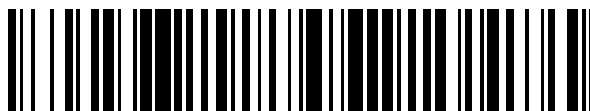


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 838**

51 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2008 E 08775818 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 2175718**

54 Título: **Expansores de fluidos corporales que comprenden tampones de ácidos aminosulfónicos N-sustituidos**

30 Prioridad:

03.07.2007 GB 0712833

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

14.06.2013

73 Titular/es:

**AQIX LTD (100.0%)
Imperial College London Incubator, Exhibition
Road
London SW7 2AZ , GB**

72 Inventor/es:

REES, DOUGLAS

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 407 838 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

Expansores de fluidos corporales que comprenden tampones de ácidos aminosulfónicos N-sustituídos.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a expansores de fluidos corporales. En particular, la invención se refiere a medios líquidos fisiológicos para su utilización en la expansión, el mantenimiento o el reemplazo del volumen de sangre o fluido corporal extravascular. Se prevé que la invención encuentre utilización en diversas aplicaciones médicas, incluyendo en procedimientos de infusión intravenosa y extravascular (por ejemplo, peritoneal).

Antecedentes de la técnica

La pérdida de volumen de sangre, también conocida como hipovolemia, puede resultar de, por ejemplo, varias causas incluyendo lesión física, cirugía, hemorragias internas o quemaduras. También puede inducirse hipovolemia mediante la ingesta de fármacos tales como diuréticos y vasodilatadores.

Una pérdida significativa de volumen de sangre que resulta de hipovolemia puede ser mortal a menos que se trate rápidamente. Tal pérdida de sangre conduce a una disminución en la tensión arterial y a una reducción en el suministro de sangre necesario (y con el mismo de oxígeno) a órganos y tejidos esenciales. En consecuencia, la hipovolemia puede dar como resultado isquemia, insuficiencia orgánica múltiple, daño renal, daño cerebral y en última instancia muerte.

La hipovolemia se trata perfundiendo al sujeto con fluidos cristaloides o coloidales como sustitutos para la sangre perdida tras incidentes hemorrágicos. Estos sustitutos de fluidos actúan expandiendo el volumen de sangre, ocasionando rehidratación y normalización de la tensión arterial.

Los ejemplos de sustitutos de la sangre o expansores del volumen de sangre conocidos actualmente incluyen solución de Ringer con lactato, solución de Hartmann, HES (hidroxietilalmidón) y solución salina isotónica (cloruro de sodio) (Chiara *et al.*; Crit Care Med. 2003;31(7):1915-22; Rhee *et al.*; J.Trauma. 1998;. 44(2): 313-319; Jernigan *et al.*; Am Surg. 2004;70(12):1094-8; Via *et al.*; J.Trauma. 2001;50:1076-82).

A pesar de su capacidad para restaurar el volumen de sangre, los expansores del volumen de sangre actuales son ineficaces en la prevención de un estado grave y a menudo mortal conocido como lesión por reperfusión. Este fenómeno se observa en sujetos que han padecido hipovolemia grave y se manifiesta por sí mismo en forma de daño a órganos esenciales (tales como pulmones, riñones, hígado, etc.). Los efectos perjudiciales de la lesión por reperfusión se observan habitualmente entre 1 y 3 días tras la perfusión con expansores del volumen de sangre.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona, tal como se especifica mediante la reivindicación 1, una disolución expansora de fluidos corporales tamponada que comprende

- i) BES, estando presente BES a una concentración de desde 1 hasta 12 mmoles/l;
- ii) iones calcio e iones magnesio a una razón de concentración molar de 5:1 a 1:1, estando dichos iones calcio a una concentración de desde 0,1 hasta 2,5 mmoles/l;
- iii) iones hidrogenocarbonato de 21 a 35 mmoles/l;
- iv) iones potasio desde 2,5 hasta 6,2 mmoles/l;
- v) iones cloruro desde 96 hasta 126 mmoles/l; y
- vi) iones sodio desde 100 hasta 150 mmoles/l

para su utilización en la prevención o mejora de la pérdida de líquido extracelular en un sujeto. La presente invención también proporciona una disolución expansora de fluidos corporales según la reivindicación 1 para su utilización en el tratamiento de hipovolemia. La presente invención también proporciona una disolución expansora de fluidos corporales según la reivindicación 1 para su utilización en el tratamiento de quemaduras. La presente invención también proporciona, tal como se especifica mediante la reivindicación 4, una disolución expansora de fluidos corporales que comprende

- i) BES, estando presente BES a una concentración de desde 1 hasta 12 mmoles/l;

65

- ii) iones calcio e iones magnesio a una razón de concentración molar de 5:1 a 1:1, estando dichos iones calcio a una concentración de desde 0,1 a 2,5 mmoles/l;
- 5 iii) iones hidrogenocarbonato de 21 a 35 mmoles/l;
- iv) iones potasio desde 2,5 hasta 6,2 mmoles/l;
- v) iones cloruro desde 96 hasta 126 mmoles/l; y
- 10 vi) iones sodio desde 100 hasta 150 mmoles/l

para su utilización en la prevención y/o mejora de la lesión por reperfusión.

15 Se ha identificado una necesidad de desarrollar disoluciones adicionales que puedan compensar la pérdida de sangre y la pérdida de líquido intersticial y extracelular que resulta de hipovolemia y quemaduras graves. Hay también una necesidad de desarrollar tratamientos que sean eficaces en la prevención o disminución de la incidencia de lesión por reperfusión en sujetos hipovolémicos.

20 Además de lo anterior, hay también una necesidad de mantener un volumen suficiente de líquido extravascular, intersticial. Este fluido, que baña y rodea a las células, es esencial para mantener la homeostasis de tejidos y órganos, y funciona, entre otros, como medio de suministro de materiales a las células, de eliminación de desechos metabólicos y de facilitación de una comunicación intercelular eficaz.

25 La presente invención también aborda el problema significativo e importante de tratamientos con fluidos de reemplazo que dan como resultado estados edematosos dentro de órganos corporales, aumentando simplemente de ese modo la incidencia de lesión por reperfusión. Se proporciona un fluido fisiológico equilibrado que cumple la composición del líquido intersticial en todos los aspectos, pero de la manera más importante en cuanto a tonicidad y osmolalidad, y facilitaría un intercambio dinámico de fluidos más natural entre el espacio extravascular y la fase intersticial conjuntamente con el sistema linfático, previniendo de ese modo la aparición de edema en tejidos circundantes.

35 Tal como se especifica mediante las reivindicaciones, la invención proporciona una disolución expansora de fluidos corporales no tamponada con fosfato inorgánico, es decir, una disolución expansora de fluidos corporales tamponada en la que el tampón es un tampón fisiológicamente aceptable que no es un tampón de fosfato inorgánico, que comprende iones calcio e iones magnesio a una razón de concentración de 5:1 a 1:1.

40 La presente memoria describe una disolución expansora de fluidos corporales, que comprende un tampón distinto de fosfato que se selecciona del grupo que consiste en tampones de ácidos aminosulfónicos N-sustituidos fisiológicamente aceptables, especialmente los que presentan un valor de pK_a en disolución acuosa de desde 7,1 hasta 7,5 a 20°C, y lo más preferentemente del grupo que consiste en ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico (TES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-aminoetanosulfónico (BES) y combinaciones de los mismos.

45 La invención proporciona una disolución expansora de fluidos corporales para su utilización tal como se especifica mediante las reivindicaciones, que comprende iones calcio e iones magnesio a una razón de concentración de 5:1 a 1:1, y que comprende además BES.

50 Tal como se especifica mediante las reivindicaciones, el tampón distinto de fosfato está presente a una concentración de desde 1 hasta 12 mmoles/l, preferentemente de aproximadamente 5 mmoles/l.

Tal como se especifica mediante determinadas reivindicaciones, las disoluciones expansoras de fluidos corporales para su utilización según la invención comprenden preferentemente iones calcio e iones magnesio a una razón de concentración de desde 4:1 hasta 2:1, más preferentemente de aproximadamente 3:1.

55 Tal como se especifica mediante las reivindicaciones, las disoluciones expansoras de fluidos corporales de la invención comprenden iones calcio desde 0,1 hasta 2,5 mmoles/l. Concentraciones superiores de iones magnesio, hacia 25 mmoles/l, son útiles para modificaciones de la disolución para fines cardioplégicos, pero para utilización regular como disolución expansora de fluidos corporales se recomiendan las concentraciones indicadas a continuación.

60 Las disoluciones expansoras de fluidos corporales para su utilización según la invención pueden comprender iones calcio a una concentración de desde 1,0 hasta 2,5 mmoles/l, preferentemente desde 1,1 hasta 1,4 mmoles/l, más preferentemente desde 1,2 hasta 1,3 mmoles/l, incluso más preferentemente de aproximadamente 1,25 mmoles/l.

65 Tal como se especifica mediante determinadas reivindicaciones, las disoluciones expansoras de fluidos corporales para su utilización según la invención comprenden preferentemente iones magnesio a una concentración de desde

0,2 hasta 0,6 mmoles/l, más preferentemente desde 0,3 hasta 0,5 mmoles/l, incluso más preferentemente iones magnesio aproximadamente 0,45 mmoles/l.

5 En una realización según la invención tal como se especifica mediante las reivindicaciones, están presentes iones calcio y magnesio a una concentración de aproximadamente 1,25 mmoles/l y aproximadamente 0,45 mmoles/l respectivamente.

10 En una realización, las disoluciones expansoras de fluidos corporales para su utilización según la invención son sustitutos de la sangre para expandir y/o reemplazar el volumen de sangre. Aún en una realización adicional, los expansores de fluidos corporales son sustitutos de líquidos extravasculares, por ejemplo, sustitutos de líquido intersticial.

15 Además de lo anterior, la invención tal como se especifica mediante las reivindicaciones también abarca formas concentradas de las disoluciones definidas en la presente memoria. Por ejemplo, se abarcan concentrados de 1 a 50X, preferentemente de 5 a 20X. Con el fin de producir una disolución de 1X, es decir, la concentración, potencia de trabajo, los concentrados de 5X, 10X, 20X y 50X requieren que se añadan, respectivamente, 4, 9, 19 y 49 volúmenes de agua a un volumen de concentrado, más el equivalente de 2,1 g de hidrogenocarbonato de sodio por litro de la disolución diluida 1X.

20 La presente memoria describe disoluciones definidas en la presente memoria para su utilización como medicamentos y expansores del volumen de sangre.

25 Tal como se especifica mediante determinadas de las reivindicaciones, la invención proporciona disoluciones definidas en la presente memoria para su utilización en el tratamiento de hipovolemia y/o quemaduras, y para su utilización en la prevención y/o mejora de la lesión por reperfusión.

30 La presente memoria también describe disoluciones definidas en la presente memoria para su utilización en: (a) terapia de reemplazo de fluidos, (b) perfusión de una cavidad corporal (por ejemplo la cavidad abdominal o torácica) de un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico, y/o (c) administración intravascular o extravascular de agentes terapéuticos, de prueba y/o sinérgicos a un sujeto.

35 La utilización de una disolución definida en la presente memoria para la fabricación de medicamentos y expansores del volumen de sangre también se describe, por ejemplo, para tratar hipovolemia o para tratar la pérdida de líquido extracelular e intersticial en sujetos que padecen quemaduras.

40 La presente memoria también describe la utilización de una disolución definida en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para (a) tratar la pérdida de líquido intersticial en un sujeto que padece quemaduras, (b) tratar acidosis respiratoria y/o metabólica en un sujeto, (c) perfusión de la cavidad abdominal durante la diálisis peritoneal de un sujeto con insuficiencia renal aguda o un estado de toxicidad aguda, o (c) prevenir y/o mejorar la lesión por reperfusión.

45 La presente memoria también describe utilizaciones de disoluciones dadas a conocer en la presente memoria para administrar un agente terapéutico, de prueba y/o sinérgico a un sujeto, por ejemplo un agente biológico, tal como al menos una célula madre, un péptido o una proteína derivada del genoma.

En casos preferidos, la administración se efectúa mediante administración por una vía intravascular, intraperitoneal, intradérmica, oral, intramuscular o tópica. Opcionalmente, la administración se efectúa mediante administración al sistema linfático de un sujeto.

50 La presente memoria también describe métodos de tratamiento de hipovolemia y/o quemaduras, y métodos de prevención y/o mejora de la lesión por reperfusión, comprendiendo estos métodos administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una disolución definida en la presente memoria.

55 En casos preferidos, la hipovolemia resulta de deshidratación y/o quemaduras y/o sangrado. En otra forma de realización, la hipovolemia se induce por fármacos.

60 La presente memoria también describe un método de mantenimiento de la homeostasis fisiológica de un tejido y/u órgano *in situ* durante un procedimiento quirúrgico llevado a cabo en un sujeto, comprendiendo el método perfundir dicho tejido y/u órgano con una disolución definida en la presente memoria.

En un caso del método anterior, la disolución se mantiene a una temperatura de entre 4 y 20°C de manera que dicho tejido y/u órgano, cuando se perfunde con dicha disolución, se mantiene en un estado de hipotermia.

65 Aún en un caso adicional del método anterior, el procedimiento quirúrgico se lleva a cabo para recuperar dicho tejido y/u órgano de un sujeto donante, para su posterior trasplante a un sujeto receptor.

La presente memoria abarca métodos para administrar un agente terapéutico, de prueba y/o sinérgico a un sujeto utilizando las disoluciones descritas en la presente memoria. El agente puede ser un agente biológico, tal como al menos una célula madre, un péptido o una proteína derivada del genoma.

5 La administración puede efectuarse mediante administración por una vía intravascular, intraperitoneal, intradérmica, oral, intramuscular o tópica. Opcionalmente, la administración se efectúa mediante administración al sistema linfático de un sujeto.

10 La utilización de una disolución definida en la presente memoria se describe para (a) la diálisis de la cavidad peritoneal en un sujeto que padece insuficiencia renal aguda o un estado de toxicidad aguda; y/o (b) la irrigación de órganos abdominales y/o torácicos en un sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico.

15 Se describe una disolución tamponada sustancialmente libre de fosfato inorgánico para su utilización como medicamento, especialmente una que está también sustancialmente libre de al menos uno de tampón citrato y lactato.

Descripción de las figuras

20 Figura 1. Evaluación de la supervivencia de ratas a lo largo del tiempo como función de la disolución de resucitación utilizada. Se sometieron las ratas a extracciones de sangre en serie. Se separaron las ratas en tres grupos de tratamiento experimentales tal como sigue: (1) reemplazo de sangre por solución salina fisiológica; (2) reemplazo de sangre por una disolución preferida según la invención, denominada en la presente memoria disolución RS-I o RS-I; y (3) sin reemplazo de las pérdidas de sangre. Se monitorizó la supervivencia de las ratas en cada uno de los diversos grupos y se exponen los datos en la figura 1.

25 Figura 2. Comparación del volumen total de sangre extraída para cada uno de los brazos de estudio con referencia a la figura 1 anterior. Se extrajo sangre de las ratas tal como se describe en el ejemplo 4 a continuación.

30 Figura 3. Evaluación de las tasas respiratorias de las ratas a lo largo del tiempo en los diversos brazos de estudio definidos con referencia a la figura 1.

35 Figura 4. Evaluación de los perfiles de sangre en cerdos a lo largo de diversos periodos de tiempo de perfusión con RS-I. Se infundieron los cerdos con 1,0 l de disolución RS-I cada día durante tres días y se tomaron muestras de sangre a diversos puntos de tiempo. Se sometieron a prueba las muestras de sangre, entre otros, para determinar recuentos sanguíneos completos, determinación de química del suero, electrolitos, glucosa, lactato, osmolalidad, enzimas séricas (glutámico oxalacético transaminasa sérica/aspartato aminotransferasa [SGOT/AST], glutámico pirúvico transaminasa sérica/alanina aminotransferasa [SGPT/ALT], creatina cinasa [CK] y lactato deshidrogenasa [LDH]), factores de coagulación y niveles de fibrinógeno. Además, se midió la sangre para determinar interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α).

40 Figura 5 (a-g). Análisis de los niveles de electrolitos séricos en un modelo de cerdo normovolémico.

Figura 6 (a-d). Análisis de los niveles de metabolitos séricos en un modelo de cerdo normovolémico.

45 Figura 7 (a-d). Análisis de los niveles de enzimas séricas en un modelo de cerdo normovolémico.

Figura 8 (a-e). Análisis de los perfiles de células sanguíneas en un modelo de cerdo normovolémico.

50 Figura 9 (a-d). Análisis de los parámetros de coagulación sanguínea en un modelo de cerdo normovolémico.

Figura 10. Comparación de las razones de ADP:ATP (difosfato de adenosina:trifosfato de adenosina) en riñones de cerdos de grupo estático frío (CS) y estático caliente (WS) antes y después de 6 horas de perfusión normotérmica.

55 Figura 11. Cambio en la tensión arterial media tras resucitación en sangre autóloga, fluido RS-I y solución salina de Ringer con lactato.

Figura 12. Tiempo de protromboplastina activada (aPTT) tras resucitación en sangre autóloga, fluido RS-I y solución salina de Ringer con lactato.

60 Descripción detallada de invención

Los términos "expansor de fluidos corporales" o "disolución expansora de fluidos corporales" o "sustituto de fluidos corporales" tal como se utilizan en la presente memoria quieren decir una disolución líquida fisiológica que está prevista para su utilización en el reemplazo o la expansión de un fluido corporal, y/o en el mantenimiento de un volumen suficiente de un fluido corporal. Los fluidos corporales para los que las disoluciones para su utilización según la invención están previstas para su expansión, reemplazo o mantenimiento incluyen líquidos intravasculares

(por ejemplo, componentes sanguíneos tales como plasma), o alternativamente, líquidos extravasculares (por ejemplo líquido intersticial).

Los términos “expansor de fluidos corporales” y “disoluciones expansoras de fluidos corporales” también abarcan medios líquidos fisiológicos que están previstos para su utilización como vehículo para la administración de agentes terapéuticos, de prueba y/o sinérgicos al cuerpo de un sujeto que necesita dichos agentes, o en circunstancias en las que los agentes van a someterse a prueba, por ejemplo en sujetos no humanos.

El término “sujeto” o “sujetos” abarca, cuando sea apropiado, sujetos humanos y sujetos animales no humanos, por ejemplo sujetos mamíferos tales como roedores, cerdos, monos, perros y similares según sea apropiado en investigación experimental y ganado, caballos y similares tal como se produce en la práctica veterinaria.

Términos tales como “tampón distinto de fosfato” y “sustancialmente libre de fosfato” pretenden abarcar formas de realización de fluidos que carecen sustancialmente de iones fosfato inorgánico.

Los términos “expansor del volumen de sangre” o “disolución expansora del volumen de sangre” o “sustituto de la sangre” tal como se utilizan en la presente memoria quieren decir una disolución líquida fisiológica que está prevista para su utilización en el reemplazo, la expansión o el mantenimiento del volumen de sangre. Estas disoluciones, por tanto, encuentran utilización en la sustitución de una pérdida de volumen de sangre que resulta de hipovolemia.

El término “hipovolemia” tal como se utiliza en la presente memoria quiere decir un estado de disminución del volumen de sangre, o más específicamente, un estado de disminución del volumen de plasma sanguíneo. Las causas comunes de hipovolemia incluyen deshidratación, quemaduras, sangrado (por ejemplo hemorragia) o la ingesta de determinados fármacos tales como diuréticos y vasodilatadores.

El término “lesión por reperfusión” tal como se utiliza en la presente memoria quiere decir la lesión provocada en órganos esenciales del cuerpo tras la hipovolemia y posterior perfusión con expansores del volumen de sangre convencionales.

La presente invención surge de que el inventor se da cuenta de que los expansores del volumen de sangre convencionales son perjudiciales para el mantenimiento de la supervivencia y viabilidad de células, tejidos y órganos y por tanto pueden contribuir al desarrollo de la lesión por reperfusión.

En parte, la presente invención proviene de una apreciación de que la composición de expansores del volumen de sangre (y medios fisiológicos en general) debe basarse en un conocimiento específico de los coeficientes de actividad de las especies iónicas dentro de la fase de gel intersticial que rodea a cada célula. Estos coeficientes de actividad se han calculado y las disoluciones de la presente invención se han diseñado según estos cálculos.

Las disoluciones para su utilización según la invención utilizan tampones distintos de fosfato, basándose en la comprensión de que iones fosfato en exceso pueden ser perjudiciales para la viabilidad e integridad funcional de células, tejidos y órganos perfundidos. Los iones fosfato inhiben la glucólisis, la fosforilación oxidativa (Berman & Sanders; *Circul.Res.*, 1955; 3, 559-563), la actividad creatina cinasa (Hall & DeLuca; *Adv.Exp.Med.Biol.* 1986; 194, 71-82) y las enzimas implicadas dentro de la eliminación de radicales libres de oxígeno (De Frietas & Valentine; *Biochemistry* 1984; 23:2079). Estas enzimas son importantes en la inducción de cambios apoptóticos al nivel celular, que conducen en última instancia a la necrosis (es decir, muerte) de células, tejidos y sistemas de órganos dañados o anómalos.

Esencialmente, la utilización de disoluciones no tamponadas con fosfato evita la ineficacia de las disoluciones tamponadas con fosfato convencionales en cuando a inestabilidad por encima de pH 7,2. En particular, los iones fosfato inorgánico en disoluciones convencionales precipitan a lo largo del tiempo en forma de fosfato de calcio insoluble (Pedersen, MD Thesis, University of Aarhus, Dinamarca. Publ. S A Moller Christensen A/S. 1973; 41-51). Este problema se acentúa por variaciones en el intervalo de temperatura al que se utilizan las disoluciones y por tanto tales disoluciones tamponadas convencionales son de utilidad clínica limitada. Además, otros varios agentes de tampón distintos de fosfato, por ejemplo, citratos, determinadas combinaciones de aminoácidos y disoluciones con lactato son distintos de los agentes de tampón del pH naturales o fisiológicos que funcionan en especies de mamíferos y se ha encontrado que son ineficaces en la conservación de la función de órganos en condiciones normotérmicas *ex vivo* (véase el ejemplo 6) e *in vivo* (véase el ejemplo 8). En contraposición, la disolución para su utilización según la invención, cuando se utiliza como expansor de fluidos corporales, presenta un rendimiento potenciado porque puede utilizar el sistema de tampón natural que se encuentra en todos los mamíferos, concretamente, un sistema de $p\text{CO}_2$ /hidrogenocarbonato.

Se describen en la presente memoria disoluciones expansoras de fluidos corporales que, en virtud de su composición, pueden compensar o bien la pérdida de sangre en sujetos hipovolémicos, o bien la pérdida de líquido intersticial y extracelular asociada con quemaduras graves. Las disoluciones expansoras de fluidos corporales de la invención proporcionan medios líquidos fisiológicos que imitan el entorno iónico, de sustratos y biofísico del líquido intersticial (véase, por ejemplo, la tabla II más adelante). Como tales, se prevé que tales disoluciones se utilicen

como medios de conservación y perfusión universales. Las concentraciones de especies iónicas confirman los coeficientes de actividad de cada especie iónica dentro de la fase de gel intersticial alrededor de células de mamífero. Esto está en contraposición con muchos medios convencionales que basan sus concentraciones en las concentraciones séricas totales.

5 En la patente US nº 6.946.241, el presente inventor describe medios de cultivo celular líquidos no tamponados con fosfato. Se ha apreciado ahora que disoluciones expansoras del volumen de sangre y disoluciones expansoras de fluidos corporales eficaces en general pueden basarse en la composición de estos medios. Se prevé que las disoluciones de la presente invención no sólo compensen la pérdida de sangre asociada con hipovolemia sino que también reduzcan o prevengan la aparición de lesión por reperfusión. También se prevé que las disoluciones definidas en la presente memoria presenten aplicación en el mantenimiento *in situ* de órganos y tejidos, que quedan expuestos durante diversos procedimientos quirúrgicos.

15 Las disoluciones expansoras de fluidos corporales para su utilización según la presente invención están preferentemente libres de suero y/o componentes del suero. Las disoluciones están libres por tanto de proteínas séricas derivadas de animales y otros contaminantes, de manera que no está presente ninguna proteína sérica extraña, no definida. La ausencia de suero presenta la ventaja de que las disoluciones están "químicamente" mejor definidas que disoluciones a base de suero convencionales. Además, la ausencia de suero y componentes derivados del suero evita problemas con respecto a la posible transmisión de enfermedades infecciosas (por ejemplo virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD)) asociados con la utilización de este material *in vivo*.

25 Por los motivos facilitados anteriormente, las disoluciones expansoras de fluidos corporales para su utilización según la presente invención (y particularmente las disoluciones previstas para utilización en seres humanos) están también preferentemente libres de antígenos, pirógenos, proteínas y similares derivados de animales o foráneos. Sin embargo, en determinadas situaciones, pacientes susceptibles pueden requerir la presencia de componentes derivados de proteínas o péptidos específicos como medida de compensación de la pérdida notificada de proteínas durante diálisis renal o peritoneal. Las disoluciones descritas en la presente memoria pueden proporcionar vehículos eficaces para su utilización en la administración de tales componentes a pacientes.

30 Un descubrimiento importante que se ha desarrollado durante el trabajo con disoluciones similares a las disoluciones para su utilización según la presente invención en experimentos de perfusión de órganos y tejidos aislados es que pueden utilizar los mecanismos de tamponamiento del pH naturales observados en todas las especies de mamíferos, concretamente, autorregulación de la presión parcial de dióxido de carbono [$p\text{CO}_2$] y la concentración del ión bicarbonato [HCO_3^-] en la sangre incluso en ausencia de glóbulos rojos. La constante de disociación interrelacionada [pK_a] proporcionada por los restos imidazol/histidina de la hemoglobina parece simularse por tampón BES que, debido a su pK_a útil (7,15) y $-\Delta pK/^\circ\text{C}$ (0,016) a 20°C, mantiene automáticamente el pH de la disolución RS-I entre 7,18 - 7,45 a lo largo de un intervalo de temperatura de 10 - 37°C y por tanto es particularmente adecuado como agente de tampón en la disolución para su utilización según la invención para su utilización con especies de mamífero en condiciones fisiológicas tanto hipotérmicas como normotérmicas.

45 Tal como se estableció anteriormente, los expansores de fluidos corporales para su utilización según la presente invención adoptan y se aprovechan de un sistema de tamponamiento fisiológico natural. Este sistema de tamponamiento toma la forma de $\text{NaHCO}_3/p\text{CO}_2$ (hidrogenocarbonato de sodio/ CO_2 disuelto) en combinación con el tampón de Good zwitteriónico, BES (ácido N,N-bis[2-hidroxietil]-2-amino-etanosulfónico (Good *et al.*; Biochemistry 1966; 5:467-477)), que actúa en virtud de su pK_a ideal a lo largo de un intervalo de temperatura de 10 a 37°C, proporcionando un pH estable, un requisito esencial para la conservación celular. Se ha mostrado que BES no es tóxico para células de mamífero en cultivo en estudios a largo plazo y presenta unión insignificante de iones calcio y magnesio, eliminando así el posible peligro de precipitación de iones divalentes que se produce cuando se utilizan disoluciones de tampón fosfato doble o hidrogenocarbonato/fosfato convencionales. De hecho, se ha mostrado experimentalmente que concentrados de 10X de las disoluciones para su utilización según la invención presentan una vida útil de almacenamiento (almacenadas a de 3 a 8°C) superior a 14 meses. Además, podría utilizarse una combinación de BES y ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) y/o ácido N-tris-(hidroximetil)metil-2-amino-etanosulfónico (TES).

55 La siguiente tabla enumera tampones de ácidos aminosulfónicos N-sustituidos fisiológicamente aceptables y sus valores de pK_a en disolución acuosa a 20°C.

