

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 549**

51 Int. Cl.:

A61K 35/44 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61M 39/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2010 E 10807761 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2509609**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la extracción de venas y autotransplante**

30 Prioridad:

08.12.2009 US 267640 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2014

73 Titular/es:

**VANDERBILT UNIVERSITY (50.0%)
305 Kirkland Hall, 2201 West End Avenue
Nashville, TN 37240, US y
THE UNITED STATES GOVERNMENT AS
REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF
VETERANS AFFAIRS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BROPHY, COLLEEN;
KOMALAVILAS, PADMINI;
CHEUNG-FLYNN, JOYCE;
HOCKING, KYLE y
EAGLE, SUSAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 549 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

Procedimientos y composiciones para la extracción de venas y autotransplante

Campo de la invención

5 La invención se refiere en general a los campos de vena autóloga, injerto de vena, conservación de vena, conservación de tejido, hiperplasia de la íntima, vasoespasmo, productos farmacéuticos, dispositivos y biología vascular.

Antecedentes de la invención

10 La vena safena mayor humana (VSH) sigue siendo el conducto más usado para derivación de arterias coronaria y periféricas. La VSH normalmente se extrae de la pierna con exposición quirúrgica directa o extracción endoscópica de la vena. Las ramas se ligan y la vena se extrae y se coloca en la "mesa negra" antes de la implantación. La mayoría de los cirujanos introducen la VSH en solución salina heparinizada a temperatura ambiente. La vena se canula en el extremo distal y se distiende manualmente (con una jeringuilla) con solución salina heparinizada. Esto permite la identificación y unión de las ramas laterales que se han perdido durante la extracción. Esta distensión manual conduce a daños en la vena. Las venas también se marcan con un marcador de piel quirúrgico para optimizar la orientación durante la implantación.

15 De más de 1 millón de procedimientos de derivación coronaria que se realizan todos los años en el mundo, el 10-15% de los injertos de vena coronaria sufren una oclusión trombótica temprana; un 10-15% adicional se ocluyen en los siguientes 1-5 años debido a hiperplasia de la íntima y un 30-40% más se incluyen en los siguientes 5-7 años por la aterosclerosis progresiva superpuesta sobre la hiperplasia de la íntima. Menos de la mitad de los injertos de venas siguen permeables tras 12 años (Motwani y Topol, 1998). La colusión de los injertos venosos conduce a infarto de miocardio, pérdida de extremidades y muerte.

20 La causa principal del fallo de las derivaciones arteriales es la hiperplasia de la íntima (Clowes y Reidy, 1991). A pesar de los muchos recientes avances tecnológicos en las intervenciones vasculares, la hiperplasia de la íntima sigue siendo un problema caro y mórbido no resuelto. La hiperplasia de la íntima está mediada por una secuencia de acontecimientos que incluyen la proliferación del músculo liso vascular, la migración, la modulación fenotípica y la producción de matriz extracelular (Allaire y Clowes, 1997; Mosse et al., 1985). Este proceso conduce a un estrechamiento patológico de la luz del vaso, estenosis del injerto y, en última instancia, fallo del injerto (LoGerfo et al., 1983).

25 Una serie de fármacos que se han probado para determinar su capacidad para inhibir la hiperplasia de la íntima han fracasado en los ensayos clínicos. Los agentes antitrombóticos y antiplaquetarios, tales como warfarina, clopidogrel y aspirina, tiene poco o ningún efecto sobre la hiperplasia de la íntima (Kent y Liu, 2004). Se ha demostrado que las endoprótesis vasculares que liberan fármacos son eficaces en la prevención de la reestenosis tras angioplastia coronaria; no obstante, no se ha aprobado ninguna sustancia terapéutica para conductos autólogos. Dos ensayos clínicos de tamaño grande para la prevención del fallo de los injertos de venas vasculares coronarios y periféricos usando un debo E2F (una secuencia corta de ADN que se une a factores de transcripción y secuestra estas proteínas) para prevenir la proliferación del músculo liso fallaron en su criterio de valoración principal. Los datos de estos ensayos clínicos grandes sugieren que simplemente limitando la respuesta de proliferación no es adecuado para prevenir la hiperplasia de la íntima (Mann et al., 1999; Alexander et al., 2005). Por tanto, se tiene que apuntar a otros mecanismos distintos a la proliferación para el éxito de la prevención del fallo del injerto venoso.

30 La lesión en el injerto venoso durante la extracción produce vasoespasmo e hiperplasia de la íntima, que hace que se ocluyan los injertos. Por tanto, sería de gran beneficio identificar nuevos procedimientos quirúrgicos y terapéuticos para prevenir la lesión en el injerto durante la extracción y la posterior hiperplasia de la íntima.

Sumario de la invención

35 Por tanto, de acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento de tratar un explante venoso antes del transplante que comprende (a) estabilizar un explante venoso con erioflavina/Colorante Azul nº 1 para producir un explante venoso estabilizado, en el que la con erioflavina/Colorante Azul nº 1 se aplica al explante venoso con un rotulador y/o con una solución tampón que contiene el erioflavina/Colorante Azul nº 1 a un pH de 7,0 – 7,6; y (b) preservar la viabilidad funcional del explante venoso estabilizado. En una realización se puede aplicar erioflavina/Colorante Azul nº 1 al explante venoso mediante un rotulador que comprende un colorante y en el que el colorante comprende erioflavina/Colorante azul nº 1. En otra realización, se puede aplicar erioflavina/Colorante Azul nº 1 al explante venoso poniendo en contacto el explante venoso con una solución tamponada que comprende el erioflavina/Colorante Azul nº 1 a un pH de 7,0-7,6. El procedimiento puede además restaurar la viabilidad funcional del explante venoso que antes de la etapa (a) no era viable. La viabilidad funcional del músculo liso se define en el presente documento como la capacidad para contraerse en respuesta a la despolarización o a agonistas. Para el endotelio, la viabilidad se define la capacidad de los vasos recontraídos para relajarse a la respuesta al acetilcolina. Adicionalmente, la solución tamponada puede comprender además heparina, solución

salina tamponada, MOPS, HEPES, PIPES, acetato y/o Plasmalyte. El pH de la solución tamponada puede ser, por ejemplo, 7,35-7,45 o 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6.

Adicionalmente, la solución tamponada puede comprender además sulfato de magnesio o solución salina equilibrada de Hank.

- 5 Adicionalmente, la solución tamponada puede comprender además uno o más de un agente anticontráctil, un agente antioxidante, un oligosacárido, un agente coloidal, un agente antiinflamatorio, un conservante de la función endotelial, un regulador metabólico, un hidrogel, un inhibidor de la proteína del shock térmico 27 (HSP27), un regulador de HSP20 y/o un inhibidor de la quinas MAPKAP 2.

- 10 Adicionalmente, el agente anticontráctil puede ser al menos uno de un inhibidor de la fosfodiesterasa (p. ej., papaverina, sildenafilo, tadalafilo, vardenafilo, udenafilo, avanafilo cilistizol, pentoxifilina, dipiridamol o una combinación de los mismos), un bloqueante de los canales de calcio (p. ej., amlodipina, aranidipina, azelnidipina, barnidipina, cilnidipina, clevidipina, efonidipina, felodipina, lacidipina, lercanidipina, mandipina, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, netrendipina, prandipina o una combinación de los mismos), un donante de óxido nítrico (p. ej., nitroprusiato sódico, nitroglicerina o una combinación de las mismas), o un análogo de nucleótidos cíclicos (dibutilil cAMP, dibutilil cGMP o una combinación de los mismos o una combinación de los mismos).

Adicionalmente, el agente antioxidante puede ser, por ejemplo, N-acetilcisteína, alopurinol, glutatión, manitol, ácido ascórbico, un tocoferol, un tocotrienol o un fenol de té verde o una combinación de los mismos.

- 20 Además, el oligosacárido puede ser, por ejemplo, ácido lactobiónico, rafinosa o trehalosa, o una combinación de los mismos.

Adicionalmente, el agente coloidal puede ser, por ejemplo, almidón de hidroxietilo, dextrano, sangre o albúmina, o una combinación de los mismos.

- 25 Adicionalmente, el agente antiinflamatorio puede ser, por ejemplo, un corticosteroide (p. ej., dexametasona, hidrocortisona, cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona o una combinación de los mismos) o un antiinflamatorio no esteroideo (p. ej., aspirina, ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico o una combinación de los mismos) un inhibidor de la MAPKAP quinasa 2, anti-TNF- α , anti-IL-1- β , un inhibidor de la Cox-2 o una combinación de los mismos.

- 30 Adicionalmente, el conservante de la función endotelial puede ser, por ejemplo, un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (p. ej., enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benazepril, monopril o una combinación de los mismos), un inhibidor del receptor de angiotensina (p. ej., losartán), una estatina (p. ej., atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina o una combinación de los mismos), metformina, aminoimidazol carboxamida ribonucleótido (AICAR) o un estrógeno (p. ej., estriol, estradiol, estrona, 17 β -estradiol o una combinación de los mismos).

- 35 Adicionalmente, el regulador metabólico puede ser, por ejemplo, glucosa, adenosina amilina, péptido génico relacionado con la calcitonina, insulina o una combinación de los mismos.

Adicionalmente, el hidrogel puede estar compuesto de, por ejemplo, un polisacárido natural tal como alginato, dextrano, chitosano y glucosaminoglucano o un polímero hidrófilo tal como polietilenglicol, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polihidroxibutirato o poli(n-isopropilacrilamida).

- 40 Adicionalmente, el inhibidor de HSP27 puede ser, por ejemplo, un ARNsi o ARNm que inhibe la expresión de HSP27, un anti-ARNm que potencia la expresión de HSP20 o una combinación de los mismos.

- 45 Adicionalmente, el inhibidor de la MAPKAP quinasa 2 puede ser, por ejemplo, un inhibidor peptídico. En la realización en la que se aplica erioflavina/Colorante Azul n° 1 en el explante venoso poniendo en contacto el explante venoso con una solución tamponada que comprende el erioflavina/Colorante Azul n° 1 a un pH de 7,0 – 7,6, después el explante venoso se puede marcar con un marcador sin alcohol, tal como, entre otros, erioflavina/Colorante azul n° 1, indigotina, Rojo Allura AC o azul G brillante.

El procedimiento puede comprender además lavar la luz del explante venoso de forma que la presión de lavado interna no supere los 20 kPa.

- 50 La presente invención también proporciona un rotulador quirúrgico estéril en el que (i) el rotulador es cargado con un colorante que comprende erioflavina/Colorante Azul n° 1 o (ii) el rotulador está vacío y se proporciona con erioflavina/Colorante Azul n° 1 en una solución estéril o en forma de reactivo estéril para que un usuario cargue el rotulador.

En otra realización se proporciona un kit de explante venoso que comprende

- (a) el rotulador quirúrgico como se he definido anteriormente; y

(b) una solución tamponada fisiológica estéril o reactivos estériles para fabricar la misma. La solución tamponada puede comprender, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, MOPS, HEPES, PIPES, acetato o Plasmalyte. La solución tamponada puede estar a un pH de 7,0-7,6, o de 7,35-7,45;

en el que el kit comprende opcionalmente además uno o más de

5 (c) un recipiente adecuado para bañar un explante venoso;

(d) uno o más de heparina, un agente anti-contráctil, un agente antioxidante, un oligosacárido, un agente coloidal, un agente antiinflamatorio, un conservante de la función endotelial, un regulador metabólico, un hidrogel, un inhibidor de la proteína del shock térmico 27, sulfato de magnesio y/o un inhibidor de la quinasa MAPKAP 2;

10 (e) el dispositivo para lavar la luz de un explante venoso; en el que dicho dispositivo está diseñado para prevenir presiones de lavado en el interior del explante venoso superiores a 26,7 kPa o superiores a 20 kPa. El dispositivo puede comprender una jeringuilla y/o un catéter y una válvula de venteo. Adicionalmente, la jeringuilla o catéter puede comprender una punta en forma de bala que comprende una luz para su introducción en un extremo proximal de dicho explante venoso. Adicionalmente, el kit puede además comprender una pinza
15 diseñada para sujetar dicho explante venoso.

En el presente documento también se describe un dispositivo para lavar la luz de un explante venoso; dicho dispositivo está diseñado para prevenir las presiones de lavado dentro del explante venoso de más de 26,7 kPa o más de 20 kPa. El dispositivo puede comprender una jeringuilla y/o catéter y una válvula de venteo. La jeringuilla o catéter puede comprender una punta con forma de bala que comprende una luz para introducir un extremo distal de
20 dicho explante venoso. Adicionalmente, el dispositivo puede comprender además un tapón con forma de bala que carece de una luz para introducir un extremo proximal de dicho explante venoso. Adicionalmente, el dispositivo puede comprender además una pinza diseñada para soportar dicho explante venoso.

Todavía otra realización más comprende una solución tamponada estéril de pH 7.0-7.6, en la que dicha solución tamponada comprende además erioflavina/Colorante Azul nº 1 y opcionalmente comprende además heparina. Adicionalmente, la solución tamponada puede comprender solución salina tamponada con fosfato, MOPS, HEPES, PIPES, acetato o Plasmalyte. Adicionalmente, el pH puede ser 7,35-7,45 o 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6.

25 Adicionalmente, la solución tamponada puede comprender además sulfato de magnesio o solución salina equilibrada de Hanks.

Adicionalmente, la solución tamponada puede comprender además uno o más de un agente anticontráctil, un agente antioxidante, un oligosacárido, un agente coloidal, un agente antiinflamatorio, un conservante de la función endotelial, un regulador metabólico, un hidrogel, un inhibidor de la proteína del shock tóxico 27 (HSP27), un regulador de HSP20, un inhibidor de la MAPKAP quinasa 2 y/o combinaciones de los mismos,

30 Adicionalmente, la solución tamponada puede comprender además uno o más de un agente anticontráctil, un agente antioxidante, un oligosacárido, un agente coloidal, un agente antiinflamatorio, un conservante de la función endotelial, un regulador metabólico, un hidrogel, un inhibidor de la proteína del shock tóxico 27 (HSP27), un regulador de HSP20, un inhibidor de la MAPKAP quinasa 2 y/o combinaciones de los mismos,

Adicionalmente, el agente anticontráctil puede ser un inhibidor de la fosfodiesterasa (p. ej., papaverina, sildenafil, tadalafil, vardenafil, udenafil, avanafil, cilistazol, pentoxifilina, dipiridamol o una combinación de los mismos), un bloqueante de los canales de calcio (p. ej., amlodipina, arandipina, azelnidipina, barnidipina, cilnidipina, clevidipina, efonidipina, felodipina, lacidipina, lercanidipina, mandipina, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, netrendipina, prandipina), un donante de óxido nítrico (nitroprusiato sódico, nitroglicerina o una combinación de los mismos) o un análogo de nucleótidos cíclicos (p. ej., dibutilil cAMP, dibutilil cGMP o una combinación de los mismos).

35 Adicionalmente, el agente anticontráctil puede ser un inhibidor de la fosfodiesterasa (p. ej., papaverina, sildenafil, tadalafil, vardenafil, udenafil, avanafil, cilistazol, pentoxifilina, dipiridamol o una combinación de los mismos), un bloqueante de los canales de calcio (p. ej., amlodipina, arandipina, azelnidipina, barnidipina, cilnidipina, clevidipina, efonidipina, felodipina, lacidipina, lercanidipina, mandipina, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, netrendipina, prandipina), un donante de óxido nítrico (nitroprusiato sódico, nitroglicerina o una combinación de los mismos) o un análogo de nucleótidos cíclicos (p. ej., dibutilil cAMP, dibutilil cGMP o una combinación de los mismos).

