

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 542**

51 Int. Cl.:
A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07733409 .2**

96 Fecha de presentación: **28.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2040539**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **SOLUCIÓN PRESERVACIÓN DE ÓRGANOS.**

30 Prioridad:
29.06.2006 GB 0612877

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.01.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF
EDINBURGH
OLD COLLEGE, SOUTH BRIDGE
EDINBURGH EH8 9YL, GB**

72 Inventor/es:
MEGSON, Ian L.

74 Agente: **No consta**

ES 2 371 542 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

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la preservación de órganos y tejidos biológicos y en particular a las soluciones que se utilizan en la preservación de órganos y/o tejidos antes de ser trasplantados a un sujeto.

5 **Antecedentes de la invención**

[0002] La conservación de órganos tiene como objetivo mantener el órgano del donante en un estado morfológico y bioquímico óptimo desde el momento de la extracción hasta el momento del trasplante. El almacenamiento en frío de los órganos debe soportar las agresiones provocadas por la isquemia fría inicial y la posterior lesión por reperfusión durante la implantación.

10 [0003] Aunque este método de preservación de órganos es efectivo y ha incrementado el tiempo de conservación de los órganos de forma segura, algunos órganos no funcionan bien tras el trasplante y presentan una disfunción orgánica primaria¹. La disfunción orgánica primaria se asocia con la duración de la isquemia fría y, posiblemente, con la lesión por reperfusión². En consecuencia, a pesar del continuo progreso en la supervivencia del injerto a corto y largo plazo, la disfunción orgánica primaria continúa siendo un problema y un objetivo para la intervención terapéutica.

15 [0004] La disfunción endotelial constituye un importante mediador en el desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión (IR) y en el rechazo del trasplante^{3, 4}. La protección del endotelio vascular es un factor crítico en la preservación de órganos. Esta monocapa de células que recubre todos los vasos sanguíneos sanos normalmente libera factores relajantes derivados del endotelio para ayudar a mantener el flujo sanguíneo en la microcirculación, y para ayudar a prevenir la adhesión o inflamación de células y plaquetas que predisponen a la inflamación y la trombosis⁵.

20 [0005] La solución de la Universidad de Wisconsin (UW) ha revolucionado la conservación isquémica fría de órganos sólidos, al permitir la preservación segura de los órganos hasta las 72 horas. En la actualidad sigue siendo la solución más utilizada para la conservación en frío de los órganos intraabdominales. La composición de la solución de UW fue diseñada para contrarrestar los problemas teóricos asociados con la preservación en isquemia fría, y concretamente para minimizar la inflamación celular inducida por la hipotermia, para prevenir la acidosis intracelular, para prevenir la expansión del espacio intersticial y para prevenir las lesiones inducidas por los radicales libres de oxígeno⁶.

25 [0006] Ha habido pocos cambios en los componentes de la solución de UW desde su concepción, pero los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que muchos de los componentes de la solución de UW aportan pocos beneficios. Estos estudios sugieren que es posible mejorar la solución de UW mediante la simplificación y la eliminación de varios componentes; solo se han considerado como verdaderamente esenciales el lactobionato, la rafinosa y el glutatión⁷. Sin embargo, los ensayos clínicos en trasplante renal indican que la adición de glutatión a la solución de UW no confiere ninguna ventaja clínica⁸.

30 [0007] El glutatión (GSH) se añade a la solución de preservación de órganos de UW y a otras soluciones de preservación, tales como la solución Celsior o la solución Belzer MPS, bajo la premisa de que actúa contra el estrés oxidativo durante la isquemia fría. Sin embargo, una de las desventajas es que el glutatión a menudo se debe añadir inmediatamente antes de utilizar la solución de preservación, ya que se oxida durante el almacenamiento.

35 [0008] Se ha sugerido que el suministro/producción de pequeñas cantidades de óxido nítrico al órgano o tejido puede ser beneficioso. Vodovotz (Óxido Nítrico Nov. 2003; 9(3): 141-7), por ejemplo, mostró que la combinación de suprimir cantidades perjudiciales de NO y añadir una cantidad baja y constante de NO puede mejorar la preservación pulsátil de los riñones usando Belzer MPS que contenga glutatión. Quintana et al. (Int. J. Surg. Investig. 2001; 2(5): 401-411) también examinaron la adición de S-nitrosoglutatión (GSNO) a la solución de UW y observaron que el GSNO como donante de NO puede mejorar las propiedades de la solución de UW para preservar el hígado de las ratas, mantenimiento la morfología hepática y evitando la lesión hepática tras la conservación/reperfusión en frío.

[0009] Uno de los objetivos de la presente invención consiste en evitar y/o mitigar al menos uno de los inconvenientes anteriormente mencionados.

45 [0010] Un objetivo adicional de la invención es proporcionar una solución para la preservación de órganos con al menos una ventaja sobre la solución de la UW y/u otras soluciones relacionadas ya existentes.

[0011] La presente invención se basa en estudios realizados por los inventores para evaluar el impacto que añadir glutatión (GSH) a la solución de UW tiene sobre la función endotelial en un modelo de isquemia-reperfusión fría, así como para determinar si el éster monoetilico de GSH (GSH-MEE) para células permeables o el donante de óxido nítrico (NO) relacionado con GSH, el S-nitrosoglutatión (GSNO), podrían tener algún efecto beneficioso sobre la función vascular y la supervivencia de las células endoteliales frente al estrés oxidativo.

50 [0012] En primer lugar, se proporciona una solución para que se utilice en la preservación de órganos y/o tejidos *in vitro*. La solución comprende una fuente de S-nitrosotiol, e incluye además uno o más componentes adicionales, seleccionados a partir de almidón; hidroxietilalmidón; ácido lactobiónico; gluconato de sodio y/o potasio; glucosa; CaCl₂;

fosfato de potasio; EDTA u otro agente quelante de metal, como el sulfato de magnesio chelex; rafinosa; dextrano; albúmina recombinante; agentes de protección contra la lesión isquémica, como la adenosina; antioxidantes, como el alopurinol y/o la pentafracción, con los componentes preparados en agua, con la condición de que la solución esté sustancialmente libre de glutatión o compuestos que forman glutatión.