Agentes de tampón de ácidos aminosulfónicos N-sustituidos	pK_a a 20°C	$-\Delta pK_a/^\circ\text{C}$
MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico	6,15	0,011
ADA: Ácido N-(2-acetamido)iminodiacético	6,62	0,011
ACES: Ácido N-2-(acetamido)-2-aminoetanosulfónico	6,88	0,02
BICINE: N,N-bis(2-hidroxietil)glicina	8,35	0,018
BES: Ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico	7,15	0,016
HEPES: Ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)	7,55	0,014

Agentes de tampón de ácidos aminosulfónicos N-sustituídos	pK _a a 20°C	-ΔpK _a /°C
MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico	7,20	0,011
PIPES: Ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)	6,80	0,009
TES: Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico	7,50	0,020
TRIS: tris(hidroximetil)aminometano	8,3	0,031
TRICINE: N-tris(Hidroximetil)metilglicina	8,15	0,021

Tal como se especifica mediante las reivindicaciones, el tampón distinto de fosfato BES está presente a una concentración de desde 1 hasta 12 mmoles/l, preferentemente desde 3 hasta 7 mmoles/l, más preferentemente desde 4 hasta 6 mmoles/l, incluso más preferentemente de aproximadamente 5 mmoles/l. Tal como se especifica mediante las reivindicaciones, están presentes iones hidrogenocarbonato a una concentración de desde 21 hasta 35 mmoles/l, preferentemente desde 23 hasta 26 mmoles/l, más preferentemente de aproximadamente 25 mmoles/l.

En formas de realización preferidas de la invención, los sistemas de tampón distinto de fosfato utilizados permiten, debido a su intervalo de pK_a único, la capacidad para ajustar automáticamente el pH de las disoluciones para su utilización según la invención desde 7,05 hasta 7,5 a lo largo de un intervalo de temperatura de desde 4°C hasta 38°C. Esta característica de la invención, a diferencia de la encontrada con sistemas de tamponamiento convencionales, no requiere ninguna intervención adicional en el ajuste del pH para dar valores que oscilan entre 7,13 y 7,5 ± 0,5 a lo largo de un intervalo de temperatura de 10 a 38°C. Preferentemente, las disoluciones para su utilización según la invención presentan un pH de aproximadamente 7,46 a una temperatura de aproximadamente 37,4°C. Se prefiere que los valores de pH anteriores se mantengan *in vivo* tras la administración de las disoluciones a un sujeto que lo necesita.

Tal como se comenta en la presente memoria, las disoluciones para su utilización según la invención pueden utilizarse para procedimientos de infusión tanto intra como extravasculares. Las disoluciones pueden utilizarse también para perfundir órganos humanos y animales aislados en condiciones normotérmicas. Cuando las disoluciones se utilizan para perfundir órganos aislados, es preferible que las disoluciones se aireen con gas carbónico (95% de oxígeno/5% de dióxido de carbono).

Las disoluciones expansoras de fluidos corporales para su utilización según la presente invención pueden comprender también en cualquier combinación que se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones, uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, o todos de los siguientes componentes: iones sodio desde 100 hasta 150 (de manera preferible aproximadamente 135) mmoles/l, iones potasio desde 2,5 hasta 6,2 (de manera preferible aproximadamente 5) mmoles/l, iones calcio desde 0,1 hasta 2,5 (de manera preferible aproximadamente 1,25) mmoles/l, iones magnesio (de manera preferible aproximadamente 0,45 mmoles/l), iones cloruro desde 96 hasta 126 (de manera preferible aproximadamente 118) mmoles/l, glucosa (preferentemente D-glucosa) de 2 a 11 mmoles/l (de manera preferible aproximadamente 10), glicerol desde 50 hasta 150 (de manera preferible aproximadamente 110) μmoles/l, colina desde 7 hasta 15 (de manera preferible aproximadamente 10) μmoles/l, glutamato (preferentemente L-glutamato) desde 5 hasta 400 (de manera preferible aproximadamente 300) μmoles/l, aspartato (preferentemente L-aspartato) desde 5 hasta 200 (de manera preferible aproximadamente 20) μmoles/l, glutamina (preferentemente L-glutamina) desde 100 hasta 2000 (de manera preferible aproximadamente 400) μmoles/l, piroglutamato desde 15 hasta 215 (de manera preferible aproximadamente 60) μmoles/l, arginina (preferentemente L-arginina) desde 20 hasta 200 (de manera preferible aproximadamente 100) μmoles/l, pirofosfato de tiamina (TPP) desde 1 hasta 120 (de manera preferible aproximadamente 40) nmoles/l, D- o DL- o L-carnitina (preferentemente L-carnitina) desde 40 hasta 70 (de manera preferible aproximadamente 50) μmoles/l, e insulina porcina o humana (preferentemente insulina humana) desde 5 hasta 200 (de manera preferible aproximadamente 28) mU.I./l.

Se proporcionan preferentemente iones cloruro como sales de sodio, potasio, calcio y magnesio. Preferentemente, cuando está presente, se proporciona la colina como una sal de cloruro.

Las disoluciones para su utilización abarcadas por la presente invención comprenden varios sustratos que conservan la homeostasis metabólica de tejidos y órganos. Se ha mostrado que la glucosa y el glicerol son satisfactorios en el cumplimiento de las demandas de energía de órganos y tejidos aislados, incluso cuando no son el sustrato preferido para el órgano en cuestión (por ejemplo el corazón) mediante la inclusión de niveles fisiológicos de insulina. Aparte de su capacidad para metabolizarse, el glicerol y la glucosa presentan también propiedades de estabilización de membranas y de eliminación de radicales libres, que se ha mostrado que son extremadamente importantes en el mantenimiento de la viabilidad fisiológica de órganos y tejidos.

Tal como se describió anteriormente, también pueden incluirse aspartato y glutamato en las disoluciones para su utilización según la invención, para potenciar el metabolismo oxidativo mediante la reposición de productos intermedios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), manteniendo de ese modo los niveles de fosfato de alta energía incluso durante el ataque isquémico. De manera similar, el glutamato está implicado en el mantenimiento de los potenciales de oxidación-reducción intracelulares. Se prevé que optimizando las lanzaderas de fosfato de glicerol

y aspartato-malato, las células mantendrán un equilibrio de NAD/NADH (nicotinamida adenina dinucleótido/nicotinamida adenina dinucleótido reducido) óptimo y de ese modo sustentarán los niveles de nucleótidos de adenina. Además, el glutamato y la adenina pueden actuar como metabolitos intermedios para formar piroglutamato y después de eso participar en el ciclo de gamma-glutamilo para sintetizar glutatión, un agente beneficioso en la prevención de la generación de radicales de oxígeno tóxicos asociados con la incidencia de lesión por reperfusión en órganos y tejidos de mamíferos durante el almacenamiento de órganos de donantes antes de su trasplante y tras terapias de reemplazo del volumen de sangre.

La tiamina desempeña un papel importante en la oxidación de α -cetoácidos (mediante la acción de tiamina cocarboxilasa) y previene la acumulación de piruvato y aldehído de piruvato tóxico, minimizando de ese modo la apoptosis celular y la necrosis acompañante de tejidos y órganos asociados.

En el ciclo de los TCA, el pirofosfato de tiamina (TPP), que se incluye en disoluciones preferidas para su utilización según la invención, es un cofactor en el metabolismo de un ácido α -cetoglutárico para formar succinil-coenzima A, mediante descarboxilación oxidativa, o para formar glutamato, mediante aminación reductora. En esencia, TPP está implicado en numerosas rutas bioquímicas interrelacionadas, especialmente las rutas de las pentosas fosfato y glucolítica. La tiamina puede emplearse como pirofosfato de tiamina, difosfato de tiamina o tiamina diamida. Preferentemente, las disoluciones para su utilización según la invención comprenden tiamina como cloruro de pirofosfato de tiamina.

Además, la inclusión de pirofosfato de tiamina en la formulación de las disoluciones de la invención también parecería ser necesaria para pacientes con diálisis peritoneal con el fin de prevenir el agotamiento de ión fosfato y la calcificación ya que puede dializarse fácilmente a través de membranas de hemodiálisis (PM - 175 Dalton) y se ha administrado previamente o bien por vía intravenosa o bien mediante la disolución de diálisis peritoneal o hemodiálisis para reponer los niveles de pirofosfato y/o fosfato plasmáticos.

Se ha notificado que el vitaminoide carnitina presenta múltiples efectos en la mejora de la función cardiaca de manera distinta de simplemente optimizando el metabolismo oxidativo, tal como promoviendo la utilización de sustratos alternativos y puede mejorar adicionalmente el flujo de sangre coronario. Se prefiere la L-carnitina a los isómeros D o DL porque no provoca inhibición del metabolismo de acetil co-enzima A/ácidos grasos libres. Preferentemente, el componente vitaminoide comprende 50 μ moles/l de clorhidrato de [-]- β -hidroxi- γ -trimetilamino-butirato (L-carnitina). En esta invención, la inclusión preferida del isómero L de carnitina pretende optimizar el transporte de ácidos grasos de cadena larga desde el citosol al interior de la matriz mitocondrial al sitio de β -oxidación y de ese modo tamponar la razón de acetil CoA/CoA intramitocondrial (en la que CoA es coenzima A) estimulando la síntesis de acetilcarnitina a partir de carnitina acetil transferasa. Esta reducción en la razón de acetil CoA/CoA dará como resultado un flujo de salida de acetilcarnitina desde la mitocondria con una estimulación asociada de la piruvato deshidrogenasa y una reversión de la inhibición por ácidos grasos de la oxidación de glucosa. En última instancia, la optimización de la utilización de ácidos grasos libres como fuente de energía es esencial para todos los tipos de células, pero esto debe realizarse con la conservación de la utilización de hidratos de carbono (glucosa) mediante el funcionamiento optimizado de las enzimas implicadas en la glucólisis, por ejemplo, hexocinasa, glucocinasa, fosfofructocinasa.

Tal como se describió anteriormente, las disoluciones para su utilización según la invención pueden comprender también insulina. La utilización de insulina humana recombinante (por ejemplo expresada en *E. coli* o *S. cerevisiae*) no sólo descarta el riesgo de contaminación viral o antigénica en células/tejidos/órganos receptores, tal como puede ser el caso con insulina derivada de otras fuentes animales o de mamíferos, sino que también conduce a que se logre un mejor ajuste de las moléculas de insulina a la estructura del receptor de insulina humano, es decir, se optimizará la especificidad del receptor para conservar las muchas funciones asociadas de la insulina en procesos celulares.

Esencialmente, los efectos biológicos de la insulina no se refieren simplemente a su capacidad para regular el metabolismo de hidratos de carbono y el transporte facilitado de la glucosa circulante al interior de células si no que también a su capacidad para ocasionar (i) la potenciación de la actividad glucocinasa intracelular y la incorporación de aminoácidos para dar proteínas, (ii) la estimulación de la traducción del ADN (ácido desoxirribonucleico) para dar proteínas, (iii) el aumento de la síntesis de lípidos y (iv) la estimulación del transporte de sodio, potasio y fosfato inorgánico a través de membranas celulares.

En formas de realización preferidas de la invención, se han utilizado niveles séricos humanos, normales de insulina. En contraposición, las formulaciones de perfundido conocidas convencionales, cuando incorporan insulina, utilizan niveles no naturales de esta hormona (por ejemplo de 10 a 50 x 10⁶ mUI/l; aproximadamente un millón de veces más concentrada que la insulina encontrada en determinadas disoluciones para su utilización según la invención). El motivo de esto se refiere al hecho de que sólo una pequeña cantidad de la insulina existe como moléculas individuales en tales concentraciones. El resto de la insulina existe en forma de agregados grandes, que son ineficaces en la estimulación de los receptores de insulina y por tanto son biológicamente inactivos. Determinadas disoluciones para su utilización según la invención logran niveles séricos humanos, normales de insulina acidificando

la insulina durante la formulación para evitar la formación de agregados, de modo que se permite que existan especies individuales activas, moleculares de insulina en disolución a pH $7,3 \pm 0,2$.

Las concentraciones de especies iónicas en disoluciones para su utilización según la invención confirman los coeficientes de actividad de cada especie iónica y no simplemente sus concentraciones séricas totales. Por ejemplo, la unión al suero de iones calcio y magnesio debe distinguirse de los niveles reales libres, ionizados de estos iones. Los iones magnesio son importantes en varias reacciones celulares críticas y se notifica que su presencia extracelular estimula la actividad respiratoria mitocondrial y modula los efectos de un rápido flujo de entrada de calcio y flujo de salida de potasio. Igualmente, una concentración adecuada de iones calcio es importante para mantener los niveles libres de este ión presentes en la circulación.

La conductividad iónica de las disoluciones para su utilización según la invención es preferentemente comparable a la del suero humano, concretamente $12,0 \pm 0,3 \text{ mS cm}^{-1}$ y como tal mantiene el estado ionizado de la membrana celular y las actividades de restos enzimáticos.

Por tanto, según lo anterior, las disoluciones para su utilización según la presente invención son isosmóticas con respecto al suero humano (aprox. 290 mOsmoles/l) y no parecen necesitar la inclusión de expansores del plasma, tal como se demuestra por el hecho de que sólo se producen cambios menores (aprox. un 8%) en la hidratación durante la perfusión hipotérmica a largo plazo (es decir, de 4 a 52 h) del corazón de rata aislado y preparaciones de músculo-nervio visceral. Esto puede explicarse por el hecho de que la membrana celular se encuentra en continuidad con una fase intersticial de gel al 99% de modo que se proporciona un tamponamiento coloidal natural del intercambio en equilibrio iónico de Donnan en exceso a través de la membrana celular. La mayoría de la presión osmótica se proporciona por iones sodio y sus aniones acompañantes, y sólo un pequeño componente (aprox. un 0,5%) puede atribuirse a proteínas plasmáticas. La inclusión de los niveles séricos del metabolito, glicerol, en esta disolución puede contribuir también al tamponamiento osmótico en la superficie de contacto del líquido intersticial que rodea a cada célula, específicamente la que implica la red transcápsular.

En la práctica, la inclusión de agentes oncóticos se ve comprometida además por su afinidad por iones calcio y magnesio, necesitando diálisis previa en disolución nueva de modo que no se altere la composición catiónica. La naturaleza lábil de los expansores de polipéptidos también los hace poco prácticos por su predisposición a desnaturalización mecánica. Desafortunadamente, aunque estos expansores coloidales son esencialmente no tóxicos, su utilización está contraindicado en cuanto a que, por ejemplo, (1) la viscosidad aumentada aumenta el grosor de la capa "no agitada" alrededor de las células de modo que se dificulta la difusión de metabolitos, (2) la alteración del potencial bioeléctrico de la membrana superficial de modo que se altera el metabolismo celular y las actividades de receptores, (3) la antigenicidad de expansores proteínicos, (4) la aglutinación y hemólisis de glóbulos rojos (RBC) y (5) el bloqueo de la microvasculatura y la isquemia.

Se prevé que las disoluciones para su utilización según la invención se utilicen generalmente como composiciones de base a las que pueden añadirse componentes adicionales, dependiendo del fin médico específico. Por ejemplo, se prevé que las disoluciones para su utilización según la invención puedan complementarse con, por ejemplo, glóbulos rojos (RBC), plasma y/o plaquetas para la generación de sangre artificial. Tales componentes de la sangre pueden ser o bien naturales o bien artificiales. Por tanto, pueden añadirse productos químicos adicionales a la composición de base tal y como se requiera. Por tanto, se pretende que las disoluciones encuentren una amplia aplicabilidad como composiciones de base en las que una utilidad médica requiere la expansión, el reemplazo, el mantenimiento y/o la complementación, etc. de un fluido corporal con un agente de tampón cuyo pK_a coincide estrechamente y se comporta como el de restos imidazol/histidina de la hemoglobina (pK_a : 7,0) excluyendo de ese modo la utilización de citrato (pK_a : 3,09), lactato (pK_a : 3,85) o cualquier agente de tampón de pK_a no adecuado de manera similar así como iones fosfato inorgánico con sus efectos perjudiciales notificados sobre procesos bioquímicos y fisiológicos.

En determinadas formas de realización, las disoluciones para su utilización según la invención son para su utilización en el tratamiento de hipovolemia o la pérdida de líquido intersticial y extracelular ocasionada en sujetos que padecen quemaduras graves. Además, en determinadas formas de realización, las disoluciones para su utilización según la invención son para su utilización en la prevención y/o mejora de la lesión por reperfusión. Las disoluciones descritas en la presente memoria se utilizan por tanto como medicamentos. Para tratar hipovolemia y para prevenir/mejorar la lesión por reperfusión, es preferible administrar de manera sistémica las disoluciones para su utilización según la invención mediante la vía intravenosa. En tales casos, el paciente se colocará de manera segura en posición decúbito y se preparará clínicamente para la administración intravenosa del medicamento específico adoptando procedimientos convencionales, clínicos. La administración de dicho medicamento al paciente se ejecutará en condiciones controladas, supervisadas hasta que se logre la finalización del tratamiento.

Sin embargo, además de reemplazar, mantener o expandir el volumen de sangre, se prevé que las disoluciones descritas en la presente memoria encuentren también otras utilidades que incluyen las siguientes; para mantener, conservar e irrigar tejidos y órganos *in situ* durante procedimientos quirúrgicos, para perfundir la cavidad abdominal de un sujeto que padece insuficiencia renal aguda o un estado de toxicidad aguda y para conservar tejidos y órganos de donantes *in situ* durante procedimientos quirúrgicos para su extracción del paciente donante. Por tanto,

así como pueden administrarse a través de la vía intravascular, las disoluciones también pueden administrarse por otras vías, por ejemplo, utilizando vías intraperitoneales, intradérmicas, intramusculares, tópicas u orales. En pacientes con insuficiencia renal aguda o toxicidad aguda, el paciente se preparará con anestesia para la intervención quirúrgica mediante lo cual se insertará una cánula en la cavidad peritoneal, se fijará a su posición para garantizar la irrigación continua con la disolución a temperaturas normotérmicas. La extracción de la cánula peritoneal se realizará en condiciones quirúrgicas una vez que se ha logrado la normalidad en el análisis de la química sanguínea del paciente. Para el tratamiento de quemaduras, es preferible administrar las disoluciones localmente mediante aplicación tópica al sitio de la propia quemadura. Sin embargo, además, la deshidratación ocasionada como resultado de quemaduras graves puede tratarse a través de la administración sistémica de las disoluciones. En tales circunstancias, el paciente se colocará de manera segura en posición decúbito y se preparará clínicamente para la administración intravenosa del medicamento específico adoptando procedimientos convencionales, clínicos. La ubicación y el grado de afectación de la quemadura se evaluarán en cuanto a la administración en el sitio intravenoso de la disolución y el requisito de agentes terapéuticos adicionales basándose en el riesgo de infección adicional. Este método de tratamiento terapéutico dará como resultado un flujo hacia el exterior, extravascular de la disolución eliminando de ese modo cualquier acumulación de exudados de microorganismos tóxicos o infecciosos y requiere de ese modo una monitorización constante de los vendajes quirúrgicos. En formas de realización preferidas, las disoluciones para su utilización según la invención son para su utilización en el tratamiento de sujetos mamíferos humanos y no humanos, por ejemplo, seres humanos.

Tal como se mencionó anteriormente, se prevé que una aplicación de las disoluciones definidas en la presente memoria sea para conservar órganos de donantes *in situ* antes, durante y después de procedimientos quirúrgicos para su extracción del sujeto donante. La utilización de las disoluciones descritas en la presente memoria en este sentido podría implicar, por ejemplo, infusión de cuerpo completo (procedimiento de oxigenación por membrana extracorpórea [ECMO]) recogiendo riñones, corazón, hígado, etc. de cadáver de un donante seguido por perfusión normotérmica del órgano aislado. Estudios preliminares (no mostrados en la presente memoria) han indicado que RS-I tal como se define en la presente memoria (véanse los ejemplos) presenta la capacidad para reanimar órganos humanos de cadáver conservados hipotérmicamente permitiendo que se utilicen tales órganos en pruebas preclínicas de bioensayos con fármacos, abordando de ese modo el problema de reacciones adversas a medicamentos (RAM) que se notifica que se producen utilizando evaluación de fármacos *in vitro* e *in vivo* en modelos animales.

También se prevé que las disoluciones descritas en la presente memoria se utilicen como medios para la administración eficaz de agentes a un sujeto que lo necesita, o en circunstancias en las que los agentes van a someterse a prueba, por ejemplo en sujetos no humanos. Por ejemplo, las disoluciones descritas en la presente memoria pueden utilizarse como diluyentes para la administración de agentes farmacéuticos, de prueba o sinérgicos o, alternativamente, para la administración de células madre, péptido o proteína derivada del genoma a un sujeto que lo necesita. La administración de células madre podría ocasionarse, por ejemplo, suspendiendo las células madre en medios definidos en la presente memoria, y administrando la suspensión resultante directamente al tejido u órgano en el que se requiere. Con este régimen terapéutico, los pacientes se someterán a la extracción quirúrgica de tipos de células madre derivadas, por ejemplo, cardiomiocitos, hepatocitos, que entonces pueden suspenderse en las disoluciones descritas en la presente memoria y preincubarse durante 12-18 horas. La proliferación adicional del tipo de célula madre se realizará utilizando técnicas de medios de cultivo corrientes tras lo cual las células se resuspenderán en la disolución y se transportarán al pie de la cama del paciente en condiciones hipotérmicas o hipotérmicas suaves antes de la ejecución de la terapia. Los pacientes se someterán a anestesia local o general dependiendo de la vía de administración de la terapia derivada de células madre, por ejemplo, anestesia local para la administración intramiocardio de cardiomiocitos, y la administración de la terapia realizada a temperaturas normotérmicas bajo buena práctica clínica. Alternativamente, la administración puede efectuarse mediante la administración de la suspensión al sistema linfático.

Se apreciará que pueden aplicarse los métodos generales de administración de expansores del volumen de sangre, conocidos en la técnica, cuando se utilizan las disoluciones para su utilización según la invención. En particular, pueden aplicarse los métodos para regular el nivel de administración requerida en una situación particular (por ejemplo en referencia al mantenimiento de función cardiovascular y tensión arterial adecuadas) utilizando la información disponible para el experto, considerando el estado de la técnica.

Se apreciará además que pueden aplicarse técnicas de perfusión convencionales, conocidas en la materia, para bañar e irrigar tejidos y órganos *in situ* durante procedimientos quirúrgicos y para dializar cavidades corporales, cuando se utilizan las disoluciones descritas en la presente memoria.

Se prevé que puedan utilizarse subcomponentes específicos de las disoluciones descritas en la presente memoria individualmente o en cualquier combinación.

Se describen a continuación formas de realización particulares de la invención a modo de los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan para ilustrar formas de realización de la invención pero no debe considerarse que la limitan de ningún modo.

Ejemplo 1: Formulación de la disolución RS-I*Formulación*

5 En las siguientes preparaciones, se utilizó en todo momento agua purificada Milli-Q libre de endotoxinas (Millipore Corp, Milford, MA) o agua ASTM tipo I equivalente [resistividad no superior a 18,0 MΩ-cm a 25°C], tanto en la agitación inicial como en la dilución final. El término "agua purificada" se utiliza a continuación en la presente memoria para indicar agua de esta calidad.

10 Se preparó pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa), Sigma C4655 como una disolución madre de 0,4 mg/ml en agua purificada y se almacenó congelada en viales de vidrio oscuros. Se preparó cloruro de colina (Sigma C7527) como una disolución madre de 17,5 mg/ml en agua purificada y se almacenó congelada en viales de vidrio. Se preparó insulina recombinante humana (Sigma I0259/I2643) como una disolución madre de 0,5 U.I./ml en agua purificada acidificada hasta pH 2,4 con ácido clorhídrico 0,12 N y se almacenó congelada en viales de vidrio.

15 Para la preparación de una disolución concentrada 10X de disolución RS-I, se llenó un recipiente de acero inoxidable con 8 litros de agua purificada y, se pesaron los siguientes componentes y se añadieron mientras se agitaba constantemente, en el siguiente orden: 642,96 gramos de cloruro de sodio (CFK0484), 37,28 gramos de cloruro de potasio (BDH10198), 18,38 gramos de cloruro de calcio dihidratado (BDS10117), 9,14 gramos de cloruro de magnesio hexahidratado (BDH101494) y 106,61 gramos de ácido libre de BES (Sigma B6266), 1,84 miligramos de pirofosfato de tiamina (Sigma C9655) (utilizando 4,6 ml de la disolución madre), 0,9899 gramos de L-carnitina (Sigma C0238), 0,1397 gramos de cloruro de colina (Sigma 7527) en forma de 8 ml de la disolución madre, 1,013 gramos de glicerol (Sigma G2025), 2,8 U.I. de insulina recombinante humana (5 ml de la disolución madre), 0,310 gramos de sal de sodio de L-aspartato (Sigma A6683), 180,2 gramos de D-glucosa anhidra (Sigma G7021), 5,07 gramos de sal de sodio de L-glutamato (Sigma G5889) y 5,84 gramos de L-glutamina (Sigma G5763). Se agitó la totalidad hasta que se disolvió completamente y entonces se produjo el volumen final de 10 litros añadiendo agua purificada adicional.

20 Se esterilizó por filtración la disolución RS-I 10X a través de un cartucho de PH₂O Sartobran/filtro de 0,2 micrómetros (Sartorius Corp. EE.UU.) en frascos de vidrio sellados estériles de 100 ml.

25 Esta disolución RS-I es un concentrado de 10 veces de la disolución prevista para su utilización, pero con hidrogenocarbonato de sodio contenido. Cuando se necesite, la disolución RS-I 10X puede diluirse con la cantidad apropiada de agua purificada, y añadirse hidrogenocarbonato de sodio.

30 Para la preparación de la disolución RS-I 1X, pueden diluirse 100 ml de la disolución RS-I de concentrado de 10 veces anterior con 900 ml de agua purificada hasta 1 litro con la adición de 2,1 g de hidrogenocarbonato de sodio libre de endotoxina (Sigma S4019) y almacenarse a 8-10°C antes de su utilización. El hidrogenocarbonato de sodio no se añade preferentemente a las disoluciones de concentrado antes de que se almacenen, puesto que el almacenamiento prolongado del concentrado que contiene iones hidrogenocarbonato puede provocar precipitaciones de carbonato de calcio. Las disoluciones madre 1X para almacenamiento a corto plazo pueden contener hidrogenocarbonato de sodio.

35 Para su utilización como disolución expansora de fluidos corporales, cada litro de la disolución puede contener 100 mg/l de cloranfenicol (Sigma C3175) u otros agentes antifúngicos o antibióticos convencionales para prevenir el riesgo de infección bacteriana.

40 Deben tenerse en cuenta los siguientes factores cuando se prepara la disolución:

- 50 1) el método de reunión de las disoluciones y, específicamente;
- 2) la utilización de agua purificada tal como se mencionó anteriormente para constituir todas las disoluciones madre y los frascos de concentrado de 10 veces de disoluciones fabricadas para su utilización según la invención;
- 55 3) los métodos de preparación de disoluciones madre estériles para su utilización según la invención y concentrados no debe implicar tratamiento en autoclave o irradiación con rayos gamma. Por ejemplo, la irradiación de la disolución para lograr la esterilidad dará como resultado la degradación de los componentes glutamina, glucosa, insulina y pirofosfato de tiamina;
- 60 4) la utilización de frascos de vidrio para el almacenamiento de todas las disoluciones madre de concentrado de 10 veces;
- 65 5) la preparación de insulina solubilizada mediante acidificación a pH 2,4 más almacenamiento de los componentes de insulina y las disoluciones madre a -20°C;

6) la preparación de pirofosfato de tiamina más disoluciones madre de TPP almacenadas a -20°C en condiciones de oscuridad (véase el motivo a continuación);

7) la preparación de disoluciones madre de cloruro de colina almacenadas a -20°C;

8) la utilización de cloruro de magnesio hexahidratado (es decir, 6H₂O). Esto es porque si se utiliza la sal deshidratada, entonces adsorbe agua de modo que el peso utilizado para calcular el contenido en ión magnesio preciso será erróneo (esto es un motivo común de constitución errónea de disoluciones de Krebs en cuando a los niveles de ión calcio e ión magnesio correctos).

La inclusión de todos los componentes preferidos, tal como se describe en este ejemplo, permite que estos componentes funcionen en sinergia para producir un efecto fisiológico equilibrado global.

Especificaciones de fabricación

1. Disoluciones madre: Se han preparado diversas concentraciones madre de disoluciones para su utilización según la invención, concretamente, 1X, 10X y 20X para almacenamiento a largo plazo, pero los concentrados madre preferidos son concentrados de 10X utilizando agua purificada esterilizada por filtración en frascos de 100 ml sellados para su almacenamiento en condiciones de oscuridad a de 3 a 8°C. Las disoluciones madre se reconstituyen para su utilización como disoluciones 1X mediante la adición de 100 ml de concentrados de 10X de disoluciones madre a 900 ml de agua purificada con la adición de 2,1 g de hidrogenocarbonato de sodio para dar un pH final de 7,22 ± 0,04 a 20°C. Las concentraciones madre de 10X estériles de disoluciones para su utilización según la invención presentan un pH de 4,6 ± 0,2 y se ha mostrado que permanecen estériles, y libres de precipitaciones, durante periodos de hasta diez años. La vida útil de almacenamiento fabricada recomendada de concentrados madre de 10X de disoluciones para su utilización según la invención es de 14 meses cuando se almacenan a de 3 a 8°C en condiciones de oscuridad.