40 Adicionalmente, el agente antioxidante puede ser, por ejemplo, N-acetilcisteína, alopurinol, glutatión, manitol, ácido ascórbico, un tocoferol, un tocotrienol o un fenol del té verde o una combinación de los mismos.

El oligosacárido puede ser, por ejemplo, ácido lactobiónico, rafinosa, trehalosa o una combinación de los mismos.

El agente coloidal puede ser, por ejemplo, hidroxietilalmidón, dextrano o albúmina o una combinación de los mismos.

45 El agente antiinflamatorio puede ser, por ejemplo, un corticosteroide (p. ej., dexametasona, hidrocortisona, cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona o una combinación de los mismos), un antiinflamatorio no esteroideo (p. ej., aspirina, ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico o una combinación de los mismos), un inhibidor de la MAPKAP quinasa 2, anti-TNF- α , anti-IL-1- β , un inhibidor de la Cox-2 o una combinación de los mismos.

Adicionalmente, el conservante de la función endotelial puede ser un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (p. ej., enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benazepril, monopril o una combinación de los mismos), un inhibidor del receptor de angiotensina (p. ej., losartán), una estatina (p. ej., atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina o una combinación de los mismos), metformina, un estrógeno (p. ej., estriol, estradiol, estrona, 17 β -estradiol o una combinación de los mismos) o una combinación de los mismos.

50 Adicionalmente, el conservante de la función endotelial puede ser un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (p. ej., enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benazepril, monopril o una combinación de los mismos), un inhibidor del receptor de angiotensina (p. ej., losartán), una estatina (p. ej., atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina o una combinación de los mismos), metformina, un estrógeno (p. ej., estriol, estradiol, estrona, 17 β -estradiol o una combinación de los mismos) o una combinación de los mismos.

Adicionalmente, el regulador metabólico puede ser, por ejemplo, glucosa, adenosina, amilina, péptido génico relacionado con la calcitonina, insulina o una combinación de los mismos.

5 Adicionalmente, el hidrogel puede estar compuesto por un polisacárido natural, tal como alginato, dextrano, chitosano, y glicosaminoglicano o un polímero hidrófilo tal como polietilenglicol, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polihidroxibutirato o poli(n-isopropilacrilamida).

Adicionalmente, el inhibidor de la HSP27 puede ser, por ejemplo, un ARNsi o ARNmi que inhibe la expresión de HSP27, un anti-ARNmi que potencia la expresión de HSP20 o una combinación de los mismos.

El inhibidor de la MAPKAP quinasa 2 puede ser, por ejemplo, un inhibidor peptídico.

10 Por tanto, las composiciones de la presente invención tienen amplios usos, incluyendo el uso en la asistencia sanitaria proporcionando dispositivos médicos estériles y esterilización y descontaminación de superficies.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención también proporciona un colorante que comprende erioflavina/Colorante Azul nº 1 para su uso en el marcaje de una vena en un paciente, antes de la extracción de la vena del paciente.

15 La presente invención también proporciona el uso de erioflavina/Colorante Azul nº 1 para marcar un explante venoso.

La presente invención también proporciona el uso de erioflavina/Colorante Azul nº 1 para estabiliza y/o conservar o restaurar la viabilidad funcional de un explante venoso.

Breve descripción de las figuras

20 Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La FIG. 1 muestra la viabilidad funcional del músculo liso variable en la vena safena humana.

25 Las FIGS. 2A-B muestran que las técnicas actuales de extracción quirúrgica conducen a una menor viabilidad funcional del músculo liso.

La FIG. 3 demuestra que las técnicas actuales de extracción quirúrgica conducen a una reducción de la viabilidad funcional endotelial.

Las FIGS. 4A-B muestran que las actuales técnicas de extracción quirúrgica reducen la relajación independiente del endotelio de la vena safena humana.

30 La FIG. 5 demuestra que los injertos de vena safena humana con marcajes azules mostraban una menor viabilidad funcional del músculo liso.

La FIG. 6 demuestra que el marcaje cutáneo quirúrgico reducía la viabilidad del músculo liso de la vena safena humana.

La FIG. 7 muestra que los rotuladores para piel quirúrgicos reducen la viabilidad de la vena safena de cerdo.

35 La FIG. 8 muestra que la respuesta funcional (respuesta contráctil a C1) se correlaciona con la viabilidad celular en las venas safenas humanas.

Las FIGS. 9A-B demuestran que la erioflavina restaura la viabilidad funcional después de una lesión por estiramiento en la vena safena porcina.

La FIG. 10 muestra que Rojo Allura no restablecía la lesión inducida por estiramiento en venas safenas porcinas.

40 La FIG. 11 demuestra que la erioflavina restablece la viabilidad del músculo liso en la vena safena humana.

Las FIGS. 12A-C muestran que la erioflavina bloquea la contracción inducida por BzATP en la vena safena.

La FIG. 13 demuestra que la erioflavina reduce el espesor de la íntima en la vena safena humana en un modelo de cultivo orgánico.

La FIG. 14 muestra que la erioflavina reduce el espesor de la capa íntima en la vena safena porcina distendida.

45 La FIG. 15 demuestra que la manipulación durante la preparación quirúrgica altera la relajación dependiente del endotelio en la vena safena humana.

La FIG. 16 muestra que una válvula de liberación de presión (de venteo) limita la presión en la vena safena humana durante la distensión manual.

La FIG. 17 muestra que la distensión manual con una válvula de liberación de presión evita la pérdida de función endotelial en la vena safena porcina.

- 5 La FIG. 18A-B muestra que la preincubación con papaverina inhibe las contracciones inducidas por histamina y KCl en la arteria coronaria porcina.

La FIG. 19A-B muestra que la preincubación con papaverina inhibe las contracciones inducidas por norepinefrina en la vena safena humana.

La FIG. 20 muestra el kit del dispositivo de extracción de vena.

10 **Descripción detallada de la invención**

Por tanto, la presente invención proporciona nuevos procedimientos y reactivos con los que extraer, tratar, conservar y transplantar conductos autólogos e inhibir la hiperplasia de la íntima. El pH de la solución usada para almacenar los conductos vena autólogos antes de la implantación, que incluye solución salina heparinizada, es altamente ácido (pH 6,2). Se ha demostrado que este pH ácido reduce la funcionalidad del conducto. Además, el uso de los marcadores de piel quirúrgicos que comprende alcohol isopropílico, para marcar los conductos autólogos, también reduce la funcionalidad del conducto. La erio Glaucina, conocida por otro lado como FD y C colorante azul nº 1, no es tóxica para la vena y restablece la integridad funcional después de la lesión. También se ha demostrado que la distensión manual común de la vena puede conducir a presiones intraluminales superiores a 40 kPa, que también tienen un efecto perjudicial sobre la funcionalidad del conducto. La colocación de la válvula de venteo sobre la jeringuilla reduce lo máximo posible la presión intraluminal a 17,3-18,7 kPa, de modo que se protege el conducto de la vena.

I. Solución de extracción

En un aspecto, la presente invención describe una solución tamponada, a pH 7,0-7,6, en la que introducir la vena después de la extracción. En una realización, el tampón es solución salina tamponada con fosfato; no obstante, son formulaciones alternativas MOPS, HEPES, PIPES y acetato. También se puede añadir a la solución sulfato de magnesio (5 mM) para estabilizar membranas.

Otra opción de tampón es Plasma-Lyte 56 Injection (inyección de múltiples electrolitos, de tipo 1, USP) una solución hipotónica apirógena estéril en un recipiente de una sola dosis para administración intravenosa. Cada 100 ml contiene 234 mg de cloruro sódico, USP (NaCl); 128 mg de acetato potásico ($C_2H_3KO_2$) y 32 mg de acetato de magnesio tetrahidrato ($Mg(C_2H_3O_2)_2 \cdot 4H_2O$). No contiene agentes antimicrobianos. El pH se ajusta con ácido clorhídrico.

La solución de extracción se puede preparar como una solución altamente viscosa, tal como se describe en Seal y Panitch (2003). Estos autores describieron una matriz polimérica de formación rápida con propiedades de liberación controlada basada en afinidad desarrollada a base de interacciones entre péptidos de unión a la heparina y heparina. Las pruebas mecánicas dinámicas de las composiciones al 10% (peso/volumen) que consisten en una proporción molar de 3:1 entre poli(etilenglicol)-copéptido (aproximadamente 18.000 g/mol) y la heparina (aproximadamente 18.000 g/mol) reveló un perfil viscoelástico similar al de las soluciones poliméricas concentradas de alto peso molecular y en fusión. Además, las mezclas biopoliméricas recuperadas rápidamente tras desnaturalización térmica y agresión mecánica. Estos materiales de tipo gel pudieron secuestrar péptidos exógenos de unión a heparina y podrían liberar estos péptidos durante varios días a velocidades dependientes de la afinidad relativa por la heparina. Las velocidades iniciales de liberación variaron desde 3,3% por hora para un péptido con baja afinidad por la heparina a 0,025% por hora para un péptido con una fuerte afinidad por la heparina. Alterando la afinidad de los péptidos por la heparina se pueden desarrollar una serie de péptidos para dar una gama de perfiles de liberación útiles para la liberación controlada in vivo de sustancias terapéuticas.

45 II. Aditivos complementarios de la solución

En otro aspecto, las soluciones pueden contener aditivos adicionales para abordar varios aspectos protectores de la invención.

Por ejemplo, las soluciones pueden incluir heparina (1-10 U/ml) para prevenir la formación de trombos. La heparina es un glucosaminoglucano altamente sulfatado que se usa ampliamente como anticoagulante inyectable y tiene la densidad de carga negativa más alta de cualquier molécula biológica conocida. También se puede usar para formar una superficie anticoagulante interna en varios dispositivos médicos y experimentales, tales como tubos de ensayos y máquinas para diálisis renal. La heparina de calidad farmacéutica deriva de tejidos mucosos de animales para carne sacrificados, tales como intestino porcino (de cerdo) o pulmón bovino (de vaca).

Aunque se usa principalmente en medicina para anticoagulación, el papel fisiológico verdadero de la heparina en el cuerpo permanece sin aclarar, porque la anticoagulación sanguínea se consigue principalmente con proteoglicanos de heparán sulfato derivados de células endoteliales. Normalmente, la heparina se almacena en el interior de los gránulos de los mastocitos y solo se liberan en la vasculatura en los lugares en los que hay una lesión tisular. Se ha propuesto que, en lugar de anticoagulación, el principal objetivo de la heparina es un mecanismo de defensa en los lugares en los que hay una lesión tisular contra las bacterias invasoras y otros materiales extraños. Además, está conservado en una serie de especies muy diferentes, incluyendo algunos invertebrados que no tienen un sistema de coagulación de la sangre similar.

La heparina nativa es un polímero con un peso molecular que varía de 3 kDa a 50 kDa, aunque el peso molecular promedio de las preparaciones de heparina más comerciales está en el intervalo de 12 kDa a 15 kDa. La heparina es un miembro de la familia de glucosaminoglucanos de los hidratos de carbono (definido como un compuesto orgánico que tiene la fórmula empírica $C_m(H_2O)_n$; es decir, consiste únicamente en carbono, hidrógeno y oxígeno, con una proporción átomos de hidrógeno:oxígeno de 2:1). Los glucosaminoglucanos(GAG) o mucopolisacáridos son polisacáridos largos sin ramificar que consisten en una unidad repetida de disacáridos. La unidad de repetición consiste en una hexosa (azúcar de seis carbonos) o un ácido hexurónico unida a una hexosamina (azúcar de seis carbonos que contiene nitrógeno).

La heparina (que incluye la molécula de heparán sulfato estrechamente relacionada) consiste en una unidad repetida de disacárido sulfatado de forma variable. Las principales unidades de disacárido que se producen en la heparina se muestran a continuación. La unidad de disacárido más frecuente está compuesta por un ácido idurónico 2-O-sulfatado y glucosamina 6-O-sulfatada, N-sulfatada, IdoA(2S)-GlcNS(6S). Por ejemplo, esto suma el 85% de las heparinas de pulmón de carne y aproximadamente el 75% de los de mucosa intestinal porcina. Más adelante se muestran los disacáridos raros que contienen una glucosamina 3-O-sulfatada (GlcNS(3S,6S)) o un grupo amina libre ($GlcNH_3^+$). En condiciones fisiológicas, los grupos éster y amida sulfato están desprotonados y atraen a los contraiones con carga positiva para formar una sal de heparina. Es de esta forma en que la heparina se suele administrar como anticoagulante.

En otro aspecto, la solución de extracción puede ser un hidrogel que recubre el vaso para minimizar el volumen manteniendo la humedad del vaso. Además, el hidrogel puede contener una sustancia terapéutica para ayudar a mantener la relajación vascular. Los hidrogeles incluyen los sintetizados a partir de polímeros hidrófilos que están reticulados a través de enlaces covalentes, tales como poli(etilenglicol), poli(acrilamida, polifumerato, poli(N-isopropilacrilamida) etc., o cualquier material de tipo gel reticulado a través de interacciones físicas, incluyendo hidrofóbicas e iónicas. Los geles incluyen poliuretanos, agarosa y alginatos.

En otro aspecto, la solución incluye papaverina (1 mM) para inhibir la contracción y el espasmo de la vena. Agentes antiespasmódicos alternativos son nicardipina, nitroprusiato sódico, nitroglicerina (0,5-1,0 mM) o dibutilil cAMP (2 mM).

En otro aspecto, la solución incluye antioxidantes para prevenir el daño oxidativo en la vena. Antioxidantes concretos de interés son N-acetilcisteína (10 mM), alopurinol (1 mM), glutatión (3 mM), manitol (30-60 mM) o fenoles de té verde (0,5-1,0 mg/ml).

En otro aspecto, la presente invención describe oligosacáridos en la solución de extracción para prevenir la desecación del injerto. Oligosacáridos concretos son ácido lactobiónico ((100 mM), rafinosa (30 mM) o trehalosa (30 mM). El ácido lactobiónico es un disacárido que proporciona soporte osmótico y previene la dilatación celular. La rafinosa es un trisacárido que proporciona hipertonicidad. La trehalosa es un disacárido con propiedades de retención de agua.

En otro aspecto, la presente invención describe almidón en la solución de extracción para soportar la presión osmótica coloidal. El hidroxietilalmidón ((30-50 mM), dextrano (40 g/l), sangre o albúmina son agentes coloidales particularmente contemplados.

En otro aspecto, la solución incluye agentes antiinflamatorios. Los esteroides como la dexametasona (5-10 mg/l) o el ácido salicílico son ejemplos de agentes antiinflamatorios.

En otro aspecto se incluirán fármacos para prevenir la disfunción endotelial. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, las estatinas, la metformina, AICAR y los estrógenos son ejemplos de dichos fármacos.

En otro aspecto, la solución incluye reguladores metabólicos. La glucosa (200 mM), la adenosina (5 mM) y la insulina (100 U/ml) son reguladores metabólicos particularmente contemplados.

En otro aspecto, la solución incluye un nuevo inhibidor peptídico de la MAPKAP quinasa 2 (y péptidos relacionados) para reducir la inflamación, potenciar la relajación del músculo liso y prevenir el espasmo. Las solicitudes de PCT US2007/16246 Y US2008/72525 describen dichos inhibidores.