5 **[0013]** Como se menciona en los antecedentes de la invención, el glutatión y/o los compuestos que forman glutatión a menudo se agregan o se incluyen en las soluciones de reperfusión de órganos, como en la solución de UW. La presente invención se basa en parte en el uso de soluciones que están libres o sustancialmente libres de glutatión o de compuestos que forman glutatión. Por sustancialmente libres se entiende niveles inferiores a 50 μ M, siendo utilizado normalmente el glutatión en mM. Los compuestos que forman glutatión incluyen N-acetilcisteína, cisteína o disulfuro de glutatión. Debe tenerse en cuenta que las soluciones de preservación de órganos de la técnica anterior pueden almacenarse libres de glutatión antes de su uso, pero que el glutatión, o los compuestos que forman glutatión, tendrán que añadirse con antelación o justo antes de utilizarse. La presente invención, por tanto, se refiere a la formulación de una solución de preservación de órganos destinada a ser administrada a un sujeto.

10 **[0014]** Normalmente el S-nitrosotiol es S-nitroglutatión. El S-nitrosotiol, como el S-nitrosoglutatión, habitualmente se añade en cantidades de 1 μ M - 1mM, tales como 20 μ M - 500 μ M.

15 **[0015]** La solución de preservación de órganos de la presente invención consta naturalmente de otros componentes conocidos y utilizados en otras soluciones de preservación, como la de UW (ver US 4.798.824 y 4.879.283, por ejemplo), la de Celsior y la de Belzer MPS. Otros componentes pueden incluir amortiguadores ácido-básicos para ayudar a mantener el pH de la solución. Los amortiguadores típicos pueden basarse en fosfatos, como el KH_2PO_4 . Además, es probable que haya fuentes de potasio y sodio y que la solución tenga que tener una osmolaridad deseada.

20 **[0016]** Otros componentes pueden incluir o ser seleccionados a partir de almidón; hidroxietilalmidón; ácido lactobiónico; gluconato de sodio y/o potasio; glucosa; CaCl_2 ; fosfato de potasio; EDTA u otro agente quelante de metal, como el sulfato de magnesio chelex; rafinosa; dextrano; albúmina recombinante; agentes de protección contra la lesión isquémica, como la adenosina; antioxidantes, como el alopurinol y/o la pentafracción, con los componentes preparados en agua. Otros componentes opcionales pueden incluir antibióticos, como la penicilina; la insulina (para ayudar en la absorción de glucosa) y/o anti-inflamatorios, como la dexametasona.

25 **[0017]** El uso de EDTA u otro agente quelante de metal puede ser particularmente ventajoso, ya que los iones metálicos de transición pueden tener un efecto no deseado sobre el S-nitrosoglutatión y su extracción/quelación sería deseable.

30 **[0018]** También puede ser deseable proteger la solución de la luz durante el almacenamiento. Por tanto, la solución debe ser almacenada en un recipiente opaco o semiopaco antes de su uso.

[00019] Por tanto, en lo que se refiere a otro aspecto, la presente invención proporciona un envase sustancialmente impermeable a la luz, que contiene la solución relacionada con la presente invención. Por impermeable a la luz se entiende una luz ambiente como la que encontramos en los entornos convencionales donde se almacenan/transportan estos envases.

35 **[0020]** Puede resultar conveniente durante el almacenamiento, antes de usar la solución, que el GSNO se guarde de forma separada de los otros componentes para ayudar a mantener la vida útil de la solución. De esta manera, el GSNO se añadirá o se mezclará con los otros componentes poco o inmediatamente antes de su uso para preservar los órganos y/o los tejidos (es decir, entre varias horas o minutos antes de su uso, por ejemplo de 6-2 horas a 10-5 minutos, etc.)

40 **[0021]** El GSNO puede añadirse como un sólido a la solución que comprende los otros componentes, o puede presentarse en solución, disuelto en un solvente estabilizador adecuado, como el DMSO, opcionalmente disuelto en agua en una proporción 1:1 - 4:1: DMSO/DMF: agua o DMF.

45 **[0022]** Con tal de facilitar el uso, la solución que comprende todos los componentes necesarios, salvo el GSNO, puede suministrarse en un recipiente, como por ejemplo una bolsa, etc., al cual deberá añadirse el GSNO. El GSNO puede encontrarse en un compartimento adyacente rompible o dentro del recipiente, de tal manera que, antes de la ruptura de la membrana, pared o similar del compartimento rompible, el GSNO se mantiene separado de los otros componentes, pero al romperse el GSNO se mezcla con el resto de componentes y se convierte en parte de la solución.

50 **[0023]** Así, por ejemplo, el GSNO puede almacenarse en DMSO (por ejemplo, 50 - 100% en agua desionizada o destilada; <5ml) por ejemplo en una especie de bolsillo, burbuja o jeringa que forma parte integral de la bolsa o envase que contiene la solución de preservación. El GSNO estará preferentemente protegido de la luz mientras se halle en el recipiente de almacenamiento. Bajo condiciones de refrigeración, el GSNO en DMSO formará una masa congelada, que se separa de la solución de preservación de órganos por una membrana o lámina de metal impermeable. Inmediatamente antes de su uso, el DMSO sólido que contiene GSNO se empuja a través de la membrana o lámina de metal, con lo cual se disuelve rápidamente en la solución acuosa para dar una concentración final de GSNO dentro del rango deseado (1 μ M - 1mM) y una concentración final de DMSO que, por lo general, no exceda del 1% de la solución de preservación de órganos final.

[0024] Una de las formulaciones que especialmente se prefiere es la que se muestra a continuación:

S-nitrosoglutatión	50µM - 200µM
Lactobionato	50mM - 200mM
KH ₂ PO ₄	10mM - 100mM
MgSO ₄	1mM - 20mM
Fuente de carbohidratos (Ej. rafinosa, glucosa o sacarosa)	2mM - 50mM
Agente quelante de metal (Ej. EDTA or chelex)	0,01mM - 1mM
Agente protector contra lesiones isquémicas, como la adenosina	1mM - 10mM
Antioxidante, como el alopurinol	100µM - 5mM
Anti-inflamatorio, como la dexametasona	5mg/l - 30mg/l
Insulina	10u/l-100u/l
Antibiótico(s), como la penicilina	50mg/l - 250mg/l

[0025] Una alternativa a la solución citada anteriormente es la solución de UW sin glutatión, pero incluyendo S-nitrosoglutatión en una concentración de 50 µM - 200 µM.

