

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 319**

51 Int. Cl.:
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06819957 .9**
96 Fecha de presentación: **13.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **2010903**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **Aparato y procedimiento para el diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombótica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular**

30 Prioridad:
14.12.2005 IT DA20050212 U

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2012

73 Titular/es:
Sedidodici Srl
Via Roveredo 20/B
33170 Pordenone, IT y
Centro di Riferimento Oncologico

72 Inventor/es:
DE MARCO, Luigino;
STEFFAN, Agostino y
MAZZUCATO, Mario

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 387 319 T3

DESCRIPCIÓN

Aparato y procedimiento para el diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombótica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un aparato y procedimiento para el diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombótica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular. Para ser más exactos, la presente invención permite el estudio *in vitro*, en un circuito cerrado, de hemostasia primaria y la formación del coágulo.

Antecedentes de la invención

10 La hemostasia es el proceso que conduce a la detención de pérdida de sangre de vasos sanguíneos dañados y es esencial para la vida. Puede dividirse en tres procesos principales:

- adhesión y activación de las plaquetas;
- formación de fibrina;
- contracción vascular.

15 La trombosis es una formación no deseada de un bloqueo hemostático o un trombo dentro de un vaso sanguíneo o del corazón.

Un acontecimiento hemostático patológico, bien trombótico, debido a la falta repentina de flujo sanguíneo en un vaso sanguíneo, como sucede con arterias coronarias en infarto de miocardio, o bien hemorrágico, representa un grave problema para el sistema cardiovascular. Por otro lado, una de las manifestaciones de enfermedad más frecuentes en el "mundo Occidental" se asocia sin duda alguna con alteraciones cardiovasculares adquiridas tales como manifestaciones ateroscleróticas, aneurismas, derivaciones aterovenosas, vasculitis, anomalías de las válvulas cardiacas, fibrilaciones auriculares y enfermedades de conducción, trombosis de las venas y arterias y numerosas anomalías genéticas asociadas con defectos hemostáticos. Estas manifestaciones patológicas pueden estar presentes incluso en sujetos que en su vida diaria normal no han mostrado nunca ningún acontecimiento patológico y que, por el contrario, con ocasión de operaciones quirúrgicas, pueden sufrir manifestaciones hemorrágicas graves. Se reconoce que la enfermedad cardiovascular representa la causa de muerte del 39% de los hombres y 49% de las mujeres (Ital Heart J 2004; 5 (Supl 3): 22S-37S).

En la última década el número de anomalías genéticas halladas en estos defectos hereditarios o adquiridos ha aumentado drásticamente.

30 En muchos casos, sin embargo, la identificación de las anomalías genéticas no conduce a la conclusión de que ese paciente particular tendrá sin duda alguna una manifestación patológica, al igual que por otro lado los sujetos con manifestaciones trombóticas o hemorrágicas no siempre tienen una anomalía genética manifiesta.

Esta situación, claramente difícil desde un punto de vista de diagnóstico y pronóstico, se debe al hecho de que el sistema hemostático, que controla principalmente el estado de reparación de tejido, se caracteriza por una combinación multifactorial de acciones bioquímicas-biofísicas para controlar y regular el proceso, con una abundancia de "mecanismos redundantes", también capaces de compensar posibles deficiencias no graves.

Esto hace extremadamente importante tener, en el ambiente clínico, un ensayo funcional *ex vivo* que pueda identificar riesgos trombóticos y hemorrágicos potenciales en sujetos "silenciosos" para manifestaciones cardiovasculares patológicas.

40 Como se conoce, las plaquetas son los principales protagonistas celulares de procesos hemostáticos y con sus capacidades adhesivas y de agregación intrínsecas normalmente controlan la reparación de daño tisular, que deriva de acontecimientos fisiológicos o que siguen a lesiones patológicas.

En particular, las interacciones entre plaquetas y el endotelio basal son importantes.

45 En un vaso sanguíneo no dañado normal el endotelio realiza un papel activo en la prevención de la formación del trombo. De hecho, el endotelio genera y libera no solamente prostaciclina y nítróxico, que inhiben la agregación de plaquetas, sino también el activador de plasminógeno y sustancias anticoagulantes tales como heparina y heparin sulfato.

Cuando una placa aterosclerótica se rompe o un vaso sanguíneo se corta o se daña, el endotelio se daña y las plaquetas se adhieren a las sustancias que componen el subendotelio, por ejemplo colágeno, y se activan.

50 Esta adhesión implica la interacción entre los componentes subendoteliales como el factor de Von Willerbrand, y el complejo de receptor glicoproteico GPIb-IX-V localizado en la membrana superficial de las plaquetas.

La activación de las plaquetas conduce a su cambio de forma, a medida que se aplanan y se forman pseudópodos.

La masa de plaquetas agregadas forma un tapón que, junto con la constricción de los vasos mantiene la hemostasia en los vasos pequeños hasta que el tapón de plaqueta se refuerza por la fibrina.

5 Sin embargo, en algunas condiciones, las plaquetas pueden exacerbar el proceso de reparación y se activan de una manera inapropiada si hay un cambio patológico en los vasos sanguíneos, por ejemplo aterosclerosis que puede provocar un acontecimiento drástico que conduce a la oclusión del vaso sanguíneo: trombosis. Este último acontecimiento, si se produce en distritos "nobles" tales como la circulación del cerebro o corazón, pueden tener consecuencias letales.

10 Para entender los mecanismos que conducen a la formación y crecimiento de un "trombo mural" oclusivo es necesario definir las propiedades, que son variables, del flujo sanguíneo y la pared vascular del flujo sanguíneo y la pared vascular. Estas variables, como la naturaleza de las superficies reactivas, células sanguíneas y pared vascular y las fuerzas hidrodinámicas, pueden modular directamente el proceso de adhesión, activación, agregación y crecimiento de los trombos plaquetarios.

15 La fase primaria de la "cascada trombótica" implica que las plaquetas, primero en movimiento con el flujo sanguíneo, se unen de forma irreversible, adhesión estable, hasta el punto de daño vascular, resistiendo la acción contraria de las fuerzas hidrodinámicas que tienden a devolverlas al fluido (Bell GI, Science. 1978; 200(4342): 618-27).

20 Las fuerzas hidrodinámicas que se oponen a la adhesión aumentan a medida que aumentan las tasas de cizallamiento, y se contrastan eficazmente por la acción de la sustancia citoadhesiva Factor de Von Willerbrand (vWF) (Savage, B y col. 1996; Cell 84: 289-297). Debido a sus propias propiedades intrínsecas el vWF es capaz de cambiar el estado conformacional una vez unido al colágeno, la sustancia básica de la matriz extracelular, y sometido a altas tasas de cizallamiento. De hecho, en estas condiciones el vWF pasa de una forma globular, propia de su estado en solución en la sangre, a la forma elongada, caracterizada por un aumento fundamental de los sitios de adhesión disponibles para las plaquetas (Siedlecky CA. y col. Blood. 1996; 88(8): 2939-50). El vWF aumenta por lo tanto su capacidad adhesiva con el aumento de intensidad del flujo; esta peculiaridad, asociada con la capacidad de 25 el colágeno para unirse a las plaquetas a flujo bajo, provoca que la asociación vWF-colágeno represente un mecanismo de adhesión dinámica para las plaquetas, capaz de adaptarse a cualquier condición de fluidodinámica, de la vena o arteria, fisiológica en la preparación del daño tisular o patológica tal como por ejemplo en la rotura de la placa aterosclerótica (Kher N. y col. Semin Thromb Hemost. 2004; 30(6): 665-72). Otras sustancias, como los proteoglicanos, fibronectina, fibrinógeno, y otras sustancias que derivan de las células endoteliales, concurren para mejorar la eficacia de este modelo adhesivo, adaptándose a los diversos distritos vasculares y las diferentes estimulaciones capaces de iniciar el proceso hemostático (Ruggeri ZM. J Thromb Hemost. 2003; 1(7): 1335-42).

30 También se sabe que una hemorragia o trombosis puede permanecer fácilmente sin diagnosticar con el uso de sistemas analíticos tradicionales, tales como la evaluación del tiempo de hemorragia, turbidimetría, agregación de plaquetas potenciométrica, en luminiscencia u otros.

35 En el campo de diagnóstico de las patologías hemostáticas, se conocen en particular tres aparatos, que se ilustrarán ahora brevemente (Harrison P. Blood Reviews. 2005; 19: 111-123).

40 El aparato conocido PFA-100 (Dade-Behring) estimula función plaquetaria a altas tasas de cizallamiento. Este aparato conocido necesita sangre con citrato para evitar que tenga lugar una coagulación; sin embargo, esto evita el funcionamiento normal de las plaquetas, al menos con respecto a adhesión. El aparato conocido PFA-100 también necesita un activador externo, ADP o Adrenalina. Este aparato conocido parece capaz de reemplazar el tiempo de hemorragia, pero se perjudica por el alto hematocrito, bajo conteo plaquetario y, en resumen, es un instrumento que no es muy flexible y no es sensible a condiciones pretrombóticas.

45 También se conoce el aparato IMPACT (Diamed), que aprovecha el principio del analizador de cono y placa (CPA) usando sangre completa y una superficie de poliestireno; este aparato conocido mide la agregación plaquetaria a altas tasas de cizallamiento y la adhesión a la superficie de la placa; este aparato conocido es sensible a deficiencias en vWF y fibrinógeno, pero no es muy sensible a otras proteínas de la matriz extracelular.

También se conoce el aparato Ultegra-RPFA (Accumetrix), que consiste en un agregómetro turbidimétrico; sin embargo, es solamente una evolución tecnológica del enfoque agregométrico ya conocido y por lo tanto padece las mismas limitaciones extensivas.

50 También se conocen los documentos de patente WO-A-93/00989, WO-A-94/16326 y WO-A-2006/066008 que se refieren a cámaras de perfusión para analizar los fenómenos de trombogénesis. En estos documentos conocidos, la sangre se introduce a través de un circuito y a través de la cámara de perfusión por medio de una bomba de generación de vacío, al menos en las etapas iniciales del análisis. Sin embargo, el vacío generado constituye sustancialmente una fase de expansión variable que actúa con una fuerza aplicada en una fase incompresible, es decir, la sangre. Esto evita cualquier control de las fuerzas de flujo, haciendo imposible calcular el ambiente vascular al que se refiere el análisis. Además, una aplicación en condiciones de microgravedad se hace imposible debido a la presencia de una fase gaseosa, incluso si está enrarecida, en el sistema inevitablemente implica una interferencia

negativa de la fuerza de la gravedad, con el efecto de que se generan emulsiones, que son totalmente incompatibles con el ambiente vascular fisiológico que debe simularse.