La solución incluye ARNsi o ARNmi para disminuir la expresión de HSP27 para prevenir la hiperplasia de la íntima. Las secuencias de ARNsi de hebra sentido son 1) GACCAAGGAUGGCGUGGUGUU (SEC ID N° 1) y 2) AUACACGCUGCCCCCGUUU (SEC ID N° 2). Las secuencias de ARNmi de hebra sentido son 1) miR-580 o miR-1300, AACUCUUACUACUUAGUAAUCC (SEC ID N° 3) y 2) miR-552, UUGUCCACUGACCAAUCUGUU (SEC ID N° 4). La secuencia de anti-miR-320 es: UCGCCCUCUCAACCCAGCUUUU. La expresión de ARNsi y ARNmi es plasmídica o sintética. Se puede liberar el ADN o los oligodúplex sintéticos mediante permeabilización o presurización reversible (Monahan et al., 2009).

III. Antagonistas del receptor de P2X₇

Las lesiones conducen a una liberación prolongada de ATP que pueden actuar los receptores de ATP (Khakh y North, 2006). Los receptores P2X son una familia de canales iónicos dependientes de ligando que se unen al ATP extracelular. El receptor P2X₇ es responsable de la lisis dependiente de ATP de los macrófagos y también se encuentra en el músculo liso de la vena safena humana (Cario-Toumaniantz et al., 1998). Activation of the P2X₇ receptor can form membrane pores permeable to large molecules in human saphenous vein (Cario-Toumaniantz et al., 1998). Esto conduce a incrementos de los niveles de Ca²⁺ intracelular, que puede activar las caspasas y, en última instancia, producir la muerte celular por autólisis y apoptosis (Donnelly-Roberts et al., 2004). La activación del receptor P2X₇ se ha asociado con la activación de la ruta de la p38 MAPK y con cambios en el citoesqueleto de la actina (Pfeiffer et al., 2004). La activación del receptor P2X₇ también conduce a la producción y liberación de interleucinas y otras citocinas que contribuyen a la respuesta inflamatoria (Donnelly-Roberts et al., 2004). Recientemente, se ha mostrado que la activación sistémica de un antagonista del receptor P2X₇ mejora la recuperación en un modelo de roedor de lesión de la médula espinal inducida por estiramiento (Peng et al., 2009).

En la literatura se ha descrito una serie de antagonistas del receptor P2X₇. Por ejemplo, Alcaraz et al. (2003) describen la síntesis y la evaluación farmacológica de una serie de potentes antagonistas del receptor P2X₇. Los compuestos inhiben la formación de poros mediada por BzATP en las células THP-1. La distribución del receptor P2X₇ en las células inflamatorias, más principalmente en los macrófagos, mastocitos y linfocitos, sugiere que los antagonistas de P2X₇ tienen un papel significativo en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria. Carroll et al. (2009) revisaron distintas series químicas de antagonistas potentes y altamente selectivos del receptor P2X₇.

Las siguientes patentes de EE.UU. divulgan antagonistas del receptor P2X₇: 7.709.469, 6.812.226, 7.741.493, 7.718.693 y 7.326.792. Las siguientes publicaciones de patente de EE.UU. divulgan antagonistas del receptor P2X₇: 2010/0292295, 2010/0292224, 2010/0286390, 2010/0210705, 2010/0168171, 2010/0160389, 2010/0160388, 2010/0160387, 2010/0160384, 2010/0160373, 2010/0144829, 2010/0144727, 2010/0105068, 2010/0075968, 2010/0056595, 2010/0036101, 2009/0264501, 2009/0215727, 2009/0197928, 2009/0149524, 2009/0005330, 2008/0132550, 2008/0009541, 2007/0122849, 2007/0082930, 2005/0054013, 2005/0026916 y 2002/0182646.

Como se ha tratado anteriormente, un aspecto de la invención incluye un marcador que contiene un colorante no tóxico para marcar la vena, FD y C Azul n° 1 (erioglaucina), un colorante alimentario artificial aprobado por la FDA (E N°133), que no solo se ha demostrado que es no tóxico sino que es protector de las técnicas de extracción que son dañinas para las venas safenas y es un antagonista del receptor P2X₇. El azul brillante G, un análogo de la erioglaucina, también es un antagonista del receptor P2X₇.

La indigotina (E132) es otro colorante artificial azul oscuro aprobado por la FDA. El Verde Rápido (E143) es otro colorante artificial verde azulado aprobado por la FDA. Los colorantes naturales, tales como la curcumina o la betanina, son otras alternativas. La curcumina es el principal curcuminoide de la especia tumérico y tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Como aditivo alimentario, su número E es E100. La betanina es un colorante alimentario glucosídico rojo obtenido de la remolacha y un colorante alimentario natural. Otros posibles colorantes incluyen el azul genesteína, azul de venas, tinta china, Rojo Allura AC, tartazina y eritrosina.

IV. Dispositivos

En estudios preliminares, que se tratan más adelante, se demuestra que las técnicas de extracción usadas actualmente son dañinas para las venas safenas. Estos datos suponen un nuevo paradigma para pensar sobre los fallos de los injertos de venas y ofrecen abordajes simples y directos para mejorar la lesión en los injertos de venas.

Por tanto, en otro aspecto de la invención, la presente invención describe una válvula de "venteo" para prevenir la sobredistensión de la vena durante la unión de la rama lateral. La válvula T de alivio de la presión Qosina (parte n° D002501) es un ejemplo. En otro aspecto de la invención, la presente invención describe una aguja "en punta de bala" que se usa para fijar la vena y un dispositivo para prevenir el estiramiento de la vena.

V. Kits

La presente invención describe un kit para usar junto con procedimientos quirúrgicos de trasplantes de vena. Los kits de inmunodetección comprenderán, en medios de recipientes adecuados, varios recipientes, dispositivos y/o reactivos, junto con las instrucciones de uso adecuadas.

5 El kit comprenderá soluciones de extracción o reactivos para fabricarlos. Las soluciones o reactivos se proporcionarán en forma estéril, opcionalmente con recipientes estériles para mezclar y almacenar soluciones de extracción. El kit puede también comprender de forma ventajosa una cámara para bañar/almacenar tejido de trasplante después del explante y antes del trasplante. También se pueden incluir otros diversos aditivos complementarios descritos anteriormente.

Otro elemento del kit puede ser la inclusión de un rotulador quirúrgico que comprende un colorante/marcador no tóxico, como se ha descrito anteriormente. El rotulador puede estar "previamente cargado" con el marcador/colorante o se puede proporcionar vacío con el marcador/colorante en solución o en forma de reactivo para que el usuario lo cargue en el rotulador.

10 Otros dispositivos, incluidos una jeringuilla, catéter y /o tubos equipados con o que incluyen una válvula de venteo como se ha descrito anteriormente. También se puede incluir un dispositivo para sujetar una vena en su lugar, tal como una pinza, equipada opcionalmente con un soporte o base, que permite colocar "sin manos" el injerto para su tratamiento posterior.

15 El aspecto del recipiente del kit generalmente incluirá medios par sujetar al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, paquete, jeringuilla, catéter u otro recipiente de forma segura y protegida, por ejemplo, en confinamiento cerrado para la venta comercial. Dichos medios pueden incluir recipientes de plásticos moldeados por inyección o por soplado en los que se retienen los recipientes, dispositivos o reactivos deseados.

VI. Ejemplos

20 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para esta práctica. No obstante, los expertos en la materia deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin desviarse del alcance de la invención.

25 Ejemplo 1- Toxicidad de los rotuladores quirúrgicos para el tejido venoso

Se recogieron los segmentos desechados no identificados de vena safena humana (n = 66), después de obtener el consentimiento informado aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Vanderbilt (Nashville, TN), de pacientes sometidos a una derivación de las arterias coronarias o una derivación vascular periférica. Las venas se almacenaron en solución salina hasta el final del procedimiento quirúrgico, momento en el cual se introdujeron en tampón de extracción de trasplante frío (lactobionato potásico 100 mM, KH_2PO_4 25 mM, MgSO_4 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, 50 g/l de hidroxietilalmidón pH 7.4). La presencia de marcas azules se evaluó para cada VSH. Se cortaron anillos de 1,0 mm de anchura de los segmentos de la vena safena diseccionada libre de grasa y de tejido conjuntivo, se rasparon del endotelio y se suspendieron en un baño muscular que contiene un tampón bicarbonato (NaCl 120 mM, KCl 4,7 mM, MgSO_4 1,0 mM, NaH_2PO_4 1,0 mM, glucosa 10 mM, CaCl_2 1,5 mM y Na_2HCO_3 25 mM, pH 7.4), se gasificaron con 95% de O_2 / 5% de CO_2 a 37°C. Los anillos se estiraron manualmente hasta 4 g de tensión y se mantuvieron a una tensión de reposo de 1g y se equilibraron durante ~2 horas. Se obtuvieron mediciones de la fuerza usando un transductor de fuerza Radnoti Glass Technology (Monrovia, CA) (159901 A) en interfaz con un sistema de adquisición de datos Powerlab y el software Chart (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Para determinar la viabilidad, los anillos se contrajeron con KCl 110 mM (con sustitución equimolar de NaCl en tampón bicarbonato) y se midió la fuerza generada. La fuerza se convirtió en tensión ($[\text{Newtons (N)/m}^2] = \text{fuerza (g)} \times 0,0987/\text{área}$, en la que el área es igual al peso húmedo [$\text{mg} / \text{longitud (mm a la longitud máxima)}$] dividida por $1,055 \times 10^5 \text{N/m}^2$). Se produjo una variabilidad en la viabilidad funcional de las venas (FIG. 1). Las venas que generaban una tensión de $\leq 0,025 \times 10^5 \text{N/m}^2$ se consideraron no viables (gris) y las que generaban una tensión de $> 0,025 \times 10^5 \text{N/m}^2$ eran viables (negro). El 40% de las venas analizadas fue no viable. Cada punto representa un paciente diferente y un agregado de al menos tres anillos distintos de cada paciente.

Los segmentos de vena safena humana (n = 8) se recogieron antes de la preparación de la vena para el trasplante en la circulación arterial (sin manipular, SM) y después de la preparación quirúrgica (después de la manipulación, DM). La preparación implica distensión manual de la vena, marcar con un rotulador de piel quirúrgico e introducir la vena en solución salina heparinizada. Se determinó la respuesta contráctil a KCl 110 mM (FIG. 2A) o a fenilefrina (10^{-6}M , FIG. 2B) y la fuerza generada se convirtió en tensión (10^5N/m^2). La manipulación durante la preparación de la vena condujo a una menor respuesta contráctil al KCl y a la fenilefrina (FIGS. 2A-B). Cada punto representa un paciente diferente y un agregado de la respuesta al menos tres anillos distintos de cada paciente.

55 Las venas safenas humanas también se precontrajeron con fenilefrina (10^{-6}M), seguido de tratamiento con carbacol ($5 \times 10^{-7}\text{M}$) para determinar la relajación dependiente del endotelio (Furchgott et al., 1980). Los segmentos de vena safena humana (n = 5) se recogieron antes de la preparación de la vena para el trasplante en la circulación arterial (sin manipular, SM) y después de la preparación quirúrgica (después de la manipulación, DM). Los anillos de cada segmento se suspendieron en un baño de músculo, se equilibraron en un tampón bicarbonato y se contrajeron con

KCl 110 mM. Tras 30 minutos adicionales de equilibrado en un tampón bicarbonato, los anillos se precontraieron con fenilefrina (PE) 10^{-6} M y se trataron con carbacol 5×10^{-7} M. La fuerza se midió y se convirtió en tensión 10^5 N/m². Las respuestas se expresaron como el % de la contracción máxima inducida por PE. La manipulación típica durante la preparación quirúrgica condujo a una menor relajación dependiente del endotelio (FIG. 3). SM min tenía $28,74 \pm 3,542\%$ de la relajación dependiente del endotelio, mientras que los DM se contraieron en respuesta al carbacol ($-5,976 \pm 0,9172\%$).

Las venas safenas humanas también se precontraieron con fenilefrina (10^{-6} M), seguido de tratamiento con nitroprusiato sódico (10^{-7} M) para determinar la relajación independiente del endotelio. Los segmentos de la vena safena (n = 6) se recogieron antes de la preparación de la extracción (sin manipular, SM) o después de la preparación de la extracción (después de la manipulación, DM). Los anillos de cada segmento se suspendieron en un baño de músculo, se equilibraron en un tampón bicarbonato y se contraieron con KCl 110 mM. Tras 30 minutos adicionales de equilibrado en un tampón bicarbonato, los anillos se precontraieron con fenilefrina (PE) 10^{-6} M y se trataron con nitroprusiato sódico 10^{-7} M. La manipulación típica durante la preparación quirúrgica redujo la relajación independiente del endotelio de la vena safena humana (FIGS. 4A-B). Trazados de la fuerza representativos de los segmentos SM y DM recogidos del mismo paciente en respuesta a PE y SNP (FIG. 4A). Las relajaciones independientes del endotelio mostradas por los dos grupos, expresada como el % de la contracción máxima inducida por PE, fueron significativamente diferentes. Las venas SM mostraron una relajación del $86,62 \pm 5,986\%$, mientras que las venas DM mostraron una relajación del $4,292 \pm 1,397\%$ (FIG. 4B).

De las 38 venas recogidas de los pacientes sometidos a una derivación de las arterias coronarias o a cirugía de revascularización vascular periférica, 16 de las venas no tenían ningún color visible con rotulador quirúrgico mientras que 22 de las venas tenían un color visible. Se cortaron anillos de las venas, se suspendieron en baño muscular y se equilibraron en tampón bicarbonato. Los anillos se contraieron con KCl 110 mM y la fuerza generada se convirtió en tensión (10^5 N/m²). La fuerza generada por los dos grupos de venas fue significativamente diferente (FIG. 5). Las venas que tenían un marcaje azul visible mostraron respuestas menos contráctiles ($0,047 \pm 0,014$ 10^5 N/m²) que las venas que no tenían un marcaje visible ($0,174 \pm 0,023$ 10^5 N/m²).

Los segmentos desechados no identificados de la vena safena humana que no tenían ningún color se usaron para analizar el efecto de diferentes procedimientos de marcaje. Los anillos cortados de los segmentos se dejaron sin marcar (control; n = 12), se marcaron con un rotulador quirúrgico (Cardinal Health, #5227 tinta violeta para marcaje; n = 5), se marcaron en 50% de alcohol isopropílico, un disolvente usado en el marcador de la piel (n = 4) o se marcaron con azul de metileno (Akorn, Inc., Lake Forest IL; n = 10) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los anillos se rasparon del endotelio y se suspendieron en un baño muscular que contiene un tampón bicarbonato (NaCl 120 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,0 mM, NaH₂PO₄ 1,0 mM, glucosa 10 mM, CaCl₂ 1,5 mM y Na₂HCO₃ 25 mM, pH 7.4), se gasificaron con 95% de O₂ / 5% de CO₂ a 37°C. Los anillos se estiraron manualmente hasta 4 g de tensión y se mantuvieron a una tensión de reposo de 1 g y se equilibraron durante ~2 horas. Se obtuvieron mediciones de la fuerza usando un transductor de fuerza Radnoti Glass Technology (Monrovia, CA) (159901 A) en interfaz con un sistema de adquisición de datos Powerlab y el software Chart (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Los anillos se contraieron con KCl 110 mM (con sustitución equimolar de NaCl en tampón bicarbonato) y la fuerza generada se convirtió en tensión 10^5 N/m². Los tres grupos marcados fueron significativamente diferentes del grupo control sin marcar (p ≤ 0,05) (FIG. 6). Los anillos que no tenían marcajes tenían una tensión promedio de $0,110 \pm 0,014$ 10^5 N/m², los anillos marcados con el marcador de piel quirúrgico tenían una tensión promedio de $0,003 \pm 0,00110^5$ N/m², los anillos marcados con un 50% de alcohol isopropílico tenían una tensión promedio de $0,005 \pm 0,003$ 10^5 N/m² y los anillos marcados con azul de metileno tenían una tensión promedio de $0,014 \pm 0,01$ 10^5 N/m².