5 **[0026]** La solución de preservación de la presente invención puede prepararse mezclando los componentes deseados con cierta cantidad de agua, como por ejemplo agua destilada y/o desionizada, y añadiendo más agua después hasta obtener la cantidad adecuada. Por ejemplo, si la cantidad digamos es 101, entonces los componentes se disuelven primero en 7 – 91 y, una vez que los compuestos se hayan disuelto (el pH entonces se ajusta a, por ejemplo, pH 7,3 añadiendo ácido y/o base), puede añadirse más agua para que la solución sea de 101. Como las soluciones de la
10 presente invención no incluyen glutatión y el GSNO no se almacena como parte de la solución, se espera que éstas tengan una vida útil relativamente larga, por lo general de más de 1 mes si están en el refrigerador. El inventor ha observado que el GSNO se descompone con el tiempo cuando se mantiene refrigerado dentro de una solución de preservación de órganos típica. Sin embargo, cuando el GSNO se guarda dentro de un solvente que garantiza la conservación, como una solución de DMSO, la estabilidad de GSNO puede mantenerse durante largos periodos de
15 tiempo (ver la Sección de ejemplos).

20 **[0027]** Se debe entender que las soluciones de preservación de la presente invención se pueden usar simplemente para almacenar el órgano o tejido que requiera ser preservado y/o se pueden perfundir a través del tejido, utilizando procedimientos y/o máquinas conocidas en este campo. Normalmente la conservación deberá realizarse a una temperatura reducida, de unos 2 - 10 °C y, antes de usar el órgano o tejido, deberá reperfundirse con una solución a una temperatura que sea o se aproxime a la temperatura corporal, a unos 37°C.

25 **[0028]** La soluciones de la presente invención pueden utilizarse en órganos y/o tejidos tales como riñones, hígado, corazón, pulmones, páncreas y similares, y el órgano/tejido puede obtenerse, aunque no necesariamente, de un cadáver. También se pueden utilizar en vasos sanguíneos, como venas o arterias que sean injertadas a un paciente. Normalmente el sujeto es un ser humano, pero hay otros animales que también reciben trasplantes y, por tanto, la solución puede utilizarse para preservar órganos y tejidos de animales no humanos.

[0029] Por otro lado, se proporciona un método de preservación de órganos y/o tejidos que comprende los siguientes pasos:

[0030] 1. a) obtener el órgano y/o tejido de una fuente adecuada; y

30 **[0031]** 2. b) mantener el órgano y/o tejido en una solución de la presente invención y/o reperfundir una solución de la presente invención a través del órgano y/o tejido.

[0032] Se espera que las soluciones, o similares en su composición, sean capaces de preservar/utilizarse para almacenar órganos durante al menos 24 - 48 horas, ya que ese es el tiempo en el que las soluciones de UW se pueden usar, aunque tienen la ventaja de no tener glutatión y sí incluir S-nitrosoglutatión.

[0033] La presente invención se describe a continuación con más detalle a modo de ejemplo y haciendo referencia a las Figuras que se muestran:

[0034] En la Figura 1 se muestra la contracción máxima de los anillos aórticos sometidos a 1h o 48h de isquemia fría en las soluciones de UW con KCl (60mM);

5 **[0035]** En la Figura 2 se muestran las curvas de concentración de los anillos aórticos sometidos a fenilefrina (FE) después de a) 1h de almacenamiento en frío en las soluciones de UW; b) 48h de almacenamiento en frío en las soluciones de UW. ***P<0,001, ns = no significativo;

10 **[0036]** En la Figura 4 se muestra la respuesta contráctil de los anillos aórticos a PE (EC₈₀) y el efecto del posterior tratamiento con el inhibidor de NO sintasa, L-NAME (100mM) y el barrido de NO, cPTIO después de a) 1h o b) 48h de almacenamiento en frío en las soluciones de UW. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns = no significativo;

[0037] En la Figura 5 se muestra la comparación de las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) supervivientes después de 24 horas de incubación bajo condiciones estándar (sin estrés) o en presencia del generador de radicales hidroxilos, menadiona (10 µM), el sistema de generación de superóxido, la xantina/xantina oxidasa (X/XO; 5 µM, 1mU/ml) o H₂O₂; 100µM). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns = no significativo; y

15 **[0038]** En la figura 6 se muestra la descomposición de concentraciones relevantes de GSNO en la solución modificada de UW (100 Mm GSNO) y DMSO (1mM GSNO) a lo largo de unos 6 - 8 días a 4 - 6°C en la oscuridad (refrigerador), según se calculó durante la monitorización de la absorbancia a 339nm (característico del enlace S-NO).

Materiales y métodos

20 **[0039]** El cuidado de animales y los protocolos experimentales se realizaron conforme a la Ley de 1986 en la que se recogen las Directrices del Ministerio del Interior de Reino Unido sobre Operaciones de Animales (Procedimientos Científicos). Las ratas adultas macho de la cepa Wistar que pesaban entre 300-450 g se pusieron en un entorno a temperatura controlada con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad, y tuvieron libre acceso al agua y a una dieta normal. La solución de la Universidad de Wisconsin se preparó de acuerdo con el protocolo estándar: lactobionato de potasio 100mM, KH₂PO₄ 25mM, MgSO₄ 5mM, rafinosa 30mM, adenosina 5mM, alopurinol 1mM, dexametasona 16 mg/L, insulina 40U/L, penicilina 200.000 U/L y EDTA 0,03mM con pH 7,4. El EDTA se añadió para ayudar a proteger el GSNO contra la descomposición catalizada por iones metálicos. Se introdujeron burbujas de gas argón en la solución durante 1 hora para imitar la hipoxia. Los niveles de oxígeno se confirmaron mediante un electrodo de oxígeno (analizador integrado de radicales libres Apollo 4000, World Precision Instruments Inc. EEUU). El burbujeo que se produjo durante 30 minutos consumió más del 90% de oxígeno de la solución.

Protocolo experimental

35 **[0040]** Después de la dislocación cervical, se realizó una laparotomía y la aorta se diseccionó limpiando la grasa periaórtica y el tejido conectivo. Los vasos se dividieron en anillos aórticos de entre 3 y 5 mm con cuidado de no estirarlos o dañarlos. Los anillos aórticos se conservaron en isquemia fría (a 4°C de 1 a 48 horas) en recipientes sellados y llenados con soluciones control hipóxicas (de UW sin GSH); de UW con SGH (3mM); de UW con éster monoetilico de glutatión (GSHMEE; 3mM) o de UW con S-nitrosoglutatión (GSNO; 100 µM).

