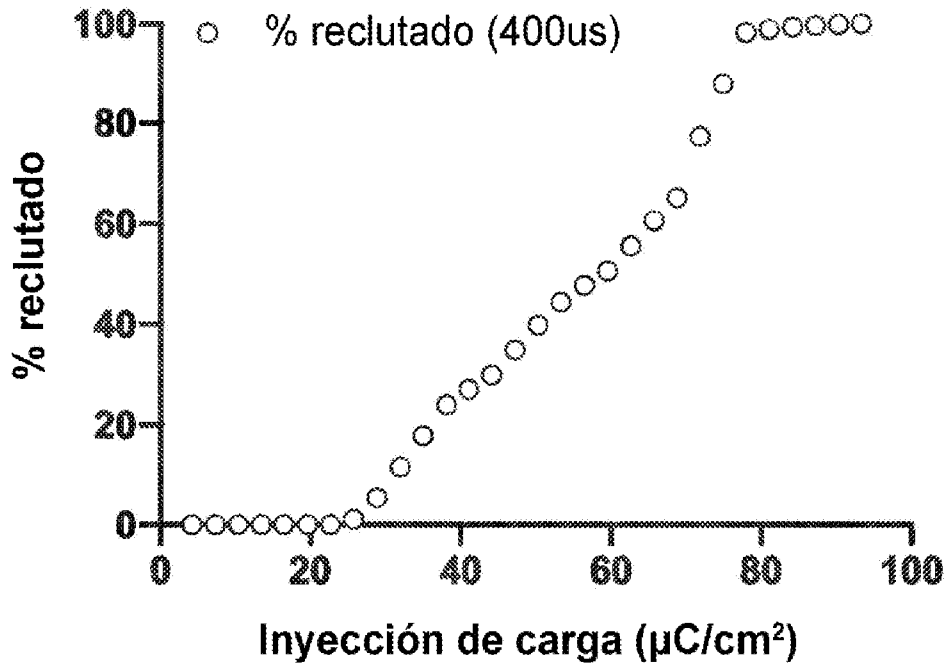


FIG. 19b

datos *in-silico* de modelos porcinos

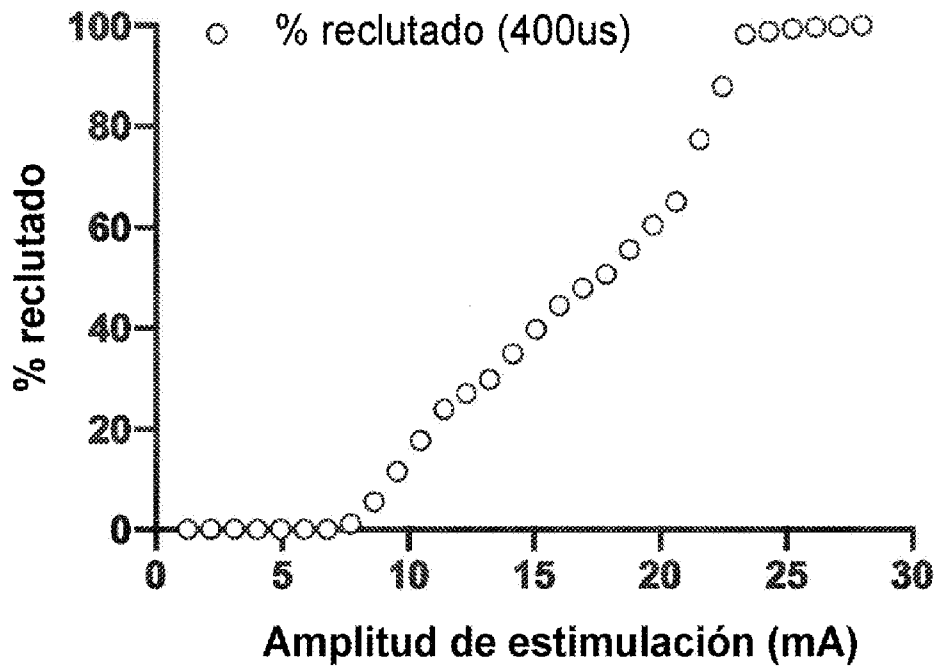


FIG. 19c

datos *in-silico* de modelos humanos

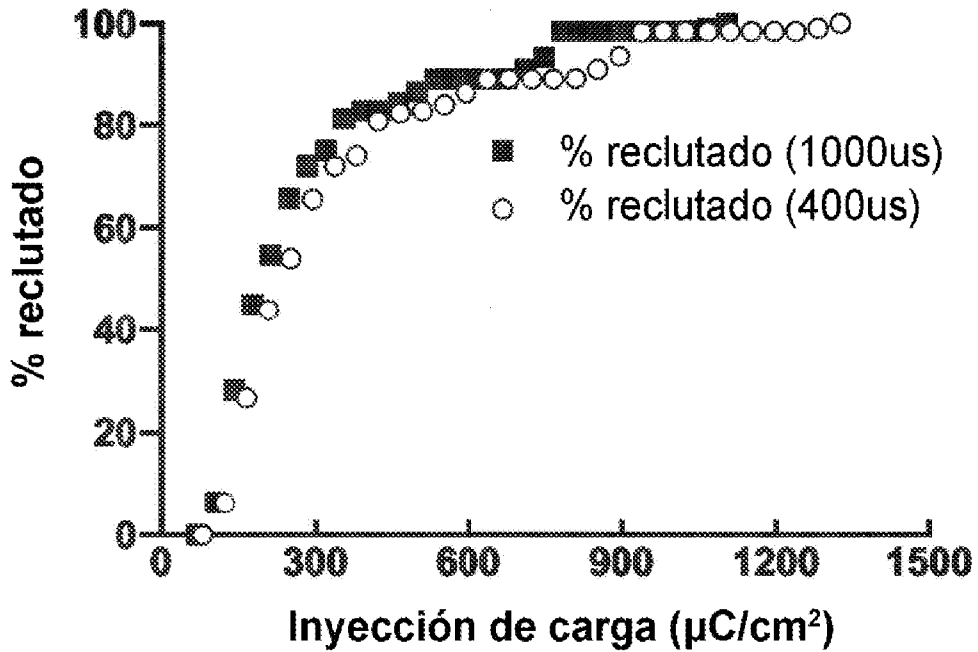


FIG. 19d

datos *in-silico* de modelos humanos