Las venas safenas porcinas recién aisladas se usaron para analizar el efecto de diferentes procedimientos de marcaje. Las venas se recogieron e introdujeron en tampón de extracción para trasplantes frío [lactobionato potásico 100 mM, KH₂PO₄ 25 mM, MgSO₄ 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, hidroxietilalmidón 50g/l, pH 7,4]. Los vasos se almacenaron en tampón de extracción para trasplantes a 4°C y se analizaron en las 24 horas posteriores a la extracción. Para analizar la viabilidad se cortaron anillos de 1,0 mm de anchura de segmentos de la vena safena y se les retiró la grasa y el tejido conjuntivo. Los anillos de vena safena no se trataron (control; n = 6), se marcaron con el marcador de piel quirúrgico (n = 3) o 50 % de alcohol isopropílico (el disolvente usado en el marcador quirúrgico; n = 3) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los anillos se equilibraron después en un baño muscular, se contraieron con KCl y la fuerza se midió y se convirtió en tensión (10^5 N/m²). Los anillos que no tenían marcas tenían una tensión promedio de $0,263 \pm 0,039$ N/m², los anillos marcados con el marcador de piel quirúrgico tenía una tensión promedio de $0,114 \pm 0,017$ N/m² y los anillos marcados con 50% de alcohol isopropílico tenían una tensión promedio de $0,00005 \pm 0,00005$ N/m². Los dos grupos marcados fueron significativamente diferentes del grupo control sin marcar (p ≤ 0,05). (FIG. 7).

Ejemplo 2- Células de vena vivas se correlacionan con la viabilidad funcional

Se usó un ensayo de células vivas para determinar la viabilidad celular de la vena safena humana. Se recogieron los segmentos desechados no identificados de vena safena (n = 13), después de obtener el consentimiento informado aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Vanderbilt (Nashville, TN), de pacientes sometidos a una derivación de las arterias coronarias o una derivación vascular periférica. Las venas se almacenaron en

solución salina hasta el final del procedimiento quirúrgico, momento en el cual se introdujeron en tampón de extracción de transplante frío (lactobionato potásico 100 mM, KH_2PO_4 25 mM, MgSO_4 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, 50 g/l de hidroxietilalmidón pH 7,4). Los vasos se almacenaron en tampón de extracción para trasplantes a 4°C y se analizaron en las 24 horas posteriores a la extracción. Cada vena se sometió a un experimento fisiológico y el ensayo de células vivas usando bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT). Para analizar la viabilidad, se cortaron anillos de 1,0 mm de anchura de los segmentos de la vena safena diseccionada libre de grasa y de tejido conjuntivo, algunos se rasparon del endotelio y se suspendieron en un baño muscular que contiene un tampón bicarbonato (NaCl 120 mM, KCl 4,7 mM, MgSO_4 1,0 mM, NaH_2PO_4 1,0 mM, glucosa 10 mM, CaCl_2 1,5 mM y Na_2HCO_3 25 mM, pH 7.4), se gasificaron con 95% de O_2 / 5% de CO_2 a 37°C. Los anillos se estiraron manualmente hasta 4 g de tensión y se mantuvieron a una tensión de reposo de 1g y se equilibraron durante ~2 horas. Se obtuvieron mediciones de la fuerza usando un transductor de fuerza Radnoti Glass Technology (Monrovia, CA) (159901 A) en interfaz con un sistema de adquisición de datos Powerlab y el software Chart (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Los anillos se contrajeron con KCl 110 mM (con sustitución equimolar de NaCl en tampón bicarbonato) y se midió la fuerza generada. Todos los tejidos que no se contrajeron con KCl se consideraron no viables. La fuerza se convirtió en tensión 10^5 N/m^2 para cada anillo y se promedió para cada vena. Para evaluar la viabilidad celular, tres anillos de cada vena se colocaron por separado en 0,25 ml de una solución de MTT al 0,1% (preparada en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH 7,4). Para el control negativo, un anillo se colocó en 20 ml de agua y se sometió a microondas durante 10 minutos para inactivar cualquier actividad enzimática antes de introducirlo en la solución de MTT al 0,1%. Los anillos se incubaron a 37°C durante 1 hora. La reacción se detuvo introduciendo los anillos en agua destilada. Los tejidos se pesaron y se introdujeron en 1 ml de CelloSolve (Sigma) durante 4 horas a 37 °C para extraer el colorante de formazán de cada uno. La concentración del colorante se midió a 570 nm usando un espectrofotómetro (Beckman Coulter). La absorbancia del control negativo se restó de cada muestra. El índice de viabilidad se expresó como la $\text{DO}_{570}/\text{mg/ml}$. El promedio para cada vena se calculó de los tres anillos. La tensión promedio obtenida de cada vena se representó a continuación frente al índice de viabilidad promedio.

Los datos representan una pendiente significativa que muestra que había una relación proporcional ($R^2 = 0,7262$) entre la viabilidad mitocondrial y la viabilidad por tensión determinada por la a contracción inducida por KCl 110 mM (FIG. 8). Los anillos de VSH representativos del índice de viabilidad bajo (izquierda) y alta (derecha) se muestran en el recuadro.

30 Ejemplo 3. Soluciones y procedimientos de extracción de venas

La vena safena porcina recién aislada se recogió en tampón de extracción para trasplantes frío (lactobionato potásico 100 mM, KH_2PO_4 25 mM, MgSO_4 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, hidroxietilalmidón 50 g/l, pH 7,4). Los vasos se analizaron en las 24 horas de la extracción y se almacenaron en tampón de extracción para trasplantes a 4°C. La vena se limpió de grasa y tejido conjuntivo y se cortó en segmentos de 2 cm de longitud. Los segmentos se estiraron hasta dos veces su longitud de reposo (estirado; $n = 7$) o no se manipularon (control; $n = 12$). Después de estirar, los segmentos de ambos grupos se dividieron adicionalmente. Después se aplicó una solución de erioglaucina (FCF, 2,6 mM, en 5% de propilenglicol y agua) o vehículo con una torunda de algodón en una línea longitudinal en los segmentos de vena sin tratar (FCF; $n = 8$) o estirados (Estirado+FCF; $n = 3$). Los segmentos se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en Plasmalyte y después se cortaron en anillos. Los anillos se suspendieron en un baño muscular que contiene un tampón bicarbonato (NaCl 120 mM, KCl 4,7 mM, MgSO_4 1,0 mM, NaH_2PO_4 1,0 mM, glucosa 10 mM, CaCl_2 1,5 mM y Na_2HCO_3 25 mM, pH 7.4), se introdujeron burbujas de 95% de O_2 / 5% de CO_2 a 37°C. Los anillos se estiraron manualmente hasta 4 g de tensión y se mantuvieron a una tensión de reposo de 1g y se equilibraron durante ~2 horas. Las mediciones de la fuerza se obtuvieron usando un transductor de fuerza Radnoti Glass Technology (Monrovia, CA) (159901A) en interfaz con un sistema de adquisición de datos Powerlab y el software Chart (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Los anillos se contrajeron con KCl 110 mM (con sustitución equimolar de NaCl en tampón bicarbonato) y la fuerza generada se convirtió en tensión 10^5 N/m^2 (FIG. 9). Los anillos control tenían una tensión promedio de $0,47 \pm 0,034 \text{ N/m}^2$, los anillos marcados con el colorante erioglaucina tenían una tensión promedio de $0,566 \pm 0,064 \text{ N/m}^2$ y los anillos estirados tenían una tensión promedio de $0,367 \pm 0,042 \text{ N/m}^2$ y los anillos estirados con el colorante erioglaucina tenían una tensión promedio de $0,713 \pm 0,111 \text{ N/m}^2$. La tensión para la vena estirada fue significativamente diferente ($*p < 0,05$) de la de las venas no estiradas control y la vena estirada con el colorante erioglaucina ($\#p < 0,05$) fue significativamente diferente cuando se comparó con la estirada sin el colorante erioglaucina (FIG. 9).

No obstante, el tratamiento con otro colorante, Rojo Allura, no restableció la viabilidad funcional después de la lesión por estiramiento de la vena safena porcina (FIG. 10), las venas safenas porcinas ($n = 4$) se dejaron sin tratar (control) o se estiraron a dos veces su longitud de reposo (sin colorante), se cortaron en anillos y se suspendieron en el tampón bicarbonato en un baño muscular. Los anillos de los segmentos estirados se incubaron con Rojo Allura 50 μM (+Rojo) o 50 μM de erioglaucina (+FCF) durante 30 minutos. Después se dejaron equilibrar los anillos en el tampón bicarbonato antes de contraerlos con KCl 110 mM. La fuerza generada se convirtió en tensión (10^5 N/m^2). Los datos representan la respuesta contráctil relativa a los anillos control, que se fijó como un 100%. La tensión para la vena estirada no fue significativamente diferente de la de la vena estirada con Rojo Allura (NS). El colorante erioglaucina restableció significativamente la respuesta contráctil en la vena estirada ($\#p \leq 0,05$) cuando se comparó con la vena estirada con Rojo Allura.

El efecto de la erio glucina sobre la vena safena humana se determinó usando segmentos desechados no identificados de vena safena humana de pacientes sometidos a derivación de arterias coronarias o a cirugía de derivación vascular periférica (n = 4). Las venas se almacenaron en solución salina hasta el final del procedimiento quirúrgico, momento en el cual se introdujeron en tampón de extracción de trasplante frío (lactobionato potásico 100 mM, KH₂PO₄ 25 mM, MgSO₄ 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, 50 g/l de hidroxietilalmidón pH 7,4). Los vasos se analizaron en las 24 horas posteriores al almacenamiento de extracción en tampón de extracción de trasplantes a 4°C. Para analizar la viabilidad, se cortaron anillos de 1,0 mm de anchura de segmentos de la vena safena de la que se ha limpiado la grasa y el tejido conjuntivo, se trataron con una solución de erio glucina (FCF, 2.6 mM, en 5% de propilenglicol y agua) o vehículo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, los tejidos se rasparon del endotelio y se suspendieron en un baño muscular que contiene un tampón bicarbonato, se desgasificaron con 95% de O₂/5% de CO₂ a 37°C. Los anillos se estiraron manualmente hasta 4 g de tensión y se mantuvieron a una tensión de reposo de 1 g y se equilibraron durante ~2 horas. Se obtuvieron mediciones de la fuerza usando un transductor de fuerza Radnoti Glass Technology (Monrovia, CA) (159901 A) en interfaz con un sistema de adquisición de datos Powerlab y el software Chart (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Los anillos se contrajeron con KCl 110 mM (con sustitución equimolar de NaCl en tampón bicarbonato) y se midió la fuerza generada. La fuerza se convirtió en tensión 10⁵ N/m² y se representó para los anillos de vehículo y de erio glucina. Los trazados representativos de la muestra de los anillos se dejaron sin tratar (control) o se trataron con el colorante erio glucina (FCF) se representan (FIG. 11A). Los anillos de vehículo tenían una tensión promedio de 0,015 ± 0,012 N/m² y los anillos tratados con erio glucina tenían una tensión promedio de 0,103 ± 0,021 N/m² (FIG. 11B). Los dos grupos eran significativamente diferentes (p ≤ 0,05).

Los segmentos de la vena safena humana se recogieron tras la extracción antes de la manipulación quirúrgica de pacientes sometidos a derivación de las arterias coronarias o a cirugía de derivación vascular periférica y se almacenaron en PlasmaLyte. Los vasos se analizaron en las 2 horas anteriores a la extracción. La vena safena porcina recién aislada se recogió en tampón de extracción para trasplantes frío (lactobionato potásico 100 mM, KH₂PO₄ 25 mM, MgSO₄ 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, hidroxietilalmidón 50 g/l, pH 7,4). Los vasos se analizaron en las 24 horas anteriores a la extracción. Se cortaron anillos de 1,0 mm de anchura de las venas safenas porcinas (FIG. 12A, n = 2) y la vena safena humana no manipulada (FIG. 12B, n = 4) se limpió de grasa y tejido conjuntivo. Después, los anillos se rasparon del endotelio y se suspendieron en un baño muscular que contiene un tampón bicarbonato, se introdujeron burbujas con 95% de O₂/5% de CO₂ a 37°C. Los anillos se estiraron manualmente hasta 4 g de tensión y se mantuvieron a una tensión de reposo de 1 g y se equilibraron durante ~2 horas. Se obtuvieron mediciones de la fuerza usando un transductor de fuerza Radnoti Glass Technology (Monrovia, CA) (159901 A) en interfaz con un sistema de adquisición de datos Powerlab y el software Chart (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Los anillos se contrajeron con KCl 110 mM. Tras un equilibrio adicional de 30 minutos, los anillos se trataron con una solución de erio glucina (FCF, 50-200 µM durante 30 minutos) o vehículo durante 30 minutos y después se contrajeron con BzATP 100 µM. La fuerza se midió y se convirtió en tensión. La respuesta se expresó como el % de la contracción máxima de KCl. El trazado de la fuerza representativa de la vena safena humana contraída con BzATP después del tratamiento con vehículo (control) o erio glucina 50 µM (pretratamiento con FCF) se representa en la FIG. 12C. El pretratamiento con erio glucina (FCF) pero no el vehículo (control) inhibió significativamente la contracción inducida por BzATP (*p<0,05) (FIG. 12B).

Los segmentos de vena safena humana se recogieron antes de la preparación de la vena para trasplante en la circulación arterial (sin manipular, SM) y después de la preparación quirúrgica (después de manipular, DM) de los mismos pacientes en PlasmaLyte y se usaron en las 2 horas posteriores a la extracción. El segmento se cortó en anillos de ~1 mm y un anillo de cada grupo se fijó en formalina (pre-cultivo). Los otros anillos se cultivaron en medio RPMI suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 30% de suero bovino fetal a 5% de CO₂ y a 37°C en ausencia (Control) o presencia de erio glucina (FCF) 50 µM durante 14 días. Tras 14 días, los anillos se fijaron en formalina, se seccionaron a 5 µm y se tiñeron usando tinción de Verhoff Van Gieson. La micrografía óptica de los anillos se capturó usando un Axiovert 200 y el espesor de la íntima se midió usando AxioVision. Los datos representan el % del incremento del espesor de la íntima relacionado con el espesor de la íntima basal del anillo pre-cultivo que se fijó como el 0%. Las barras de error muestran el error estándar de la media. La manipulación durante la preparación de la vena aumentó el espesor de la capa íntima (#p = 0,053 en la prueba t pareada) y el tratamiento con erio glucina inhibió significativamente (* p < ,05) el desarrollo del espesor de la íntima cuando se comparó con el control (FIG. 13).