5 También se conoce el documento DE-A-1-031-3284, que describe la aplicación de una bomba pulsátil para una aplicación cíclica a un birreactor en el que se insertan sustancias nutritivas alternativas y se retiran sustancias catabólicas de las células que se cultivan. Por lo tanto, esta aplicación también es inadecuada para el ambiente vascular fisiológico que debe simularse.

10 También se conocen las siguientes publicaciones científicas: BARSTAD R. M. y col: "A perfusion chamber developed to investigate thrombus formation and shear profiles in flowing native human blood at the apex of well-defined stenoses" ARTERIOSCLEROSIS AND THROMBOSIS: A JOURNAL OF VASCULAR BIOLOGY / AMERICAN HEART ASSOCIATION. DEC. 1994, vol. 14, N° 12, Diciembre 1994 (12-1994) páginas 1984-1991 y DIAZ-RICART M. y col: "Digital image analysis of platelet-extracellular matrix interactions: studies in von Willerbrand disease patients and aspirin-treated donors." HAEMOSTASIS. 1994 JUL-AUG vol. 24, n° 4, julio de 1994 (07-1994), páginas 219-229.

15 En estas publicaciones conocidas se usa una bomba peristáltica para conseguir perfusión. Sin embargo, este tipo de bomba es mecánicamente traumática para las células sanguíneas, que son vitales y reaccionan al estrés físico. El uso de una bomba pulsátil en un circuito cerrado se conoce de van Brengel y col., Arteriosclerosis, vol. 8 (1988), páginas 332-335.

20 Un fin de la presente invención es conseguir un aparato y procedimiento para el diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombótica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular que permita analizar el fenómeno hemostático en su totalidad y complejidad: adhesión plaquetaria a la matriz subendotelial, activación, agregación, crecimiento del trombo plaquetario y su estabilidad, en condiciones fluidodinámicas variable de acuerdo con el ambiente vascular considerado.

El Solicitante ha concebido, ensayado y realizado la presente invención para superar los defectos del estado de la técnica y obtener estos y otros fines y ventajas.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención se expone y caracteriza en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes relativas describen otras características de la invención o variantes de la idea principal de la invención.

30 De acuerdo con el fin anterior, de acuerdo con la presente invención, un aparato para el diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombótica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular comprende un sistema de tubos, en un circuito cerrado, en el que la sangre completa que va a someterse a diagnóstico es capaz de fluir; el sistema de tubos reproduce fielmente el circuito sanguíneo humano, y provechosamente las acciones de los fármacos antitrombóticos o antihemorrágicos pueden analizarse en el mismo.

35 El sistema de tubos comprende una cámara que tiene una pluralidad de microcanales que, gracias a sus características geométricas, simulan eficazmente las condiciones fluidodinámicas de la sangre en un capilar.

En esta cámara, también llamada cámara o cartucho de perfusión, es decir, donde los líquidos pasan o fluyen, en este caso sangre tomada de un cuerpo humano, se producen fenómenos biológicos de adhesión, activación, agregación y crecimiento del trombo plaquetario y su estabilización.

40 De acuerdo con una característica de la presente invención, dentro de los microcanales de la cámara de perfusión hay un sustrato citoadhesivo, para simular una superficie de vaso dañada.

La sangre se hace fluir en los tubos, y en particular en los microcanales de la cámara de perfusión, por medio de bombeo, provechosamente adecuado para reproducir al menos un flujo pulsátil, con presiones sanguíneas dentro del circuito cerrado en condiciones fisiológicas.

45 El medio de bombeo de tipo pulsátil y el circuito cerrado son capaces de simular fielmente el circuito cardiovascular humano y, en particular, son capaces de reproducir, de acuerdo con la frecuencia, el flujo coronario pulsátil o el flujo continuo de las arterias pequeñas y capilares, en condiciones fluidodinámicas controladas. El medio de bombeo de tipo pulsátil evita la presencia de gas en el circuito cerrado, y elimina el riesgo de producción de emulsión, que invalida el análisis.

50 En una realización preferente, la invención permite detectar la presión de la sangre en el circuito y en la cámara de perfusión por medio de medio de medición de presión adecuado, para controlar la fluidodinámica del circuito. El medio de medición de la presión controla el funcionamiento del medio de bombeo de modo que, cuando la constricción basal aumenta, debido al crecimiento del trombo, el flujo de sangre se mantiene sustancialmente constante, como sucede con mecanismos compensatorios fisiológicos reales.

El circuito cerrado conseguido también es ventajoso debido a que permite eliminar el riesgo de filtraciones de sangre

desde el aparato, reduciendo drásticamente de este modo el riesgo de contaminación a los operadores, y aumentando las condiciones globales de limpieza e higiene.

5 De acuerdo con la presente invención, los fenómenos hemostáticos que conducen a la formación del trombo plaquetario se controlan, en la cámara de perfusión, mediante adquisición de datos, por ejemplo imágenes, por un medio de adquisición óptica, que comprende provechosamente al menos un microscopio, conectado en serie a medio de filmación, por ejemplo una cámara.

El medio de filmación es por ejemplo, pero sin limitación, del tipo CCD, y tiene un sistema de grabación/adquisición integrado, conectado a medio de procesamiento electrónico, tal como un sistema computerizado digital que tiene un programa memorizado.

10 El programa, cuando se ejecuta en la memoria del sistema computerizado, es capaz de analizar en tiempo real las variaciones morfológicas, cinéticas y bioquímicas dentro y fuera de las plaquetas y la formación del trombo y su estabilización, en respuesta a diferentes tasas de cizallamiento aplicadas y diferentes superficies citoadhesivas.

De acuerdo con una característica ventajosa de la presente invención, el aparato es capaz de controlar el proceso de formación del trombo y además permite evitar el acontecimiento trombótico e infarto posterior.

15 Provechosamente, de hecho, la invención permite recrear artificialmente y fielmente el ambiente vascular del cuerpo humano, permitiendo controlar y analizar la posible formación de trombos "etapa a etapa".

20 Provechosamente, la formación del trombo en los microvasos, es decir, su constricción no es el único acontecimiento que puede detectarse por la invención puesto que, gracias a su enseñanza, es posible detectar tanto las etapas antes de la formación del trombo, es decir, las primeras etapas adhesivas de las plaquetas en la superficie adecuada, la etapa de activación de plaquetas y también la etapa posterior cuando se forma el trombo, es decir, la constricción del vaso sanguíneo, como su posible consolidación y disolución. En particular, la invención es sensible a acontecimientos bioquímicos interplaquetarios específicos, en plaquetas individuales, agregados o trombos, tales como calcio intracelular u otra sustancia característica de procesos de activación, independientemente del proceso de activación. Esto es posible debido a que la invención proporciona una detección en tiempo real de los datos analíticos, gracias a una detección continua y presentación durante el análisis, a diferencia del estado de la técnica, a una frecuencia numérica o de imágenes para detectar los datos analíticos que es igual o mayor que la capacidad media del ojo humano, es decir, igual o mayor de 25 imágenes por segundo. Frecuencias más bajas, como una imagen cada 10 segundos, como en el documento WO-A-2006066008, hacen el sistema de detección insensible a fenómenos de activación de plaquetas, que se producen en un intervalo temporal de varias centésimas de segundo.

25

30

Además, la presente invención permite realizar el ensayo de diagnóstico en diferentes condiciones clínicas, por ejemplo en las condiciones frecuentes de deficiencia plaquetaria o alto hematocrito.

Provechosamente, además, la presente invención también se usa para controlar la eficacia de la terapia de reemplazo con concentrados de plaquetas en diferentes patologías, oncológicas y de otro modo.

35 Otra característica ventajosa de la invención es que la cámara de perfusión está hecha de un bloque de plásticos único en el que se realizan microvasos usando técnicas basadas en láser; los microvasos tienen un diámetro comprendido entre 50 y 100 micrómetros y por lo tanto el revestimiento del citoadhesivo necesario se produce sobre toda la superficie del vaso. Esto es considerablemente diferente, por ejemplo, del documento WO-A-93/00989, en el que la cámara de perfusión se proporciona con un llamado "cubreobjetos", en el que se realiza exclusivamente el revestimiento.

40

Además, a diferencia de la publicación BARSTAD, la cámara de perfusión preparada aquí no se proporciona con canales inicialmente estenóticos. De hecho, la presencia de estenosis implicaría la formación de perturbaciones del flujo, del tipo vórtex o flujo caótico, y esto impediría el control de la dinámica de fluido del circuito y de la cámara de perfusión. Además, la formación de un flujo perturbado en el circuito de la presente invención puede detectarse por medio de una cámara de televisión lineal, y analizarse como una matriz numérica, para describir una característica de la formación de trombos.

45

Provechosamente, por lo tanto, la cámara de perfusión puede ser desechable, es decir, usarse y después descartarse, estar lista para su uso y ser parte de un sistema cerrado, totalmente automático, para realizar un ensayo completo en un periodo de tiempo corto y usando solamente una cámara por examen.

50 Provechosamente, el plástico usado, por ejemplo Copolímero de Olefina de Cole o COC, u otro plástico ópticamente inerte, para conseguir las cámaras de perfusión, es transparente a la radiación luminosa, es inerte con respecto a rayos UV, no es autofluorescente y tiene una alta capacidad para unirse a proteínas, es decir, más del 60%.

Una característica innovadora de la presente invención es la capacidad de realizar los análisis en condiciones de sellado hidráulico absoluto, puesto que el circuito y la cámara de perfusión determinan en su conjunto un sistema hidráulicamente cerrado durante el procedimiento analítico. Esto asegura que no haya contaminación gaseosa en

55

ninguna parte del circuito, también gracias al hecho de que se usan tubos de ensayo de toma de muestras, que contienen las sustancias anticoagulantes y los marcadores usados, y recipientes de líquidos del aparato, incluyendo para descarga, que consisten en sacos de material plástico blando, es decir, compresible, proporcionado con válvulas de retención. Durante la toma de muestras, la entrada al saco que actúa como un tubo de ensayo de toma de muestras consiste en un conjunto de toma de muestras normal con una aguja y una válvula de protección, mientras que la salida relativa consiste en una jeringa de succión manual. Cuando el saco que actúa como tubo de ensayo está lleno de sangre anticoagulada, sin gas dentro, está listo para carga automática en el aparato de análisis.