2. Cocarboxilasa: Se preparan disoluciones madre de cloruro de pirofosfato de tiamina (cocarboxilasa) a 18,4 g/ml utilizando agua purificada libre de endotoxina, esterilizada por filtración en viales sellados oscuros para prevenir la degradación por fotones del pirofosfato de tiamina, y se almacenan congeladas antes de la reunión de los concentrados madre de 10X de disoluciones para su utilización según la invención.

3. Insulina: Se prepara insulina recombinante humana como disoluciones madre concentradas acidificadas (pH 2,4) a 0,5 mU.I./ml utilizando agua purificada libre de endotoxinas y se esteriliza por filtración en viales sellados y se almacena congelada antes de la reunión de los concentrados madre de disoluciones para su utilización según la invención.

4. Colina: Se preparan disoluciones madre de cloruro de colina a 17,45 mg/ml utilizando agua purificada libre de endotoxinas y se almacenan congeladas en viales sellados antes de la reunión de los concentrados madre de disoluciones para su utilización según la invención.

5. El cloranfenicol no es un componente esencial de las disoluciones para su utilización según la invención pero se añade preferentemente, o bien durante el almacenamiento, o bien tras haberse abierto los viales almacenados, para garantizar la esterilidad durante la exposición prolongada de las disoluciones a la atmósfera y para reducir el riesgo de infección en sujetos tratados con las disoluciones expansoras de fluidos corporales de la invención.

Ejemplo 2: Composición final de la disolución RS-I

La siguiente tabla resume la composición de la disolución RS-I para su utilización como expansor de fluidos corporales.

TABLA I

Componente	Concentración
NaCl	110,00 mmoles/l
KCl	5,00 mmoles/l
CaCl ₂	1,25 mmoles/l
MgCl ₂	0,45 mmoles/l
NaHCO ₃	25,0 mmoles/l
BES	5,00 mmoles/l
D-Glucosa	10,00 mmoles/l
Glicerol	0,11 mmoles/l
L-Glutamato	0,30 mmoles/l
L-Glutamina	0,40 mmoles/l

Componente	Concentración
L-Aspartato	0,02 mmoles/l
L-Carnitina	0,05 mmoles/l
Cloruro de colina	0,01 mmoles/l
TPP (cocarboxiasa)	40,00 nmoles/l
Insulina recombinante humana	28 mUI/l

La disolución descrita en los ejemplos 1 y 2 y denominada en la presente memoria RS-I representa una forma preferida de la disolución expansora de fluidos corporales para su utilización según la invención.

5 Ejemplo 3: Una comparación de los constituyentes químicos de RS-I, suero humano y líquido intersticial humano

En la actualidad, y según el pensamiento prevalente en la técnica, la formulación de disoluciones de conservación, perfundido y reemplazo del volumen de sangre se inclina fuertemente hacia la adopción de la composición del medio o bien intracelular o bien extravascular. Sin embargo, tal como se indicó ya en la presente memoria, quedan por solucionar numerosos problemas. Al considerar la ultraestructura de las membranas celulares, el inventor se ha apartado del pensamiento actual y ha tomado un enfoque diferente, concretamente que una disolución fisiológica debe formularse para imitar, de una manera artificial práctica, el medio directamente adyacente a la membrana celular, concretamente, la fase de líquido intersticial, manteniendo de ese modo en lo posible la homeostasis y la dinámica funcional de la membrana celular y los restos de enzimas y receptores asociados. La conservación satisfactoria resultante de la función celular de células, tejidos y órganos aislados de especies animales y seres humanos, demostrada en los ejemplos 6 y 7 en la presente memoria, ilustra el éxito de este enfoque.

Este ejemplo expone una comparación de los diversos niveles de componentes presentes en suero humano, líquido intersticial humano y disolución RS-I, tal como se facilita a continuación en la tabla II.

TABLA II

Componente	Suero	RS-I	Líquido intersticial [analizado o estimado]
Iones sodio	131 -148 mmoles/l	135 mmoles/l	136 mmoles/l
Iones potasio	3,4 -5,2 mmoles/l	5,0 mmoles/l	4,4 mmoles/l
Iones calcio	1,12 -1,46 mmoles/l	1,25 mmoles/l	1,18 mmoles/l
Iones magnesio	0,38 -0,72 mmoles/l	0,45 mmoles/l	0,51 mmoles/l
Iones cloruro	101 -111 mmoles/l	119 mmoles/l	117 mmoles/l
Iones hidrogenocarbonato	21 -29 mmoles/l	25 mmoles/l	23,9 mmoles/l
Ácido orgánico	6,4 mmoles/l	5 mmoles/l (BES)	7 mmoles/l
Glucosa	3,6 -6,1 mmoles/l	10 mmoles/l	3,3 -3,6 mmoles/l
Glicerol	31 -131 μ moles/l	110 μ moles/l	87 μ moles/l
Glutamato	310 -475 μ moles/l	300 μ moles/l	≡ valores séricos
Glutamina	188 -320 μ moles/l	400 μ moles/l	≡ valores séricos
Aspartato	1 -11 μ moles/l	20 μ moles/l	≡ valores séricos
Carnitina (recomb.)	35 -85 μ moles/l	50 μ moles/l	≡ valores séricos
Colina	18-70 μ moles/l	10 μ moles/l	≡ valores séricos
Pirofosfato de tiamina	6 -135 nmoles/l	40 nmoles/l	≡ valores séricos
Insulina humana (recomb.)	6 -35 mUI/l	28 mUI/l	24 mUI/l
pH a 37,4°C	7,32 -7,45	7,30 -7,46	7,35 -7,38
Albúmina	0,65 mmoles/l	CERO	0,19 mmoles/l
Osmolalidad (mOsm/kg de agua)	264-290	265-286	264-282
Conductividad específica (mS cm ⁻¹)	11,7 -12,3	11,9 -12,6	11,8 -12,2

25 Ejemplo 4: Un estudio para investigar el efecto de infusiones intravenosas de disolución RS-I utilizando un modelo hemorrágico de rata

Procedimientos quirúrgicos en el laboratorio de animales

Los procedimientos consistían en una laparotomía por la línea media inferior en condiciones estériles tras la inducción de anestesia completa utilizando una inyección intramuscular (i.m.) de 0,1 cc de xilocaína + 0,2 cc de ketamina por cada 100 gramos de peso corporal. Tras esto, se disecciona la aorta de la rata y se inserta una cánula bajo visión directa utilizando un angiocatéter de calibre 24. Esto permite el acceso directo para grandes cantidades de extracción de sangre así como la administración de disoluciones. Como dosis de mantenimiento, se administran inyecciones i.m. de 0,2 cc de ketamina cada 25 minutos a todas las ratas. Se deja que los animales respiren espontáneamente durante todo el experimento y se monitoriza de manera continua su tasa respiratoria. Se utiliza un

calentador para mantener las ratas a temperatura corporal normal durante la experimentación. Como resultado de la laparotomía por la línea media inferior, se exponen los intestinos para descubrir los vasos abdominales. Se envuelven los intestinos con gasa húmeda (empapada en solución salina) para minimizar la pérdida de agua. A la finalización del experimento, o bien se sacrifica la rata mientras está bajo anestesia o bien se repara la perforación aórtica en el sitio del catéter utilizando una figura de Prolene 6-0 de 8 suturas y cierre de la incisión de laparotomía utilizando una sutura de Vicryl 2-0 en 2 capas.

A las ratas elegidas para la parte de supervivencia del estudio se les administran antibióticos intramusculares y se deja que se alimenten a voluntad tras la operación. Este procedimiento tarda de 25 a 30 minutos en completarse por rata.

Animales y agrupaciones experimentales

Se utilizaron 19 ratas Sprague-Dawley de similar edad (10-12 semanas) y peso (de 280 a 320 g) en los experimentos. Se aleatorizaron las ratas mediante asignación de números al azar a uno de 3 brazos: (1) reemplazo del volumen de sangre por un volumen igual de solución salina fisiológica (5 ratas); (2) reemplazo del volumen de sangre por un volumen igual de disolución RS-I tal como se definió anteriormente (7 ratas); o (3) sin reemplazo de las pérdidas de sangre (7 ratas). El criterio de valoración primario del estudio en este caso fue la muerte del animal documentada por parada cardiorrespiratoria.

Protocolos de hemorragia y resucitación

Se sometieron las ratas a extracciones de sangre en serie en incrementos de 2 cc (simulando una hemorragia controlada) cada 30 minutos. Al final de cada extracción, se inyectaron a 0,1 ml de disolución heparinizada (1000 unidades en 20 ml de solución salina normal) en un tubo de heparina para evitar la coagulación de la sangre. Se asignaron las ratas aleatoriamente a uno de 3 brazos tal como se definió anteriormente.

Los datos observados y recogidos fueron los siguientes:

- a. Numero de extracciones de sangre (por tanto volumen de hemorragia)
- b. Tasa respiratoria (medida cada 10 minutos)
- c. Transcurso de tiempo hasta la muerte (tiempo de supervivencia en minutos desde el comienzo de la hemorragia)
- d. Cambios físicos visibles
- e. Patología

Estadística

Se definió la supervivencia como el tiempo desde la primera extracción de sangre hasta el momento de documentación de la parada cardiopulmonar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p era inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Se expresaron todos los valores como la media \pm desviación estándar (DE). Se realizaron utilizando el software SPSS versión 13.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

Resultados del estudio

Resumen: Las ratas en el brazo "sin" resucitación tenían los tiempos de supervivencia más cortos y el menor volumen de sangre extraído. El tiempo de supervivencia y el volumen extraído medio mejoraron significativamente mediante la adición de o bien solución salina normal o bien RS-I. RS-I proporcionó un tiempo de supervivencia estadísticamente superior ($p < 0,01$) y permitió que se extrajera un mayor volumen de sangre en comparación con solución salina fisiológica ($p < 0,01$).

Tiempos de supervivencia: Se ilustra en la figura 1 la supervivencia de las ratas a lo largo del tiempo como una función de la disolución de resucitación utilizada. Las ratas en el brazo "sin" resucitación tenían la supervivencia más corta. El tiempo de supervivencia mejoró significativamente añadiendo o bien reemplazo con solución salina de las pérdidas de sangre o bien reemplazo con RS-I. Ambas disoluciones mostraron una diferencia significativa en comparación con el tiempo de supervivencia de ratas no resucitadas; la diferencia media entre los grupos de RS-I y sin resucitación era de $89 \pm 13,13$ minutos ($p < 0,01$), y entre solución salina y "sin" resucitación era de $57 \pm 15,87$ minutos ($p < 0,05$). RS-I era superior a solución salina y dio como resultado un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de supervivencia. La diferencia media en los tiempos de supervivencia entre ratas tratadas con RS-I y ratas tratadas con solución salina era significativa a $43,40 \pm 6,90$ minutos ($p < 0,01$).

Volumen de sangre extraído: Se expone en la figura 2 el volumen total de sangre extraído para cada uno de los brazos del estudio. Ambos grupos de ratas resucitadas con fluido mostraban una diferencia significativa en el volumen de sangre extraído en comparación con el brazo control “sin” resucitación (RS-I con respecto a “sin” resucitación $5,73 \pm 0,62$ ml y solución salina con respecto a “sin” resucitación $3,64 \pm 0,70$ ml, con $p < 0,01$ para ambos). Se encontró que la diferencia media en el volumen de sangre extraído de ratas resucitadas con RS-I en comparación con ratas resucitadas con solución salina era estadísticamente significativo ($p < 0,01$) a $2,82 \pm 0,45$ ml.

Tasas respiratorias: La figura 3 ilustra las tasas respiratorias de las ratas a lo largo del tiempo en los diversos brazos del estudio. Ratas resucitadas con RS-I sobrevivieron la mayor cantidad de tiempo y mostraron una disminución inferior en la tasa respiratoria global, aunque inicialmente (primeros 100 minutos) se observó un descenso más rápido en la tasa respiratoria. La tasa respiratoria global para ratas resucitadas con solución salina disminuyó a una tasa más rápida que la de ratas infundidas con RS-I y esta disminución era incluso más rápida todavía para las ratas que no recibieron infusión de fluido.

15 *Conclusión*

RS-I parece ser un sustituto del plasma más eficaz que solución salina fisiológica con respecto al tiempo de supervivencia y el volumen de pérdida de sangre en un modelo de rata de choque hemorrágico controlado.

20 **Ejemplo 5: Un estudio para investigar la seguridad de la administración de RS-I como líquido intravenoso (i.v.)**

Objetivo del estudio

25 Se diseñó este estudio como estudio piloto para evaluar la seguridad de RS-I cuando se administra como agente de infusión intravenosa (i.v.) en un modelo de animal grande (cerdo).

Métodos

30 Se utilizaron 6 cerdos en este brazo del estudio, de ambos géneros, con un peso que oscilaba entre 27 y 35 kg. Se albergaron los cerdos en la instalación para el cuidado de animales y se mantuvieron NPO (nada por vía oral) durante la noche la noche previa al estudio. Se albergó cada cerdo en una jaula separada.

35 En el día 0, se sedó inicialmente cada cerdo utilizando una inyección intramuscular de ketamina (de 15 a 20 mg/kg) seguido por inducción de anestesia e intubación endometrial. Se mantuvo la anestesia con halotano para lograr la ausencia de respuesta a la estimulación quirúrgica sin disminución de la frecuencia cardíaca. Cada cerdo recibió profilaxis con antibiótico preoperatorio mediante inyección intramuscular de gentamicina al 10% (1 cc/10 kg).

40 Se colocó quirúrgicamente un catéter venoso central mediante cuenta atrás directa, en condiciones asépticas estrictas, en la vena yugular interna izquierda de cada cerdo. Se tunelizó de manera extensa la vía central en los tejidos subcutáneos del cerdo hasta un sitio de salida en el lado lateral y dorsal del cuello del cerdo y se fijó en su sitio. Se realizó esto por dos motivos; para prevenir el desplazamiento accidental del catéter y para minimizar el riesgo de infecciones relacionadas con la vía. Se dejó entonces que los animales volvieran a sus jaulas para que se recuperaran de la anestesia.

45 En el día 1, se sedó cada cerdo utilizando una inyección intramuscular de ketamina (35 mg/kg) y xilazina (7 mg/kg). Se extrajeron muestras de sangre de nivel inicial a partir de la vía central bajo una técnica aséptica y se enviaron inmediatamente al laboratorio para su análisis. Se sometió a prueba el perfil de la sangre extraída para determinar los recuentos de sangre completa, la determinación de la química del suero: electrolitos, osmolalidad, pH, glucosa, lactato, creatinina, nitrógeno de urea en sangre (BUN), enzimas séricas (aspartato aminotransferasa [SGOT/AST], alanina aminotransferasa [SGPT/ALT], creatina cinasa [CK] total y lactato deshidrogenasa [LDH]), factores de coagulación y niveles de fibrinógeno. Además, se tomó sangre para la medición de la actividad proinflamatoria, por ejemplo, activación de neutrófilos, interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), y se centrifugaron las muestras y se almacenaron a -80°C para su evaluación posterior.

50 Tras extraerse la sangre, cada cerdo tenía 1,0 l de RS-I (a temp. ambiente) infundido lentamente a lo largo de 1-2 horas mediante la vía central. Se monitorizó directamente el cerdo durante la infusión para detectar cualquier signo de enfermedad o comportamiento/manifestaciones poco comunes. Se dejó entonces que los cerdos volvieran a sus estancias normales y se monitorizaron por el veterinario de la instalación de animales para detectar cualquier signo de enfermedad o comportamiento/manifestaciones poco comunes.

60 Se repitió el mismo procedimiento realizado en el día 1 en el día 2 y 3. Antes de cada infusión de RS-I, se extrajo el mismo perfil de sangre (descrito a continuación) para evaluar cualquier efecto de enfermedad relacionado con la administración de RS-I. Se monitorizaron entonces los cerdos durante 7 días y se sacrificaron de manera humanitaria en el día 7 mediante administración de disolución de cloruro de potasio intravenosa bajo sedación con ketamina. Antes de la eutanasia, se recogió una muestra de sangre final (día 7). Se extrajeron también muestras de

sangre para medir TNF- α e IL-6. Se centrifugaron estas muestras a 2000 r.p.m. [20°C] durante 5 minutos y entonces se almacenaron a -80°C para procesarse posteriormente utilizando ensayos ELISA porcinos disponibles comercialmente. Se realizó un examen *post-mortem* en cada cerdo, y se recogieron órganos (cerebro, pulmones, hígado y riñones) y o bien se almacenaron en formaldehído o bien se congelaron a -80°C para examen histológico y pruebas apoptóticas en una fecha posterior.

Resultados

Se observaron los 6 cerdos durante 1 semana, y todos mostraban hábitos de comportamiento y alimentación que estaban dentro de los límites normales.

Se exponen en la figura 4 los resultados de la sangre y se presentan gráficamente en las figuras 5 - 9. Estos resultados de la sangre estaban dentro de los intervalos normales de cerdos de esta categoría de peso.

Análisis de las categorías del perfil de la sangre

1. Parámetros biofísicos y de electrolitos:

No se observó ninguna diferencia significativa ($p < 0,05$) en los electrolitos séricos o la osmolalidad a lo largo del periodo experimental de 7 días en comparación con los valores de nivel inicial ("control") (figura 4G, tabla 1; figura 5 a - g). Se observó una elevación de los niveles de ión sodio hasta dentro de los valores de intervalos publicados tras 48 horas en los cerdos n.^{os} 2 y 5, que regresaron a los niveles iniciales hacia el día 7 (figura 5a). Sólo el cerdo n.^o 6 mostró una elevación progresiva durante el periodo experimental pero, al igual que lo hizo el nivel de tendencia global, regresó al valor de intervalo máximo de 150 mmoles/l (figura 4G, tabla 1; figura 5a).

No se observó ningún cambio significativo en el equilibrio ácido-base (es decir, niveles de bicarbonato; figura 5f) o los niveles de cloruro (figura 4G, tabla 1; figura 5e, f) durante los mismos periodos experimentales.

2. Metabolitos séricos:

Aunque todos los niveles iniciales de metabolitos séricos estaban elevados de manera natural en el día 1 tras el traumatismo de los procedimientos de manipulación quirúrgica, todos (excepto el lactato) presentaban una tendencia a regresar a los valores séricos normales hacia el día 7 (figura 6). Había una considerable variación en los niveles de lactato sin una tendencia estadísticamente significativa con los niveles de lactato por debajo de los valores de referencia (figura 6) en el día 2 y 3.

3. Enzimas séricas:

Había una elevación confirmada de todas las enzimas séricas examinadas tras el traumatismo de los procedimientos de manipulación quirúrgica (figura 7) pero todas (excepto SGPT[ALT]; figura 7b) mostraron una disminución hacia el día 7 hasta valores séricos aceptables, indicando una restauración de la integridad funcional del corazón, el hígado, los pulmones y los riñones. La elevación observada de SGPT[ALT] estaba dentro del valor sérico normal de percentil 50 y no era estadísticamente diferente ($P < 0,26$) dentro o entre datos de grupos indicando de nuevo la integridad funcional del corazón y los pulmones hacia el día 7.

4. Componentes sanguíneos:

Cada cerdo normovolémico tenía un volumen de sangre total estimado de 1,8 - 2,3 l (67 ml/kg) y cada cerdo recibió un volumen total de 3 l de RS-I a lo largo de un periodo de 72 horas. No se observó hemodilución del recuento de RBC permaneciendo los valores de hematocrito (Hct) y los niveles de hemoglobina (Hg) dentro de intervalos normales hasta el día 7 (figura 8 a,b,c). Igualmente, el recuento de linfocitos regresó a los niveles iniciales a lo largo del periodo de siete días investigado (figura 8d) mostrando sólo el recuento de glóbulos blancos (WBC) una ligera elevación insignificante hacia el día 7 (figura 8e).

En cuanto a los parámetros de coagulación de la sangre investigados, sólo el cerdo n.^o 2 mostró un valor de nivel inicial anómalo para plaquetas que se restauró hasta la normalidad hacia el día 7 (figura 9a). Los parámetros de coagulación de la sangre, es decir, índices de coagulación de protrombina (INR) y tiempos de protromboplastina parcial activada (aPTT) (véase la figura 9 b, c) permanecieron constantes y dentro de los límites publicados. Los niveles de fibrinógeno no parecían mostrar una tendencia descendente a lo largo del periodo experimental de siete días (figura 9d) sino que de nuevo los valores permanecían dentro de límites aceptables para especies porcinas.

Tras la infusión de RS-I a lo largo de un periodo de 48 horas, hubo una tendencia global hacia la restauración de los niveles iniciales de WBC (figura 8e) y una disminución en los niveles de linfocitos (figura 8d) hacia el día 7, lo que sugiere la ausencia de cualquier efecto proinflamatorio.

Deducciones

5 Debe reconocerse que numerosos estudios de investigación que implican especies porcinas han observado una gran diversidad en los valores de perfiles del suero y de la sangre. En el presente estudio, estos valores concordaban con la especie porcina examinada, habiendo una buena correlación estadística.

No parecía que se hubiese producido hemodilución en los cerdos normovolémicos infundidos con disolución RS-I durante el periodo experimental (figura 4G, tabla 1).

10 De manera característica, las terapias de reemplazo del volumen son susceptibles a la incidencia de episodios inflamatorios, anafilácticos, de hipercoagulabilidad, aparentemente relacionados con la antigenicidad y/o toxicidad de los diversos excipientes utilizados en la formulación de los fluidos de reemplazo de la sangre administrados. Éste no parece ser el caso en la administración intravenosa de la disolución RS-I a partir del análisis de los datos del perfil de células sanguíneas obtenidos.

15 Era de importancia en este estudio piloto evaluar los aspectos de seguridad de la administración de la disolución RS-I por vía intravenosa y que no hubiese incidencia de acidosis hiperclorémica (metabólica), un hallazgo común en la práctica clínica con fluidos de reemplazo del volumen. No se observó ninguna alteración en el equilibrio ácido-base en los cerdos examinados a lo largo de un periodo de siete días, tal como se demuestra por los niveles sostenidos de ión cloruro y bicarbonato.

20 La observación provisional de que la supresión de los niveles de lactato séricos iniciales se producía en todos los cerdos estudiados durante la infusión de la disolución RS-I hacia los días 2 y 3 (figura 6b) parecía implicar que en el cerdo normovolémico infundido con RS-I, prevalecen condiciones para optimizar:

- 25
- a) el metabolismo del piruvato (glucólisis) para mantener los niveles de lactato séricos
 - b) el catabolismo del lactato tisular para generar ATP y
 - c) la resíntesis por el hígado (ciclo de Cori) para formar glucosa o glucógeno.

30 Todos los cerdos estudiados mostraban una disminución gradual a lo largo del periodo experimental de la lactato deshidrogenasa (LDH) sérica, una enzima vinculada íntimamente con el metabolismo del lactato/piruvato, y liberada de manera característica a partir de tejidos y órganos durante la lesión por reperfusión.

35 Era de particular interés en este estudio la observación de que la liberación de las enzimas (por ejemplo, CPK (creatina fosfocinasa), SGOT, SGPT) asociadas con órganos dañados (por ejemplo, corazón, pulmón, hígado, riñón) durante la reperfusión de disoluciones intravenosas, aunque estaba inicialmente elevada en el día 1 tras el traumatismo de los procedimientos quirúrgicos necesarios para monitorizar las funciones corporales (véase Métodos), disminuía gradualmente hasta dentro de niveles normales publicados (figura 4G, tabla 1).

40 *Conclusiones*

45 Se completó satisfactoriamente el estudio detallado anteriormente que implicaba infusiones i.v. diarias de 1,0 l de RS-I en el cerdo durante un periodo de 3 días. Se concluyó, basándose en los resultados obtenidos, que RS-I no presenta ningún problema de seguridad aparente cuando se administra por vía intravenosa a cerdos de granja en condiciones clínicamente aceptables.

Ejemplo 6: Un estudio de la función de riñones aislados tras su conservación utilizando RS-I

Métodos

50 Se conservaron riñones de cerdos donantes a corazón parado (NHBD) durante 2 horas en condiciones estáticas "frías" (de 0°C a 4°C) (CS) en o bien RS-I o bien las disoluciones de conservación hipotérmicas comerciales, Soltran o UW (Universidad de Wisconsin) o durante 2 horas en condiciones estáticas "calientes" (31°C) (WS). Se reperfundieron posteriormente los riñones con una mezcla 50:50 de sangre autóloga/perfundido de Ringer con lactato en condiciones normotérmicas durante periodos de 6 a 8 horas.

Resultados

60 Se exponen en la tabla III a continuación los parámetros funcionales medidos en riñón de cerdo aislado tras 6 horas de perfusión normotérmica con sangre autóloga, en la que "n" representa el número de riñones sometidos a prueba:

TABLA III

Parámetros funcionales tras 6 horas de perfusión	RS-I almacenamiento a 4°C (n=6)	RS-I almacenamiento a 30°C (n=6)	Lavado con Soltran almacenamiento a 4°C (n=6)	Lavado con UW almacenamiento a 4°C (n=6)	valor de "p"
pH	7,37 ± 0,15	7,30 ± 0,09	7,21 ± 0,1	7,23 ± 0,12	0,1468
Hidrogeno-carbonato	21,8 ± 6,83	17,6 ± 4,24	14,6 ± 3,08	15,3 ± 4,26	0,154
Exceso de base	-4,7 ± 9,16	-10 ± 5,9	-9,7 ± 5,90	-13,5 ± 6,4	0,248
Niveles de K ⁺ séricos	5,83 ± 0,34	8,01 ± 1,22	7,73 ± 1,21	8,23 ± 1,27	0,003
Consumo de O ₂ ml/min./g	47,3 ± 12,11	28,7 ± 6,53	31 ± 6,26	33,7 ± 15,1	0,059
% de aumento de peso	12,7 ± 9	30,3 ± 9,3	21,2 ± 7,7	29,7 ± 3,44	0,0109
Diuresis total (ml)	692 ± 230	257 ± 118	536 ± 221	410 ± 153	0,0103
RBF ml/min./100g	79,3 ± 17,89	48 ± 11,28	50 ± 10,16	55,5 ± 21,9	0,0214
RVR mmHg/ml/min.	0,4 ± 0,09	0,73 ± 0,26	0,52 ± 0,09	0,8 ± 0,43	0,0173

5 El presente estudio reveló que RS-I tenía un rendimiento significativamente superior que otras disoluciones en el mantenimiento de la función renal tal como se evalúa tras la reanimación del riñón en sangre autóloga. Los análisis de los datos obtenidos a lo largo de los periodos de reperfusión revelaron que los riñones conservados en RS-I a 4°C presentaban (1) consumo de oxígeno aumentado, (2) tasas de aclaramiento de creatinina aumentadas, (3) flujo de sangre renal [RBF] aumentado, (4) diuresis aumentada, (5) resistencia vascular renal [RVR] disminuida, (6) aumento de peso disminuido (es decir, menos edema), (7) pH de la sangre estable y retención del equilibrio ácido-base [niveles de ión bicarbonato] y (8) pérdida insignificante de K⁺ intracelular.

10 De particular significación es la estabilidad observada del pH de la sangre y la retención del equilibrio ácido-base neutro (H⁺/HCO₃⁻). Esta estabilidad observada indica que en los riñones conservados con RS-I el sistema de tamponamiento del pH principal, la lanzadera de glutamina-amoniaco, no se había visto comprometida tal como se observa con otras disoluciones de conservación disponibles comercialmente (véase la tabla III anterior). De significación adicional era la observación de que en los riñones conservados durante 2 horas en condiciones isquémicas "calientes" (WS) en AQIX®RS-I, la reperfusión posterior a lo largo de 6-8 horas daba como resultado una restauración del equilibrio ADP:ATP (véase la figura 10).

20 Los niveles de razón ADP:ATP eran los más altos en las biopsias antes de la perfusión y eran indicativos del daño isquémico sostenido durante los periodos de almacenamiento en CS/WS (figura 10). Sin embargo, tras 6 horas de perfusión, la razón había mejorado en ambos grupos mostrando una recuperación de la función celular pero sin diferencias significativas (p = 0,71) observadas entre los grupos de riñones en CS y WS (MD Kay *et al.*, 2006; Transplant International 20 (1), 88-92).