La vena safena porcina recién extraída se recogió mediante un procedimiento sin tocar en condiciones estériles y se almacenó en tampón de extracción para trasplantes frío (lactobionato potásico 100 mM, KH₂PO₄ 25 mM, MgSO₄ 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, hidroxietilalmidón 50 g/l, pH 7,4). Los vasos se usaron en las 24 horas anteriores a la extracción. Las venas se dividieron en tres segmentos que se dejaron sin tratar (sin manipular, n = 7), se distendieron (distendidas, n = 8) a >40 kPa o se distendieron en presencia de la válvula de alivio de presión (venteo, n = 7). Cada segmento se cortó después en anillos de ~1 mm y un anillo de cada condición se fijó inmediatamente en formalina (pre-cultivo). Los otros anillos se cultivaron en medio RPMI suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 30% de suero bovino fetal a 5% de CO₂ y a 37°C en ausencia (Control) o presencia de erio glucina (FCF) 50 µM, azul brillante G (BBG) 50 µM o Rojo Allura 50 µM durante 14 días. Tras 14 días, los anillos se fijaron en formalina, se seccionaron a 5 µm y se tiñeron usando tinción de Verhoff Van Gieson. La micrografía óptica de los anillos se capturó usando un Axiovert 200 y el espesor

de la íntima se midió usando AxioVision. El tratamiento con erio glucina pero no con rojo allura inhibió los incrementos inducidos por la distensión en el espesor de la íntima, * $p < 0,05$ en comparación con las distendidas-control (FIG. 14).

5 Los anillos de la arteria mamaria interna izquierda humana (LIMA; $n = 3$) y las venas safenas se obtuvieron antes de la preparación de la vena para trasplante en la circulación arterial (sin manipular, SM; $n = 5$) y tras la preparación quirúrgica (después de la manipulación, DM; $n = 5$). Los anillos cortados de los segmentos SM se incubaron en solución de la University of Wisconsin (UW), solución salina heparinizada (HS), PlasmaLyte heparinizado (HP) o PlasmaLyte heparinizado que contiene trehalosa (HPT) 30 mM durante 2 horas a temperatura ambiente. Se cortaron anillos de las venas, se suspendieron en baño muscular y se equilibraron en tampón bicarbonato. Los anillos se precontrajeron con fenilefrina 10^{-6} M y después se trataron con carbacol 5×10^{-7} M para determinar la relajación dependiente del endotelio. Los anillos de la LIMA tenían una relajación dependiente del endotelio mayor que la vena safena (FIG. 15). La manipulación durante la preparación quirúrgica condujo a una menor relajación dependiente del endotelio (FIG. 15). El almacenamiento en solución salina heparinizada [* $p < 0,05$ en comparación con HS para todos los grupos SM (SM, UW, HP, y HPT)], pero no en Plasmalyte heparinizado, Plasmalyte heparinizado más trehalosa o solución de extracción para trasplante condujo a una menor relajación dependiente del endotelio (FIG. 15). Los datos se presentan como el % de relajación (en comparación con la contracción máxima inducida por fenilefrina).

20 Se recogieron los segmentos desechados no identificados de vena safena humana ($n = 5$), después de obtener el consentimiento informado aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Vanderbilt (Nashville, TN), de pacientes sometidos a una derivación de las arterias coronarias o una derivación vascular periférica. Las venas se almacenaron en solución salina hasta el final del procedimiento quirúrgico, momento en el cual se introdujeron en tampón de extracción de trasplante frío (lactobionato potásico 100 mM, KH_2PO_4 25 mM, MgSO_4 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, 50 g/l de hidroxietilalmidón pH 7,4). Los vasos se analizaron en las 24 horas posteriores a la extracción y almacenamiento en tampón de extracción para trasplante a 4°C. Se conectó una válvula de venteo a una jeringuilla en un extremo y a una vena safena canulada en el otro. El extremo distal de la vena safena también se canuló y se conectó a un transductor de presión. La presión se monitorizó mientras que la vena se distendió con cuna jeringuilla manual y sin la válvula de liberación de presión. El monitor de presión no mediría las presiones por encima de los 40 kPa. Esto creó tres grupos y fueron los siguientes: presión de venteo (Popoff), presión máxima con válvula de venteo (máx con válvula) y presión máxima sin válvula de venteo (máx sin válvula). Las venas que tenían una válvula de venteo tenían una presión media de $18 \pm 0,17$ kPa y una presión máxima de $19 \pm 0,27$ kPa, mientras que las venas sin la válvula de venteo tenía una presión media de $40 \pm 0,00$ kPa (FIG. 16). La presión promedio y máxima en las venas con la válvula de venteo fueron significativamente diferentes de las de las venas sin la válvula de venteo ($p \leq 0,05$).

35 La vena safena porcina recién extraída se recogió mediante un procedimiento sin tocar en condiciones estériles y se almacenó en tampón de extracción para trasplantes frío (lactobionato potásico 100 mM, KH_2PO_4 25 mM, MgSO_4 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, hidroxietilalmidón 50 g/l, pH 7,4). Los vasos se usaron en las 24 horas anteriores a la extracción. Las venas ($n = 4$) se distendieron manualmente con una jeringuilla en ausencia (distendidas) o presencia de una válvula de liberación de presión (venteo) en línea. Los segmentos control no estaban distendidos (ND). Tras la distensión se cortaron anillos de los segmentos y se suspendieron en un baño muscular. Los anillos se contrajeron previamente con fenilefrina 10^{-6} M y después se trataron con carbacol 5×10^{-7} M para determinar la relajación dependiente del endotelio. Los datos se presentan como el % de relajación (en comparación con la contracción máxima inducida por fenilefrina). La distensión manual con una jeringuilla a mano condujo a disminuciones significativas ($p < 0,0005$) en la relajación dependiente del endotelio y la válvula de liberación de presión evita esta pérdida de relajación dependiente del endotelio (FIG. 17).

45 Arterias coronarias porcinas se aislaron de cerdos sacrificados y se introdujeron directamente en tampón de extracción para trasplantes frío (lactobionato potásico 100 mM, KH_2PO_4 25 mM, MgSO_4 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, hidroxietilalmidón 50 g/l, pH 7,4). Las arterias coronarias se limpiaron de grasa y tejidos adventicios y se retiró el endotelio. Se cortaron anillos transversales (de 1,0 mm de espesor) y se suspendieron en un baño muscular, se unieron mediante seda 3-0 para forzar los transductores (Kent Scientific, CT) en interfaz con una tabla A-D de traducción de datos (Data Translation, MA). Los datos se adquirieron con el programa de software Power Lab. Los anillos de arterias coronarias porcinas se suspendieron en un baño muscular y se equilibraron en tampón bicarbonato de Krebs Ringer durante 2 horas. Los anillos se estiraron y la longitud se ajustó progresivamente hasta obtener la tensión máxima. Los anillos se contrajeron con KCl 110 mM (con sustitución equimolar de NaCl en tampón bicarbonato) y la fuerza generada se midió y se convirtió en tensión [Newtons (N)/ m^2] = fuerza (g) $\times 0,0987/\text{área}$, en la que el área es igual al peso húmedo [mg/longitud (mm a la longitud máxima)] dividido por 1,055. Los anillos se lavaron y equilibraron durante otros 30 minutos. Los anillos se trataron con histamina 5 μM , KCl 110 mM, papaverina (PAP) 1 mM, papaverina 1 mM durante 10 minutos, seguido de histamina 5 μM o papaverina 1 mM durante 10 min, seguido de KCl 110 mM y la fuerza generada se midió y se convirtió en tensión. Los trazados de la fuerza representativos de los anillos tratados con histamina (Hist), 5 μM , KCl (KCl) 110 mM, papaverina (PAP) 1 mM, papaverina 1 mM durante 10 minutos, seguido de histamina 5 μM (Pap+Hist) o papaverina 1 mM durante 10 min, seguido de KCl (Pap+KCl) 110 mM se representaron en la FIG. 18A. La disminución de la tensión se convirtió en un porcentaje de la contracción máxima inicial por KCl, que se fijó en 100%. El tratamiento con papaverina redujo la tensión basal en los anillos ($-15,0 \pm 3,135\%$) (FIG. 18B). El

pretratamiento de los anillos con papaverina inhibió completamente la contracción inducida por histamina ($-12,0 \pm 4,163$ en comparación con $98,613 \pm 11,049$) y KCl ($-20,0 \pm 10,00$ en comparación con $103,33 \pm 2,404\%$) (FIG. 18B).

Los segmentos desechados no identificados de vena safena humana ($n = 6$) se recogieron, tras el consentimiento informado aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Vanderbilt (Nashville, TN), de pacientes sometidos a cirugía de derivación de las arterias coronarias o de derivación vascular periférica. Las venas se almacenaron en una solución salina hasta el final del procedimiento quirúrgico, momento en el cual se introdujeron en tampón de extracción para trasplantes frío (lactobionato potásico 100 mM, KH_2PO_4 25 mM, MgSO_4 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatión 3 mM, alopurinol 1 mM, hidroxietilalmidón 50 g/l, pH 7,4). Los vasos se analizaron en las 24 horas posteriores a la extracción y almacenamiento en tampón de extracción para trasplantes a 4°C. Las venas se limpiaron de grasa y de tejidos adventicios y se retiró el endotelio. Se cortaron anillos transversales (de 1,0 mm de espesor) y se suspendieron en un baño muscular, se unieron mediante seda 3-0 para forzar los transductores (Kent Scientific, CT) en interfaz con el sistema de adquisición de datos Powerlab y el software Chart (AD Instruments, Colorado Springs, CO). Los anillos de vena safena humana se suspendieron en un baño muscular y se equilibraron en tampón bicarbonato de Krebs Ringer durante 2 horas. Los anillos se estiraron y la longitud se ajustó progresivamente hasta obtener la tensión máxima. Los anillos se contrajeron con KCl 110 mM (con sustitución equimolar de NaCl en tampón bicarbonato) y la fuerza generada se midió y se convirtió en tensión [Newtons (N)/m^2] = fuerza (g) x 0,0987/área, en la que el área es igual al peso húmedo [mg/longitud (mm a la longitud máxima)] dividido por 1,055. Los anillos se lavaron y equilibraron durante otros 30 minutos. Los anillos se trataron con norepinefrina (NE) 0,5 μM , papaverina (Pap) 1 mM o papaverina 1 mM durante 10 minutos, seguido de NE 0,5 μM y la fuerza generada se midió y se convirtió en tensión. La disminución de la tensión se convirtió en un porcentaje de la contracción máxima inicial por KCl, que se fijó en 100%. Los trazados de la fuerza representativos de los anillos tratados con NE (NE) 0,5 μM , papaverina (Pap) 1 mM o papaverina 1 mM durante 10 minutos, seguido de NE 0,5 μM se representaron en FIG. 19A. La disminución de la tensión se convirtió en un porcentaje de la contracción inicial máxima por KCl que se fijó en 100%. $n = 6$. El tratamiento con papaverina redujo la tensión basal en los anillos ($-9,772,0 \pm 3,226\%$). El pretratamiento de la vena safena humana con papaverina inhibió completamente la contracción inducida por NE ($-3,210 \pm 5,119$ en comparación $89,935 \pm 18,344\%$) (FIG. 19B).

El dispositivo de extracción de vena se muestra en la FIG. 20. El extremo distal de la vena (la vena está invertida por las válvulas de la vena) se canula con un catéter de plástico con punta en forma de bala que tiene una luz para irrigación y se fija al catéter con una pinza con un muelle. El catéter está recortado en la base. Y un catéter con punta en forma de bala adicional sin luz se fija al extremo proximal de la vena con el extremo opuesto de la base recortado. El dispositivo se abre poco a poco hasta que la vena tiene la misma longitud que in vivo. Una jeringuilla con un tubo de extensión y una válvula de liberación de presión en línea se fija al extremo distal de la vena. Ahora, la vena se puede distender y se ligan las ramas laterales.

Ejemplo 4 – Protocolo clínico predictivo

La vena safena mayor se extraerá quirúrgicamente usando técnicas quirúrgicas estándar. El extremo distal de la vena se puede canular con una cánula venosa con punta en forma de bala y se fija con una pinza o un nudo de seda. La válvula de liberación de la presión se fijará a la cánula con una jeringuilla de 10 o 20 cc fijada al otro extremo de la válvula. En algunos casos, los tubos de extensión se colocarán entre la jeringuilla y la válvula. La vena se distenderá con la solución de extracción de la vena y las tributarias identificadas y ligadas con suturas de seda o pinzas. La vena se marcará con el marcador del kit a lo largo de una superficie larga para mantener la orientación de la vena. En algunos casos, la vena se puede marcar antes de su extracción del paciente. Después, la vena se introducirá en la solución de extracción hasta la implantación en la circulación arterial. En una realización, el colorante del rotulador contendrá un antagonista del receptor P2X_7 y la solución de extracción no contendrá un antagonista del receptor P2X_7 . En otra realización, el colorante del rotulador no contendrá un antagonista del receptor P2X_7 , pero sí la solución. En una tercera realización, tanto el colorante del rotulador como la solución contendrán un antagonista del receptor P2X_7 .

VII. Referencias

Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento.

Motwani JG, Topol EJ (1998) Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 97: 916-931.

Clowes AW, Reidy MA (1991) Prevention of stenosis after vascular reconstruction: pharmacologic control of intimal hyperplasia--a review. *J Vasc Surg* 13: 885-891.

Allaire E, Clowes AW (1997) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann Thorac Surg* 63: 582-591.

Mosse PR, Campbell GR, Wang ZL, Campbell JH (1985) Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media. *Lab Invest* 53: 556-562.