Esta realización con su sello hidráulico permite realizar el análisis, de una manera absolutamente innovadora, también en condiciones de microgravedad, o en cualquier caso de gravedad distinta de la gravedad de la Tierra, y también puede actuar en instalaciones o vehículos que no estén en la Tierra, por ejemplo para analizar y controlar la formación de trombos en astronautas.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de una forma preferente de realización, proporcionada como ejemplo no restrictivo con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- la figura 1 es un diagrama de un aparato de acuerdo con la presente invención;
- la figura 2 es una imagen de la adhesión de la plaqueta al sustrato citoadhesivo, en este caso específico un versicano;
- la figura 3 es otra imagen de la adhesión de la plaqueta al versicano;
- la figura 4 es una gráfica del desarrollo a lo largo del tiempo de la adhesión de la plaqueta al versicano;
- la figura 5 es un diagrama de la actuación de un sistema de receptor de plaquetas;
- la figura 6 es una vista esquemática de una parte del aparato de la figura 1;
- la figura 7 es una vista esquemática de una variante de construcción de la parte de la figura 6;
- la figura 8 es otra vista esquemática de la parte de la figura 7;
- la figura 9 es un diagrama de la secuencia de funcionamiento de la parte de la figura 6 o 7;
- la figura 10 es una vista esquemática de un sensor de presión del aparato de la figura 1;
- la figura 11 es una gráfica del desarrollo de la presión del flujo sanguíneo en el aparato de la figura 1;
- la figura 12 muestra una secuencia de imágenes de la interacción de plaquetas con la superficie del sustrato y análisis del material de soporte plástico del aparato de la figura 1;
- la figura 13 es una vista esquemática de una parte del aparato de la figura 1;
- la figura 14 es un gráfico del desarrollo de la presión sanguínea en el aparato de la figura 1;
- la figura 15 es una gráfica del perfil de la velocidad de la sangre en el aparato de la figura 1;
- la figura 16 es una vista en perspectiva esquemática de una parte del aparato de la figura 1;
- la figura 17 es una vista lateral de la parte de la figura 16; y
- la figura 18 es una imagen de la formación de un trombo plaquetario en el aparato de la figura 1.

Descripción detallada de una forma preferente de realización

De acuerdo con la presente invención, la figura 1 muestra con el número de referencia 10 un aparato para el diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombótica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular.

En el transcurso de experimentos realizados, el solicitante ha definido numerosos parámetros que se refieren a las principales características de investigación de un ensayo de diagnóstico eficaz, capaz de diferenciar anomalías trombóticas o hemorrágicas potenciales en sujetos sanos pero que pueden derivar de predisposiciones genéticas y/o ambientales. El aparato y procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la presente invención debe necesariamente implicar funcionalidad plaquetaria debido a que, como se ha mostrado anteriormente, representa el principal protagonista del proceso hemostático.

Sin embargo, los otros componentes sanguíneos celulares, leucocitos, eritrocitos, micropartículas y componentes sanguíneos solubles, factores coagulantes, composición iónica, pueden desempeñar papeles decisivos.

Por esta razón el solicitante ha elegido usar, en la presente invención, "sangre completa", no manipulada y suficientemente anticoagulada, por medio de PPACK, Irudina y otros, para no interferir con los mecanismos adhesivos y de activación de las células sanguíneas.

Puesto que la característica morfológica de adhesión y agregación plaquetaria está estrechamente asociada con los acontecimientos de activación intracelulares que implican fenómenos de transducción de señales, es de importancia fundamental coordinar estas evaluaciones morfológicas con variaciones bioquímicas intracelulares que tienen las plaquetas y controlarlas en tiempo real.

Para cumplir estos requisitos, de acuerdo con la presente invención, el aparato 10 comprende un circuito completamente cerrado y sellado 26, que comprende elementos tubulares 11 en los que la sangre fluye, con

- 5 elementos de recogida y descarte 36, capaces de conectarse selectivamente al circuito cerrado 26 por medio de válvulas no mostradas en los dibujos, un sistema de análisis de imágenes computerizado, que comprende medio de adquisición óptica 33 y procesadores electrónicos 17, 18, que se basa en el uso de sondas fluorescentes introducidas dentro de las plaquetas y resuspendidas en sangre completa, una cámara de perfusión 12 en la que se hace que se produzcan los fenómenos de adhesión-activación-agregación-formación del trombo plaquetario y su estabilización, y un software sofisticado capaz de seguir en tiempo real y a alta frecuencia (al menos 25 imágenes por segundo) las variaciones morfológicas, cinéticas y bioquímicas dentro de las plaquetas (Ca⁺⁺, NO, Ph...).
- 10 De acuerdo con la presente invención, el procesador electrónico 17 es capaz de controlar en tiempo real las condiciones de flujo en la cámara de perfusión 12, mientras que el procesador electrónico 18 es capaz de realizar el análisis computerizado del funcionamiento plaquetario, "tormenta plaquetaria".
- De acuerdo con la presente invención, el plan experimental desarrollado por el solicitante proporciona el uso de una cámara de perfusión 12 por ejemplo con un flujo paralelo (figuras 1, 16, 17) en la que se producen fenómenos hemostáticos que conducen a la formación del trombo plaquetario.
- 15 Los procesos que se producen en la cámara 12 se controlan y analizan por un sistema computerizado digital que comprende los procesadores electrónicos 17, 18 por medio de un software capaz de analizar la formación del trombo en respuesta a diferentes tasas de cizallamiento aplicadas a diferentes superficies citoadhesivas.
- El aparato de acuerdo con la presente invención se equipa con elementos tubulares interconectados de forma fluida en los que la sangre es capaz de fluir y adecuados para conseguir un circuito cerrado 26 que estimule un circuito hemático, en el que las acciones de fármacos antitrombóticos y antihemorrágicos también pueden analizarse.
- 20 De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, el flujo de sangre se controla por medio de bombeo 13, tal como una jeringa de bomba de consumo o bomba pulsátil, y las imágenes se adquieren por medio de adquisición óptica 33 que comprende al menos un microscopio 14 y un dispositivo de adquisición de vídeo 15, por ejemplo una cámara CCD, provechosamente asociada con medio de grabación 16.
- 25 En este caso, por microscopio 14 los inventores quieren decir un sistema optoelectrónico que consiste en un iluminador polimocromático, también un láser, una lente de autoenfocado, que coopera con una matriz o cámara de TV de tipo lineal o detector 15, que permite una visión de tipo microscópico.
- Las imágenes derivan del microscopio 14 y se capturan por la combinación de la cámara CCD 15 y el grabador 16, que pueden ser provechosamente digitales o analógicos. Las plaquetas pueden marcarse con una sonda fluorescente adecuada de acuerdo con el aparato de adquisición y con el fenómeno biológico para controlar por ejemplo mepacrina o fluo3-AM en el caso de que se use un microscopio de fluorescencia, con fluo4-AM si se usa un microscopio confocal u otro.
- 30 Como alternativa, en lugar de un sistema capaz de adquirir imágenes, también es posible usar otros sistemas de un tipo óptico, que usan por ejemplo un dispositivo láser dirigido con semiconductores, como un velocímetro láser.
- 35 Las capacidades analíticas del aparato 10 son tales que detectan la dinámica del contacto celular con las superficies adhesivas, y entre células, la duración de las uniones relativas, la distribución espacial de los agregados, las dinámicas del crecimiento del trombo plaquetario y, estudiando los movimientos del calcio intracitoplásmico, estudian la transmisión de las señales de activación dentro de las células.
- Provechosamente, la presente invención se ha desarrollado adaptando esta tecnología a condiciones de uso fáciles y versátiles, y es adecuada para análisis rutinarios simples o, en una configuración diferente, para estudios más sofisticados para investigación básica y farmacológica.
- 40 De acuerdo con la presente invención, la experimentación se dirigió a identificar el sustrato citoadhesivo ideal, que debe estar presente dentro de la cámara de perfusión 12 para simular una superficie de vaso dañada, para usarse a tasas de cizallamiento tanto altas como bajas.
- 45 Esta característica es particularmente importante porque permite, provechosamente variando solamente la característica física del caudal, simular el ambiente venoso y/o arterial. Los resultados del análisis experimental de diversos componentes de la matriz extracelular se resumen en la Tabla 1. La Tabla 1 presenta diversas sustancias citoadhesivas presentes dentro de la cámara de perfusión 12 usada como un prototipo de acuerdo con la presente invención, para estudiar la capacidad adhesiva y diversos parámetros plaquetarios.

Tabla 1

Sustrato citoadhesivo	Plaquetas			
	Frecuencia de adhesión	Duración del contacto	Movilidad	Agregación
Colágeno de tipo I/III	++	++	--	++
Colágeno de tipo VI	++	++	--	++
PG-M/versicano (vascular)	++	+	+	(+)
Fibronectina de Perlecan	--	--	--	--
Laminina-1 (-2, -4, -5, -8, -10, -11)	--	--	--	--
Vitronectina	--	--	--	--
Decorina	+	+	+	--
Biglicano	+	+	+	--
Fibulina-1 (-2)	--	--	--	--
Tenascina-C	--	--	--	--
Lumican	--	--	--	--
	--	--	--	--
Trombospondina-1	--	--	--	--

A partir de la Tabla 1, y de acuerdo con publicaciones anteriores, los colágenos y el factor de von Willerbrand son capaces de promover la adhesión y agregación de las plaquetas. Como se muestra en la Tabla 1, esta serie de experimentos demuestra la capacidad de algunos PG-M/versicanos, sustancias de proteoglicanos de la matriz extracelular, para producir una cierta adhesión estable de las plaquetas y que también son capaces de aumentar considerablemente, una vez mezcladas con los colágenos, la capacidad de agregación y el crecimiento del trombo plaquetario (Mazzucato M y col. FASEB J. 2002; 16(14): 1903-16), aunque no son capaces de promover la activación de plaquetas. Provechosamente, como puede verse a partir de la Tabla 1, la sustancia usada eficazmente como un sustrato citoadhesivo es colágeno de tipo I.

Las Figuras 2 y 3 muestran imágenes en tiempo real del número de plaquetas que forman contactos transitorios con el sustrato Versicano V1/V2 que derivan del subendotelio de la aorta. Las imágenes se capturan mediante el medio de adquisición óptica 33 y se graban por el medio de grabación de imágenes 16, tal como un grabador de vídeo, a la velocidad de 25 imágenes/segundo (señal PAL) durante un periodo de 30 segundos y se suman una sobre otra en capas. A la izquierda, figura 2, aparece la primera imagen capturada, con dos leucocitos indicados por las flechas. La Figura 3 muestra la suma de las imágenes, en las que pueden verse dos leucocitos (flechas) que han realizado un viaje durante los 30 segundos de la duración de la grabación. La velocidad media es de aproximadamente $2,67 \pm 0,13 \mu\text{m/s}$ y aproximadamente 15% de las plaquetas adherentes se transfieren a la superficie de versicano V1/V2 con una velocidad media de aproximadamente $1,05 \pm 0,1 \mu\text{m/s}$, mientras que las plaquetas restantes muestran una adhesión temporal estable.