25 **EJEMPLO 7: Evaluación de la capacidad de RS-I para mantener la viabilidad de preparaciones de tejidos y órganos de mamíferos aislados a lo largo de diversos periodos de tiempo de conservación.**

30 Métodos

Se evaluó la viabilidad funcional de preparaciones de órganos y tejidos de mamíferos tras el almacenamiento/perfusión de los tejidos/órganos durante diversos periodos en disolución RS-I. Se evaluó la viabilidad utilizando una variedad de indicadores funcionales, por ejemplo, mantenimiento de los potenciales de membrana celular, producción de neurotransmisores, miogenicidad, sensibilidad de receptores de membrana, funciones enzimáticas, cambios histológicos, etc.

Resultados

40 La tabla IV a continuación revela la capacidad de la disolución RS-I para mantener la viabilidad funcional de diversas preparaciones de órganos y tejidos humanos y de animales mamíferos a lo largo de periodos de conservación de longitud variable (entre 0,3 y 10 días).

TABLA IV

Especie	Preparaciones de órganos/tejidos	Máx. días almacenados	Condiciones de conservación		
			°C de almacenamiento	°C experimentales	
rata	yeyuno	9,0	8-12	35	
	yeyuno	1,5	-	35	
	íleo	8,0	8-12	35	
	íleo	1,3	-	20-35	
	colon	5,0	-	20-35	
	útero	3,0	-	35	
	útero	10,0	8-12	35	
	músculo detrusor	2,0	-	20-35	
	músculo diafragma	0,6	-	35-37	
	músculo diafragma	2,0	-	20-35	
	músculo sóleo	1,1	-	20-35	
	corazón	0,8	-	35-37	
	corazón	2,1	-	20-25	
	corazón-pulmón	1,2	-	20-35	
	RBC	4,0	Sin hemólisis a 4°C		
	riñón	1,0	-	20-35	
	hígado	0,3	-	35	
	conejo	intestino (yeyuno)	5,0	8-12	37
		intestino (yeyuno)	2,0	-	20-37
útero		7,0	8-12	37	
cuello uterino superior		2,0	8-12	37	
ganglio		0,8	-	37	
RBC		3,0	Sin hemólisis a 4°C		
cobaya	íleo	7,0	8-12	37	
	músculo detrusor	4,0	8-12	37	
	músculo detrusor	1,0	-	20-37	
	corazón	0,4	-	20-37	
ratón	músculo sóleo	0,9	-	20-35	
	músculo diafragma	1,5	-	20-35	
	músculo intercostal	0,9	-	20-35	
cerdo	riñón	0,8	0-4	37	
	riñón	0,8	30	37	
ser humano	músculo intercostal	1,3	-	37	
	riñón (órgano)	1,5	0-4	37	
	intestino(órgano)	0,3	-	37	
	colon (biopsia)	1,3	0-4	-	
	pulmón(órgano)	0,3	-	37	
	bronquios del pulmón (biopsia)	0,8	-	37	
	trabécula auricular (biopsia)	0,6	-	37	
	hígado (órgano)	0,3	-	37	
	RBC	1,3	0-4	-	
	RBC	0,3	-	37	
Leucocitos	0,8	-	37		

5 **EJEMPLO 8: Un estudio preclínico para comparar la eficacia del fluido RS-I con sangre autóloga y solución salina cuando se administran por vía intravenosa en un modelo de cerdo hemorrágico**

Objetivo del estudio

10 Investigar la eficacia de RS-I como disolución de resucitación (expansión del volumen) así como su eficacia en la reducción de la lesión por reperfusión tisular tras traumatismo hemorrágico en el cerdo en comparación con el reemplazo con sangre autóloga o solución de Ringer con lactato (LR), una disolución de expansión del volumen de sangre comúnmente utilizada en aplicaciones clínicas.

Métodos

15 En este estudio, se utilizaron 23 cerdos de granja no singénicos seleccionados aleatoriamente en los cuatro grupos experimentales, concretamente, 3 "de manera simulada" (control), 6 con sangre autóloga, 6 con disolución RS-I y 6 con solución de LR. En condiciones de anestesia general normalizadas, se instrumentaron los animales para permitir la medición completa de todo el perfil hemodinámico. Se realizó entonces una hemorragia rápida en los cerdos a partir de la arteria femoral hasta que la MAP alcanzó 30 mm Hg. Se continuó la hemorragia según fuese necesario

20

para mantener la MAP a 30 +/- 2 mm Hg durante 45 minutos. Se recogió la sangre derramada en bolsas tratadas con ACD y se utilizó el peso neto para estimar el volumen de sangre extraído por la hemorragia.

5 A la conclusión del periodo de choque de 45 minutos, los animales recibieron o bien solución de Ringer con lactato (LR) o bien disolución RS-I igual a de tres a cuatro veces el volumen de sangre derramado, sangre autóloga completa derramada o sin resucitación (grupo control "de manera simulada").

10 Se administraron los fluidos de resucitación de una manera dinámica, de manera incremental a lo largo de un periodo de 2 horas para mantener la MAP a 60 +/- 2 mm Hg. Se midieron todos los parámetros hemodinámicos al nivel inicial; al comienzo del periodo de choque de 45 minutos, a los 30 minutos del choque; a los 45 minutos (finalización) del choque; y a los 30, 60, 90 y 120 minutos de la resucitación. Se extrajeron muestras de sangre para el análisis de gases de la sangre, la medición del lactato, recuentos de sangre completa, determinación de la química del suero: electrolitos, glucosa, osmolaridad, enzimas séricas (aspartato aminotransferasa [SGOT/AST], alanina aminotransferasa [SGPT/ALT], creatina cinasa [CK] total y lactato deshidrogenasa [LDH]) y perfil de coagulación a los mismos intervalos de tiempo.

15 Se midieron los niveles de activación de neutrófilos mediante el método enzimático de mieloperoxidasa así como los niveles de TNF-alfa, IL-6 como índices de fenómenos apoptóticos (muerte celular).

20 Tras la resucitación, se retiraron las cánulas de los animales dejando el catéter venoso del cuello para las extracciones diarias de sangre. Durante los 7 días tras la operación, se observaron los animales para detectar cualquier cambio del comportamiento y se sometieron a extracciones de sangre en los días tras la operación 1, 2 y 7. Se sacrificaron posteriormente los animales de manera humanitaria en el día 7 tras la operación para examinar cualquier prueba patológica de lesión por reperfusión en el cerebro, riñón, pulmón e hígado.

25 *Resultados*

General:

30 Se observaron los 18 cerdos en los tres grupos experimentales supervivientes durante 1 semana y todos mostraban hábitos de comportamiento y alimentación que estaban dentro de los límites normales.

Hemodinámica

35 Los tiempos de recuperación durante los primeros 60 minutos de la resucitación para las tensiones de oclusión arterial media (véase la figura 11), venosa central, arterial pulmonar en los cerdos del grupo con RS-I eran más rápidos y comparables a los cerdos en el grupo con sangre autóloga pero más lentos en los cerdos del grupo con LR. La restauración del gasto cardiaco era significativamente más rápido y mayor en los cerdos del grupo con RS-I en comparación con los cerdos de los grupos de tanto con sangre autóloga como con LR (véase la figura 12).

40 *Perfiles sanguíneos:*

45 Las concentraciones de electrolitos séricos hacia el día 7 tras la operación se habían restaurado hasta dentro de los niveles normales para todos los grupos experimentales excepto para la elevación de la concentración de ión sodio en los cerdos del grupo con LR. La diferencia en ión fuerte y diferencia aniónica estaba dentro de los límites normales en todos los grupos de cerdos hacia el día 7 tras la operación.

50 Los niveles enzimáticos estaban elevados durante los días 1 y 2 tras la operación pero regresaron a los niveles iniciales hacia el día 7 tras la operación. No se observó ningún cambio significativo en los parámetros de coagulación sanguínea durante el periodo experimental de siete días (véase, la figura 13).

Patología

55 En el día 7 tras la operación, estaban ausentes pruebas de lesión por reperfusión en el pulmón e hígado y eran insignificantes en el riñón de los cerdos de los grupos de tanto con RS-I como con sangre autóloga pero eran una característica significativa y prevalente en estos tres órganos dentro de los cerdos del grupo con LR (véase la figura 13).

REIVINDICACIONES

1. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada, que comprende
- 5 i) BES, estando presente BES a una concentración comprendida entre 1 y 12 mmoles/l;
- ii) iones calcio e iones magnesio a una razón de concentración molar de 5:1 a 1:1, estando dichos iones calcio a una concentración comprendida entre 0,1 y 2,5 mmoles/l;
- 10 iii) iones hidrogenocarbonato de 21 a 35 mmoles/l;
- iv) iones potasio desde 2,5 hasta 6,2 mmoles/l;
- v) iones cloruro desde 96 hasta 126 mmoles/l; y
- 15 vi) iones sodio desde 100 hasta 150 mmoles/l
- para su utilización en la prevención o mejora de la pérdida de líquido extracelular en un sujeto.
- 20 2. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada según la reivindicación 1, para su utilización en el tratamiento de hipovolemia.
3. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada según la reivindicación 1, para su utilización en el tratamiento de quemaduras.
- 25 4. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada, que comprende
- i) BES, estando BES presente a una concentración comprendida entre 1 y 12 mmoles/l;
- 30 ii) iones calcio e iones magnesio a una razón de concentración molar de 5:1 a 1:1, estando dichos iones calcio a una concentración comprendida entre 0,1 y 2,5 mmoles/l;
- iii) iones hidrogenocarbonato de 21 a 35 mmoles/l;
- 35 iv) iones potasio de 2,5 a 6,2 mmoles/l;
- v) iones cloruro de 96 a 126 mmoles/l; y
- vi) iones sodio de 100 a 150 mmoles/l
- 40 para su utilización en la prevención y/o mejora de la lesión por reperfusión.
5. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que BES está presente a una concentración de 5 mmoles/l.
- 45 6. Expansor de fluidos corporales tamponado para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está también sustancialmente libre de tampón citrato y lactato.
7. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la razón de concentración molar de iones calcio e iones magnesio está comprendida entre 4:1 y 2:1, preferentemente de 3:1 aproximadamente.
- 50 8. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende iones calcio de 1,1 a 1,4 mmoles/l e iones magnesio de 0,2 a 0,6 mmoles/l.
- 55 9. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está libre de suero y/o extracto de suero.
- 60 10. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende 25 mmoles/l de iones hidrogenocarbonato.
11. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más de entre:
- 65 (a) glucosa de 2 a 11 mmoles/l;

- (b) glicerol de 50 a 150 μ moles/l;
- (c) colina de 7 a 15 μ moles/l;
- (d) glutamato de 5 a 400 μ moles/l;
- (e) aspartato de 5 a 200 μ moles/l;
- 5 (f) glutamina de 100 a 2000 μ moles/l;
- (g) piroglutamato de 15 a 215 μ moles/l;
- (h) arginina de 20 a 200 μ moles/l;
- (i) pirofosfato de tiamina de 1 a 120 nmoles/l;
- (j) D- o DL o L-carnitina de 40 a 70 μ moles/l; y
- 10 (k) insulina porcina o humana de 5 a 200 mU.I./l, preferentemente insulina humana recombinante.

12. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

- 15 (a) BES 5 mmoles/l;
- (b) iones calcio 1,25 mmoles/l;
- (c) iones magnesio 0,45 mmoles/l;
- (d) iones hidrogenocarbonato 25 mmoles/l;
- (e) iones potasio 5 mmoles/l;
- 20 (f) iones cloruro 118 mmoles/l; y
- (g) iones sodio 135 mmoles/l
- (h) D-glucosa 10 mmoles/l;
- (i) glicerol 110 μ moles/l;
- (j) colina 10 μ moles/l;
- 25 (k) L-glutamato 300 μ moles/l;
- (l) L-aspartato 20 μ moles/l;
- (m) L-glutamina 400 μ moles/l;
- (n) pirofosfato de tiamina 40 nmoles/j;
- (o) L-carnitina 50 μ moles/l; y
- 30 (p) insulina humana recombinante 28 mU.I./l.

13. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un componente antibiótico.

- 35 14. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según la reivindicación 13, en la que el componente antibiótico comprende cloranfenicol de 10 a 150 mg/l, preferentemente 100 mg/l aproximadamente.

- 40 15. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el pH está comprendido entre 7,05 y 7,5 a un intervalo de temperatura comprendido entre 4 y 38°C.

- 45 16. Disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha disolución es un sustituto de sangre o un sustituto de líquido extravascular, por ejemplo, un sustituto de líquido peritoneal.

17. Disolución madre concentrada de una disolución expansora de fluidos corporales tamponada para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que opcionalmente la disolución madre está concentrada en un factor comprendido entre 1 y 50, preferentemente entre 5 y 20.

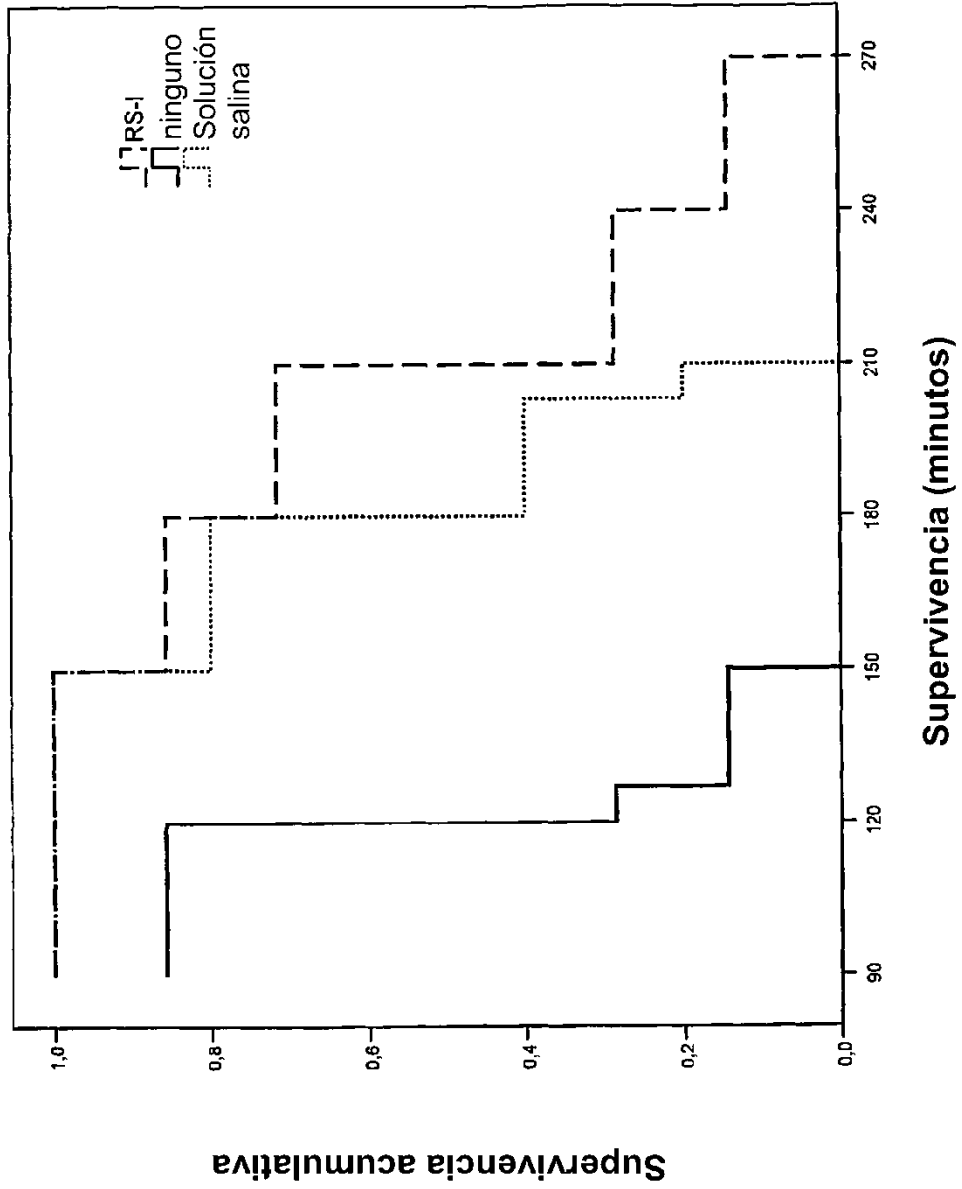


Figura 1 Tiempo de supervivencia acumulativa de ratas en minutos

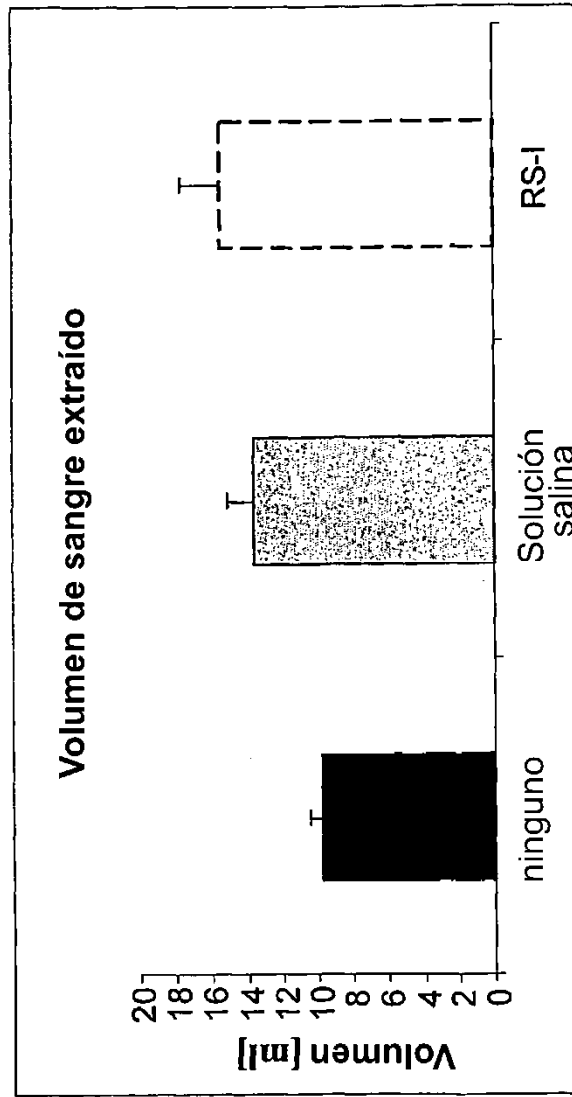


Figura 2 Volumen de sangre total extraído en cada uno de los brazos del estudio

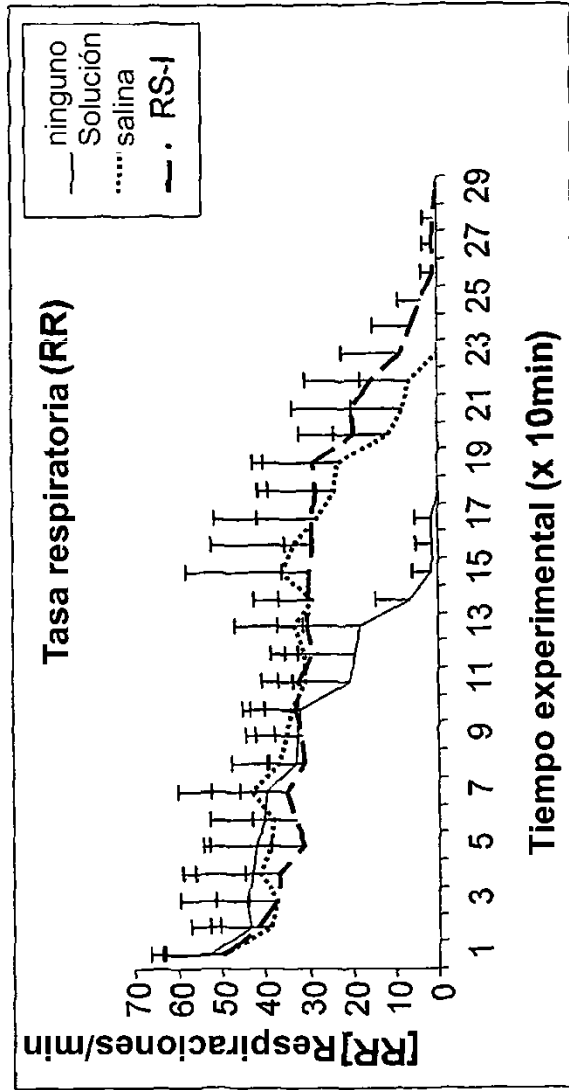


Figura 3 Tasas respiratorias de las ratas a lo largo del tiempo experimental en los diversos brazos del ensayo

FIGURA 4A

Análisis de datos de laboratorio	REFERENCIA (unidades) Valores	CERDO n° 1	CERDO n° 1	CERDO n° 1
		(8/31/2006) DÍA 1	(9/1/2006) DÍA 2	(9/2/2006) DÍA 3
CBC				
WBC	mil/mm ³ 7 a 20	20400	23900	18600
RBC	mil/mm ³ 5 a 8	6,67	6,56	6,46
Hg	g/dL 6,9 a 12,7	12,1	12	12
Hct	% 15 - 37	36	35	35
MCV	fl 50 - 68	54	54	54
MCH	Pg 17 - 23	18	18	19
MCHC	g/dL 30 - 36	34	34	35
RDW	%	18	19	19
WBC-dif				
Polimorfos	% 28 - 50	47	61	59
Linfocitos	% 40 - 60	51	33	38
Monocitos	% 2 a 10	1	6	3
Eosinófilos	% 0 - 10	1	0	0
Plaquetas	mm ³ 120k - 720k	526000	522000	458000
Glucosa	mg/dL 65 - 150	77	59	97
Ácido láctico	mmol/L 1,91 - 2,47	5,76	1,49	1,66
BUN	mg/dL 6 - 30	11	14	16
Creatinina	mg/dL 0,8 - 3,6	0,8	0,9	1
Sodio	mmol/L 135 - 150	139	139	142
Potasio	mmol/L 4,1 - 6,9	3,9	3,8	3,8
Cloruro	mmol/L 94 - 113	101	103	102
Hidrogenocarbonato	mmol/L 22 - 46	22	26	30
Calcio	mmol/L 2,07 - 3,32	2,40	2,30	2,35
Magnesio	mmol/L 0,70 - 1,00	0,90	0,82	0,78
Fosfato	mg/dL 7,0 - 10,9	8,6	8,2	7,9
Osmolalidad	mOsm/kg 280 - 306	286	295	295
SGOT (AST)	UI/L 29 - 1140	73	64	60
SGPT (ALT)	UI/L 7 - 161	66	69	70
LDH	UI/L 286 - 12.000	778	771	731
CPK	UI/L 311- 16.700	N/A	2760	1887
Protrombina				
Pt	Seg	10,6	10,8	10,7
Control	Seg	12	12	13
INR (ISI)	(Razón) 0,8 - 1,2	0,9	0,9	0,9
aPTT	Seg 17,8 - 23,3	20	19	19,5
Control	Seg	29,5	30	30,5
aPTT (Razón)		0,7	0,6	0,6
Fibrinógeno	g/L 2,06 - 6,13	2,8	3,6	3,1

FIGURA 4B

Análisis de datos de laboratorio	REFERENCIA (unidades)		CERDO n° 2	CERDO n° 2	CERDO n° 2	CERDO n° 2
	Valores		(9/7/2006) DÍA 1	(9/8/2006) DÍA 2	(9/9/2006) DÍA 3	(13/09/06) DÍA 7
CBC						
WBC	mil/mm ³	7 a 20	24700	19200	20000	29400
RBC	mil/mm ³	5 a 8	6,46	6,39	6,29	6,26
Hg	g/dL	6,9 a 12,7	11,2	11,1	10,9	10,7
Hct	%	15 – 37	32	32	32	32
MCV	fL	50 – 68	50	50	51	52
MCH	Pg	17 – 23	17	17	17	17
MCHC	g/dL	30 – 36	35	35	34	33
RDW	%		20	21	22	28
WBC-dif						
Polimorfos	%	28 – 50	32	19	36	50
Linfocitos	%	40 – 60	67	77	58	43
Monocitos	%	2 a 10	0	4	5	6
Eosinófilos	%	0 – 10	1	0	0	1
		120k –				
Plaquetas	mm ³	720k	121000	586000	575000	563000
Glucosa	mg/dL	65 – 150	87	96	92	96
Ácido láctico	mmol/L	1,91 - 2,47	0,61	0,83	1,63	5,13
BUN	mg/dL	6 – 30	14	14	18	16
Creatinina	mg/dL	0,8 – 3,6	0,6	0,7	0,8	0,7
Sodio	mmol/L	135 – 150	139	144	149	140
Potasio	mmol/L	4,1 – 6,9	4,1	4,3	4,3	4
Cloruro	mmol/L	94 – 113	99	107	110	99
Hidrogenocarbonato	mmol/L	22 – 46	32	27	30	28
Calcio	mmol/L	2,07 - 3,32	2,47	2,52	2,62	2,62
Magnesio	mmol/L	0,70 - 1,00	0,90	1,03	0,99	0,90
Fosfato	mg/dL	7 – 10,9	9,4	8,7	8,4	8,8
Osmolalidad	mOsm/kg	280 - 306	287	300	312	291
SGOT (AST)	UI/L	29 - 1140	88	70	46	38
SGPT (ALT)	UI/L	7 - 161	40	59	54	66
LDH	UI/L	286 -12.000	767	795	748	623
CPK	UI/L	311- 16.700	5234	4595	3542	743
Protrombina						
Pt	Seg		11,4	12,1	11,5	11,5
Control	Seg		12	12	12	12
Pt ratio			1	1	1	1
INR (ISI)	(Razón)	0,8 – 1,2	1	1	1	1
aPTT	Seg	17,8 - 23,3	17	22,5	20	19,5
Control	Seg		29,5	30	30	29
aPTT (Razón)			0,6	0,8	0,7	0,7
Fibrinógeno	g/L	2,06 - 6,13	3,2	3,3	2,9	2,1

FIGURA 4C

Análisis de datos de laboratorio	REFERENCIA (unidades) Valores	CERDO nº 3	CERDO nº 3	CERDO nº 3	CERDO nº 3	
		(9/14/2006) DÍA 1	(9/15/2006) DÍA 2	(16/09/06) DÍA 3	(20/09/06) DÍA 7	
CBC						
WBC	mil/mm ³	7 a 20	23100	11900	18200	26000
RBC	mil/mm ³	5 a 8	6,46	6,29	6,1	6,24
Hg	g/dl	6,9 a 12,7	11,2	10,9	10,5	11,1
Hct	%	15 - 37	32	31	31	31
MCV	fl	50 - 68	49	50	50	50
MCH	Pg	17 - 23	17	17	17	18
MCHC	g/dL	30 - 36	35	35	35	35
RDW	%		34	32	34	22
WBC-dif						
Polimorfos	%	28 - 50	54	28	29	59
Linfocitos	%	40 - 60	45	66	67	28
Monocitos	%	2 a 10	1	1	4	13
Eosinófilos	%	0 - 10	0	1	0	0
Plaquetas	mm ³	120k - 720k	455000	389000	390000	337000
Glucosa	mg/dL	65 - 150	81	96	95	78
Ácido láctico	mmol/L	1,91 - 2,47	0,68	0,46	1,14	0,31
BUN	mg/dL	6 - 30	11	13	11	10
Creatinina	mg/dL	0,8 - 3,6	0,8	0,9	0,9	0,7
Sodio	mmol/L	135 - 150	142	138	139	138
Potasio	mmol/L	4,1 - 6,9	4,1	4,1	4,5	4,5
Cloruro	mmol/L	94 - 113	103	101	102	101
Hidrogenocarbonato	mmol/L	22 - 46	28	29	29	29
Calcio	mmol/L	2,07 - 3,32	2,42	2,42	2,42	2,40
Magnesio	mmol/L	1,7 - 2,44	0,82	0,74	0,86	0,86
Fosfato	mg/dL	7,0 - 10,9	7,7	7,7	8,1	7,8
Osmolalidad	mOsm/kg	280 - 306	290	290	295	289
SGOT (AST)	UI/L	29 - 1140	33	36	26	22
SGPT (ALT)	UI/L	7 - 161	26	32	35	65
LDH	UI/L	286 - 12.000	551	605	561	576
CPK	UI/L	311 - 16.700	1609	2494	1407	252
Protrombina						
Pt	Seg		11,2	11,3	11,1	10,9
Control	Seg		12	12	12	12
INR (ISI)			0,9	0,9	0,9	0,9
aPTT	Seg	0,8 - 1,2	17	17	19,5	19
Control	Seg	17,8 - 23,3	29,5	29,5	30	30
aPTT (Razón)	(Razón)		0,6	0,6	0,7	0,6
Fibrinógeno	g/L	2,06 - 6,13	3,2	3	2,4	2,5