- LoGerfo FW, Quist WC, Cantelmo NL, Haudenschild CC (1983) Integrity of vein grafts as a function of initial intimal and medial preservation. *Circulation* 68: II117-124.
- Kent KC, Liu B (2004) Intimal hyperplasia--still here after all these years! *Ann Vasc Surg* 18: 135-137.
- 5 Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, et al. (1999) Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* 354: 1493-1498.
- Alexander JH, Hafley G, Harrington RA, Peterson ED, Ferguson TB, Jr., et al. (2005) Efficacy and safety of edifoligide, an E2F transcription factor decoy, for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery: PREVENT IV: a randomized controlled trial. *Jama* 294: 2446-2454.
- 10 Dashwood MR, Loesch A (2007) Surgical damage of the saphenous vein and graft patency. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133: 274-275.
- Dashwood M, Anand R, Loesch A, Souza D (2004) Surgical Trauma and Vein Graft Failure: Further Evidence for a Role of ET-1 in Graft Occlusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: S16-S19.
- 15 Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980. 288: p. 373-376.
- Khakh, B. S., and North, R. A. (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-532.
- Cario-Toumaniantz, C., Loirand, G., Ladoux, A., and Pacaud, P. (1998) P2X7 receptor activation-induced contraction and lysis in human saphenous vein smooth muscle. *Circ Res* 83, 196-203.
- 20 Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Faltynek, C. R., and Jarvis, M. F. (2004) Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 1053-1061.
- Monahan et al., *FASEB* 23:557-564,2009.
- 25 Pfeiffer, Z. A., Aga, M., Prabhu, U., Watters, J. J., Hall, D. J., and Bertics, P. J. (2004) The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J Leukoc Biol* 75, 1173-1182.
- Peng, W., Cotrina, M. L., Han, X., Yu, H., Bekar, L., Blum, L., Takano, T., Tian, G. F., Goldman, S. A., and Nedergaard, M. (2009) Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12489-12493.
- 30 Seal y Panitch, *Biomacromolecules* 4(6): 1572-82 (2003).
- Documento PCT/US2007/16246
- Documento PCT/US2008/72525
- Alcaraz et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13(22): 4043-4046 (2003) Carroll et al., *Purinergic Signalling* 5(1): 63-73 (2009)
- 35 Patente de EE.UU. 7.709.469
- Patente de EE.UU. 6.812.226
- Patente de EE.UU. 7.741.493
- Patente de EE.UU. 7.718.693
- Patente de EE.UU. 7.326.792
- 40 Publicación de patente de EE.UU. 2010/0292295
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0292224
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0286390
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0210705
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0168171

- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0160389
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0160388
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0160387
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0160384
- 5 Publicación de patente de EE.UU. 2010/0160373
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0144829
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0144727
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0105068
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0075968
- 10 Publicación de patente de EE.UU. 2010/0056595
- Publicación de patente de EE.UU. 2010/0036101
- Publicación de patente de EE.UU. 2009/0264501
- Publicación de patente de EE.UU. 2009/0215727
- Publicación de patente de EE.UU. 2009/0197928
- 15 Publicación de patente de EE.UU. 2009/0149524
- Publicación de patente de EE.UU. 2009/0005330
- Publicación de patente de EE.UU. 2008/0132550
- Publicación de patente de EE.UU. 2008/0009541
- Publicación de patente de EE.UU. 2007/0122849
- 20 Publicación de patente de EE.UU. 2007/0082930
- Publicación de patente de EE.UU. 2005/0054013
- Publicación de patente de EE.UU. 2005/0026916
- Publicación de patente de EE.UU. 2002/0182646

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de tratamiento de un explante venoso antes de transplantar, que comprende:
 - (a) estabilizar un explante venoso con erioglaucina/Colorante Azul nº1 para producir un explante venoso, en el que erioglaucina/Colorante Azul nº1 se aplica al explante venoso con un rotulador y/o con una solución tamponada que contiene erioglaucina/Colorante Azul nº1 a un pH de 7,0-7,6; y
 - (b) conservar la viabilidad funcional del explante venoso estabilizado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que erioglaucina/Colorante Azul nº1 se aplica al explante venoso con un rotulador que comprende un colorante y en el que el colorante comprende erioglaucina/Colorante Azul nº1.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que se aplica erioglaucina/Colorante Azul nº1 al explante venoso poniendo en contacto el explante venoso con una solución tamponada que comprende erioglaucina/Colorante Azul nº1 a un pH de 7,0-7,6.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento restablece la viabilidad funcional del explante venoso que, antes de la etapa (a) de la reivindicación 1, no era viable.
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha solución tamponada comprende además heparina, solución salina tamponada con fosfato, MOPS, HEPES, PIPES, acetato y/o Plasmalyte.
6. El procedimiento de las reivindicaciones 3 o 5, en el que dicha solución tamponada comprende además uno o más de un agente anticontráctil (tal como un inhibidor de la fosfodiesterasa, un bloqueante de los canales de calcio, un donante de óxido nítrico o un análogo de nucleótidos cíclicos), un agente antioxidante (tal como N-acetilcisteína, alopurinol, glutatión, manitol, ácido ascórbico, un tocoferol, un tocotrienol o un fenol de té verde), un oligosacárido (tal como ácido lactobiónico, rafinosa o trehalosa), un agente coloidal (tal como hidroxietilalmidón, dextrano, sangre o albúmina), un agente antiinflamatorio (tal como un corticosteroide, un antiinflamatorio no esteroideo, un inhibidor de la MAPKAP quinasa 2, anti-TNF- α , anti-IL-1- β , o un inhibidor de la Cox-2), un conservante de la función endotelial (tal como un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un inhibidor del receptor de angiotensina, una estatina, metformina o un estrógeno), un regulador metabólico (tal como glucosa, adenosina, amilina, péptido génico relacionado con la calcitonina o insulina), un hidrogel (por ejemplo, un hidrogel compuesto por un polisacárido natural, tal como alginato, dextrano, chitosano y glucosaminoglucano, o un polímero hidrófilo, tal como polietilenglicol, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polihidroxibutirato o poli(n-isopropilacrilamida), un inhibidor de la proteína del shock térmico 27 (HSP27) (tal como un ARNsi o ARNmi que inhibe la expresión de HSP27), un regulador de HSP20 (tal como un anti-ARNmi que potencia la expresión de HSP20) y/o un inhibidor de la quinasa MAPKAP 2 (tal como un inhibidor peptídico).
7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho explante está marcado con un marcador sin alcohol y, opcionalmente, en el que dicho marcador comprende un colorante que comprende erioglaucina/Colorante Azul nº1 y, además opcionalmente, en el que el procedimiento restaura la viabilidad funcional de un explante venoso que, antes de estabilizar la etapa (a) de la reivindicación 1, no era viable.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el explante venoso estabilizado se caracteriza además por ser capaz de generar una fuerza contráctil superior a la de un vaso sanguíneo control cuando se contrae con KCl in vitro.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el explante venoso estabilizado se caracteriza además por ser capaz de resistir presiones de lavado internas de menos de 26,7 kPa cuando está distendido y, opcionalmente, en el que la luz de los explantes venosos estabilizados se lava con la solución tamponada a presiones de lavado inferiores a 26,7 kPa .
10. Un rotulador quirúrgico estéril en el que (i) el rotulador está cargado con un colorante que comprende erioglaucina/Colorante Azul nº 1 o (ii) el rotulador está vacío y se proporciona con erioglaucina/Colorante Azul nº 1 en una solución estéril o en forma de reactivo estéril para que un usuario cargue el rotulador.
11. Un kit de transplante de vena estéril, que comprende:
 - (a) un rotulador quirúrgico estéril de acuerdo con la reivindicación 10; y
 - (b) una solución fisiológica tamponada estéril o reactivos estériles para fabricarla; en el que el kit opcionalmente comprende además uno o más de
 - (c) un recipiente adecuado para bañar un explante venoso;
 - (d) uno o más de heparina, un agente anti-contráctil, un agente antioxidante, un oligosacárido, un agente coloidal, un agente antiinflamatorio, un conservante de la función endotelial, un regulador metabólico, un

hidrogel, un inhibidor de la proteína del shock térmico, sulfato de magnesio y/o un inhibidor de la quinas MAPKAP 2;

5 (e) un dispositivo para lavar la luz de un explante venoso, en el que dicho dispositivo está diseñado para prevenir las presiones de lavado en el interior del explante venoso superiores a 26,7 kPa o de más de 20 kPa y, opcionalmente, en el que el dispositivo comprende una jeringuilla y/o un catéter y una válvula de venteo y, además opcionalmente, en el que la jeringuilla o catéter comprende una punta con forma de bala que comprende una luz para la introducción en un extremo proximal de dicho explante venoso; y/o

(f) una pinza diseñada para sujetar dicho explante venoso.

10 12. El kit de la reivindicación 11, en el que dicha solución tamponada comprende solución salina tamponada con fosfato, MOPS, HEPES, PIPES, acetato o Plasmalyte y en el que dicha solución tamponada está a pH de 7,0-7,6.

13. Una solución tamponada estéril de pH de 7,0-7,6, en la que dicha solución tamponada comprende erioflavina/Colorante Azul nº 1, y opcionalmente además comprende heparina.

14. La solución de la reivindicación 13, en la que dicha solución tamponada comprende solución salina tamponada con fosfato, MOPS, HEPES, PIPES, acetato o Plasmalyte.

15 15. La solución de la reivindicación 13, en la que dicha solución tamponada comprende además uno o más de un agente anticontráctil (tal como un inhibidor de la fosfodiesterasa, un bloqueante de los canales de calcio, un donante de óxido nítrico o un análogo de nucleótidos cíclicos), un agente antioxidante (tal como N-acetilcisteína, alopurinol, glutatión, manitol, ácido ascórbico, un tocoferol, un tocotrienol o un fenol de té verde), un oligosacárido (tal como ácido lactobiónico, rafinosa o trehalosa), un agente coloidal (tal como hidroxietilalmidón, dextrano, sangre o albúmina), un agente antiinflamatorio (tal como un corticosteroide, un antiinflamatorio no esteroideo, un inhibidor de la MAPKAP quinasa 2, anti-TNF- α , anti-IL-1- β , o un inhibidor de la Cox-2), un conservante de la función endotelial (tal como un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, un inhibidor del receptor de angiotensina, una estatina, metformina o un estrógeno), un regulador metabólico (tal como glucosa, adenosina, amilina, péptido génico relacionado con la calcitonina o insulina), un hidrogel (tal como un hidrogel compuesto por un polisacárido natural tal como alginato, dextrano, chitosano y glucosaminoglucano, o un polímero hidrófilo tal como polietilenglicol, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polihidroxibutirato o poli(n-isopropilacrilamida), un inhibidor de la proteína del shock térmico 27 (HSP27) (tal como un ARNsi o ARNmi que inhibe la expresión de HSP27), un regulador de HSP20 (tal como un anti-ARNmi que potencia la expresión de HSP20) y/o un inhibidor de la quinas MAPKAP 2 (tal como un inhibidor peptídico).

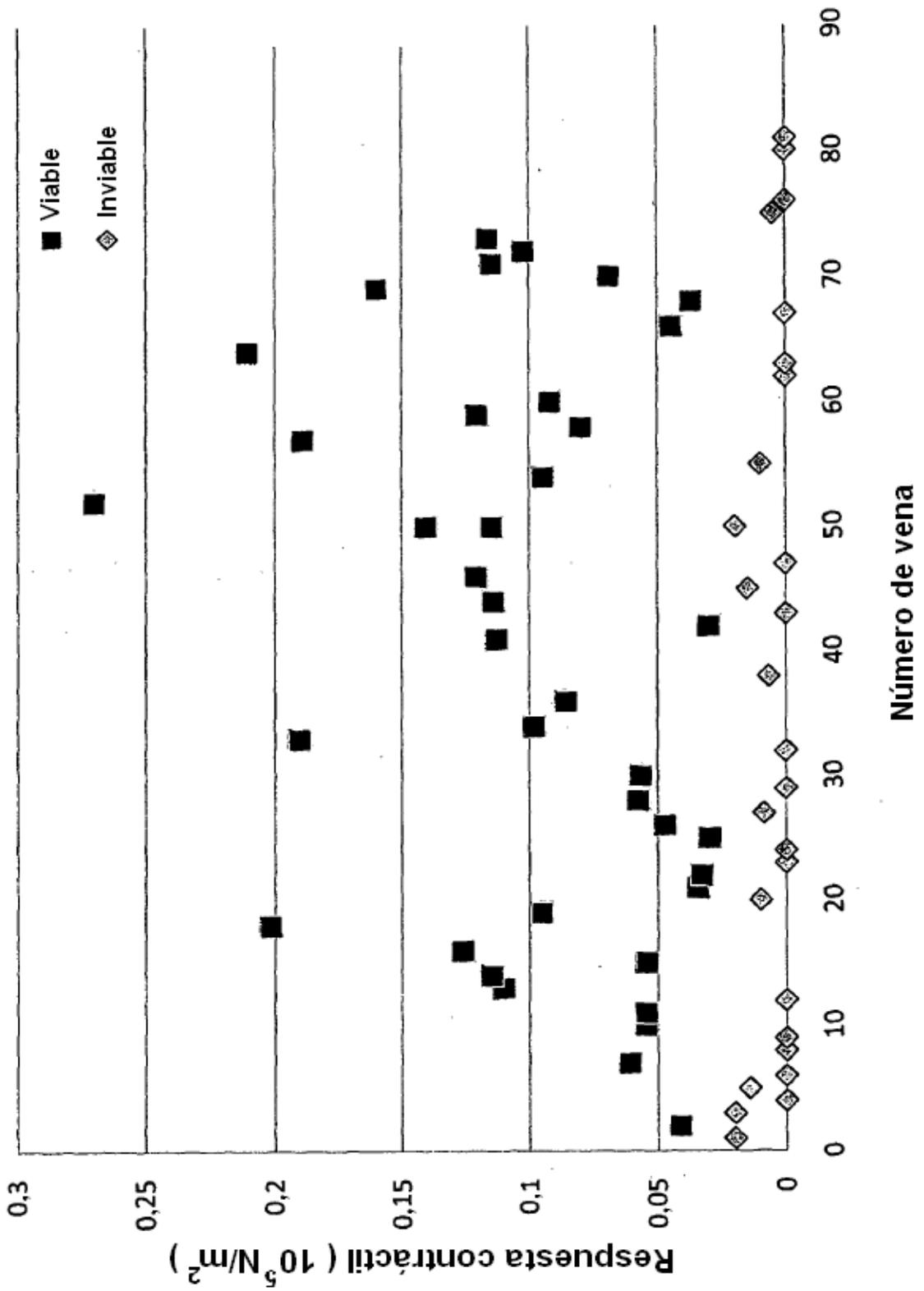
30 16. La solución de la reivindicación 13, en la que dicho pH es 7,35-7,45 o es seleccionado de pH 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6.

17. Un colorante que comprende erioflavina/Colorante Azul nº 1 para su uso en el marcado de una vena en un paciente antes de la extracción de la vena del paciente.

18. Uso de erioflavina/Colorante Azul nº 1 para marcar un explante venoso.

35 19. Uso de erioflavina/Colorante Azul nº 1 para estabilizar y/o conservar o restablecer la viabilidad funcional de un explante venoso.