La figura 4 muestra el diagrama del porcentaje de plaquetas que se han detenido en la misma posición durante el tiempo en segundos indicado en el eje x.

Para obtener información detallada de los procesos de activación plaquetaria durante la fase de adhesión y agregación dentro de la cámara de perfusión 12 de la presente invención, que parece de importancia fundamental para la interpretación biológica y clínica de las observaciones, el solicitante analizó los flujos de calcio intraplaquetario (Ca^{++}), el principal mensajero local de la transducción de la señal intracitoplásmica usando el vWF (Factor de von Willerbrand) como un sustrato citoadhesivo.

Usando un sistema de análisis computerizado innovador, asociado con software específico desarrollado por el solicitante, por medio de la invención se descubrió que la interacción de las plaquetas con el vWF, en condiciones de altas tasas de cizallamiento, produce aumentos distintos de Ca^{++} citosólico que se correlacionan con el estado de activación.

El estrés de tensión, la acción mecánica entre el receptor de plaquetas glicoproteico GPIIb α y el dominio A1 del vWF

conduce a una liberación rápida y transitoria de Ca^{++} por los depósitos intracitoplásmicos (picos de tipo α/β), que precede a la adhesión estable de las plaquetas.

5 La adhesión estable se caracteriza a su vez por la unión de la integrina de plaquetas $\alpha IIb\beta 3$ con la secuencia RGD del vWF y este acontecimiento de unión implica un aumento de Ca^{++} intracitoplásmico que es más considerable y duradero a lo largo del tiempo y se caracteriza por un flujo de Ca^{++} que llega desde el exterior (picos de tipo γ) (Mazzucato M. y col. Blood. 2002; 100(8): 2793-800). Después, una señal que se origina en el estiramiento del mecanorreceptor GPIIb α unido irreversiblemente con el vWF (dominio A1) conduce a activación suficiente de la integrina $\alpha IIb\beta 3$, para permitir una adhesión localizada.

10 Una señal adicional que llega desde el ADP liberado por la plaqueta, unido con sus receptores P2Y1 y P2Y12, es esencial para la activación total y para el crecimiento del trombo plaquetario (figura 3). La Figura 5, de hecho, muestra una representación esquemática del papel del receptor plaquetario del ADP, P2Y1, en la activación de plaquetas inducida por el vWF, inmovilizado en la superficie, y en condiciones de altas tasas de cizallamiento (300 s-1). El dominio A1 del vWF interacciona con el GPIIb α de plaquetas (Savage B. Cell. 4 sep 1998; 94(5): 657-66), mientras que la secuencia RGD del dominio CI del vWF interacciona con la integrina activada $\alpha IIb\beta 3$. En la figura 5, por PIP2 los inventores entienden fosfatidil-inositol-4,5-trifosfato, por IP3 los inventores entienden inositol-1,4,5-trifosfato, por DG los inventores entienden diacilglicerol, por PLC los inventores entienden fosfolipasa C, por PKC los inventores entienden proteína quinasa C y por PI 3-K los inventores entienden fosfatidilinositol 3-quinasa. Se muestra que ADP interacciona con uno de sus dos receptores acoplado con la proteína G y caracterizado por siete dominios transmembrana: P2Y1, asociado con Ca^{++} liberado por los depósitos internos, y con PLC β . La posición de los picos de $[Ca^{2+}]_{\alpha/\beta}$ es relativa a la interacción del GPIIb-IX-V del dominio A1 del vWF y la señal de amplificación a través de la interacción ADP-P2Y1; el pico γ representa la señal inducida por la unión del dominio CI del vWF, la integrina $\alpha IIb\beta 3$ y activación de la PI 3-K (Mazzucato y col. Blood. 15 nov 2004; 104(10): 3221-7).

25 Por medio de los experimentos ilustrados anteriormente, y otros similares, el solicitante identificó una serie de cinco grupos diferentes de sustancias o materiales que pueden usarse como una sustancia citoadhesiva en la cámara de perfusión de acuerdo con la invención, para simular la lesión del vaso. Las diferentes condiciones experimentales pueden usarse potencialmente para diferentes fines clínicos.

Los grupos de sustancias o materiales que pueden usarse como una sustancia sustrato citoadhesiva, con referencia a la Tabla 1, son:

- 30 - un grupo A que comprende sustancias sustrato que conducen a la adhesión, activación, agregación y formación del trombo plaquetario con altas tasas de cizallamiento, como las halladas en arterias y capilares, incluyendo el vWF;
- un grupo B que comprende sustancias sustrato que actúan a bajas tasas de cizallamiento, como las halladas en venas, fibrinógeno, colágenos;
- 35 - un grupo C que comprende sustancias sustrato que soportan la adhesión plaquetaria pero no activación y agregación y solamente a tasas de cizallamiento bajas, fibronectina, PGM/versicanos y perlecan;
- un grupo D que comprende sustancias sustrato que potencian la actividad protrombótica de otras moléculas, efectos aditivos a tasas de cizallamiento bajas y/o altas, tales como ciertos proteoglicanos, fibulinas implicadas en la adhesión de plaquetas y fibrinógeno;
- 40 - un grupo E que comprende sustancias sustrato que actúan como sustancias antitrombóticas a diversas tasas de cizallamiento, tales como diversos proteoglicanos, ácido hialurónico y ciertas glicoproteínas.

Además, la simulación del sistema de perfusión y análisis oprónico por medio de la cámara de perfusión 12 y el medio de adquisición óptica 33 que cooperan con el medio de procesamiento electrónico 17, 18 demostró ser en sí mismo una elección válida para el desarrollo de la fase tecnológica posterior. Para ser más exactos, la aplicación del flujo laminar constante en la cámara de perfusión 12 demostró ser en sí misma extremadamente válida en la identificación de defectos de coagulación del tipo hemorrágico y también trombótico, como se muestra en los datos de confirmación ya publicados en sujetos sometidos a estrés físico (Rock G. y col. Clin J Sport Med. 1997; 7(2): 94-9).

De acuerdo con la presente invención, el medio 13 para bombear la sangre comprende una bomba pulsátil 19, 20 adecuada para reproducir un flujo discontinuo de sangre dentro del circuito cerrado 26. De esta manera, se introduce un componente fluidodinámico en el sistema que hace al flujo en la cámara de perfusión 12 muy similar a las condiciones presentes en el flujo coronario, reproduciendo fielmente lo que realmente sucede en el circuito que irriga el corazón. El medio de bomba pulsátil 13 puede ajustarse selectivamente para aplicar un flujo constante, si lo requieren las condiciones de análisis. En otras palabras, la invención se realiza para actuar con un flujo constante o con un flujo pulsátil, para adaptarse provechosamente a cada condición de circulación, teniendo provechosamente una gran versatilidad de uso.

De acuerdo con la presente invención, el uso de la bomba pulsátil 19 permite reproducir un flujo pulsátil, unidireccional a través de tubos de perfusión 23 o canales del cartucho 12, 22 por medio de dos cierres de volumen variable, como se representa esquemáticamente en la figura 6.

Provechosamente, el flujo se dirige a través de una válvula unidireccional. El funcionamiento de la bomba 19 es muy similar a un corazón humano, porque ambos sistemas usan cavidades pulsátiles con volumen variable, seudoventrículos de acuerdo con la presente invención y válvulas unidireccionales.

5 Provechosamente, el medio de bombeo 13, de acuerdo con una realización de la presente invención como se muestra en la figura 7, separa la generación mecánica de la presión y consumo desde el circuito que contiene la sangre y en la figura 7 pueden verse los circuitos acoplados relativos.

10 De acuerdo con la presente invención, el ciclo de presión se genera por un pistón 27 en movimiento alterno en una cámara de acero 28, movido por una rueda excéntrica de un motor paso a paso. El control de la velocidad de rotación y de la rueda excéntrica permite determinar la frecuencia de pulsación y la amplitud de presión. La presión dentro del circuito de aire 29 se transmite al circuito cerrado 26 a través de una membrana de látex 30 (mostrada por una línea discontinua en la figura 7), que se expande o contrae de acuerdo con la presión de aire presente alrededor de ella. Esta conformación es particularmente adecuada para su uso con pequeñas cantidades de sangre. Ambos seudoventrículos 31, 32 están contenidos en un bloque sencillo 34 de material transparente, tal como Perspex, que permite ver el funcionamiento de la membrana 30.

15 El ciclo de funcionamiento se esquematiza de forma resumida en la figura 9. Se basa en una alternación de presurización y despresurización de los dos seudoventrículos 31, 32, de modo que las membranas de látex 30 o bolsillos puedan llenarse y vaciarse. El pistón neumático 27 alterna despresurización y presurización en cada seudoventrículo 31, 32, como se muestra en la figura 9.

20 De acuerdo con una forma ventajosa de realización de la presente invención, cada seudoventrículo 31, 32, en los que la membrana de látex 30 separa la sangre del aire, posee los tamaños indicados en la figura 8. El volumen máximo de cada seudoventrículo 31, 32 es de aproximadamente 350 μ l. De acuerdo con la presente invención, el volumen disponible para expansión máxima no se llena de forma necesariamente completa, de hecho el volumen máximo al final de cada ciclo depende de la longitud de desplazamiento del pistón 27 en el cilindro.

25 Puesto que los seudoventrículos 31, 32 son componentes críticos en el contexto de la presente invención, el Solicitante los estudió y desarrolló deliberadamente.

30 En particular, los seudoventrículos 31, 32 comprenden válvulas unidireccionales 35 que se han obtenido por medio de esferas, hechas de material plástico biocompatible, libres para moverse entre dos partes en un anillo, una construida de modo que tenga un contacto uniforme con la esfera, contacto con el que determina una detención del flujo sanguíneo, la otra construida de modo que mantenga la esfera en suspensión para que el flujo pase alrededor de ella. Un software específico, que tiene en cuenta la presión en el tiempo que deriva de un transductor de flujo, regula la velocidad del pistón 27. De esta manera es posible controlar eficazmente un perfil de presión que puede simular el perfil fisiológico o patológico. El sistema de microcirculación completo se mantiene a una temperatura constante de aproximadamente 37 °C, controlada por un microprocesador que garantiza errores del orden de $\pm 0,5$ °C.