FIGURA 4D

Análisis de datos de laboratorio	REFERENCIA (unidades)		CERDO nº 4	CERDO nº 4	CERDO nº 4	CERDO nº 4
	Valores		(20/09/06) DÍA 1	(21/09/06) DÍA 2	(22/09/06) DÍA 3	(26/09/06) DÍA 7
CBC						
WBC	mil/mm ³	7 a 20	26700	15800	21300	29700
RBC	mil/mm ³	5 a 8	6,11	5,67	6,28	4,89
Hg	g/dL	6,9 a 12,7	11,1	10,4	11,6	9,3
Hct	%	15 - 37	33	30	34	27
MCV	fL	50 - 68	54	54	54	56
MCH	Pg	17 - 23	18	18	19	19
MCHC	g/dL	30 - 36	34	34	35	34
RDW	%		20	20	20	25
WBC-dif						
Polimorfos	%	28 - 50	69	60	48	67
Linfocitos	%	40 - 60	25	32	46	24
Monocitos	%	2 a 10	6	7	2	9
Eosinófilos	%	0 - 10	0	0	4	0
Plaquetas	mm ³	120k - 720k	645000	564000	586000	676000
Glucosa	mg/dL	65 - 150	100	65	75	70
Ácido láctico	mmol/L	1,91 - 2,47	3,14	1,13	0,95	1,58
BUN	mg/dL	6 - 30	26	10	10	15
Creatinina	mg/dL	0,8 - 3,6	1	0,8	0,8	0,6
Sodio	mmol/L	135 - 150	141	139	138	142
Potasio	mmol/L	4,1 - 6,9	4,3	4,1	4,9	4,5
Cloruro	mmol/L	94 - 113	99	100	99	98
Hidrogenocarbonato	mmol/L	22 - 46	28	34	30	34
Calcio	mmol/L	2,07 - 3,32	2,25	2,27	2,42	2,59
Magnesio	mmol/L	0,7 - 1,00	0,95	0,82	0,86	0,90
Fosfato	mg/dL	7,0 - 10,9	8,6	6,4	7,5	9,3
Osmolalidad	mOsm/kg	280 - 306	295	284	287	292
SGOT (AST)	UI/L	29 - 1140	98	58	34	24
SGPT (ALT)	UI/L	7 - 161	53	55	56	54
LDH	UI/L	286 - 12.000	1083	977	933	586
CPK	UI/L	311 - 16.700	3687	2677	1346	326
Protrombina						
Pt	Seg		9,9	10,9	10,7	10,5
Control	Seg		12	12	12	12
INR (ISI)	(Razón)	0,8 - 1,2	0,8	0,9	0,9	0,9
aPTT	Seg	17,8 - 23,3	22,5	20,5	18,5	17
Control	Seg		30,5	29	30	30
aPTT (Razón)			0,7	0,7	0,6	0,6
Fibrinógeno	g/L	2,06 - 6,13	3	3,2	2,7	2,8

FIGURA 4E

Análisis de datos de laboratorio	REFERENCIA (unidades)		CERDO nº 5	CERDO nº 5	CERDO nº 5	CERDO nº 5
	Valores		(28/09/06)	(29/09/06)	(30/09/06)	(4/10/06)
			DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 7
CBC						
WBC	mil/mm ³	7 a 20	21700	19700	20300	22700
RBC	mil/mm ³	5 a 8	6,35	5,7	5,58	6,23
Hg	g/dL	6,9 a 12,7	11,1	9,9	9,8	11
Hct	%	15 - 37	33	29	29	33
MCV	Fl	50 - 68	51	51	51	52
MCH	Pg	17 - 23	18	17	18	18
MCHC	g/dL	30 - 36	34	35	34	34
RDW	%		21	20	21	21
WBC-dif						
Polimorfos	%	28 - 50	53	45	42	52
Linfocitos	%	40 - 60	43	49	52	41
Monocitos	%	2 a 10	3	3	3	5
Eosinófilos	%	0 - 10	1	1	2	1
Plaquetas	mm ³	120k - 720k	531000	456000	479000	513000
Glucosa	mg/dL	65 - 150	171	97	84	79
Ácido láctico	mmol/L	1,91 - 2,47	4,96	0,7	1,3	3,21
BUN	mg/dL	6 - 30	29	23	21	17
Creatinina	mg/dL	0,8 - 3,6	1	0,8	0,7	0,9
Sodio	mmol/L	135 - 150	142	144	150	142
Potasio	mmol/L	4,1 - 6,9	4,6	4,7	4,6	4,6
Cloruro	mmol/L	94 - 113	99	104	107	98
Hidrogenocarbonato	mmol/L	22 - 46	35	30	31	35
Calcio	mmol/L	2,07 - 3,32	2,45	2,52	2,54	2,59
Magnesio	mmol/L	0,7 - 1,00	1,07	1,07	1,03	1,15
Fosfato	mg/dL	7 - 10,9	7,9	8,2	7,7	9,4
Osmolalidad	mOsm/kg	280 - 306	305	304	310	297
SGOT (AST)	UI/L	29 - 1140	45	34	38	23
SGPT (ALT)	UI/L	7 - 161	57	56	58	45
LDH	UI/L	286 - 12.000	702	641	601	498
CPK	UI/L	311 - 16.700	2719	1916	1606	505
Protrombina						
Pt	Seg		11,2	10,9	11	11,4
Control	Seg		12	12	12	12
INR (ISI)	(Razón)	0,8 - 1,2	0,9	0,9	0,9	1
aPTT	Seg	17,8 - 23,3	15,5	16,5	18	17,5
Control	Seg		30,5	29,5	30	30,5
aPTT (Razón)			0,5	0,6	0,6	0,6
Fibrinógeno	g/L	2,06 - 6,13	2,9	2,6	2,4	2,3

FIGURA 4F

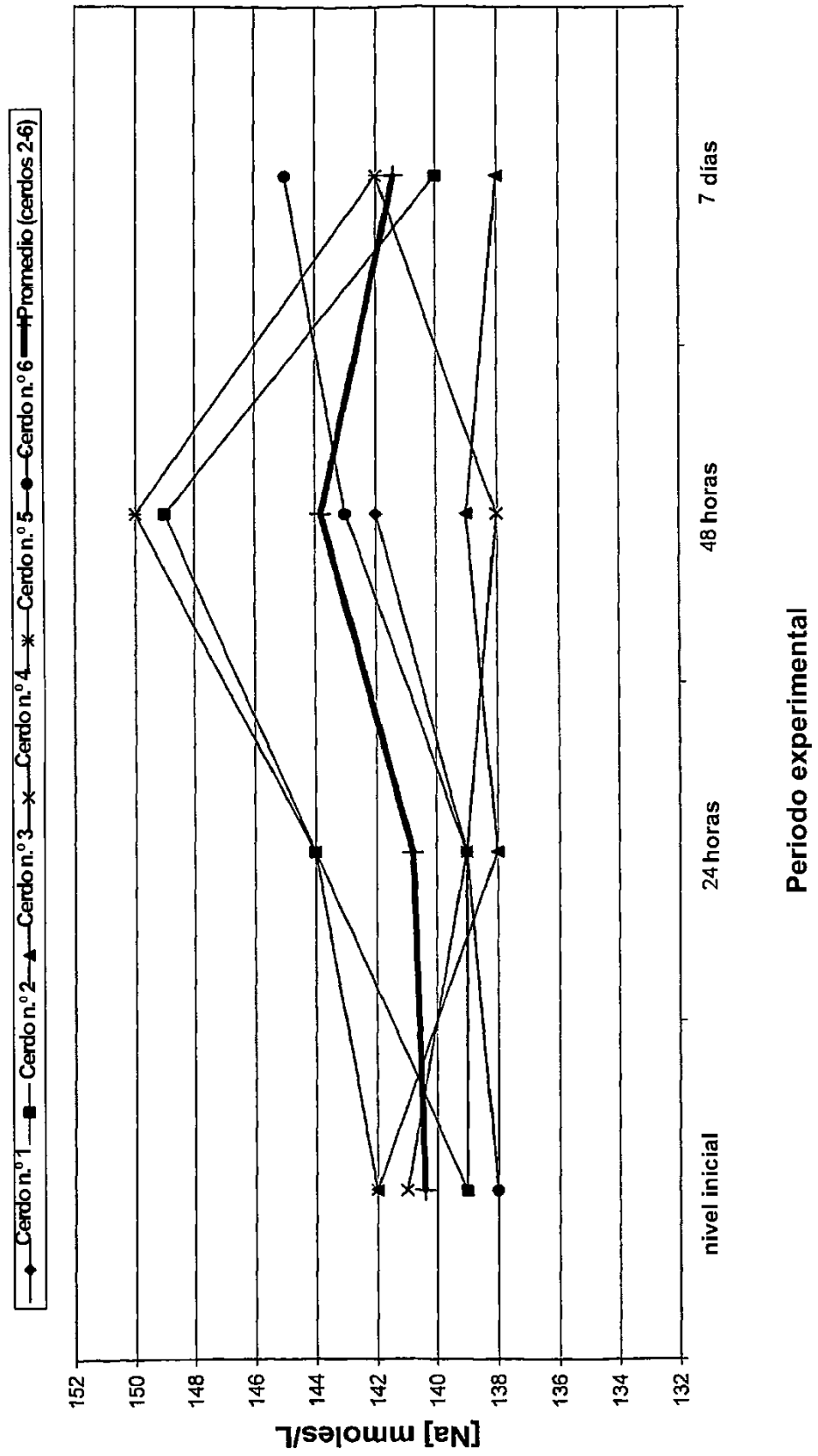
Análisis de datos de laboratorio	REFERENCIA (unidades)		CERDO nº 6 (19/10/06)	CERDO nº 6 (20/10/06)	CERDO nº 6 (21/10/06)	CERDO nº 6 (25/10/06)
	Valores		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 7
CBC						
WBC	mil/mm ³	7 a 20	21400	21100	20800	17000
RBC	mil/mm ³	5 a 8	6,05	5,49	5,77	5,36
Hg	g/dL	6,9 a 12,7	11,7	10,6	11,1	10,2
Hct	%	15 - 37	34	31	32	30
MCV	fL	50 - 68	57	57	56	56
MCH	Pg	17 - 23	19	19	19	19
MCHC	g/dL	30 - 36	34	34	35	34
RDW	%		16	16	16	16
WBC-dif						
Polimorfos	%	28 - 50	51	66	68	54
Linfocitos	%	40 - 60	47	31	32	36
Monocitos	%	2 a 10	2	3	0	6
Eosinófilos	%	0 - 10	0	0	0	1
Plaquetas	Mm ³	120k - 720k	601000	595000	616000	711000
Glucosa	mg/dL	65 - 150	74	91	105	108
Ácido láctico	mmol/L	1,91 - 2,47	1,06	0,89	1,17	1,3
BUN	mg/dL	6 - 30	10	14	9	16
Creatinina	mg/dL	0,8 - 3,6	0,7	0,7	0,8	0,5
Sodio	mmol/L	135 - 150	138	139	143	145
Potasio	mmol/L	4,1 - 6,9	3,8	4,4	4	4,5
Cloruro	mmol/L	94 - 113	98	99	103	100
Hidrogenocarbonato	mmol/L	22 - 46	31	32	31	40
Calcio	mmol/L	2,07 - 3,32	2,40	2,40	2,37	2,89
Magnesio	mmol/L	0,7 - 1,00	0,90	0,86	0,70	0,90
Fosfato	mg/dL	7,0 - 10,9	8,4	7,3	7,4	8,8
Osmolalidad	mOsm/kg	280 - 306	300	301	296	309
SGOT (AST)	UI/L	29 - 1140	103	111	50	29
SGPT (ALT)	UI/L	7 - 161	43	54	56	49
LDH	UI/L	286 - 12.000	867	939	738	618
CPK	UI/L	311- 16.700	11870	11528	4305	346
Protrombina						
Pt	Seg		15,5	16,2	13	11,6
Control	Seg		12	12	12	12
INR (ISI)	(Razón)	0,8 - 1,2	1,3	1,4	1,1	1
aPTT	Seg	17,8 - 23,3	21	23,5	23	23,5
Control	Seg		30,5	29	29,5	29
aPTT (Razón)			0,7	0,8	0,8	0,8
	g/L	2,06 - 6,13	3,2	2,7	2,2	1,6

FIGURA 4G

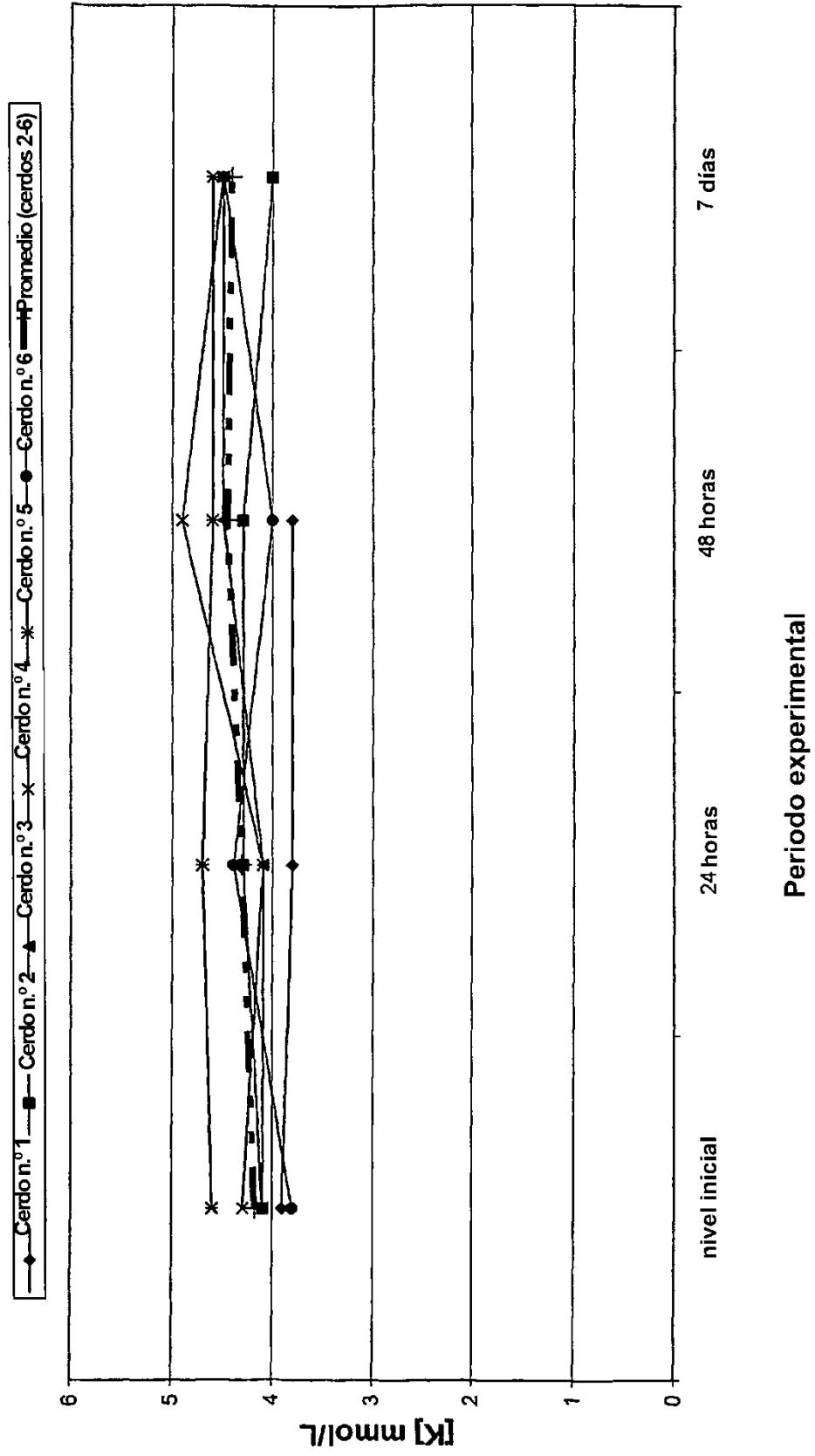
Tabla de datos resumen - **Valores de referencia y promedio del análisis de datos de sangre en un modelo de cerdo normovolémico**

Análisis	Valores de referencia	Valores promedio a lo largo del periodo experimental			
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 7
Perfil de células y sanguíneo					
RBC	5 – 8 mil/mm ³	6,286	5,908	6,004	5,796
Hg	6,9 - 12,7 g/Dl	11,26	10,58	10,78	10,46
Hct	15 – 37 %	32,8	30,6	31,6	30,6
WBC	7 – 20 mil/mm ³	23000	17540	20120	24960
Linfocitos	40 – 60 %	45,4	51,0	51,0	34,4
Plaquetas	120.000 – 720.000 mm ³	470600	518000	529200	560000
Pt [INR]	0,8 - 1,2	0,98	1,02	0,96	0,96
aPTT	17,8 - 23,3 seg	18,6	20,0	19,8	19,3
Fibrinógeno	2,06 - 6,13 g/L	3,10	2,96	2,52	2,26
Electrolitos					
Sodio	135 – 150 mmol/L	140,4	140,8	143,8	141,4
Potasio	4,1 – 6,9 mmol/L	4,18	4,32	4,46	4,42
Calcio	2,07 - 3,32 mmol/L	2,40	2,43	2,48	2,62
Magnesio	0,70 - 1,00 mmol/L	0,93	0,90	0,89	0,95
Hidrogenocarbonato	22 – 46 mmol/L	30,8	30,4	30,2	33,2
Osmolalidad	280 - 306 mOsm/kg	295,4	295,8	300,0	295,6
Metabolitos					
Glucosa	65 – 150 mg/Dl	102,6	89	90,2	86,2
Ácido láctico	1,91 - 2,47 mmol/L	2,09	0,80	1,24	2,31
BUN	6 – 30 mg/dL	18,0	14,8	13,8	14,8
Creatinina	0,8 – 3,6 mg/dL	0,82	0,78	0,8	0,68
Enzimas					
LDH	286 -12.000 UI/L	794	791,4	716,2	580,2
SGOT (AST)	29 – 1140 UI/L	73,4	61,8	38,8	27,2
SGPT (ALT)	7 - 161 UI/L	43,8	51,2	51,8	55,8
CPK	311- 16.700 UI/L	5023,8	4642	2441,2	434,4

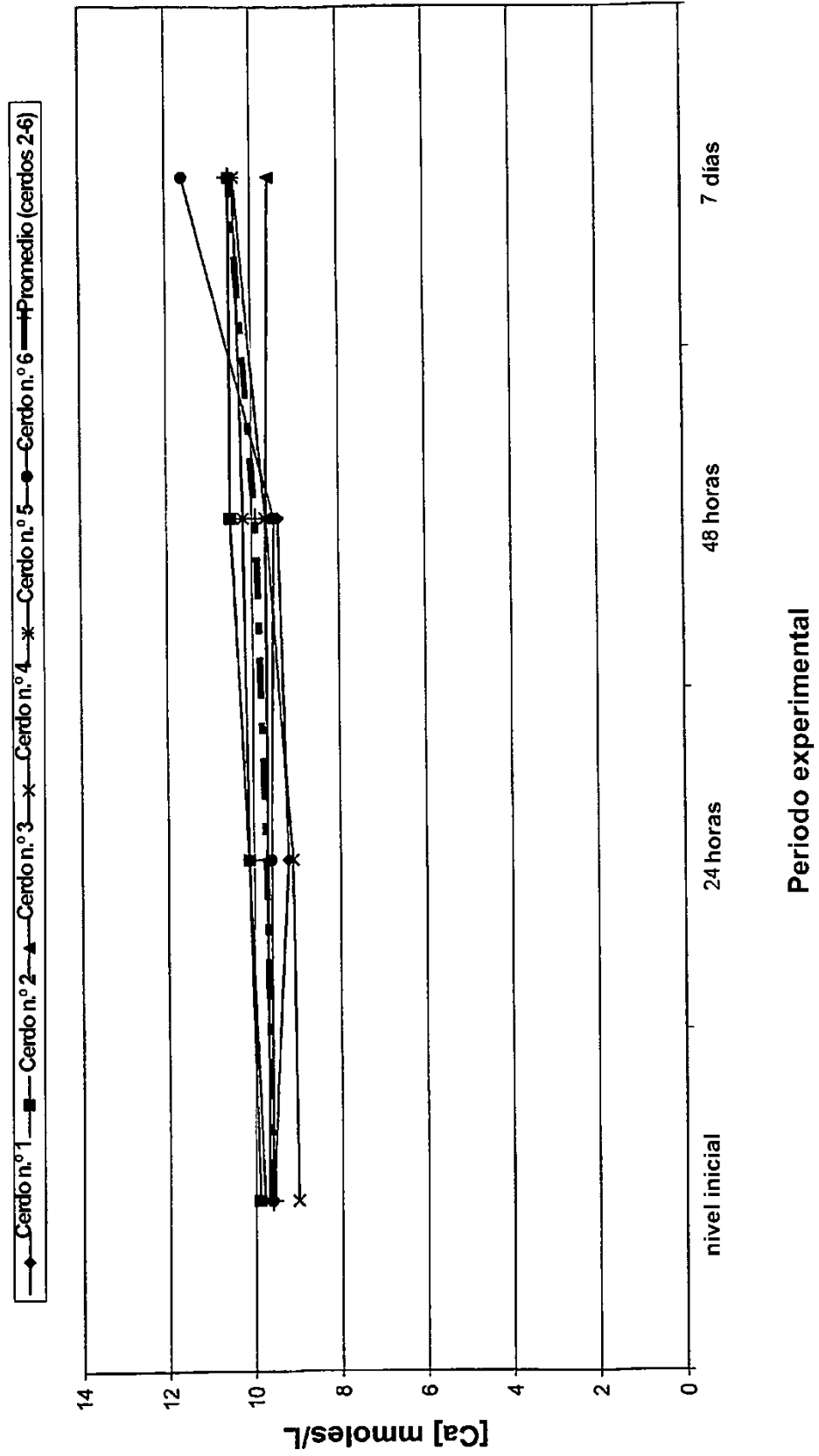
**Fig. 5 (a) Análisis de niveles de ion sodio
[Intervalo de valores : 135 -150 mmol/L]**



**Fig. 5 (b) Análisis de niveles de ion potasio
[Intervalo de valores : 4,1 - 6,9 mmol/L]**



**Fig. 5 (c) Análisis de niveles de ion calcio
[Intervalo de valores : 8,3 - 13,3 mg/dL]**



**Fig. 5 (d) Análisis de niveles de ion magnesio
[Intervalo de valores : 0,70 - 1,00 mmoles/L]**

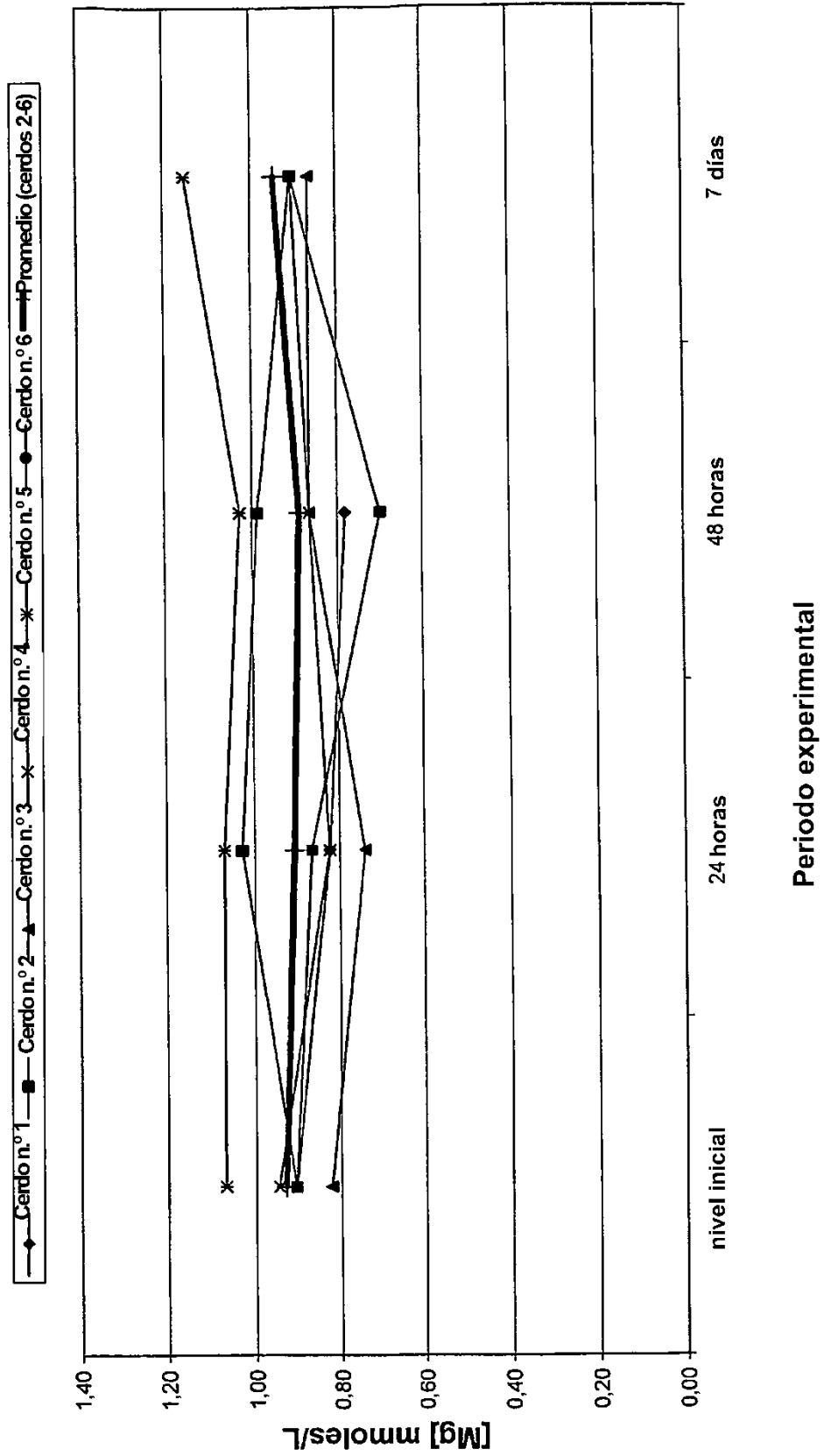
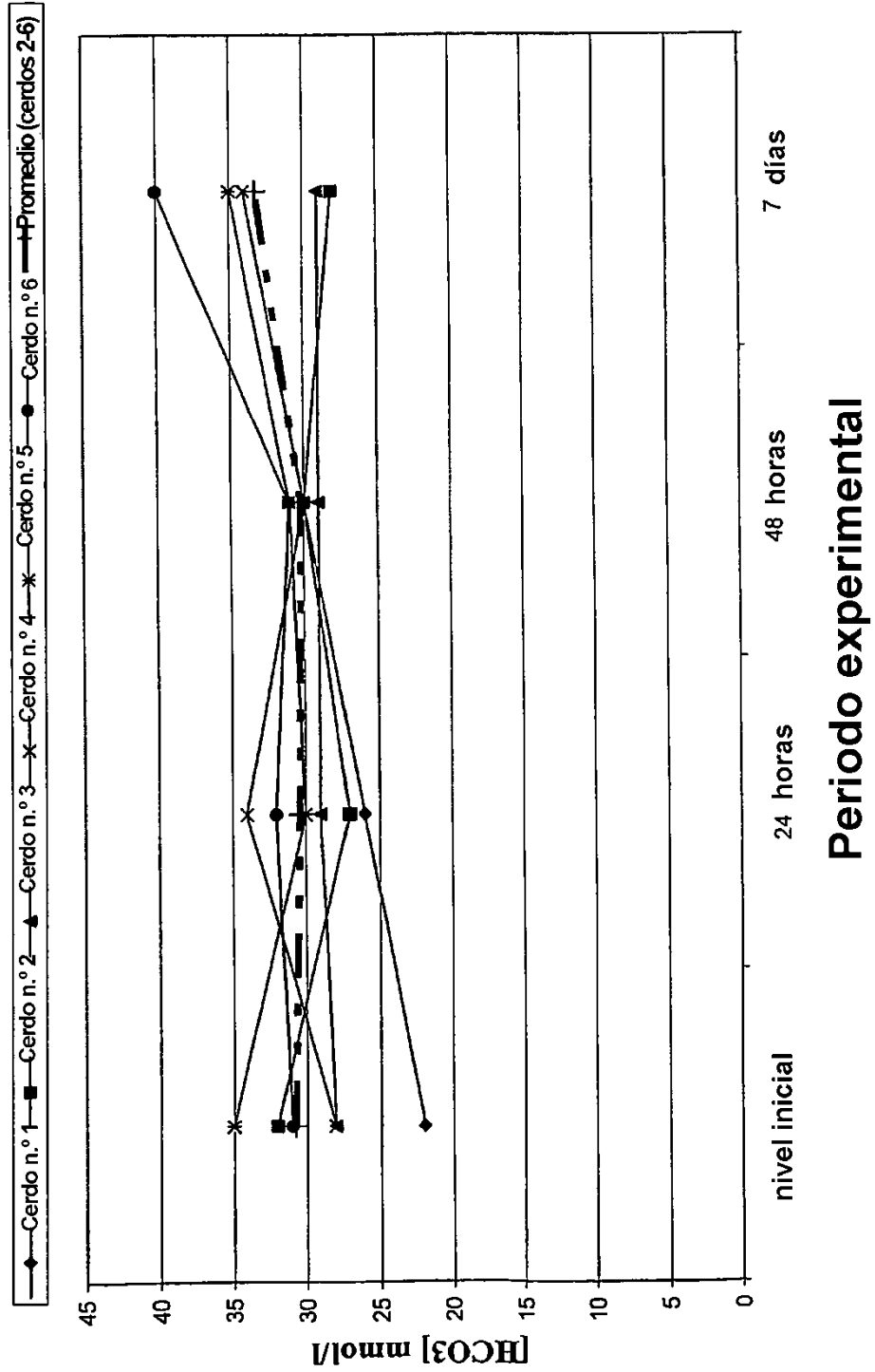