40 **[0041]** Después del almacenamiento, los anillos aórticos se suspendieron entre dos soportes de acero inoxidable en una miografía (700MO, Danish Myo, Aarhus, Dinamarca) y se reoxigenaron en baños de órganos de 10 ml que contenían la solución amortiguadora de Krebs (mM): NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄·7H₂O 1,2; glucosa 5,5; EDTA 0,03 y CaCl₂·2H₂O 1,6 (37°C; pH 7,4). Los cambios en la tensión isométrica se detectaron mediante un transductor, se registraron usando un sistema de adquisición de datos MacLab (MacLab 8 con Gráfico v 3.5; AD Instrument, Hastings, Reino Unido) y se visualizaron en un ordenador Macintosh Performa 630. Antes de la estabilización (30 minutos) se aplicó a todos los anillos una tensión de reposo de 1,5 g.

45 **[0042]** Después de la estabilización, todos los vasos se expusieron tres veces a la solución amortiguadora de Krebs, que contenía una alta concentración de potasio (60 mM), para evaluar la viabilidad del tejido y para proporcionar una contracción máxima de referencia para el posterior análisis de datos. Cada respuesta se siguió de un lavado. Se construyó entonces una curva de concentración-respuesta del agonista adrenérgico α₁, L-fenilefrina (PE; 10⁻⁸ M - 3x10⁻⁵ M) y se usó con el fin de identificar la concentración de PE necesaria para generar una contracción máxima de ~80% (EC₈₀) para posteriores estudios vasodilatadores. Tras la estabilización de las contracciones, se construyeron en todas las preparaciones las curvas de concentración-respuesta acumulativas del vasodilatador dependiente del endotelio, acetilcolina (ACh; 10⁻⁹ - 10⁻⁵ M). Solo se obtuvo una curva de concentración-respuesta por tejido. Se obtuvo otra contracción submáxima de PE y el inhibidor de NO sintasa, N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) se aplicó para inhibir la producción endógena de NO y para determinar el efecto vasodilatador del NO derivado del endotelio en condiciones basales (sin estímulos). Posteriormente, se añadió el barrido de NO, carboxi-PTIO (cPTIO; 1mM), para establecer la contribución de NO independiente de NOS a cualquier tono vasodilatador existente en condiciones basales.

Ensayo para determinar la viabilidad de las células endoteliales

[0043] Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se cultivaron en frascos de 162 ml (medio de Eagle modificado por Dulbecco 37°C, 5%CO₂). Las células se cultivaron para la confluencia y se transfirieron a placas de cultivo de 6 pozos que contenían una solución salina amortiguadora de fosfato (control), la solución de UW sin GSH, la solución de UW con GSH (3mM), la solución de UW con GSH-MEE (3mM) o la solución de UW con GSNO durante 24 horas (37°C) sin oxidantes o en presencia de un generador de radicales hidroxilos (menadiona; 10 µM), el sistema de generación de superóxido, la xantina + xantina oxidasa (5 µM; 1mU/ml) o las especies oxidantes H₂O₂ (100 µM). La viabilidad de las células tras incubaciones de 24 horas se evaluó a través de un ensayo de exclusión con azul tripán estándar.

Análisis Estadístico

[0044] El análisis estadístico se llevó a cabo mediante GraphPad Prism versión 3.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EEUU. Todos los valores se expresan como la media +/- SEM. Los datos se analizaron mediante un ANOVA unidireccional o bidireccional; el test de Dunnet post-hoc se aplicó cuando procedía siguiendo ANOVAs unidireccionales. P<0,05 se consideró significativo.

Resultados

[0045] El cloruro de potasio (60mM) generó contracciones reproducibles de los anillos aórticos después de 1h o 48h de isquemia fría en la solución de UW con y sin GSH. No hubo diferencias significativas en la magnitud de la contracción provocada en los anillos almacenados en cualquiera de las soluciones (P=0,061; Figura 1).

[0046] La fenilefrina (10-100nM) provocó una contracción estable de cada preparación equivalente al ~80% de la respuesta máxima para 60mM KCl. Después de 1 hora de isquemia fría, no había diferencias significativas entre las contracciones máximas inducidas por PE de cualquiera de las soluciones de UW y la solución estándar de UW (Figura 2a). Después de 48 horas de isquemia fría, el tejido almacenado en la solución de UW con GSNO era el único que mostraba contracciones máximas significativamente bajas en respuesta a PE en comparación con la solución de la UW sin GSH (Figura 2b).

[0047] La acetilcolina (10-100nM) produjo una vasodilatación dependiente de la concentración en PE precontrayendo los anillos aórticos después de 1 hora o 48 horas de isquemia fría en todas las soluciones de UW. Después de 1 hora de isquemia fría, los tejidos almacenados en la solución de UW libre de GSH presentaban una relajación dependiente del endotelio significativamente mayor que cualquiera de los tejidos almacenados en las soluciones con GSH (Figura 3a). Después de 48 horas de isquemia fría, todos los vasos mostraban respuestas reducidas a ACh en comparación con los que habían estado almacenados 1 hora, pero los tejidos preservados en la solución de UW con GSH presentaban una relajación dependiente del endotelio significativamente menor que los de la solución de UW sin GSH. No había diferencias significativas en la relajación dependiente del endotelio entre los tejidos almacenados en las soluciones de UW con GSNO o GSHMEE y la solución de UW libre de GSH (Figura 3b).

[0048] Añadir L-NAME a los tejidos precontraídos tras 1 hora de isquemia fría en cualquiera de las soluciones de UW con GSH provocó una contracción similar a la de los vasos tratados con la solución de UW libre de GSH (Figura 4a). Añadir, además, el barrido de NO, cPTIO, provocó una contracción significativamente mayor solo en los tejidos preservados en la solución de UW con GSNO en comparación con la solución estándar de UW (Figura 4a).