35 La medición de la presión se obtiene por medio de los sensores de medición de la presión 21, tales como un transductor de presión diferencial, por ejemplo, Motorola MPX5100, en contacto con el flujo sanguíneo. La serie de sensores de presión 21 Motorola MPX se basa en un mecanismo piezoeléctrico basado en silicio, que permite una conexión con el circuito sanguíneo 26 por medio de una unión en T de longitud mínima, de acuerdo con la presente invención, los sensores 21 se sitúan corriente arriba y corriente abajo de la cámara de perfusión 12, para evaluar la bajada de presión en la segunda. Los sensores 21 proporcionan una señal de salida al microprocesador de aproximadamente entre 0,2 Vdc a 0 Pa y a 49,88 kPa de presión aplicada. Se conecta directamente con el sistema de adquisición de datos representado por los procesadores 17, 18, para usarse para controlar la formación de la obstrucción del vaso en la cámara de perfusión 12 y simultáneamente para controlar la frecuencia y presión aplicada al circuito cerrado 26.

45 El software de adquisición determina la fracción de toma de muestras y el número de lecturas por unidad de tiempo. Puede obtenerse fácilmente una frecuencia de toma de muestras de más de 50 Hz (50 ciclos/s) y es fácilmente suficiente para controlar las variaciones de presión que representan cíclicamente la presión sistólica y diastólica del ritmo cardíaco. Los valores de presión se adquieren a través de una tarjeta de adquisición digital y se tratan por medio de un PC con un sistema operativo convencional de un tipo conocido. Por ejemplo, en la presente solicitud, la tarjeta usa ocho canales de entrada analógicos y dos canales de salida, junto con 16 conexiones I/O digitales. La conversión A/D se efectúa por la misma tarjeta, provechosamente con una resolución de 12 bits, en la que el periodo completo de la señal se resuelve en 4096 subdivisiones. El software de adquisición permite almacenar intervalos de observación largos y ejecuta numerosos análisis numéricos para identificar comportamientos de presión patológica o para registrar la progresión del crecimiento del trombo plaquetario. El software también puede controlar el consumo de energía del motor de la bomba 19, 20, que puede proporcionar información adicional sobre la reducción en el hueco de la cámara de perfusión 12 debido al crecimiento del trombo plaquetario. La Figura 11 muestra un registro típico de presión a lo largo del tiempo usando el sensor 21 y la bomba 20 como se ha descrito anteriormente.

El medio de bombeo 13 permite reproducir un flujo pulsátil, con presiones sanguíneas dentro del circuito en

condiciones fisiológicas. Además, la bomba pulsátil 19, 20 de acuerdo con la presente invención permite manipular fácilmente pequeñas cantidades de sangre.

5 De acuerdo con otra característica ventajosa, la sangre se expone a materiales biocompatibles, para prevenir contaminación y activación y a la vez proporcionar un soporte óptimo para los sustratos citoadhesivos y ser adecuado para detecciones ópticas; para este fin, además, el medio de bombeo 13 realizado de este modo permite evitar contaminaciones externas, con gran seguridad para el operador.

Los inventores también tienen adaptabilidad óptima de la cámara de perfusión 12, o cartucho 22, para diferentes tallas de cizallamiento con una tasa de cizallamiento máxima $\geq 1500 \text{ s}^{-1}$ y estrés mecánico limitado para la sangre y sus componentes celulares.

10 Para la construcción de la cámara de perfusión 12 del aparato de acuerdo con la invención, el Solicitante estudió numerosos y diferentes materiales plásticos para ensayar sus características de biocompatibilidad y adaptabilidad a las condiciones analíticas sugeridas por las investigaciones experimentales realizadas con los aparatos de imagen de vídeo descritos anteriormente. Para los análisis comparativos, el Solicitante eligió colágeno de tipo I como sustrato, debido a sus excelentes capacidades citoadhesivas. Los estudios se llevaron a cabo usando el sistema de flujo paralelo y constante como se ha descrito anteriormente. Como material de soporte plástico para el colágeno de tipo I, el Solicitante usó COC (copolímeros cíclicos con una base de olefina), COP (polímeros cíclicos con una base de olefina), poliestireno convencional, policarbonato y vidrio como un soporte de control. Estos materiales satisfacen de forma genérica los requisitos de grosor homogéneo, compatibilidad del campo visual con el análisis de imagen de alta resolución, microscopía de fluorescencia y adquisición en tiempo real. Otra característica fundamental es la gran capacidad de unión de las sustancias citoadhesivas para usar como el sustrato para adhesión de plaquetas.

15 El solicitante llevó a cabo después experimentos de perfusión con plaquetas marcadas con mepacrina y los resultados indican que no se detectó adhesión de plaquetas satisfactoria con policarbonato (PC), independientemente del tipo de sustancia adhesiva usada como sustrato. Provechosamente, los sustratos adhesivos inmovilizados en COC y COP muestran adhesión y agregación de plaquetas. La formación del trombo plaquetario en los COC incubados con colágeno de tipo I y III se consideró satisfactoria, como la formación usando el vWF, con una cinética de crecimiento rápida y estabilidad a todas las tasas de cizallamiento usadas. De hecho, la altura del trombo en aproximadamente 4 minutos excede $100 \mu\text{m}$. Por lo tanto, la elección de material plástico para la construcción del cartucho de perfusión provechosamente recae en COC. De hecho, la figura 12 muestra una observación en tiempo real, después de aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 4 minutos de perfusión, de la interacción de las plaquetas con la superficie de colágeno I, dispuestas en diferentes materiales plásticos. El colágeno de tipo I, con una concentración de aproximadamente $100 \mu\text{g/ml}$ en PBS, se aplicó a COC, COP y policarbonato. El sustrato se evaluó en cámara de flujo paralelo de tipo Hele-Show modificada para producir flujos variables. La sangre se anticoaguló con PPACK, se trató con la sonda fluorescente mepacrina y después se perfundió a través de la cámara 12 a la temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$; en este caso, el área total del campo óptico corresponde a $0,037 \text{ mm}^2$.

25 Basándose en adquisiciones previas, se realizó una cámara de perfusión multicanal o cartucho 22, es decir, comprendiendo una pluralidad de tubos 23 o microcanales. La elección de multicanales se dictó provechosamente por la necesidad de tener por un lado múltiples mediciones para poder obtener valores estadísticamente correctos y significativos del fenómeno que se observa, y por otro lado debido a la posible necesidad de usar simultáneamente varias sustancias citoadhesivas y por tanto tener respuestas cualitativamente diferentes para la misma muestra sanguínea. Esta última observación puede ser extremadamente ventajosa desde el punto de vista de usar una cantidad muy limitada de muestra.

30 Un factor importante, estudiado por el Solicitante, en la construcción del cartucho compuesto de material plástico (COC) se refiere al mecanismo de los fluidos dentro de los microcanales 23. Para estudiar esta característica el solicitante eligió un enfoque de bioingeniería. La caracterización de la dinámica del flujo sanguíneo en los microcanales 23 tiene dos elementos importantes: uno se refiere al cartucho completo 22, el otro se refiere a la superficie dentro de los microcanales 23 en los que tiene lugar adhesión plaquetaria y el crecimiento de los trombos. Para el primer elemento, la planificación y el diseño de la unidad completa es importante, cuando debe encontrarse una relación cuantitativa entre la fracción de flujo y la bajada de presión, y al mismo tiempo garantizarse una distribución uniforme del flujo a lo largo de los microcanales 23 paralelos. La reproducción de una línea de flujo uniforme dentro de los microcanales 23 afecta a una dimensión local del análisis del flujo sanguíneo. La simulación de la mecánica del fluido permite reconstruir la distribución precisa de los parámetros hemodinámicos locales, tales como presión, velocidad de flujo y tasa de cizallamiento, que son cruciales para determinar los mecanismos de adhesión y activación de plaquetas. Estas simulaciones sirven para diseñar correctamente el cartucho 22 con microcanales o capilares 23 de la invención. Los capilares alineados se alimentan por un tubo común 37, relativamente ancho con respecto a la entrada de los microcanales 23, que debe proporcionar la distribución uniforme del fluido y reducir las condiciones de flujo perturbado dentro de los capilares 23. Durante la experimentación se simulaban diferentes formas de tubos y conexiones con los capilares 23.

35 La velocidad local y distribución de presiones del flujo sanguíneo a través de los capilares 23 se determinaron provechosamente por medio de una solución numérica de la ecuación Navier-Stokes, que se refiere a la conservación de momento y masa. El solicitante consideró que el fluido sanguíneo posee densidad y viscosidad

constante, obteniendo de este modo predicciones detalladas sobre los componentes de velocidad, presión y tasa de cizallamiento, en la geometría actual a través del uso del software CFX-4.4 (AEA Technology, Reino Unido), altamente eficaz y confirmado en numerosas aplicaciones técnicas y científicas que afectan al estudio de la mecánica de fluidos en geometrías complejas. Para estas aplicaciones se asumió que la sangre es un fluido homogéneo, químicamente inerte, incompresible y con un comportamiento Newtoniano; sorprendentemente, la consideración del comportamiento de un fluido "granular" como la sangre como Newtoniano se demostró experimentalmente como una suposición válida para valores de tasas de cizallamiento por encima de 100 s⁻¹, valores que afectan a la experimentación en relación con la invención. Además, se asumió que el fluido sanguíneo tenía un régimen laminar, una condición que está presente con certeza dentro de los capilares sanguíneos en condiciones fisiológicas. En todas las condiciones se adoptaron los siguientes valores: 1056 kg/m³ para densidad; 0,0035 Pa x s para viscosidad.

Para simplificar y para proporcionar un ejemplo, se presenta aquí la simulación de un único capilar 23, representativo de todos los proporcionados para un cartucho. Los capilares 23 se realizaron provechosamente con una sección cuadrada, con un tamaño por lateral de 50 μm. El modelo de canales múltiples simplificado se muestra en la figura 13. Consiste en dos capilares situados frente a un área límite, una zona de ENTRADA que representa el distribuidor-conector para asegurar un desarrollo total del perfil de velocidad y una zona de SALIDA con el mismo volumen que el distribuidor-conector. La distancia entre dos capilares 23 es un múltiplo de la anchura de un capilar 23. La altura del sistema corresponde a la altura del capilar 23 y la longitud se fija arbitrariamente en 15 mm, pero puede ser variable según se desee y para cumplir requisitos contingentes. Posteriormente, se verificó que la longitud era suficientemente larga para permitir un perfil parabólico de la velocidad del fluido dentro de los capilares. La anchura total es de 0,35 mm. El flujo sanguíneo se determinó para producir de forma normal una tasa de cizallamiento en la pared del capilar 23 de aproximadamente 1500 s⁻¹.

La rejilla computacional se definió para los capilares 23, en particular para sus partes terminales, para detectar de una manera precisa y realista el movimiento del fluido en estas regiones. Se simularon diferentes soluciones para la entrada del fluido, comenzando desde la más simplificada, tal como por ejemplo la solución centrada en línea con los canales.