Fig. 5 (e) Análisis de niveles de hidrogenocarbonato
[Intervalo de valores : 22 - 46 mmol/L]



**Fig. 5 (f) Análisis de niveles de ion cloruro
[Intervalo de valores: 94 - 113 mmol/L]**

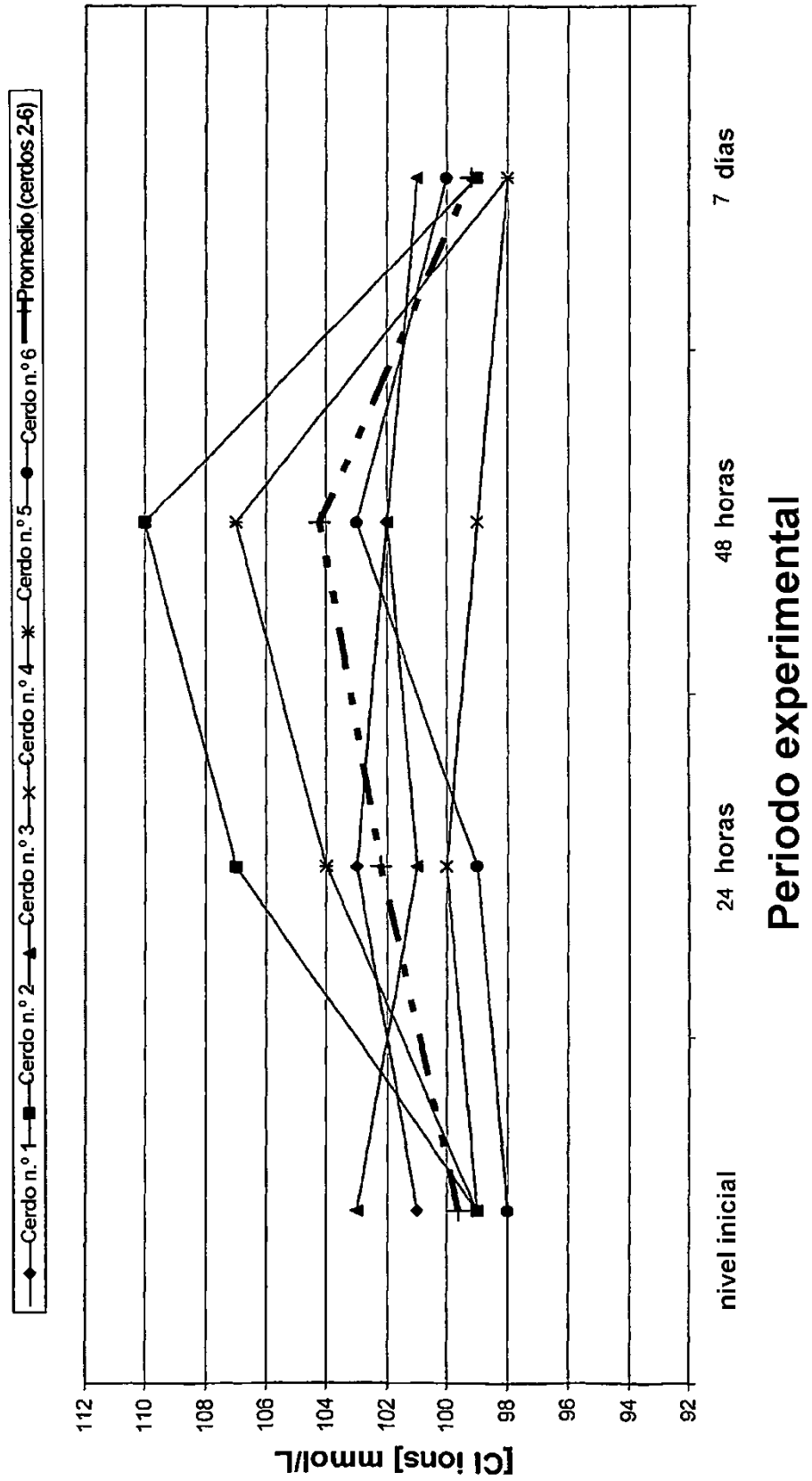
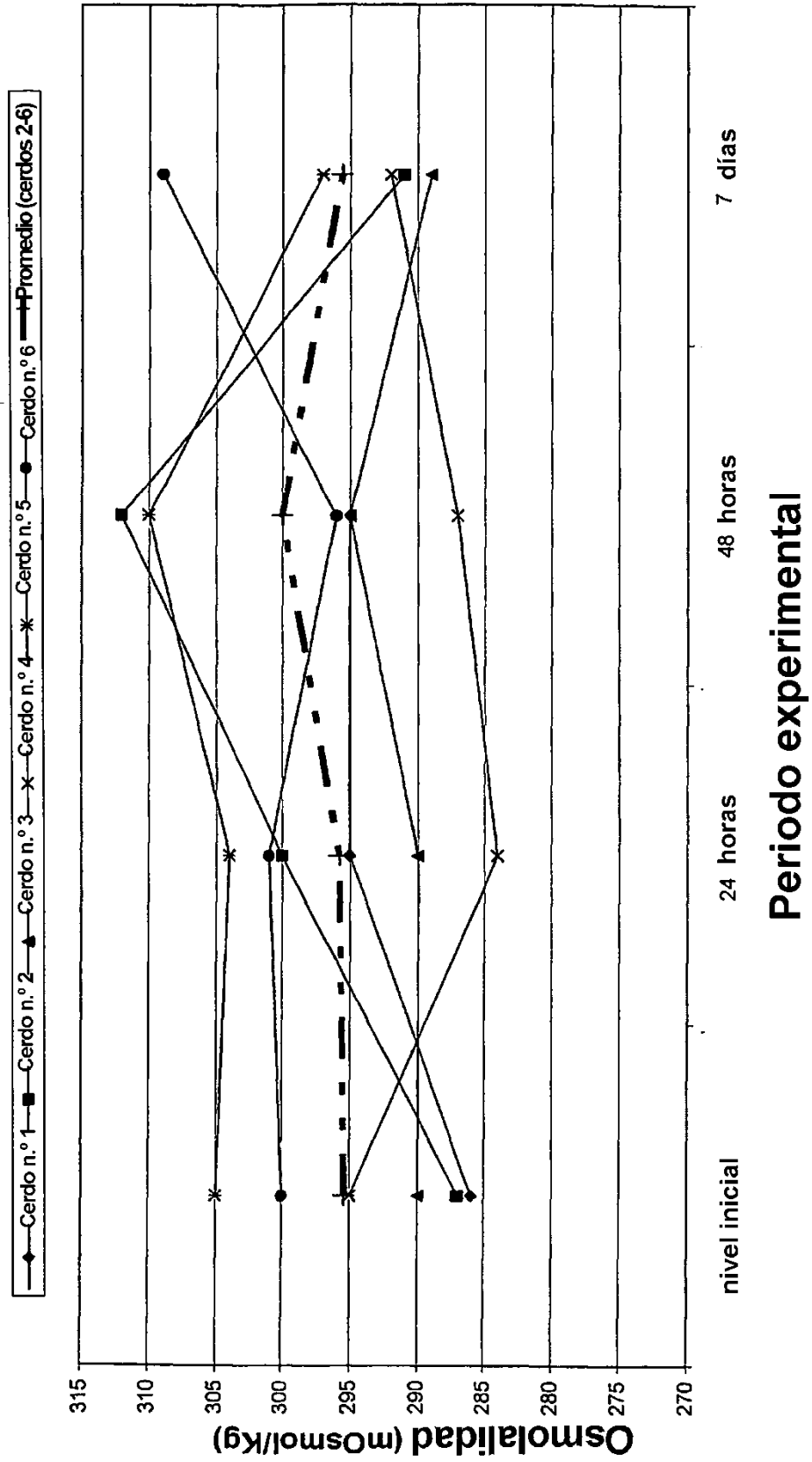
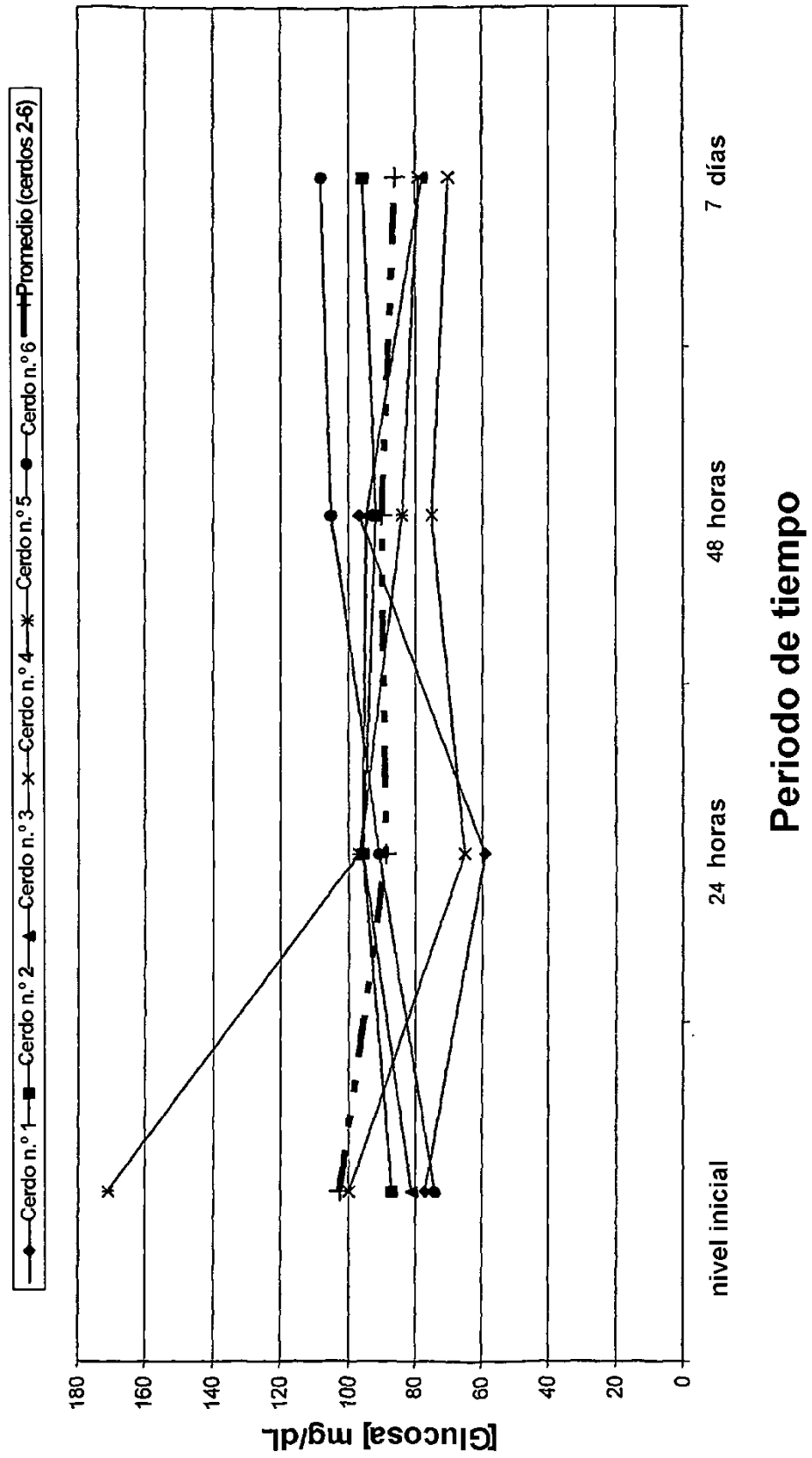


Fig. 5 (g) Análisis de niveles de osmolalidad
[Intervalo de valores : 250 - 306 mosmol/kg de agua]



**Fig. 6 (a) Análisis de niveles de glucosa en sangre
[Intervalo de valores: 65 - 150 mg/dL]**



**Fig. 6 (b) Análisis de niveles de lactato
[Intervalo de valores: 1,91 - 2,47 mmol/L]**

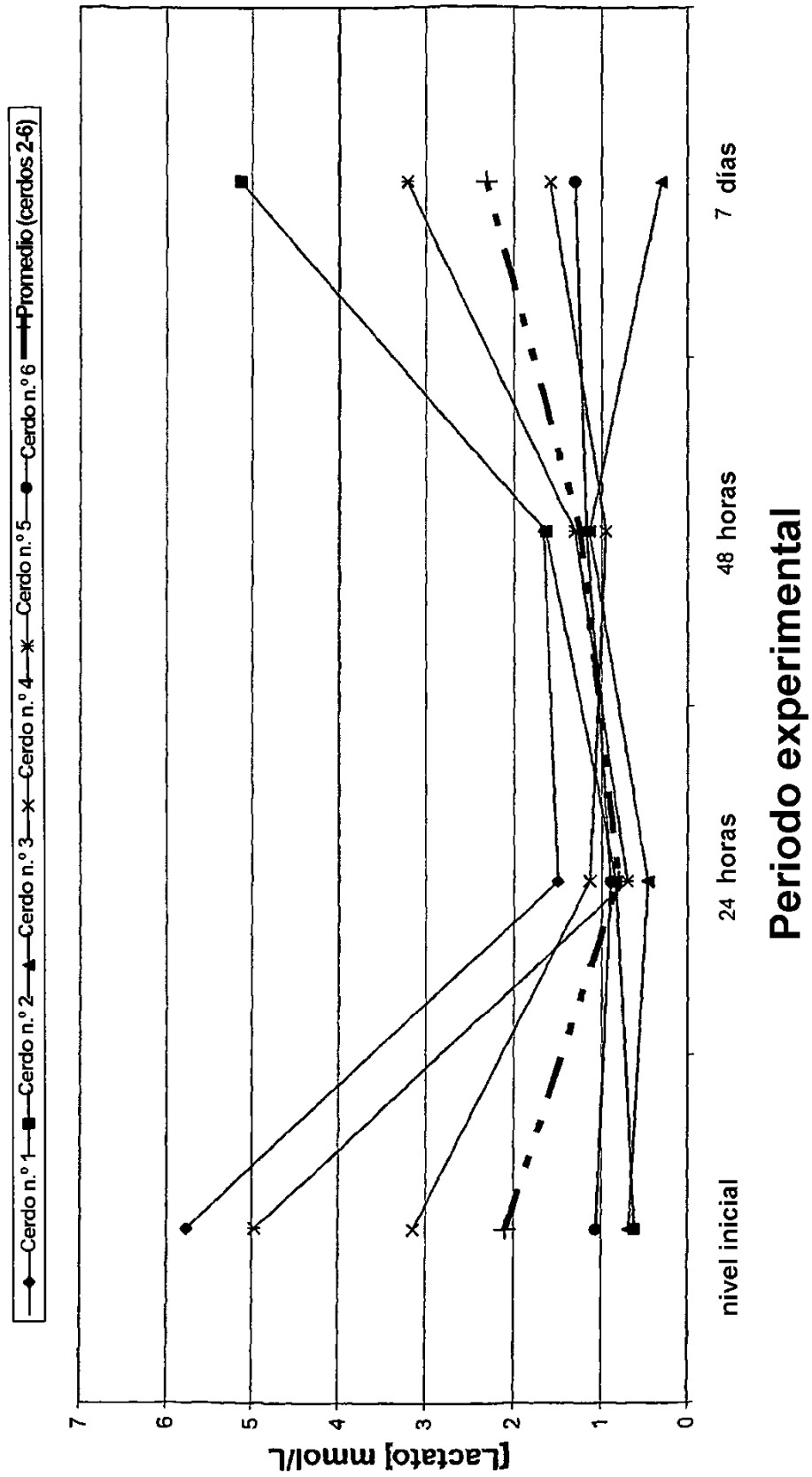
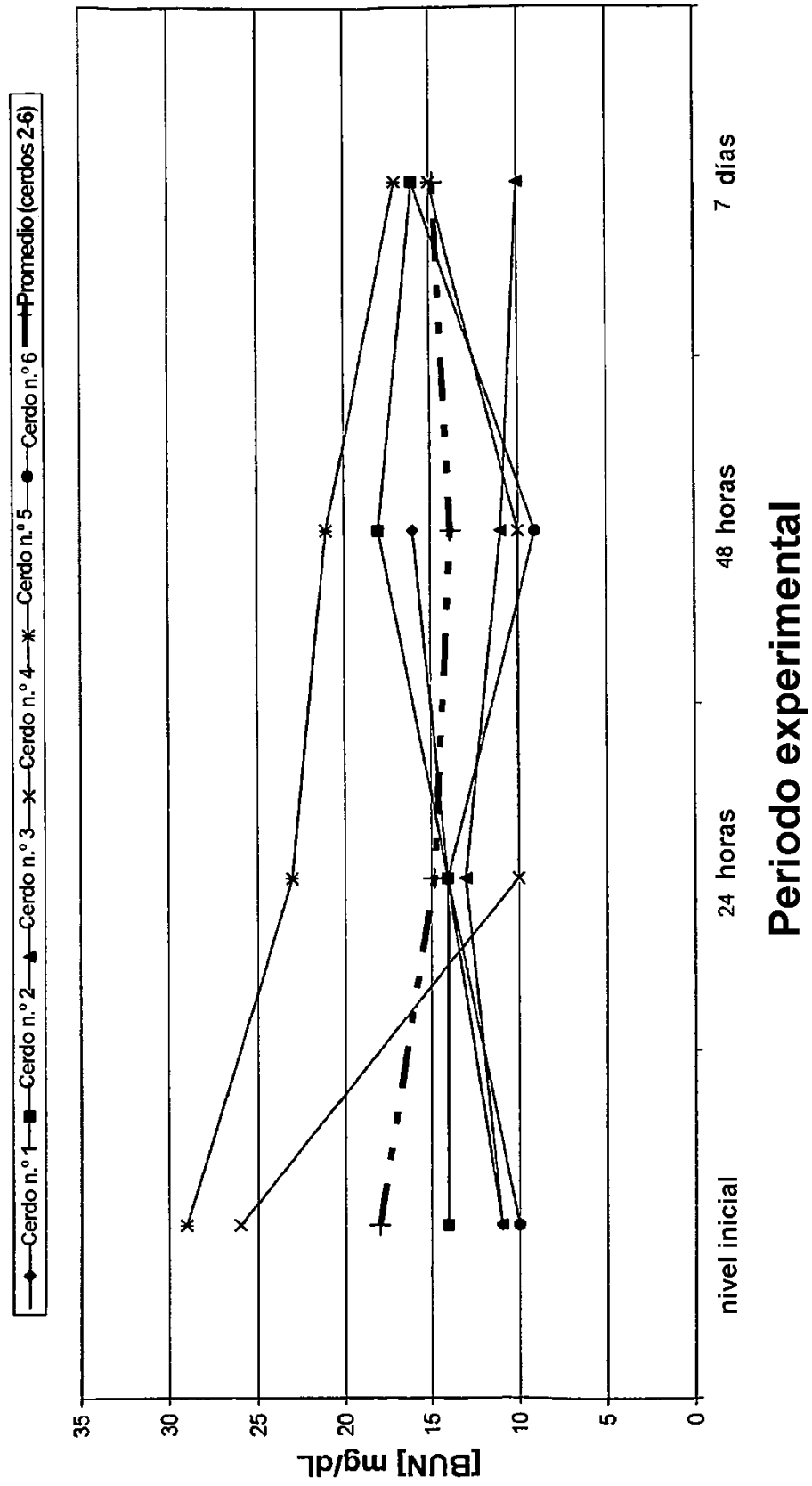
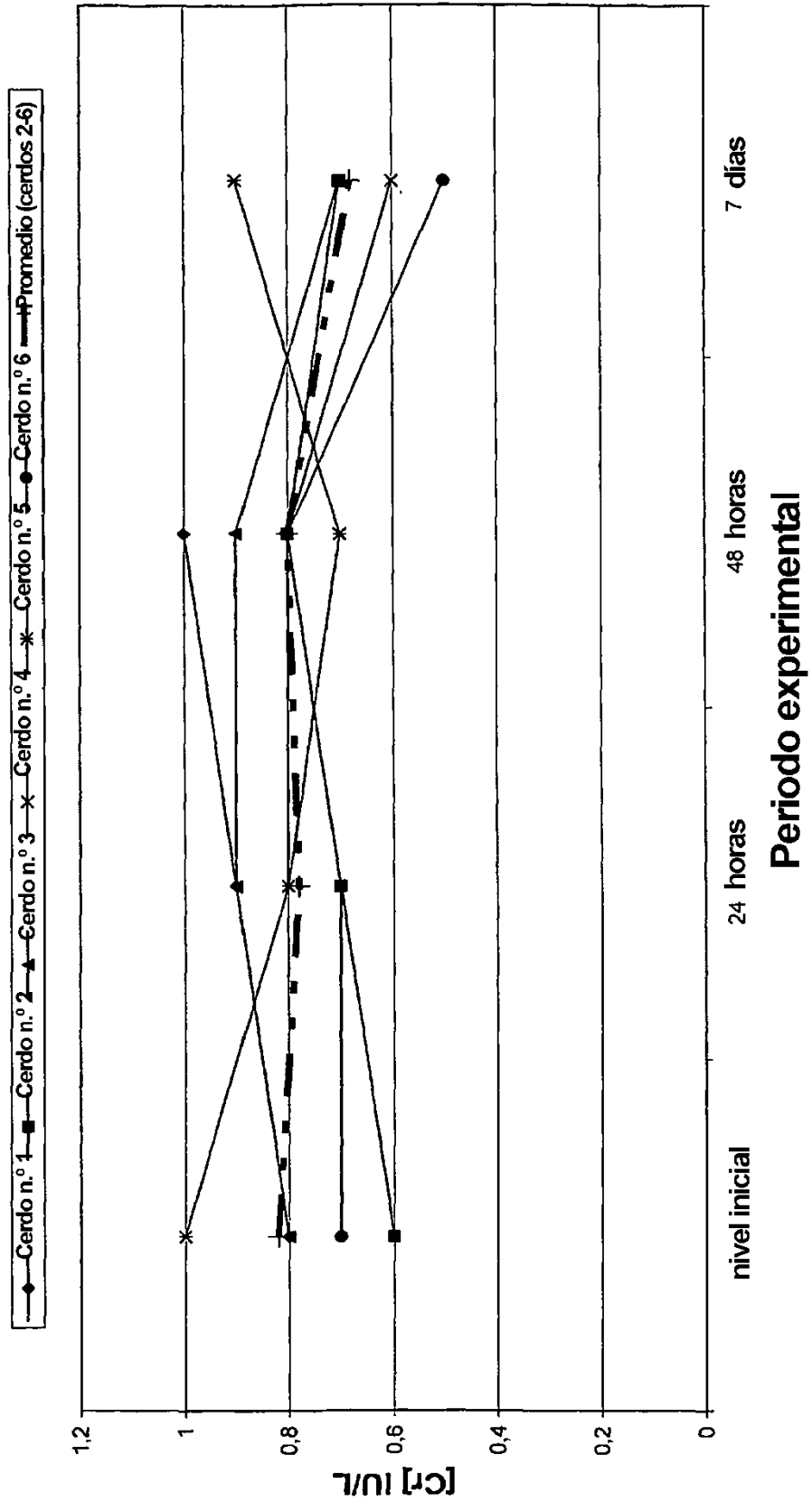


Fig. 6 (c) Análisis de niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN)
[Intervalo de valores : 6 - 30 mg/dL]



**Fig. 6 (d) Análisis de niveles de creatinina
[Intervalo de valores : 0,8 - 3,6 UI/L]**



**Fig. 7 (a) Análisis de niveles de creatina fosfoquinasa (CPK)
[Intervalo de valores : 311- 16.700 UI/L]**

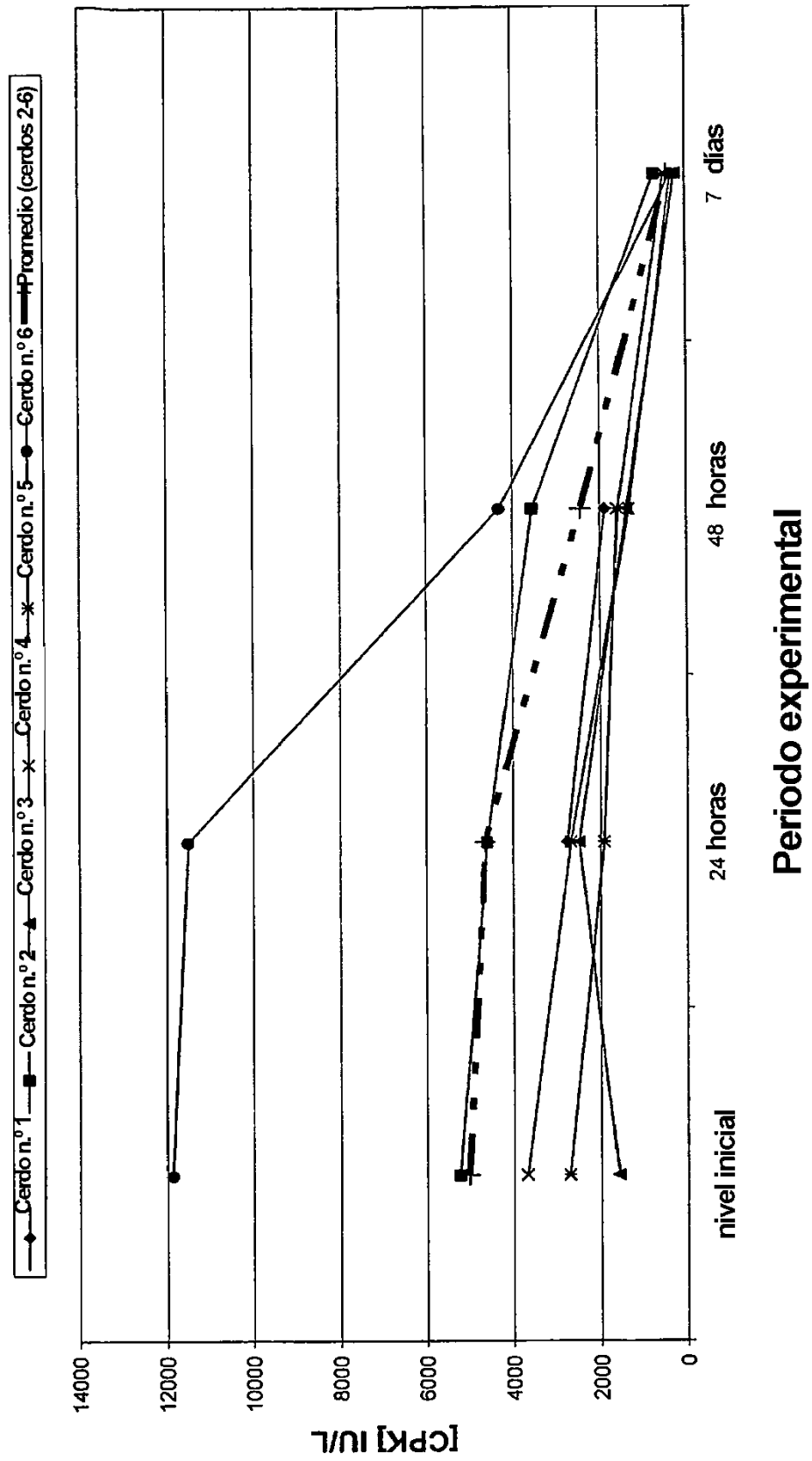


Fig. 7 (b) Análisis de niveles de SGPT (ALT)
[Intervalo de valores : 7 - 161 IU/L]