[0049] Añadir L-NAME a los tejidos precontraídos después de 48 horas de isquemia fría tanto en la solución de UW con GSHMEE como en la que contenía GSNO provocó una contracción significativamente menor en comparación con la solución estándar de UW (Figura 4b). Una vez más, añadir también cPTIO provocó una contracción significativamente mayor solo en los tejidos preservados en la solución de UW con GSNO en comparación con los almacenados en la solución estándar de UW (Figura 4b).

Ensayo de viabilidad celular

[0050] La viabilidad de las células HUVEC después de 24 horas en una solución salina amortiguadora de fosfato (control) fue de media >80% (Figura 5). Las células incubadas en las soluciones de UW que contenían GSH o GSH-MEE mostraron una viabilidad significativamente reducida, mientras que las incubadas en la solución de UW con GSNO presentaron una tasa de supervivencia no muy distinta a la del control. El generador de radicales hidroxilos era altamente citotóxico, con menos del 5% de las células que sobrevivieran el periodo de tratamiento de 24 horas en las condiciones de control. El GSH y el GSH-MEE mejoraron significativamente la supervivencia celular en presencia de menadiona, mientras que el GSNO resultó ineficaz. El sistema de generación de superóxido, X/XO, no afectó significativamente la supervivencia celular y el patrón de respuesta a los diversos tratamientos fue el mismo que el que encontramos en condiciones sin estrés. El H₂O₂ causó una importante muerte celular, pero ninguno de los tratamientos de UW tuvo un efecto significativo en la viabilidad de las células.

Discusión

[0051] La isquemia fría y la lesión por isquemia-reperfusión se caracterizan por el estrés oxidativo, al cual las células endoteliales son particularmente sensibles, no sólo en términos de viabilidad celular, sino también debido a la inactivación del potente agente protector dependiente del endotelio, el óxido nítrico (NO), causada por los radicales libres centrados en oxígeno. La vasoconstricción resultante, junto con el aumento de la tendencia a la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos y la activación de los leucocitos constituyen las limitaciones fundamentales para la preservación de órganos⁵.

[0052] El glutatión (GSH) es un elemento clave en las defensas antioxidantes intracelulares, donde puede actuar como un antioxidante en sí mismo, como fuente de equivalentes de reducción para las enzimas antioxidantes y como agente reductor endógeno para reciclar vitaminas C y E^{9,10}. Es importante destacar que el GSH es esencial para proteger a las células endoteliales del daño oxidativo¹¹. El suministro de GSH es, por tanto, un medio teóricamente beneficioso para incrementar la capacidad antioxidante de las células, y para proteger la integridad y la función de las células endoteliales en particular. Sobre esta base, parece lógico enriquecer las soluciones de preservación de órganos como la de UW con GSH, en un esfuerzo por contribuir a la protección contra el daño oxidativo.

[0053] El trabajo *in vitro* e *in vivo* previo sugiere que añadir GSH a la solución de preservación de órganos no aporta ninguna ventaja⁸. Esta falta de beneficio se debe probablemente al hecho de que el GSH de la solución de UW se oxida muy rápido a su forma inactiva durante el almacenamiento anterior a su uso; se considera que la vida media del GSH en la solución de UW es de unos 8 días de almacenamiento en frío. Además, el GSH es un tripéptido y no atraviesa fácilmente las membranas celulares¹². Dado que los radicales libres intracelulares tampoco atraviesan las membranas, esto supone un problema para que se produzca con éxito el reabastecimiento de las reservas intracelulares agotadas bajo condiciones de estrés oxidativo. El glutatión de la solución de UW es probable, por tanto, que actúe principalmente como un antioxidante extracelular de corta duración durante el período de isquemia y que solo aporte limitados beneficios en la perfusión de órganos tras el trasplante.

[0054] Después de 1 hora o 48 horas de isquemia fría en cualquiera de las soluciones de UW, la función del músculo liso parece que se conserva tal y como demuestran las curvas dependientes de la concentración de PE. El hallazgo de que los anillos almacenados en la solución de UW con GSNO durante 48 horas tienen una respuesta contráctil menor puede ser un reflejo de la actividad del NO exógeno que causa un efecto vasodilatador, pese al hecho de que el GSNO es aclarado varias horas antes de que se evalúen las respuestas a la fenilefrina. Estos resultados están en consonancia con nuestros datos anteriores que muestran que el GSNO puede mantener la dilatación mediada por NO de los segmentos de la vena safena humana y la arteria mamaria interna varias horas después del lavado¹³.

[0055] Los datos actuales muestran que tras 1 hora de isquemia fría, la vasodilatación dependiente del endotelio se vio afectada de forma significativa en los tejidos almacenados en la solución de UW con GSH en comparación con los tejidos almacenados en la solución estándar de UW. Después de 48 horas de isquemia fría, sólo los tejidos almacenados en la solución de UW con GSH presentaron esta disfunción endotelial. Estos datos implican que añadir GSH a la solución de UW tiene un efecto perjudicial sobre la disfunción endotelial durante la isquemia fría, que es de rápida aparición y adicional a la causada por la isquemia-reperfusión. El mecanismo exacto que subyace a este efecto paradójico no queda claro, pero podría estar mediado por una exacerbación del daño inducido por los radicales libres en estas condiciones. Esta hipótesis se sustenta en pruebas existentes a favor de la peroxidación de fosfolípidos inducida por radicales glutatíoniles, que tiene como resultado el daño celular; y se sustenta también en nuestros experimentos de cultivo de células endoteliales, por medio de los cuales tanto el GSH como el GSH-MEE redujeron significativamente la viabilidad celular tras una exposición de 24 horas en ausencia de estímulos oxidantes¹⁴. El GSNO no provocó la muerte de las células bajo estas condiciones, lo que sugiere que este agente podría ser preferible no sólo por sus propiedades para generar NO, sino también por carecer de efectos citotóxicos en concentraciones farmacológicamente relevantes. Además, existen datos que demuestran que el suministro de NO exógeno posibilita la citoprotección en las lesiones por isquemia-reperfusión¹⁵.

[0056] En conclusión, los datos actuales no sustentan la adición de GSH a la solución de preservación de órganos de UW; en lugar de aportar propiedades antioxidantes beneficiosas, puede provocar un efecto citotóxico paradójico. Mientras que el aducto de células permeables de GSH, GSH-MEE, parecía tener un impacto menos perjudicial sobre la función endotelial, según parece también era tóxico para las células endoteliales. El GSNO, por otra parte, no compartía las propiedades citotóxicas de GSH y GSH-MEE, al mismo tiempo que generaba NO durante varias horas después del lavado, provocando una vasodilatación sostenida que podría ayudar a mantener la perfusión en el periodo inicial tras el trasplante.