Los resultados de múltiples cálculos de simulación pueden resumirse observando que:

- la bajada de presión a través del cartucho 22 está dominada por resistencia a lo largo de los capilares 23. Esto puede verse en la figura 14, que presenta el desarrollo de la presión a lo largo del cartucho 22 variando la longitud del distribuidor-conector 37 y en el que se compara la simulación para diferentes tamaños de los distribuidores-conectores 37;
- la gran bajada de presión en los capilares 23 permite una presión uniforme en el distribuidor-conector 37, independientemente de la localización de la entrada;
- el perfil de velocidad de la sangre en los capilares 23 se desarrolla totalmente en unos pocos diámetros, dándose a una perturbación fluidodinámica irrelevante la longitud de aproximadamente 400 diámetros. Por lo tanto, el perfil de velocidad asume casi perfectamente un perfil parabólico, Poiseuille, como se muestra en la figura 15, en la que se muestra una comparación entre diferentes configuraciones de entrada del fluido sanguíneo con respecto a perfil de velocidad en los capilares a unos pocos diámetros de su comienzo.

El cartucho 22 con microcanales 23 se diseñó por lo tanto de acuerdo con todas las simulaciones fluidodinámicas, como aparece en las figuras 16, 17 y construido de COC, como se sugiere por los ensayos funcionales ilustrados. El cartucho 22 está conectado al circuito cerrado 26, en el que está el fluido sanguíneo, por medio de tubos de tipo HPLC, para reducir los espacios muertos y consiste en materiales biocompatibles, por ejemplo Tygon, Teflón u otros.

El solicitante realizó numerosos ensayos preliminares con la presente invención como se ha descrito y los resultados confirman la eficacia de la planta experimental adoptada para la experimentación. De hecho la sangre que se hace fluir en condiciones pulsátiles dentro del cartucho a la velocidad de 25 μl/min desarrolla una tasa de cizallamiento de 1500 s⁻¹, a la presión fisiológica de 15,96/10,64 kPa. La figura 18 muestra los microcanales de acuerdo con la presente invención, en los que el colágeno de tipo I se inmovilizó previamente como sustancia citoadhesiva y que representan la formación del trombo plaquetario.

Después, se hizo fluir sangre humana completa extraída de un cuerpo humano a 37 °C, se anticoaguló con una sustancia antitrombótica (P-PACK). Las plaquetas se marcaron con mepacrina 8 μM. Las imágenes muestran la formación del trombo plaquetario en dos momentos diferentes. A los 60 segundos el capilar está completamente obstruido y provechosamente el crecimiento completo del trombo se graba en tiempo real como se ha descrito anteriormente.

Provechosamente, por medio de la presente invención hubo una compresión de los mecanismos moleculares de la formación del trombo.

Además, se consiguió un sistema ventajoso con un circuito cerrado 26, que simula la circulación de sangre humana

en condiciones fluidodinámicas controladas.

Provechosamente, la cámara de perfusión 22 (cartucho) con microcanales 23 se prepara como un dispositivo desechable.

5 De acuerdo con la presente invención, además, se definieron procedimientos analíticos, identificados cuando se determina la presión, velocidad de flujo, análisis de imágenes computerizado para el estudio de hemodinámica.

Todas estas características ventajosas se exploraron y se evaluaron positivamente durante los ensayos experimentales realizados y presentados anteriormente.

10 La elección de anticoagulante también se exploró, dada la importancia de mantener íntegro el ambiente iónico en la presente invención, preferentemente seleccionando un agente antitrombótico como Irudina o P-PACK. Provechosamente, además, el ensayo puede realizarse correctamente en un periodo de dos horas desde que se toma la muestra sanguínea del cuerpo humano y el tiempo de ejecución del ensayo puede fijarse en aproximadamente tres minutos. Provechosamente, las expectativas para el funcionamiento siguen los resultados ya obtenidos y ampliamente presentados en la bibliografía. El prototipo se ensambla provechosamente en las dos configuraciones previstas, una para una exploración "más ligera" y equipada con un sistema para detectar presión y
15 consumo eléctrico, la otra pretendida para diagnóstico de segundo nivel y para investigación, equipada con sistemas optrónicos implementados con análisis de imágenes, eco-Doppler u otros.

REIVINDICACIONES

1. Aparato para el diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombótica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular, **caracterizado porque** comprende:

- 5 - una pluralidad de elementos tubulares (11) conectados de forma fluida para conseguir un circuito cerrado (26) en el que una muestra de sangre es capaz de fluir;
- medio de bombeo (13) del tipo pulsátil capaz de bombear la sangre en dicho circuito cerrado (26) en condiciones fluidodinámicas controladas y variables;
- 10 - al menos una cámara de perfusión (12), que comprende un cartucho de perfusión de canales múltiples (22) formado por una pluralidad de microcanales (23) en conexión fluida con dicho circuito cerrado (26) y en la que la sangre puede fluir, siendo capaces dichos microcanales (23) de simular condiciones fluidodinámicas de la sangre análogas a las condiciones fluidodinámicas de la sangre que fluye en el cuerpo humano de modo que se puedan reproducir fenómenos y procesos de hemostasia, determinando dicho circuito (26) y cámara de perfusión (12) en su conjunto un sistema hidráulicamente cerrado durante el procedimiento analítico;
- 15 - medio de adquisición óptica (33), adecuado para adquirir, por medio de una detección continua y en tiempo real, datos a alta frecuencia de la sangre que circula en los microcanales (23) de dicho cartucho (22);
- 20 - medio de procesamiento electrónico (17, 18) adecuado para procesar al menos dichos datos adquiridos por dicho medio de adquisición óptica (33), para efectuar selectivamente dicho diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica.

2. Aparato como en la reivindicación 1, **caracterizado porque** los microcanales (23) son capilares que tienen un diámetro comprendido entre 50 y 100 micrómetros.

3. Aparato como en la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** los microcanales (23) son alimentados por un tubo común (37), relativamente anchos con respecto a la entrada de los microcanales (23) para garantizar la distribución uniforme del fluido y reducir las condiciones de flujo perturbado dentro de dichos microcanales (23).

4. Aparato como en la reivindicación 1, 2 o 3 **caracterizado porque** dichos microcanales (23) se disponen paralelos entre sí.

5. Aparato como en cualquier reivindicación anterior, **caracterizado porque** dicho medio de adquisición óptica (33) comprende un microscopio (14) conectado en serie con un dispositivo de adquisición de vídeo (15).

30 6. Aparato como en cualquier reivindicación anterior, **caracterizado porque** comprende medio de registro (16) adecuado para registrar dichos datos adquiridos por dicho medio de adquisición óptica (33) y para poner dichos datos registrados a disposición de dicho medio de procesamiento electrónico (17, 18).

35 7. Aparato como en cualquier reivindicación anterior, **caracterizado porque** dicho medio de bombeo (13) del tipo pulsátil comprende un bomba pulsátil (19, 20) capaz de reproducir un flujo pulsátil análogo al flujo pulsátil del corazón humano.

8. Aparato como cualquier reivindicación anterior, **caracterizada por que** comprende medio de medición de la presión (21) capaz de detectar datos de presión al menos en dicho tubo (23) de dicha cámara de perfusión (12), y capaz de enviar dichos datos de presión a dicho medio de procesamiento electrónico (17, 18) de modo que puedan analizarse y procesarse.

40 9. Aparato como en cualquier reivindicación anterior, **caracterizado porque** dichos microcanales (23) están fabricados de un material polimérico.

10. Aparato como en la reivindicación 9, **caracterizado porque** dicho material polimérico es un material plástico y se selecciona de un grupo que comprende: policarbonato, copolímeros cíclicos con una base de olefina y polímeros cíclicos con una base de olefina.

45 11. Aparato como en cualquier reivindicación anterior, **caracterizado porque**, dentro de los microcanales (23) de dicho cartucho (22), está proporcionada una sustancia de sustrato citoadhesivo que es capaz de simular una superficie de vaso dañada.

12. Aparato como en la reivindicación 11, **caracterizado porque** dicha sustancia de sustrato citoadhesivo está comprendida en dicho tubo (23).

50 13. Aparato como en la reivindicación 11 o 12, **caracterizado porque** dicha sustancia de sustrato citoadhesivo está seleccionada de un grupo que comprende:

- sustancias en el grupo A que comprenden sustancias de sustrato que conducen a la adhesión, activación, agregación y formación del trombo plaquetario con altas tasas de cizallamiento, como las halladas en arterias y capilares incluyendo el vWF;

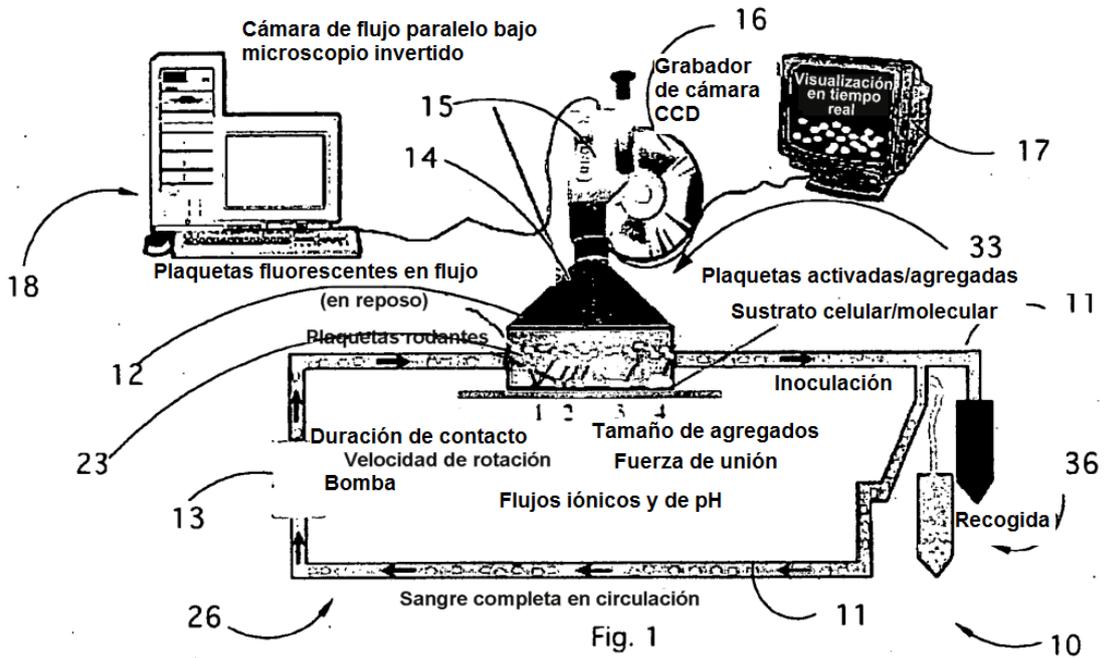
- 5 - sustancias en el grupo B que comprenden sustancias de sustrato que actúan a tasas de cizallamiento bajas, como las halladas en venas, fibrinógeno, colágenos;
- sustancias en el grupo C que comprenden sustancias de sustrato que soportan la adhesión de plaquetas pero no activación y agregación y solamente a tasas de cizallamiento bajas, fibronectina, PGM/versicanos y perlecan;
- sustancias en el grupo D que comprenden sustancias de sustrato que potencian la actividad protombótica de otras moléculas, efectos aditivos a tasas de cizallamiento altas y/o bajas, tales como ciertos proteoglicanos, fibulinas implicadas en la adhesión de plaquetas y fibrinógeno;
- 10 - sustancias en el grupo E que comprenden sustancias de sustrato que actúan como sustancias antitrombóticas a diversas tasas de cizallamiento, tales como diversos proteoglicanos, ácido hialurónico y ciertas glicoproteínas.