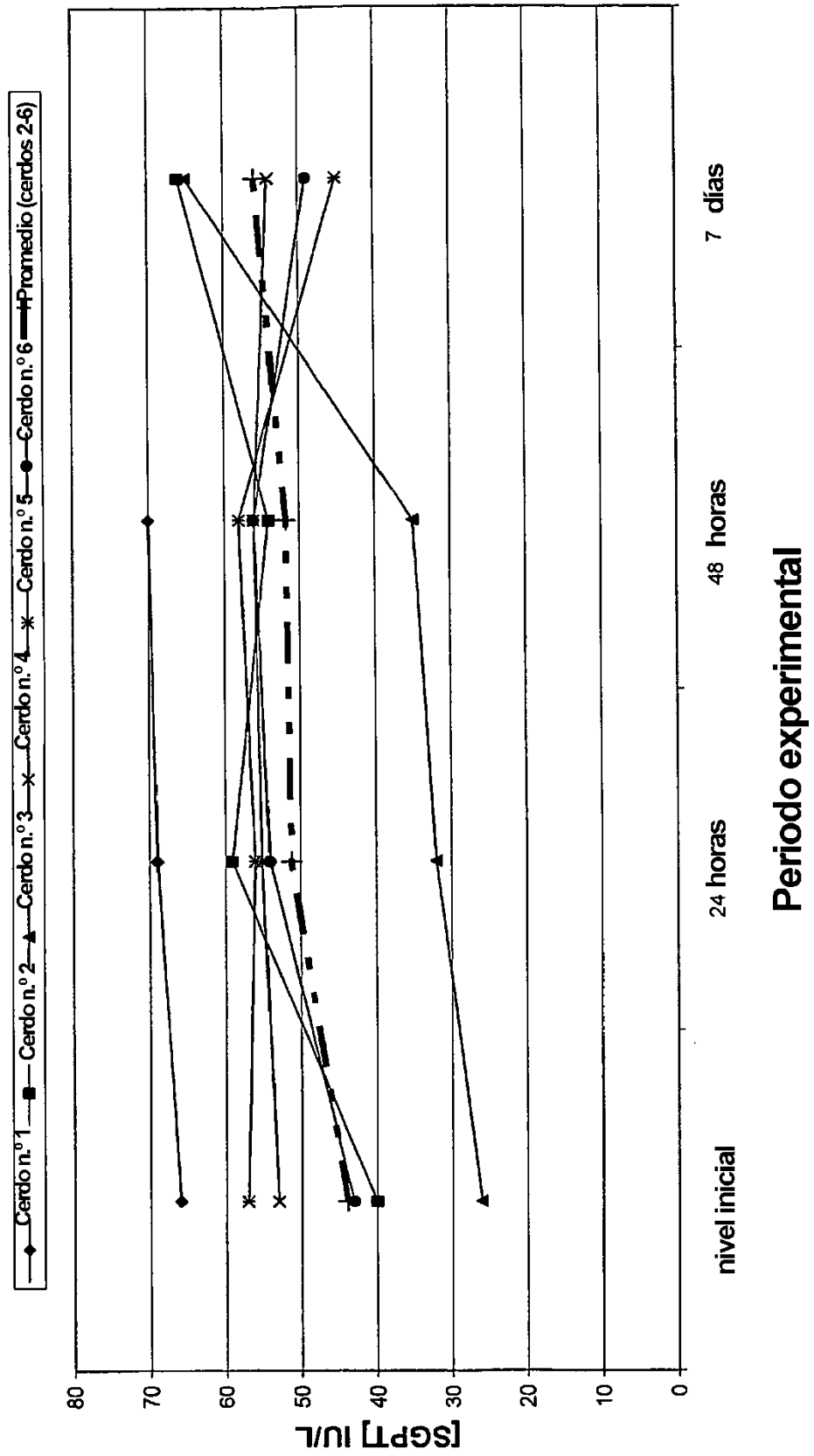
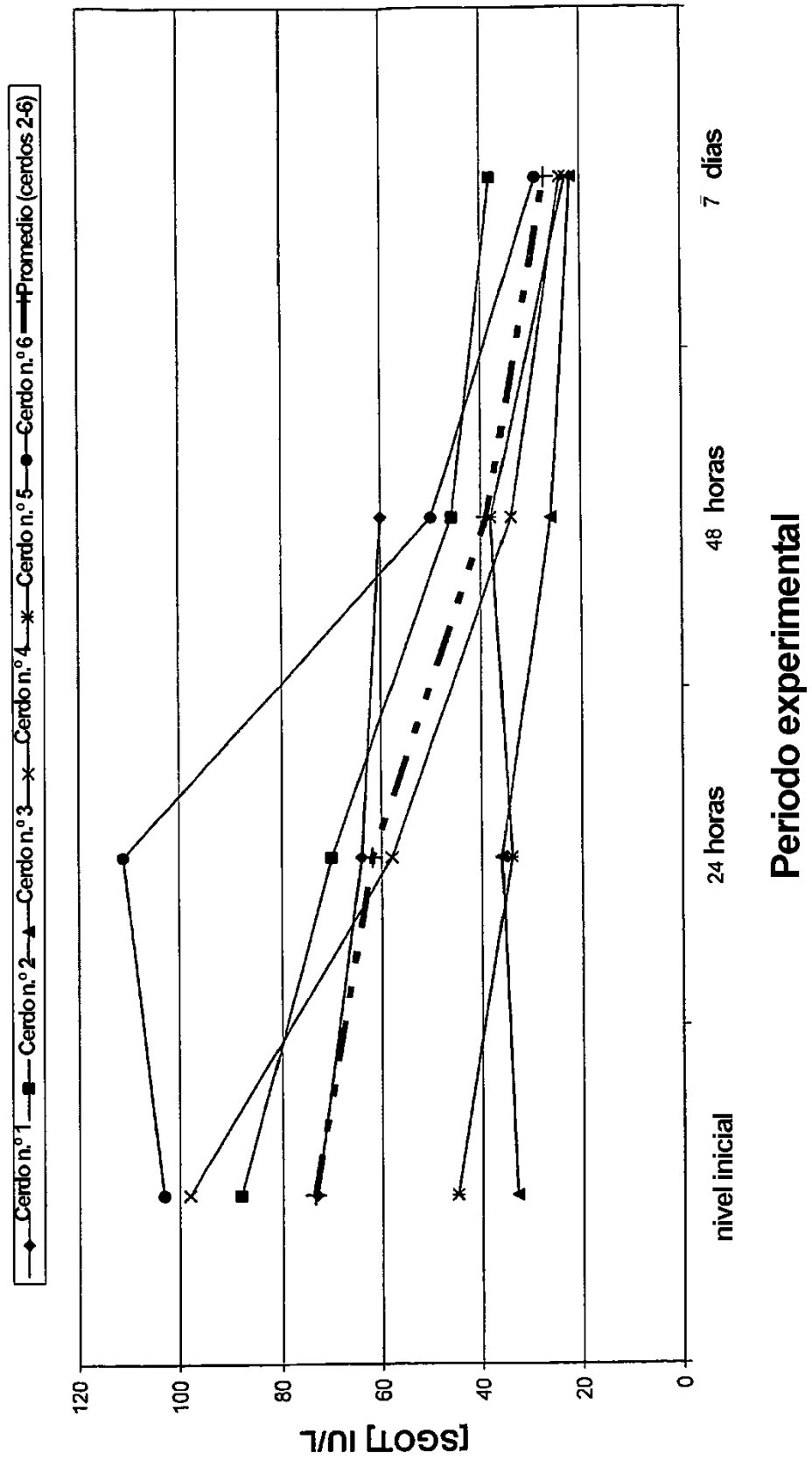


Fig. 7 (c) Análisis de niveles de SGOT (ALT)
[Intervalo de valores : 29 -1140 UI/L]



**Fig. 7 (d) Análisis de niveles de lactato deshidrogenasa [LDH]
[Intervalo de valores: 280 - 12.000 UI/L]**

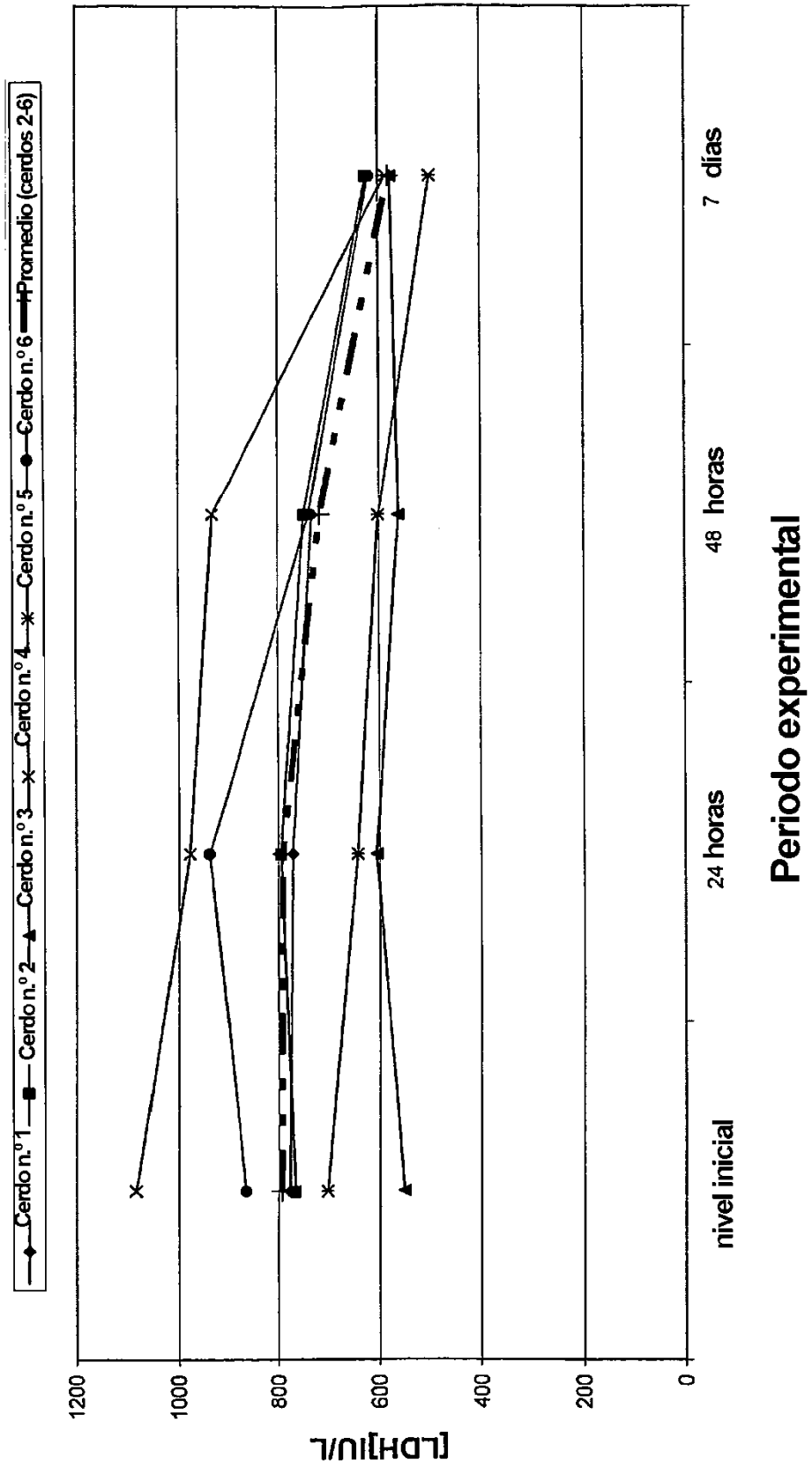


Fig. 8 (a) Análisis de recuento de RBC
[Intervalo de valores: $5 - 8 \times 10^6/\text{mm}^3$]

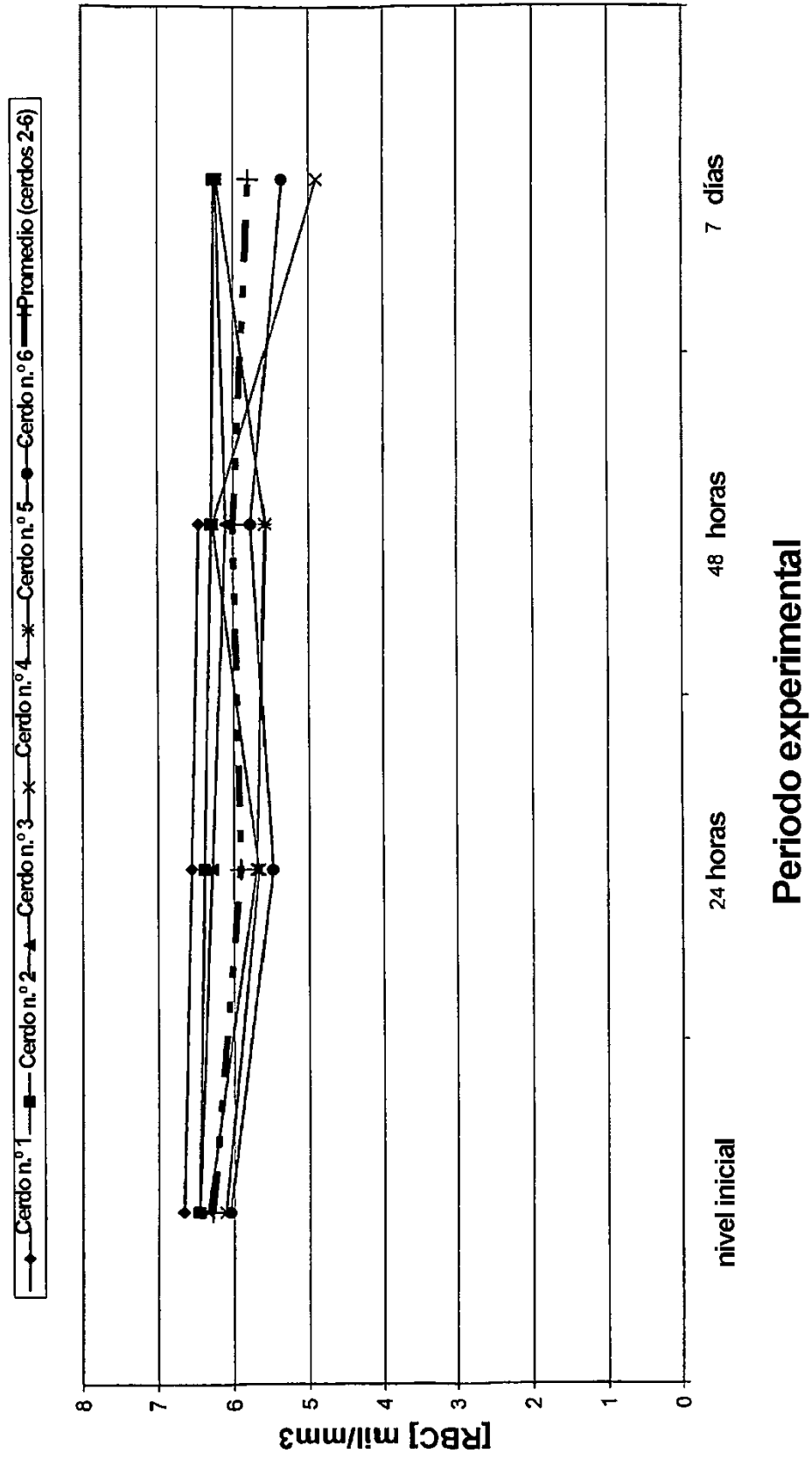


Fig. 8 (b) Análisis de niveles de hematocrito (Hct)
[Intervalo de valores : 32 - 50%]

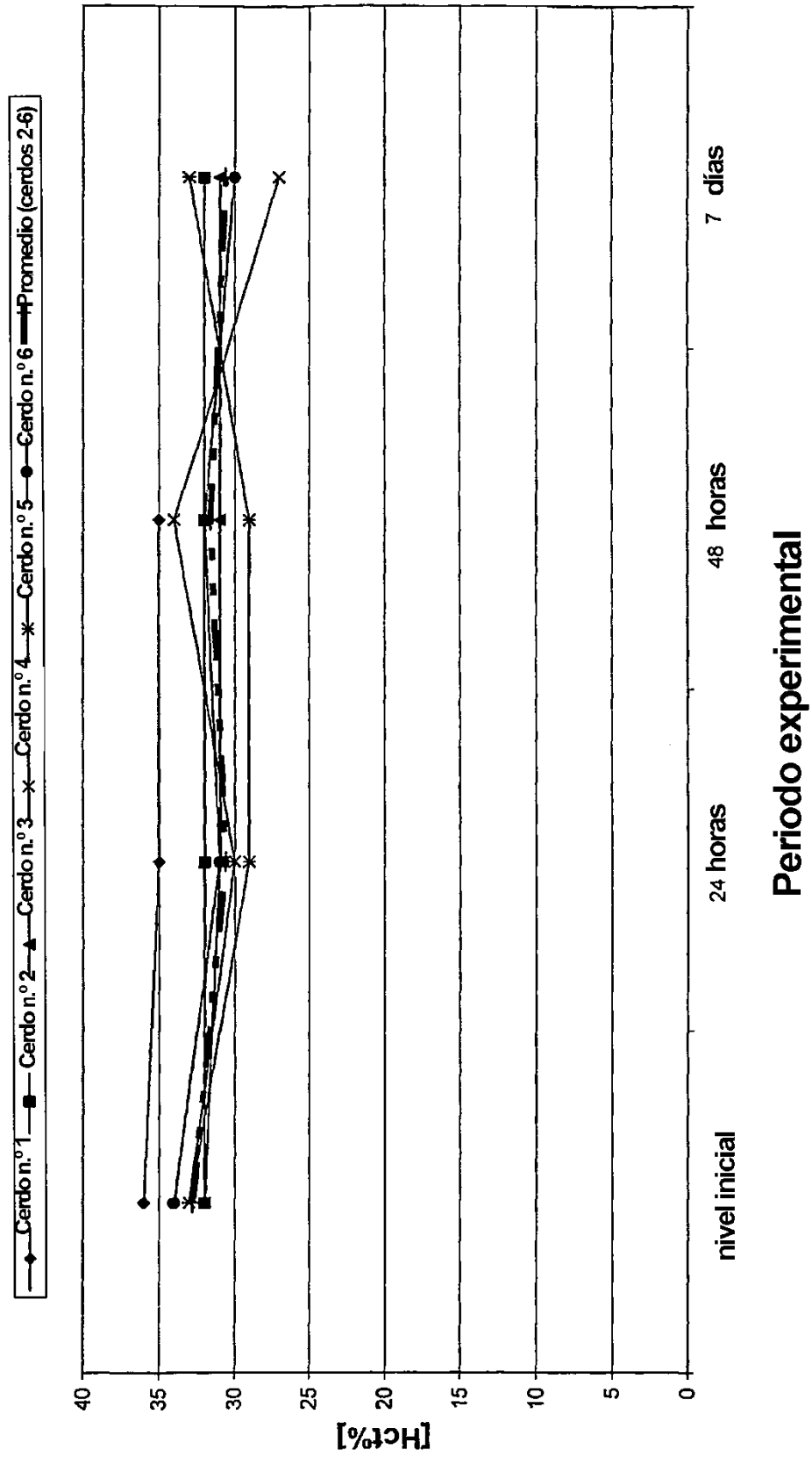
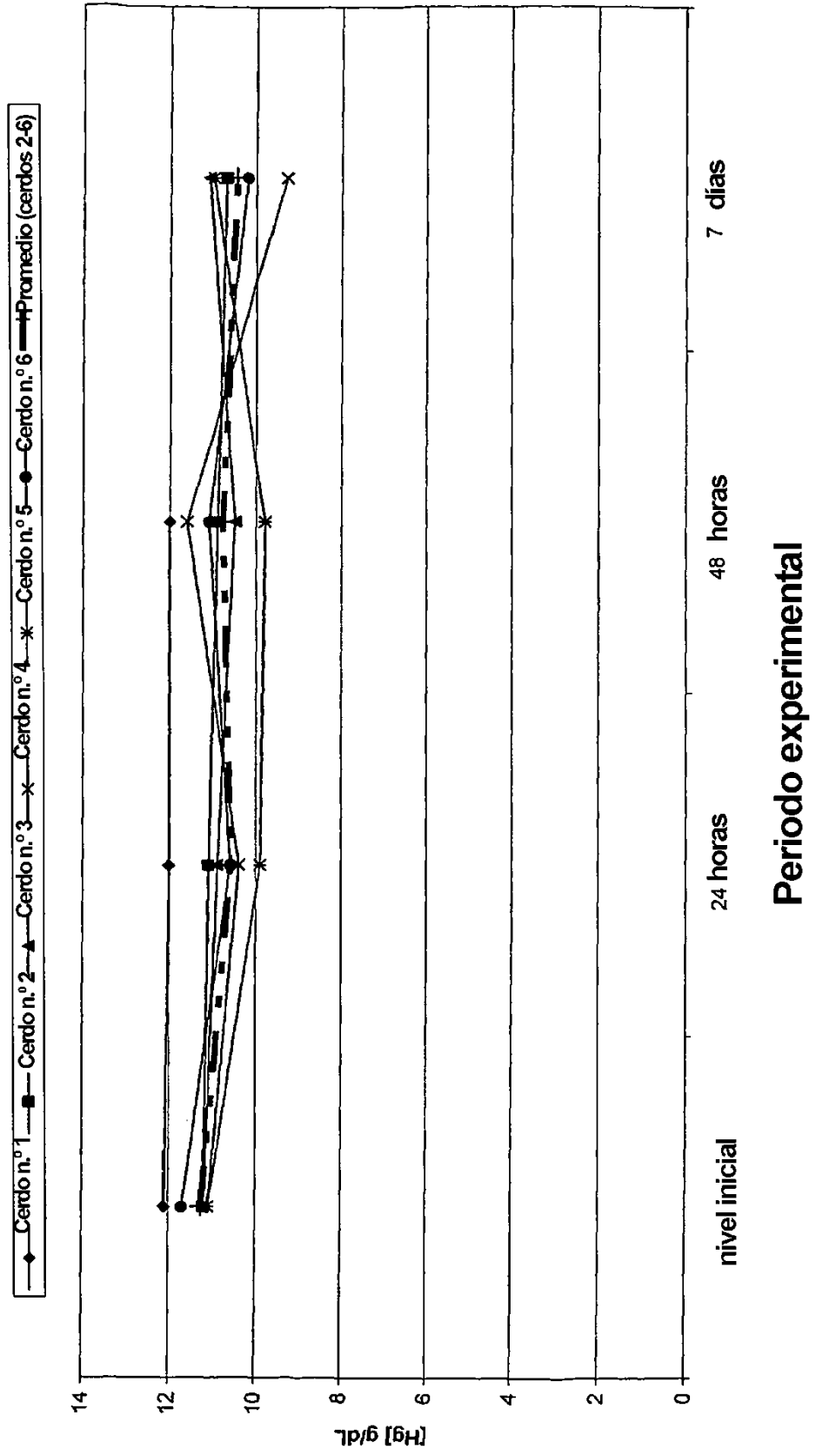


Fig. 8 (c) Análisis de niveles de hemoglobina
[Intervalo de valores : 10 - 16 g/dL]



**Fig. 8 (d) Análisis de recuento de linfocitos
[Intervalo de valores : 40 - 60%]**

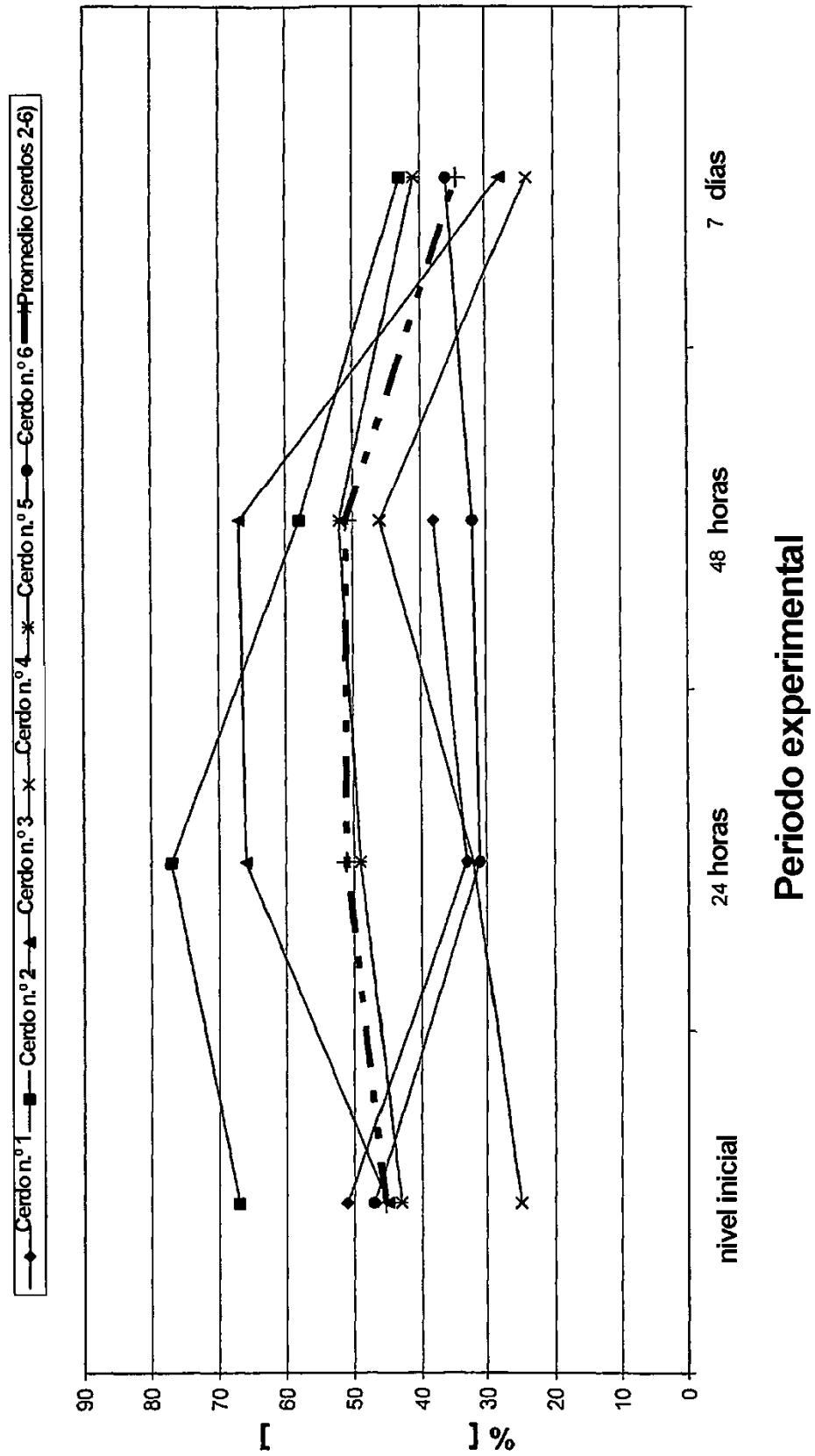


Fig. 8 (e) Análisis de recuento de WBC
[Intervalo de valores: 2 - 40 x 10⁶/mm³]