[0057] Nuestros datos indican que el GSNO en la solución modificada de UW (que contenía EDTA, pero no GSH) se descompuso con una vida media de ~6 días, mientras estaba almacenado en un refrigerador de laboratorio convencional sin luz a 4-6 °C. Durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones, el GSNO no mostró ningún tipo de descomposición significativa en DMSO al 100%. El punto de congelación de DMSO es ~15°C, por lo que estas muestras se "congelaron" eficazmente durante el experimento, contribuyendo quizás a la estabilidad de GSNO bajo estas condiciones. La aparente depresión de absorción en el momento cero de la muestra de DMSO probablemente se atribuye a la disolución incompleta del material cuando se tomó la primera medida. La falta de

descomposición importante de GSNO en DMSO durante este periodo de tiempo impidió la determinación de una vida media significativa, pero es probable que sea de varios meses.

Referencias

- [0058] 1. Southard JH, Belzer FO. Preservación de órganos. Annual Review of Medicine. 1995; 46:235-247.
- 5 [0059] 2. Erkasap S, Ates E. La solución de preservación con L-Arginina enriquecida disminuye la lesión por isquemia /reperfusión en los riñones de perros después de un almacenamiento en frío a largo plazo. Nephrology Dialysis Trasplant 2000; 15: 1224-7.
- [0060] 3. Hidalgo MA, Shah KA, Fuller BJ, Green CJ. El daño inducido por isquemia fría al endotelio vascular resulta en las alteraciones de permeabilidad en los pulmones trasplantados. Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery. 1996; 112: 1027-1035.
- 10 [0061] 4. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Los aniones superóxido y la hiperoxia inactivan el factor relajante derivado del endotelio. American Journal of Physiology. 1986; 250: H822-H827.
- [0062] 5. Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K. Biología celular de las células hepáticas de Kupffer y endoteliales. Gut. 1994; 35: 1509-1516.
- 15 [0063] 6. Belzer FO, Southard J H. Principios de preservación de órganos sólidos mediante almacenamiento en frío. Transplantation 1988; 45: 673-676.
- [0064] 7. Jamieson NV, Lindell S, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO. Un análisis de los componentes de la solución de UW con el hígado aislado y perfundido de un conejo. Transplantation. 1988; 46: 512-516.
- 20 [0065] 8. Polyak MM, Arrington BO, Kapur S, Stubenbord WT, Kinkhabwala M. Los suplementos de glutatión durante la isquemia fría no aportan ventajas funcionales precoces en el trasplante renal. Transplantation 2000; 70: 202-205.
- [0066] 9. Flohe L, Gunzler WA. Reacciones de óxido-reducción enzimáticas dependientes del glutatión. En: Arias IM, Jakoby WB, eds. Glutathione: metabolism and function. Nueva York: Raven Press; 1976:17-34.
- [0067] 10. Kosower E M. Propiedades químicas del glutatión. En: Arias IM, Jakoby BM, eds. Glutathione: metabolism and function. Nueva York: Raven Press; 1976:1-16.
- 25 [0068] 11. Kugiyama K, Ohgushi M, Motoyama T, Hirashima O, Soejima H, Misumi K, et al. La infusión intracoronaria de glutatión reducido mejora la respuesta vasomotora endotelial a la acetilcolina en la circulación coronaria humana. Circulation. 1998; 97: 2299-2301.
- [0069] 12. Boudjerna K, van Gulik T, Lindell S, Vreugdenhill P, Southard J, Belzer F. Efecto de glutatión oxidado y reducido en la preservación del hígado. Transplantation. 1990; 50: 948-951.
- 30 [0070] 13. Sogo N, Campanella C, Webb DJ, Megson IL. Los S-nitrosotioles causan una relajación mediada por óxido nítrico prolongada en la vena safena humana y en la arteria mamaria interna: potencial terapéutico en la cirugía de bypass. Br J Pharmacol. 2000; 131: 1236-1244.
- [0071] 14. Borisenko GG, Martín I, Zhao Q, Amoscato AA, Tyurina YY, Kagan VE. El glutatión propaga el estrés oxidativo provocado por la mieloperoxidasa en células HL-60. Pruebas a favor de la peroxidación de fosfolípidos inducida por radicales glutatióniles y la citotoxicidad. J Biol Chem. 2004; 279: 23453-23462.
- 35 [0072] 15. Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, et al. Efectos citoprotectores del nitrito durante la isquemia-reperfusión del corazón y el hígado in vivo. J Clin Invest. 2005; 115: 1232-40.