14. Procedimiento para el diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombotica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular, **caracterizado porque** comprende las etapas de:

- 15 - poner a disposición un circuito cerrado (26), en el que una muestra de sangre puede fluir;
- poner a disposición medio de bombeo (13) del tipo pulsátil, capaz de bombear la sangre en dicho circuito;
- poner a disposición una cámara de perfusión (12), que comprende un cartucho de perfusión de canales múltiples (22) formada por una pluralidad de microcanales (23) en conexión fluida con dicho circuito cerrado (26), siendo capaces dichos microcanales (23) de simular condiciones fluidodinámicas de la sangre análogas a las condiciones fluidodinámicas de la sangre que fluye en el cuerpo humano y para simular la hemodinámica de la sangre humana, determinando dicho circuito (26) y cámara de perfusión (12) en su conjunto un sistema hidráulicamente cerrado durante el procedimiento analítico;
- 20 - hacer a la sangre fluir dentro de dicho circuito cerrado (26) por medio de dicho medio de bombeo (13) del tipo pulsátil;
- supervisar, por medio de una detección continua y en tiempo real de datos a alta frecuencia en la sangre que circulan los microcanales (23) de dicho cartucho (22), el desarrollo del flujo de sangre al menos en los microcanales (23) de dicho cartucho (22) para efectuar selectivamente dicho diagnóstico, pronóstico y supervisión farmacológica de la patología trombotica-isquémica y hemorrágica del aparato cardiovascular.
- 25

15. Procedimiento como en la reivindicación 14, **caracterizado porque** comprende las etapas de:

- 30 - poner a disposición el medio de adquisición óptico (14), adecuado para adquirir datos sobre el flujo de sangre que circula al menos en los microcanales (23) del cartucho (22);
- poner a disposición medio de procesamiento electrónico (17, 18), adecuado para recibir dichos datos adquiridos por dicho medio de adquisición óptica (14);
- efectuar dicha etapa de supervisión por medio de dicho medio de adquisición óptica (14) y dicho medio de procesamiento electrónico (17, 18).



Tasa de cizallamiento 100 s^{-1}

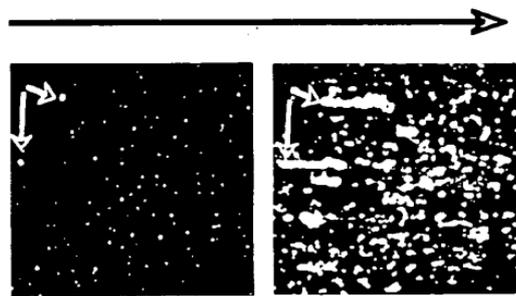


Fig. 2

Fig. 3

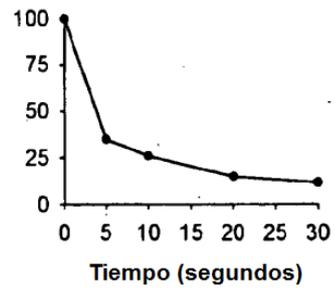
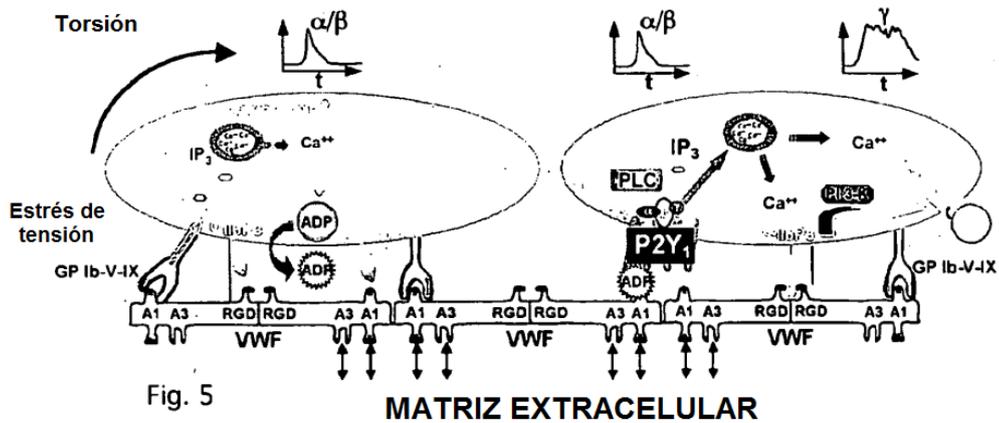
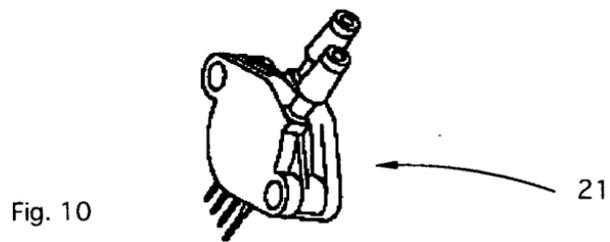
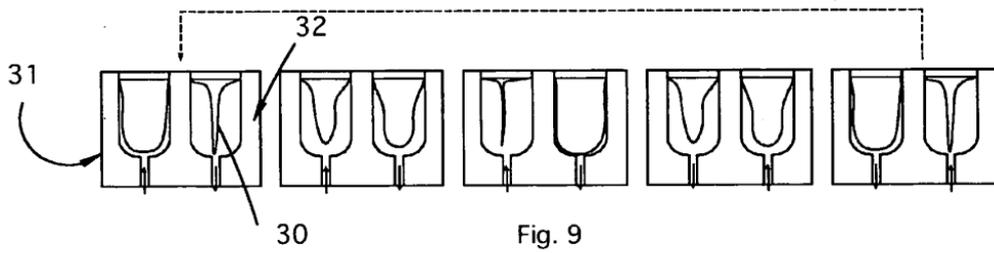
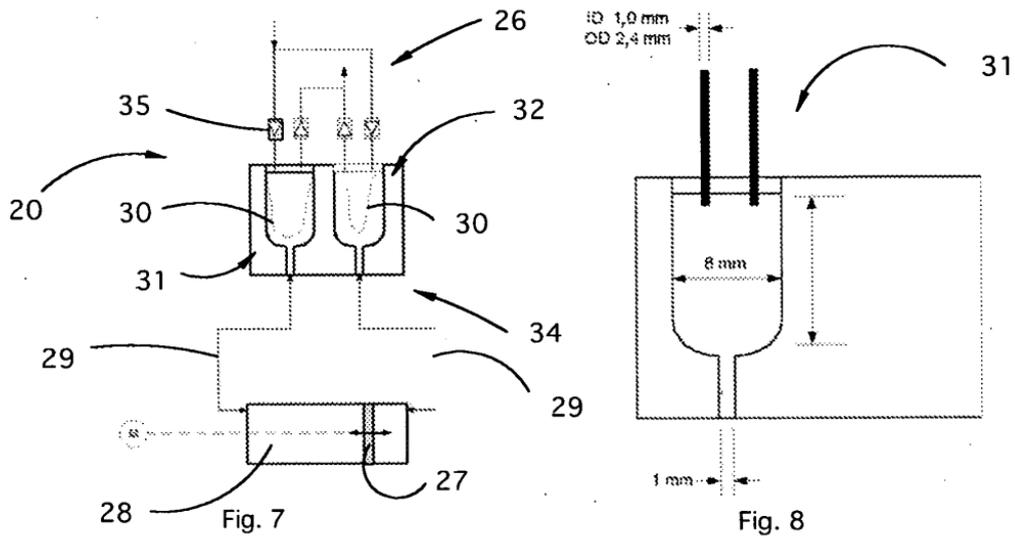
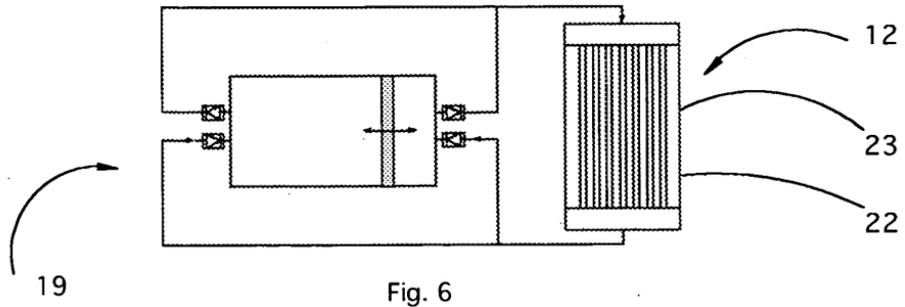