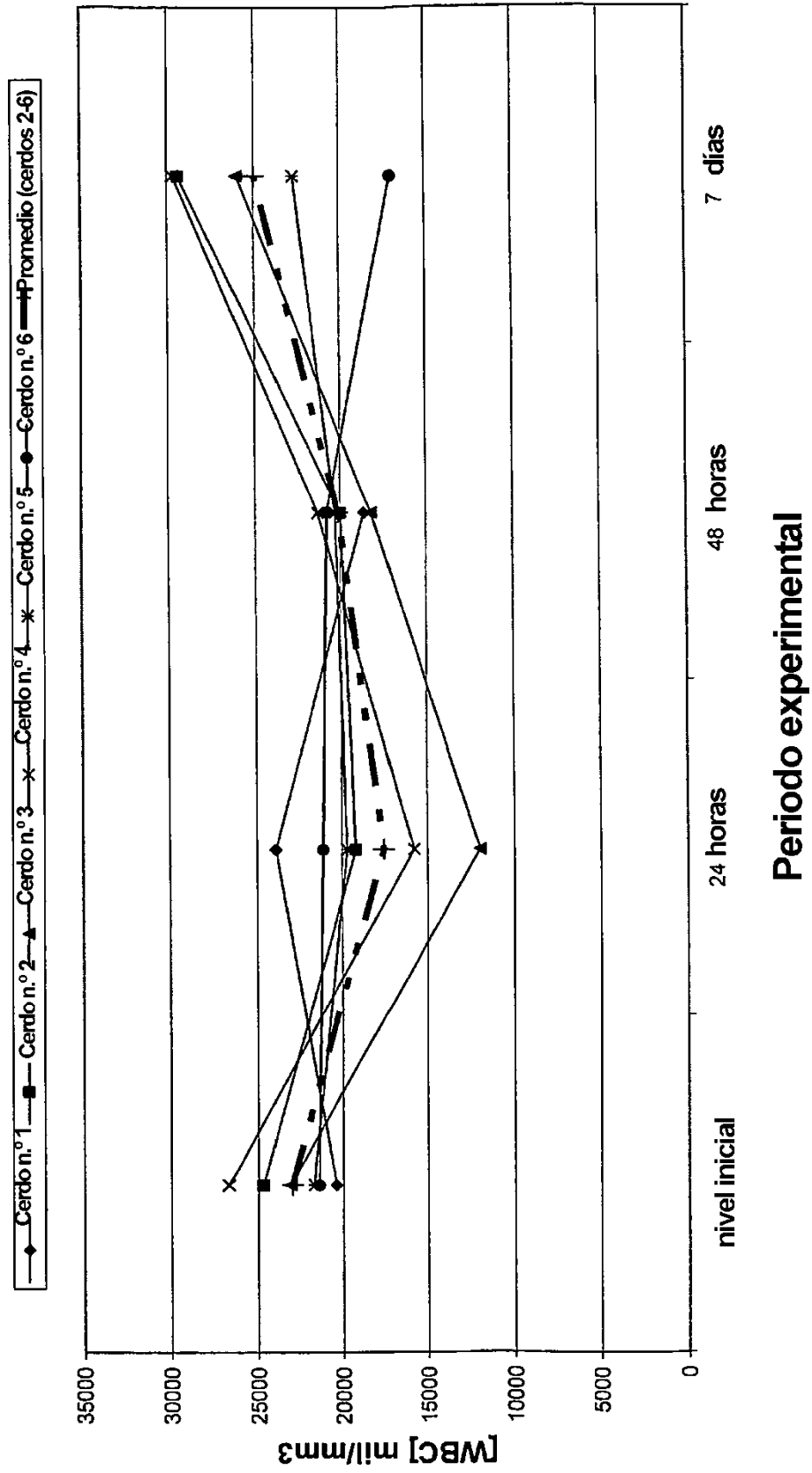
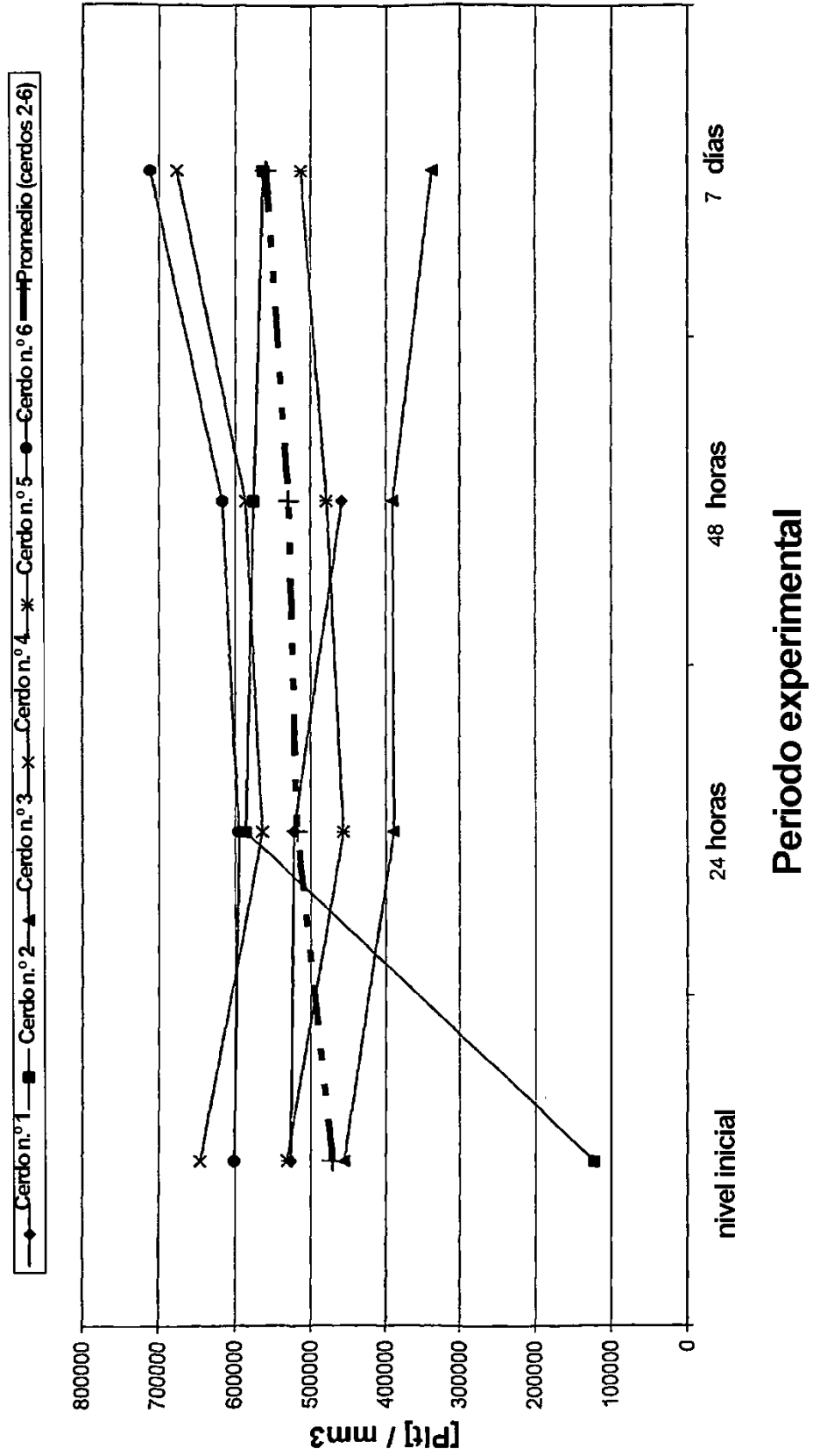
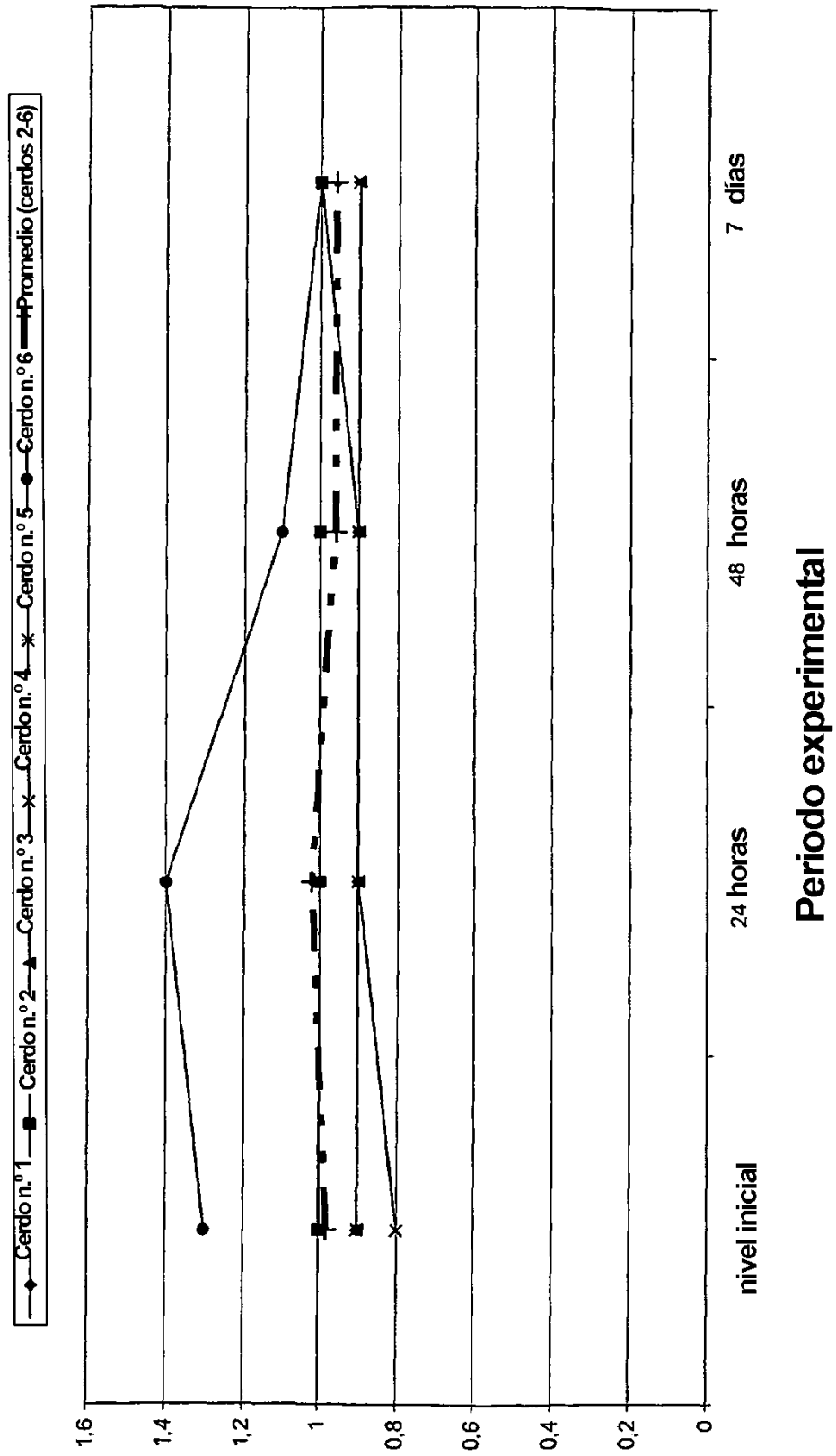


Fig. 9 (a) Análisis de recuento de plaquetas
[Intervalo de valores: 120.000 - 720.000/mm³]

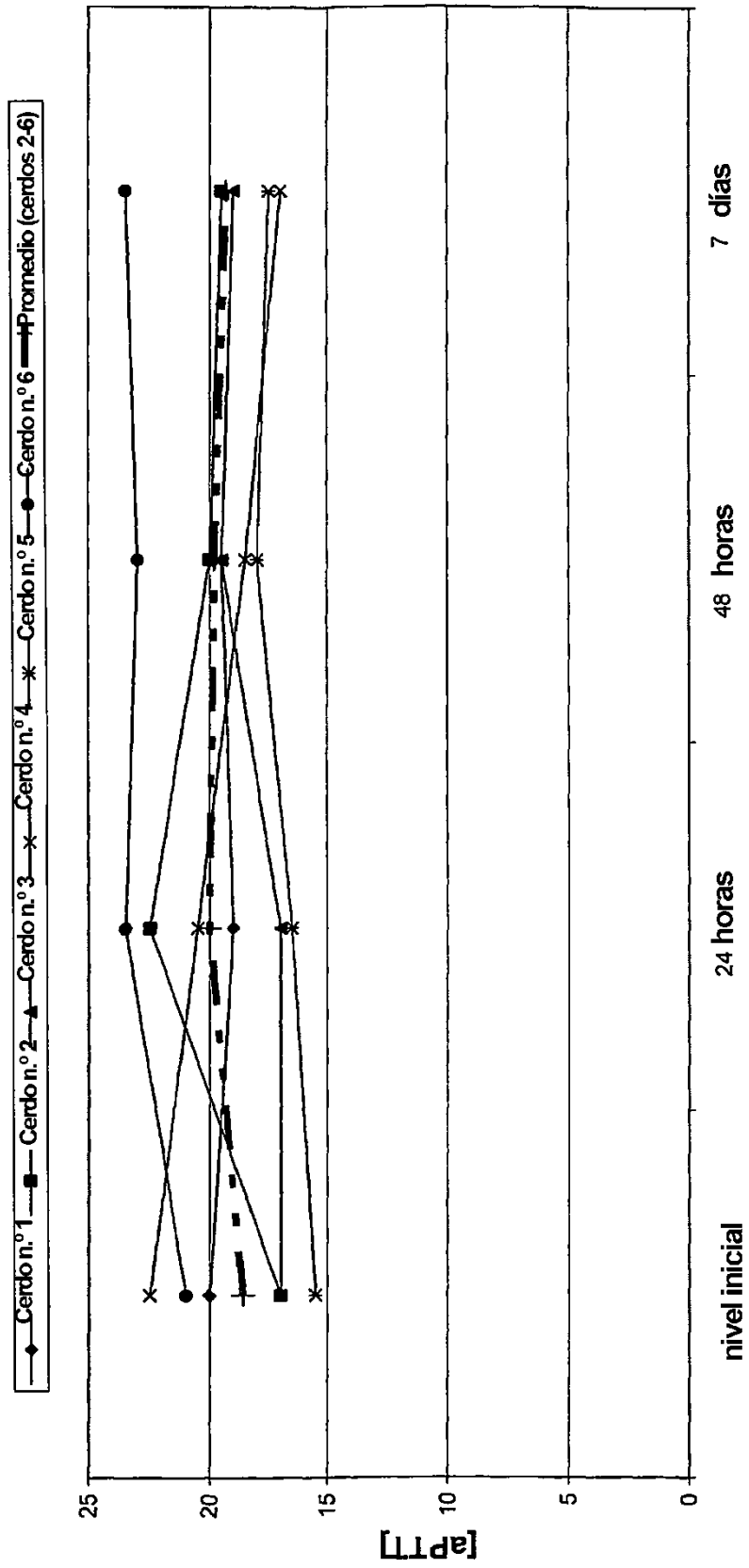


**Fig. 9 (b) Análisis de índices de coagulación de protrombina
[Intervalo de valores : (ISI) 0,8 - 1,4]**



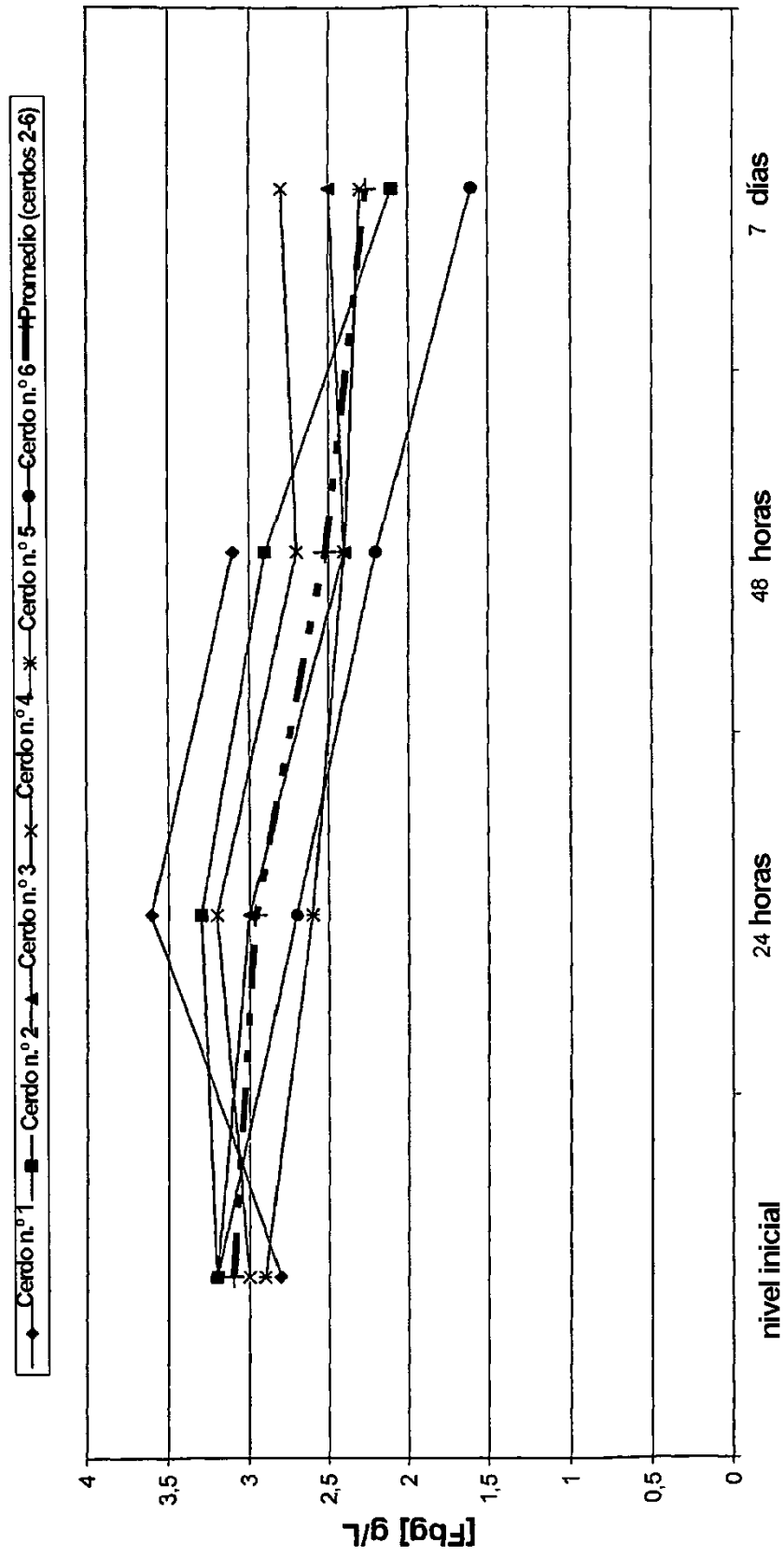
**Fig. 9 (c) Análisis de tiempo de tromboplastina parcial activada
(aPTT)**

[Intervalo de valores: 17,8 - 23,3 seg]



Periodo experimental

**Fig. 9 (d) Análisis de niveles fibrinógeno
[Intervalo de valores: 1 - 8 g/L]**



Periodo experimental

FIGURA 10

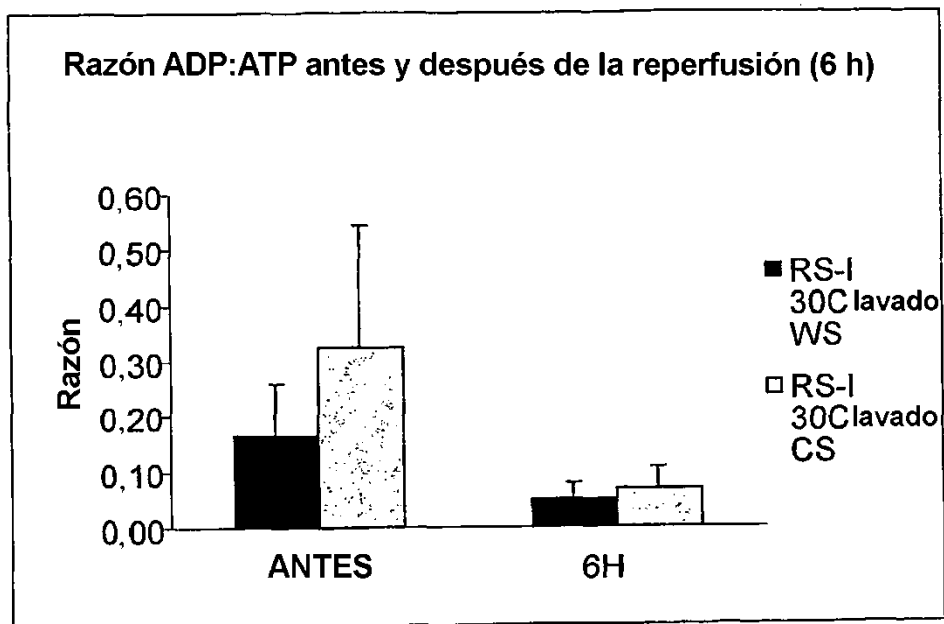
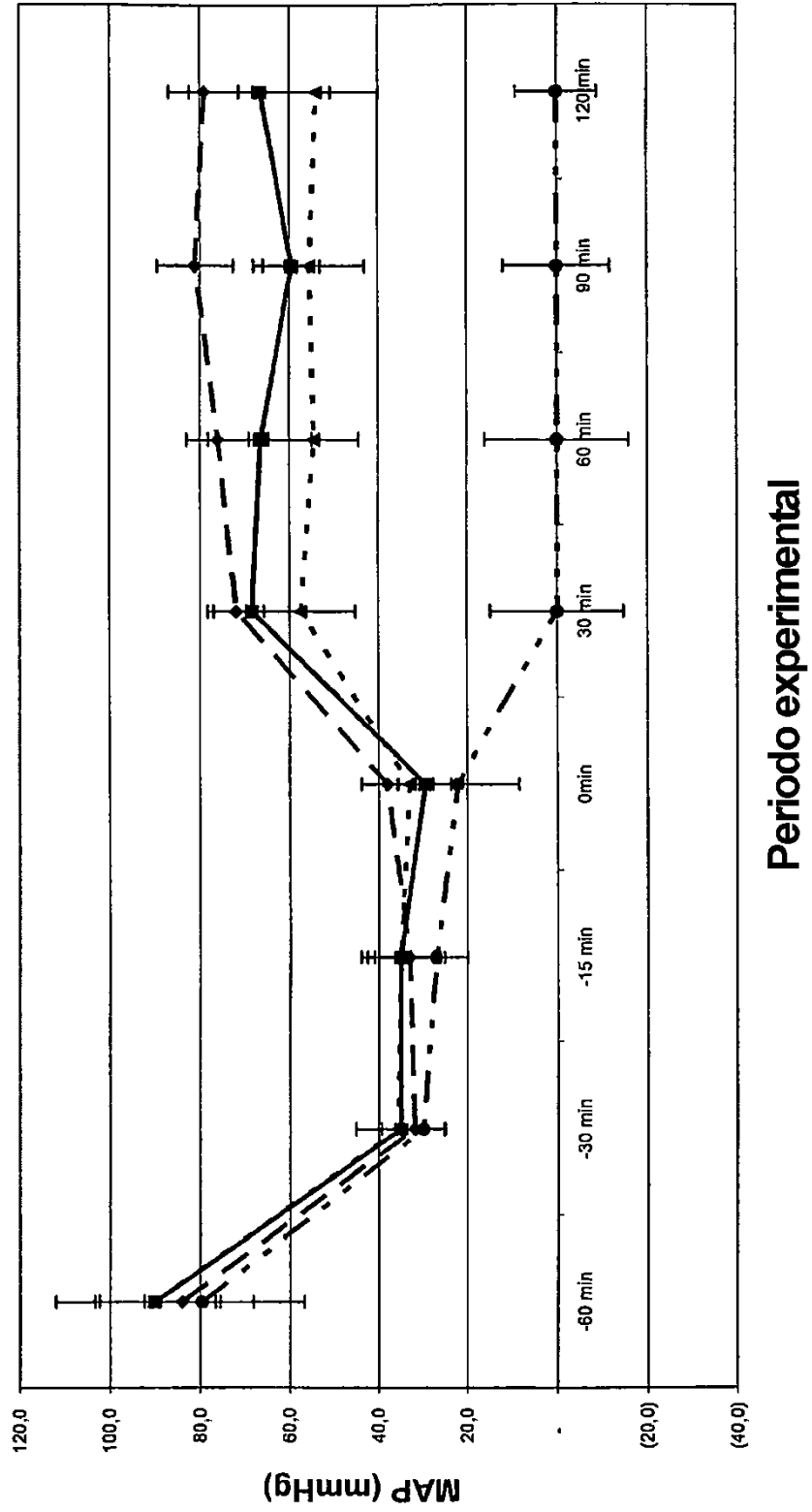


Fig. 11 Tensión arterial media (MAP) durante el periodo experimental



Periodo experimental

Fig. 12 Gasto cardiaco (CO) durante el periodo experimental

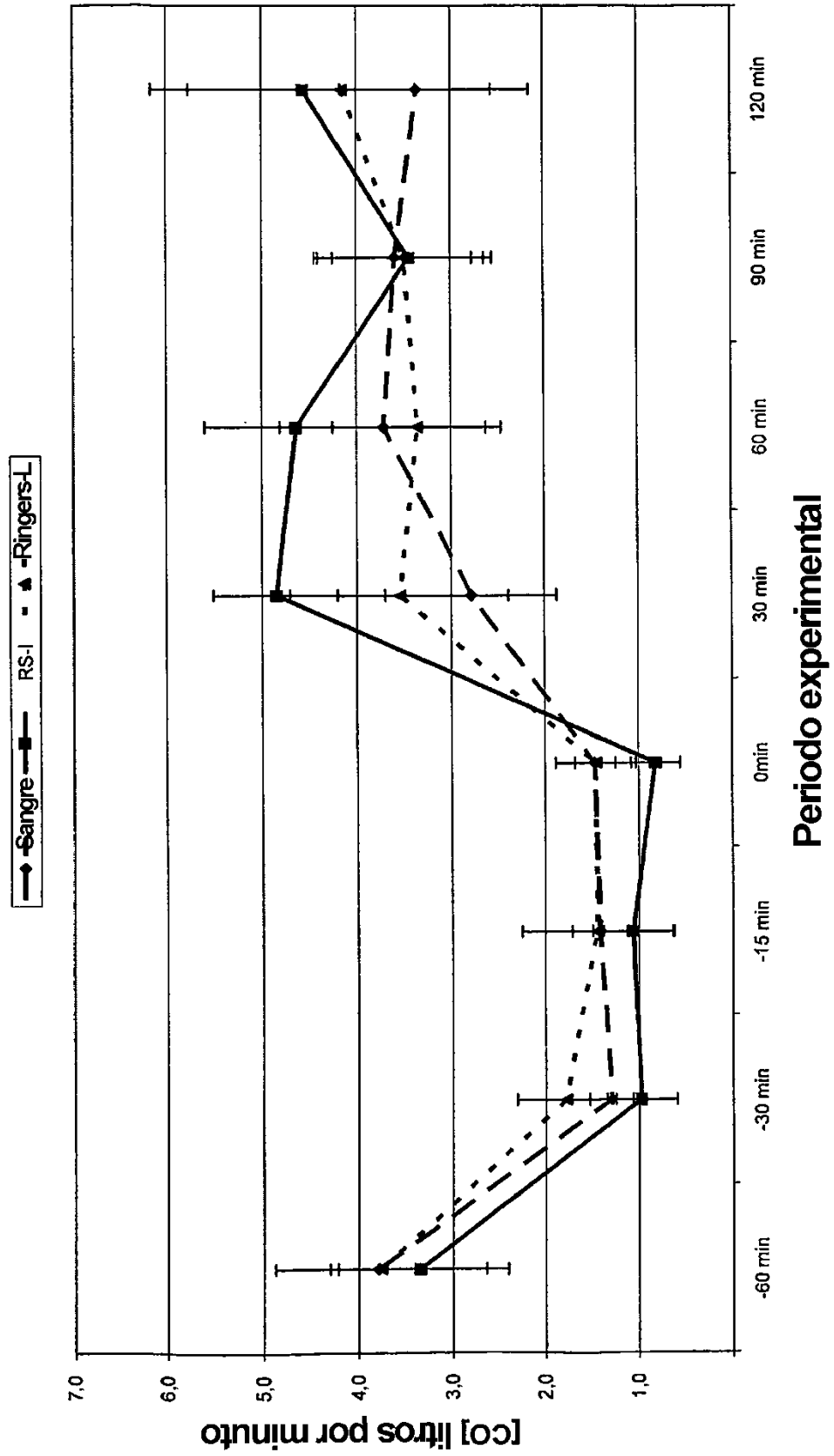


Fig. 13 Tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) durante el periodo experimental