FIG. 1



FIGS. 2A-B

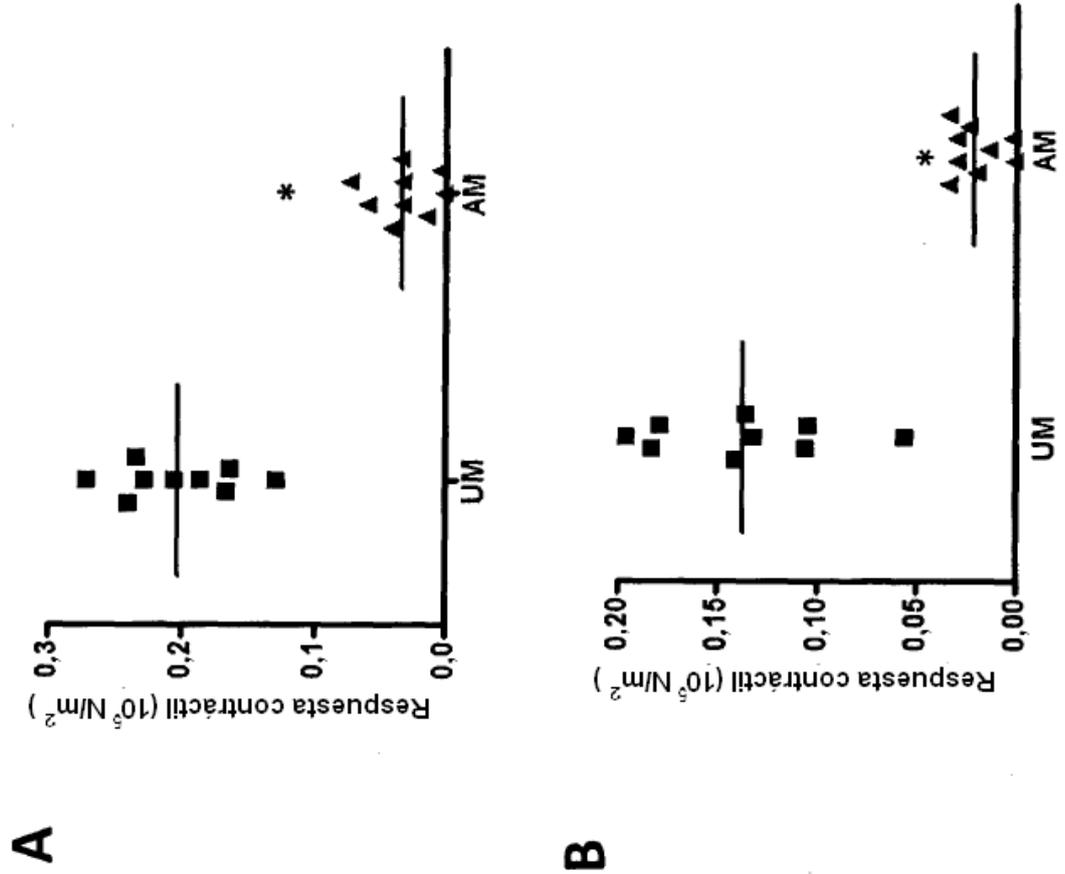


FIG. 3

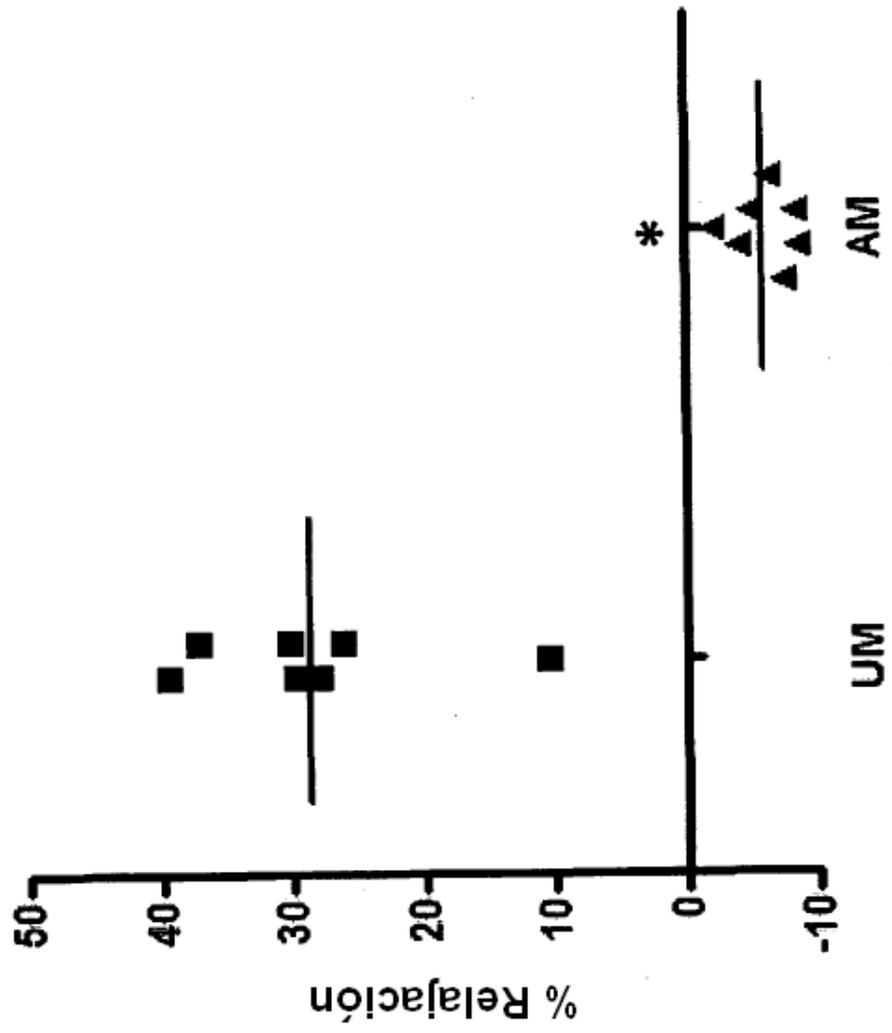


FIG. 4

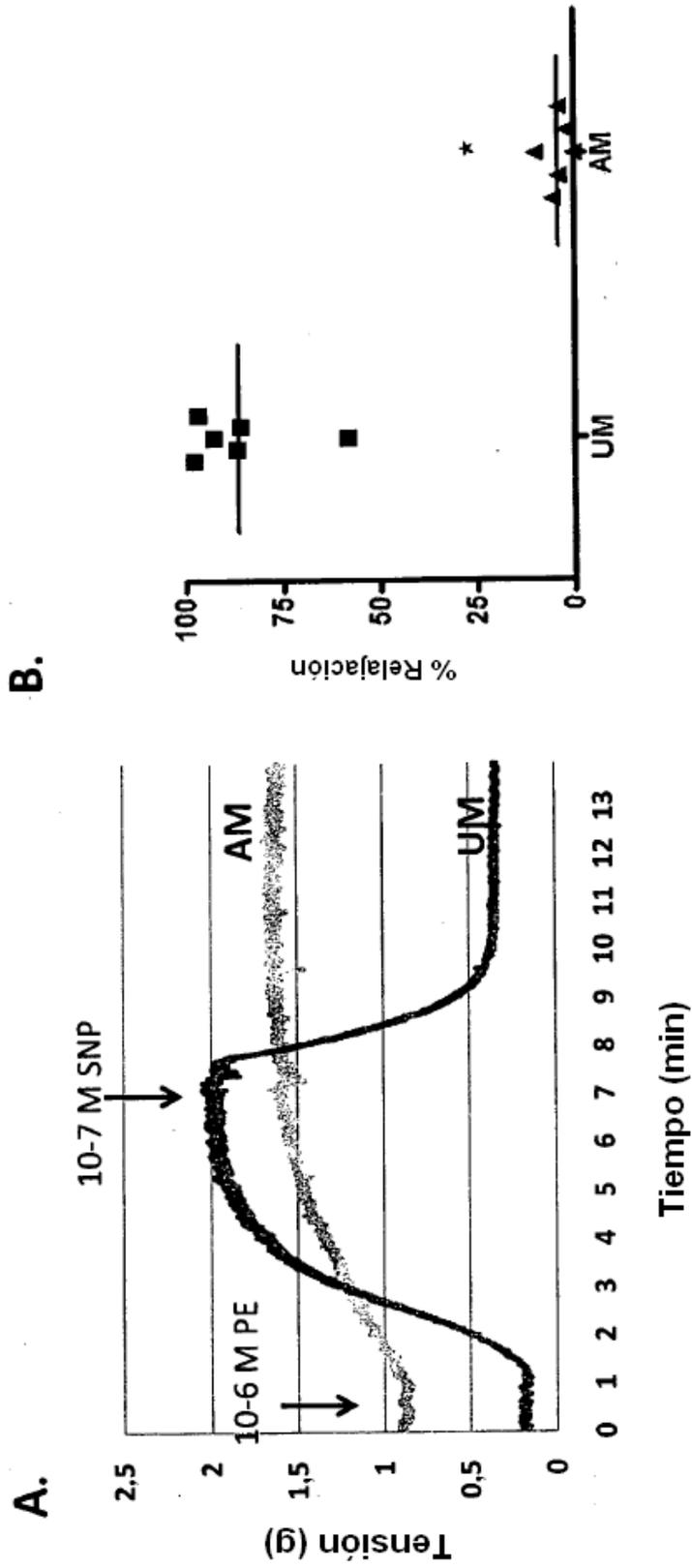


FIG. 5

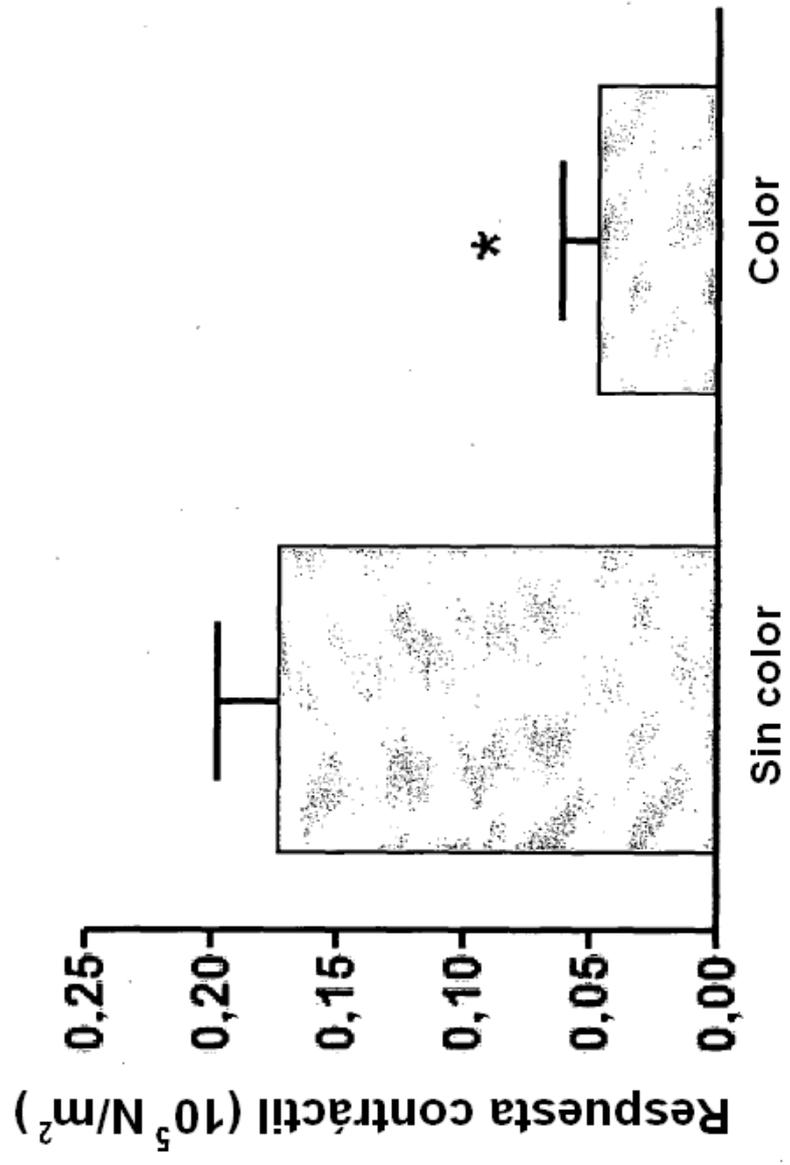


FIG. 6

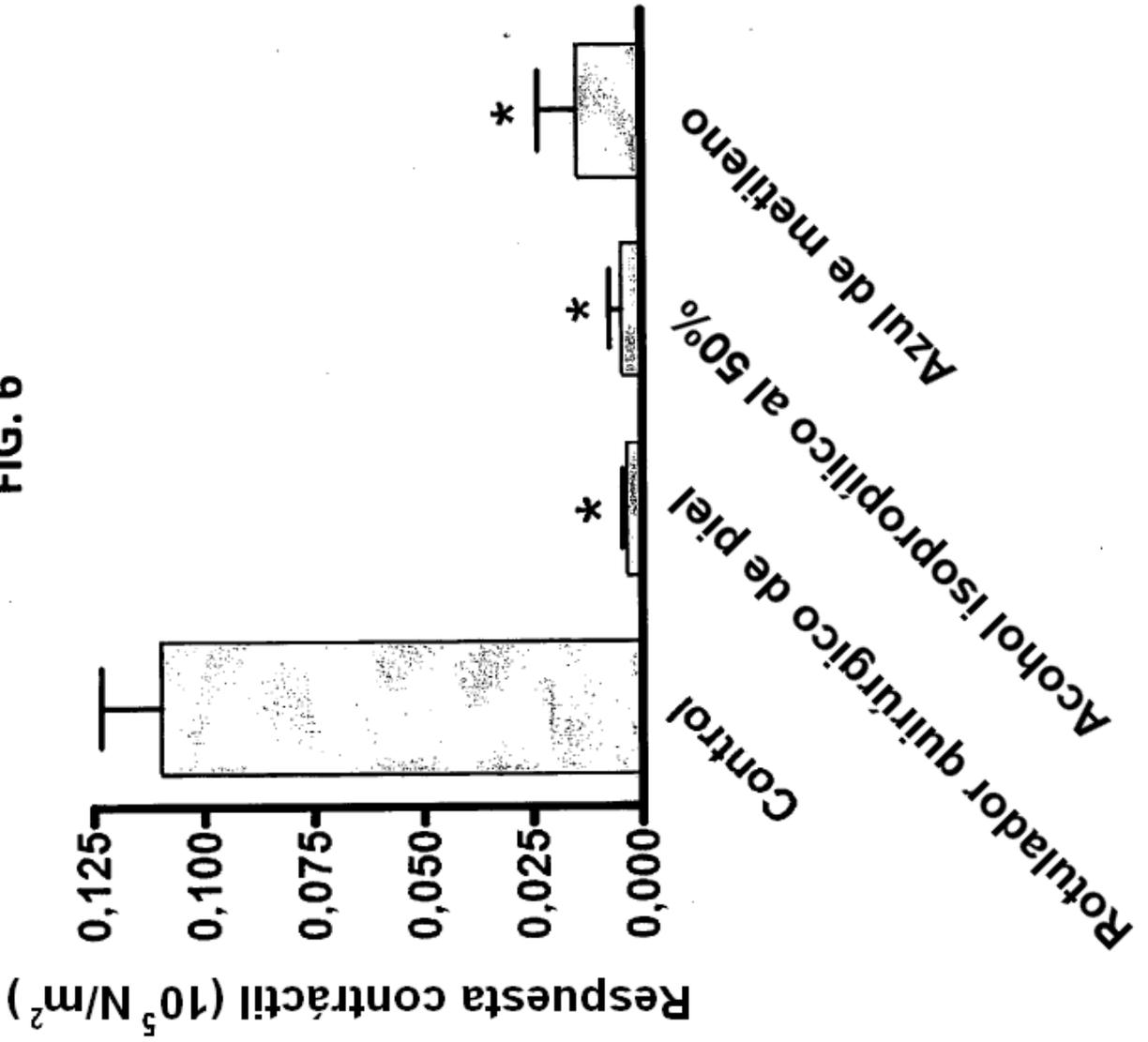


FIG. 7