Fig. 4

Fijación → Activación (I) Adhesión estable → Activación (II) Agregación





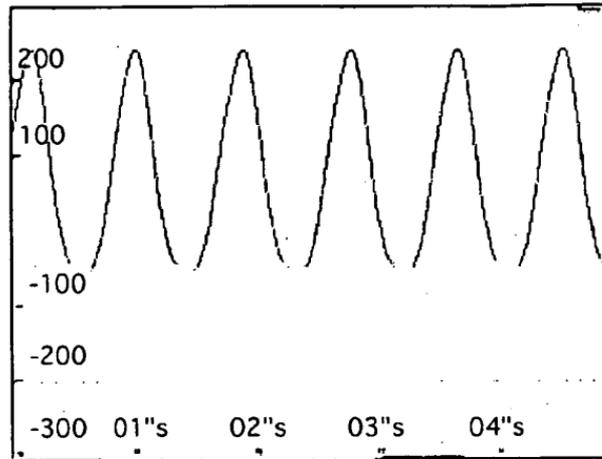


Fig. 11

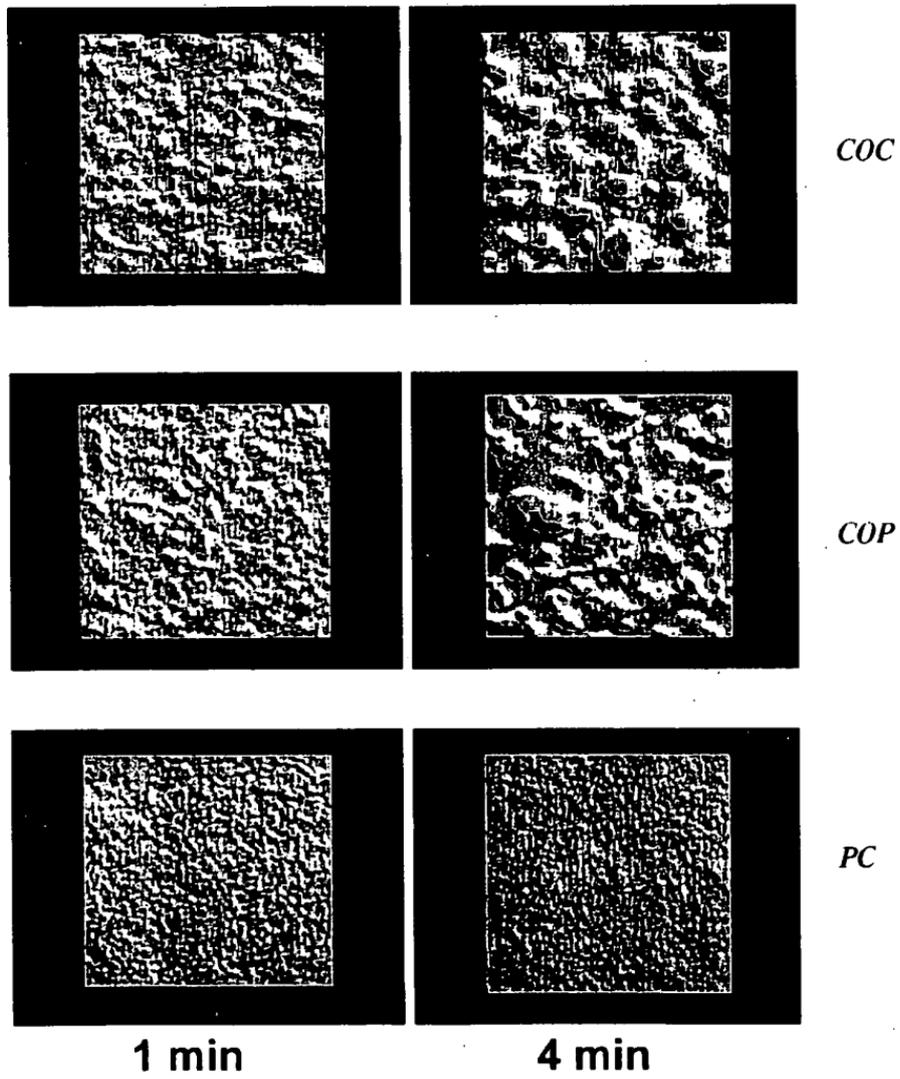


Fig. 12

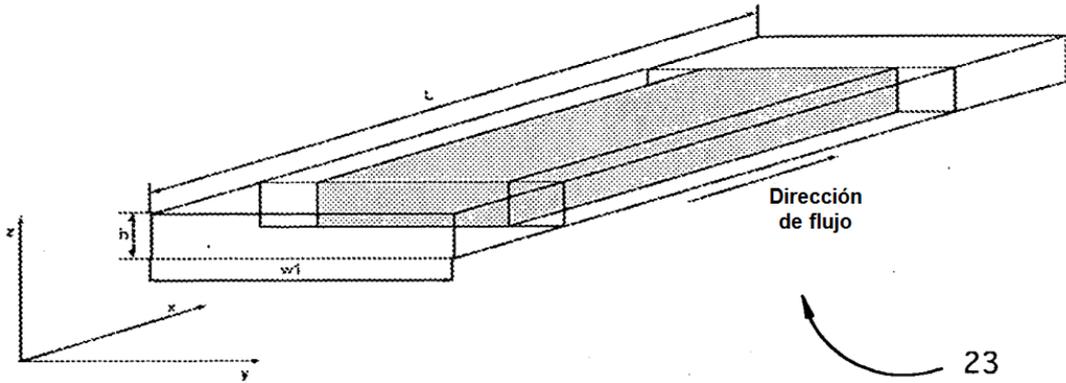


Fig. 13

23

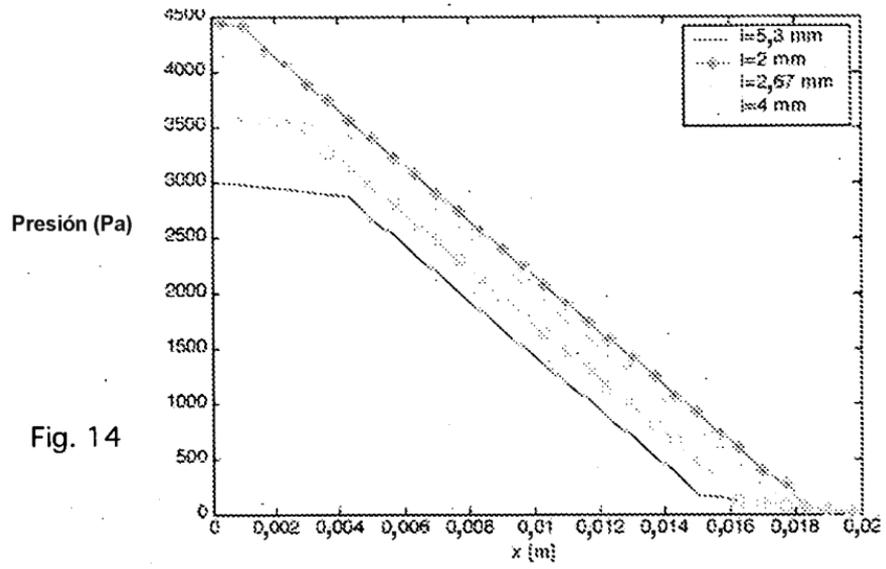


Fig. 14

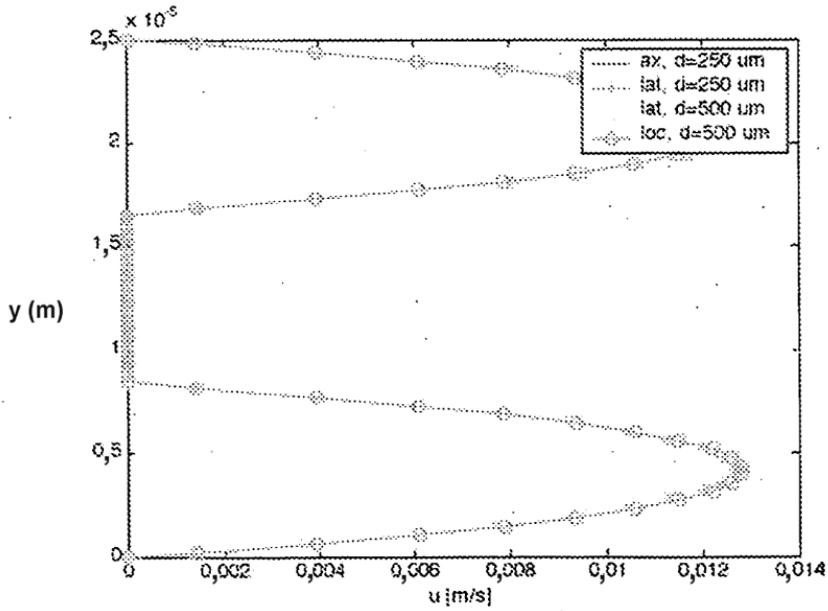


Fig. 15

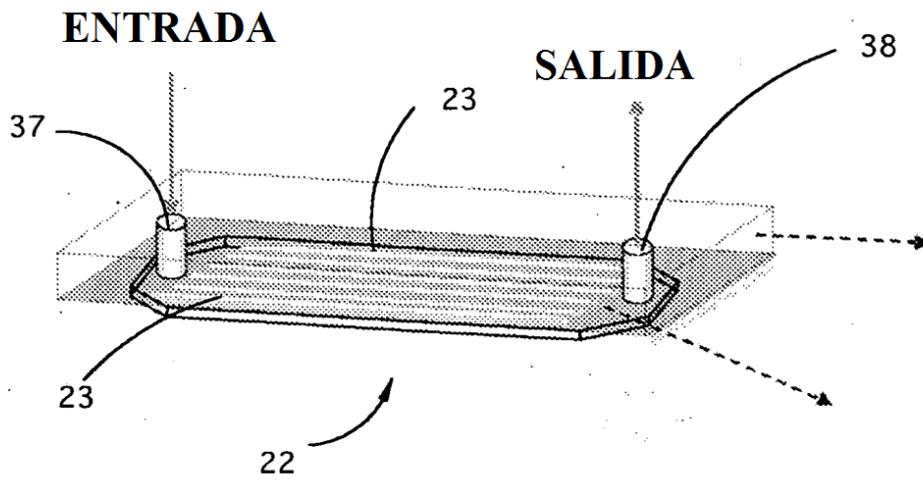


Fig. 16

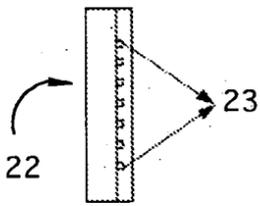


Fig. 17

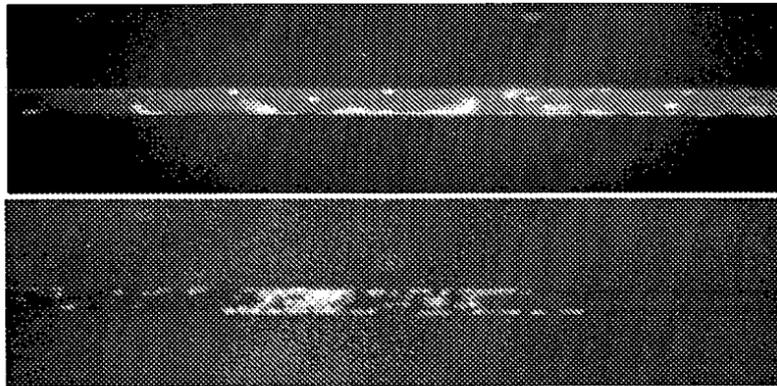


Fig. 18