REIVINDICACIONES

1. Una solución para que se utilice en la preservación de órganos y/o tejidos in vitro, donde la solución comprende una fuente de S-nitrosotiol, e incluye además uno o más componentes adicionales, seleccionados a partir de almidón; hidroxietilalmidón, ácido lactobiónico; gluconato de sodio y/o potasio; glucosa; CaCl_2 ; fosfato de potasio; EDTA u otro agente quelante de metal, como el sulfato de magnesio chelex; rafinosa; dextrano; albúmina recombinante; agentes de protección contra la lesión isquémica, como la adenosina; antioxidantes, como el alopurinol y/o la pentafracción, con los componentes preparados en agua, con la condición de que la solución esté sustancialmente libre de glutatión o compuestos que forman glutatión.
2. La solución según la reivindicación 1, en la cual la solución comprende glutatión o compuestos que forman glutatión en concentraciones de hasta 50 μM .
3. La solución según las reivindicaciones 1 o 2, en la cual el S-nitrosotiol es S-nitrosoglutaratión.
4. La solución según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la cual el S-nitrosotiol está presente en una cantidad de 1 μM - 1Mm.
5. La solución según la reivindicación 1, la cual comprende también uno o más componentes adicionales, seleccionados a partir de antibióticos, como la penicilina; insulina (para ayudar en la absorción de glucosa) y/o anti-inflamatorios, como la dexametasona.
6. La solución según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual comprende también EDTA u otro(s) agente(s) quelante(s) de metal.
7. Un envase sustancialmente impermeable a la luz, que contiene la solución según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. El envase según la reivindicación 7, en el cual el S-nitrosotiol se encuentra inicialmente en un compartimento separado del resto de la solución, y en el cual el compartimento se compone de una membrana, pared o similar rompible, que tras su ruptura permite que el S-nitrosotiol se mezcle con el resto de la solución.
9. La solución o envase según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el S-nitrosotiol se almacena en una solución estabilizadora, como DMSO o DMF, antes de mezclarse con otros componentes de la solución previamente a su uso.
10. Una solución de preservación de órganos sin glutatión y que comprende, inmediatamente antes de su uso como solución de preservación, S-nitrosoglutaratión 50 μM - 200 μM ; lactobionato 50mM - 200mM; KH_2PO_4 10mM - 100mM; MgSO_4 1mM - 20mM; fuente de carbohidratos (Ej. rafinosa, glucosa o sacarosa) 2mM - 50mM; agente quelante de metal (Ej. EDTA o Chelex) 0,01mM - 1mM; agente protector contra lesiones isquémicas, como la adenosina 1mM - 10mM; antioxidantes, como el alopurinol 100 μM - 5mM; anti-inflamatorios, como la dexametasona, 5 mg/l - 30mg/l; insulina 10u/l - 100u/l; antibiótico(s), como la penicilina 50mg/l - 250mg/l.
11. Un método de conservación de órganos y/o tejidos, que comprende los siguientes pasos:
 - a. mantener aislado el órgano y/o tejido en una solución según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 10; y/o reperfundir una solución según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 o 10 a través del órgano y/o tejido aislado.
12. Un método según la reivindicación 11, según el cual el órgano y/o tejido que se preserva son riñones, hígado, pulmón o páncreas.
13. Una solución o envase según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que se utiliza en la preservación de riñones, hígado, pulmón o páncreas.

Dibujos

Figura 1

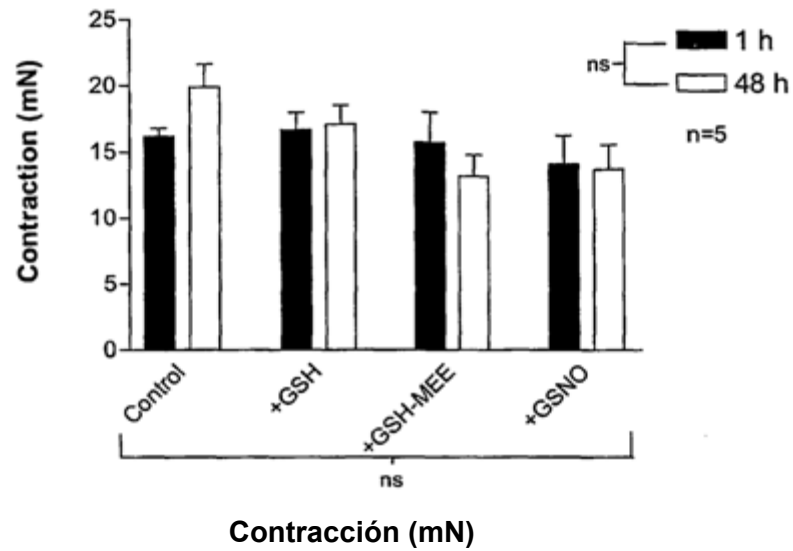


Figura 2

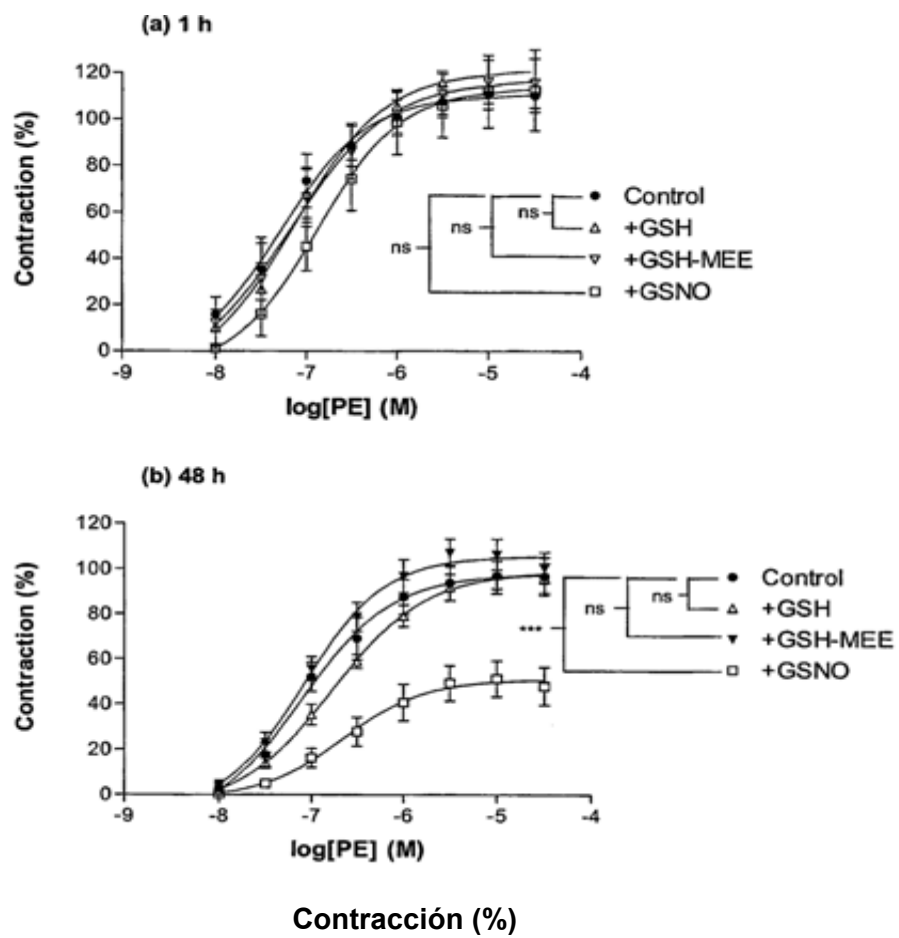
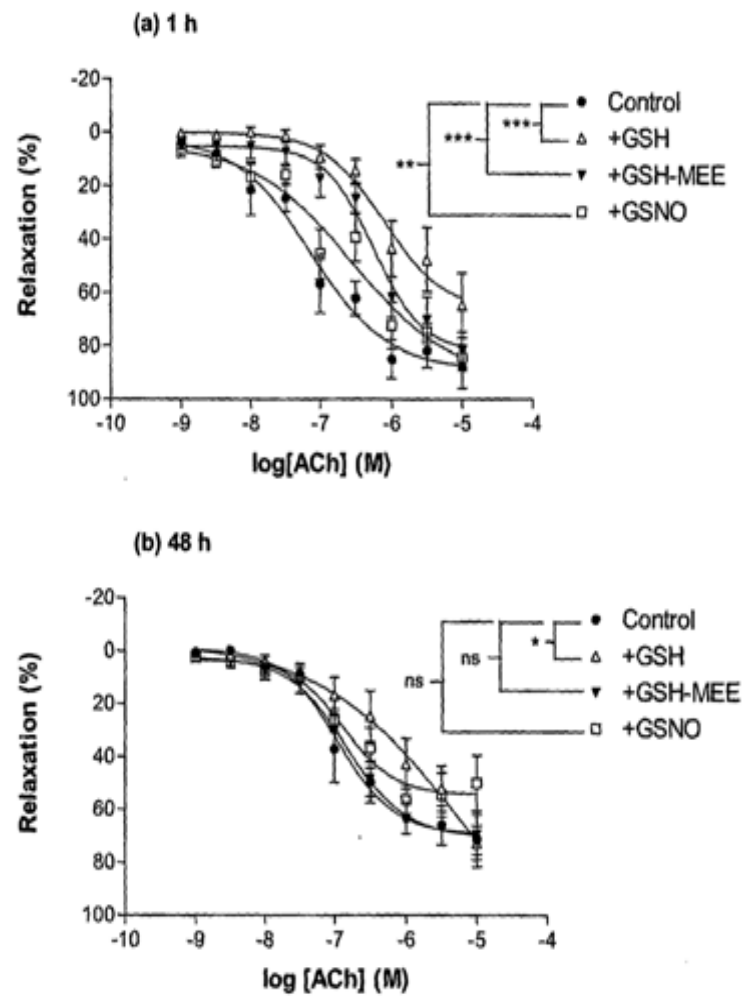


Figura 3



Relajación (%)

Figura 4

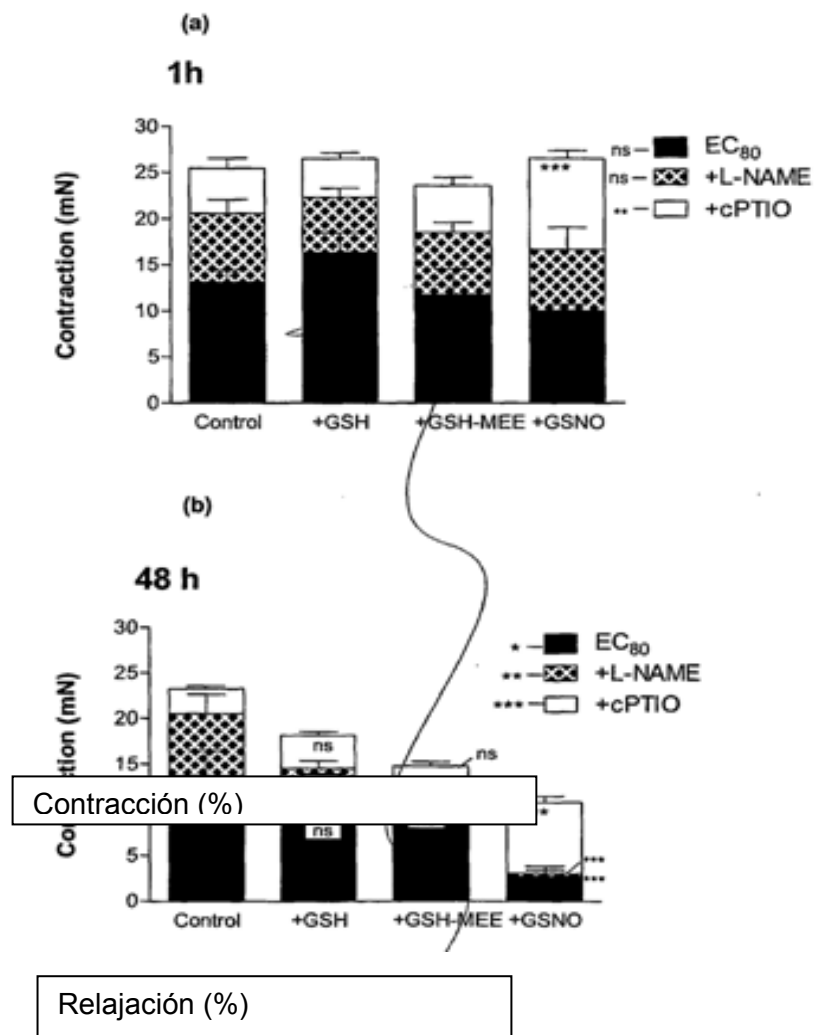
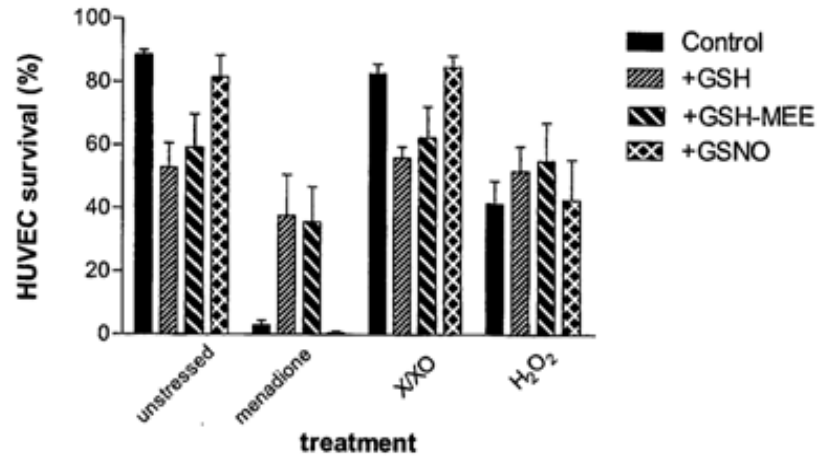


Figura 5



Supervivencia de las células HUVEC (%) / Tratamiento

Figura 6