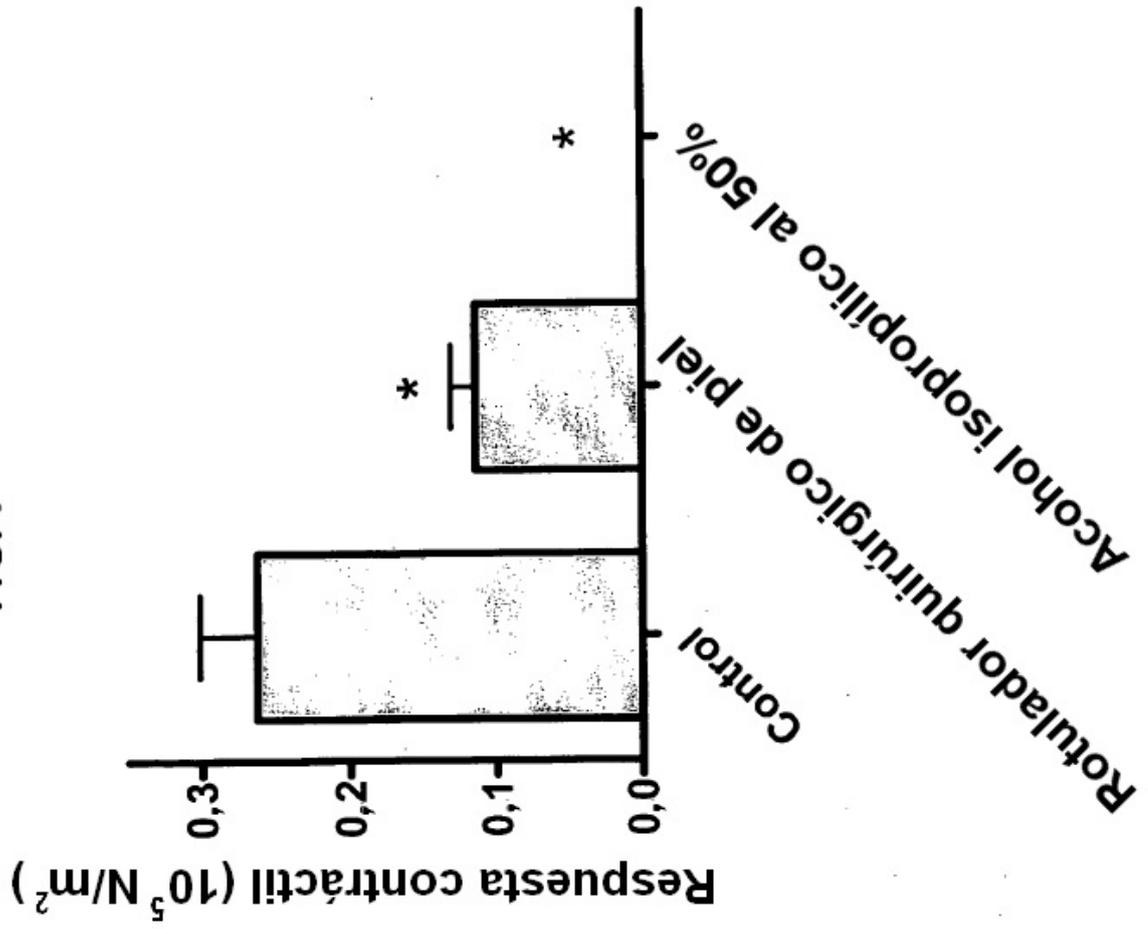


FIG. 8

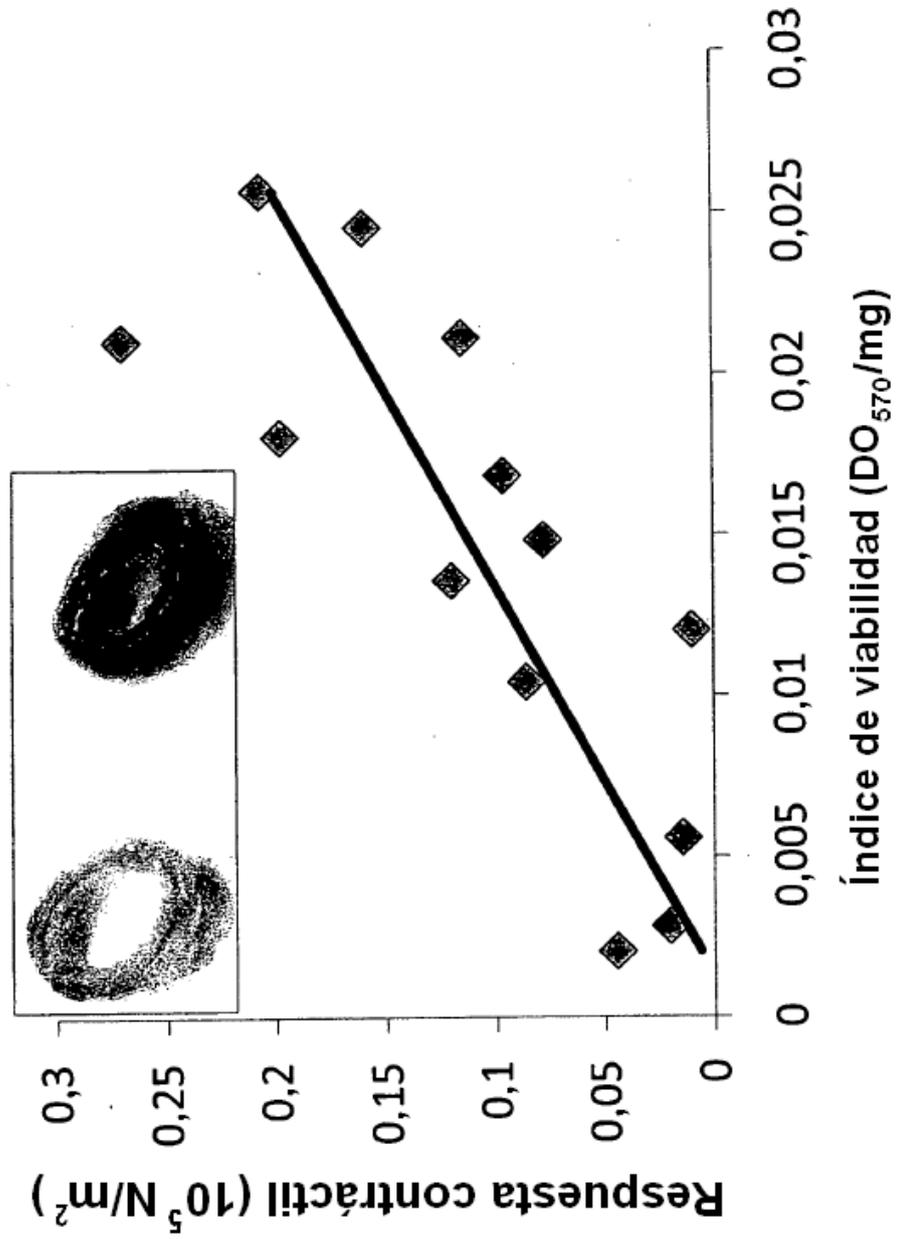


FIG. 9

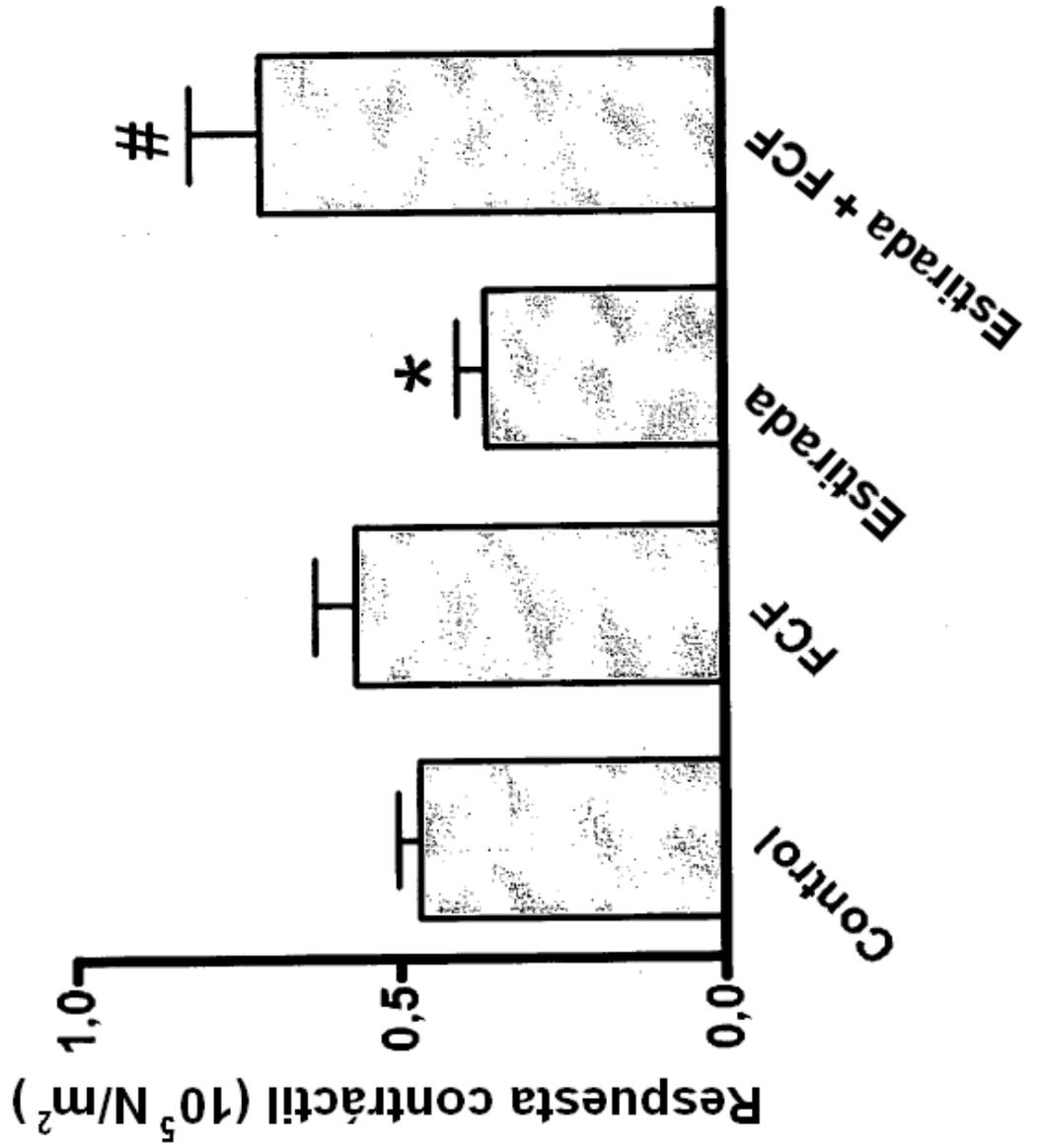


FIG. 10

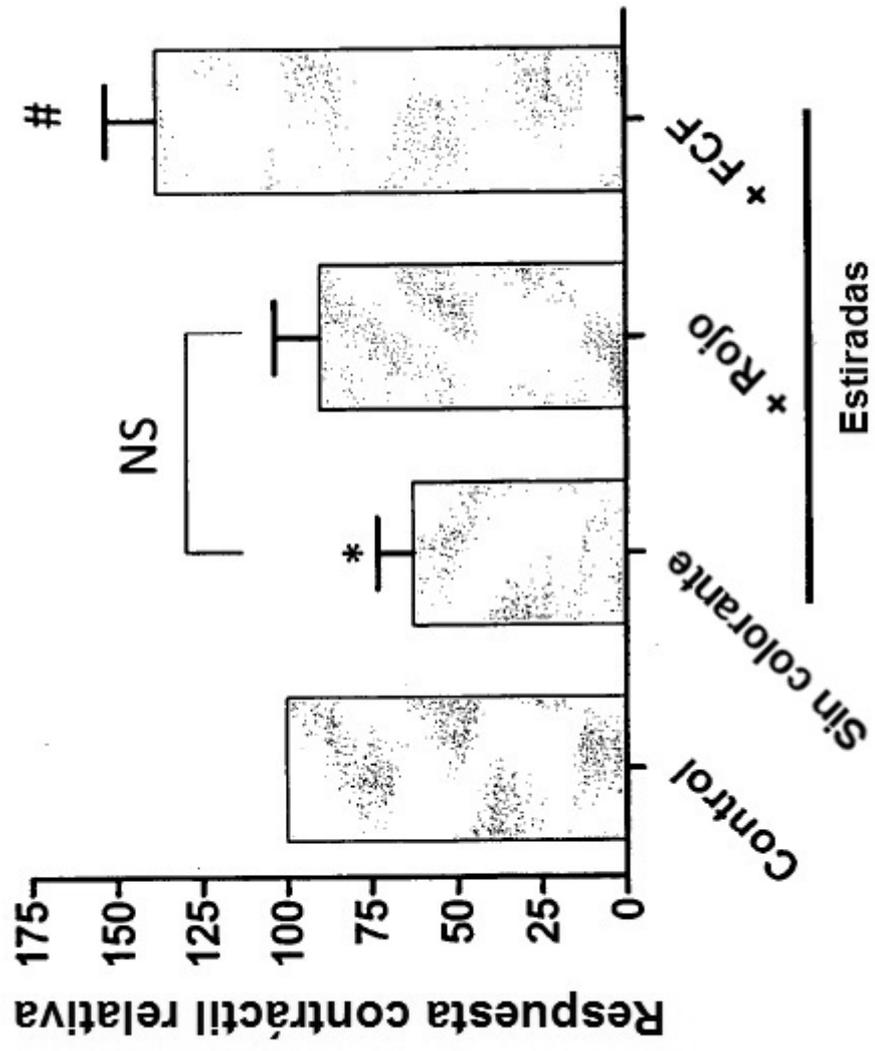


FIG. 11

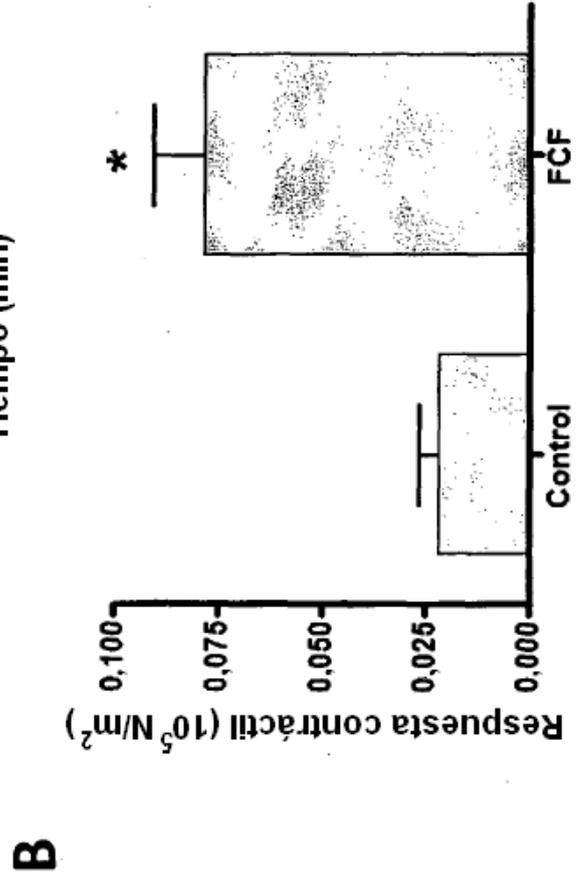
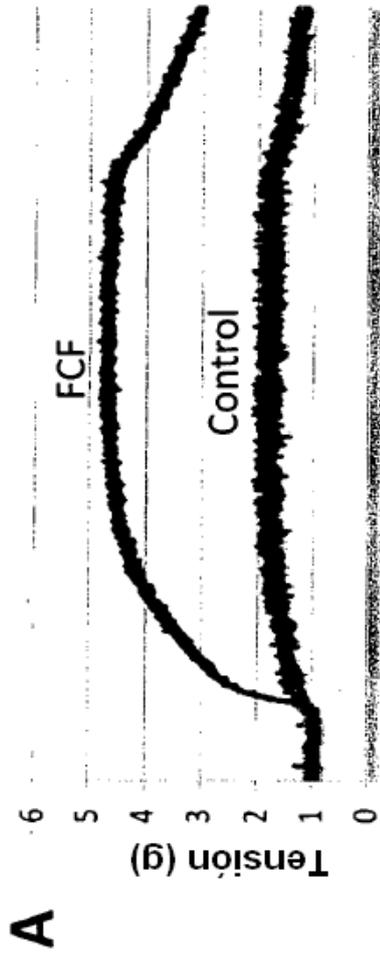


FIG. 12

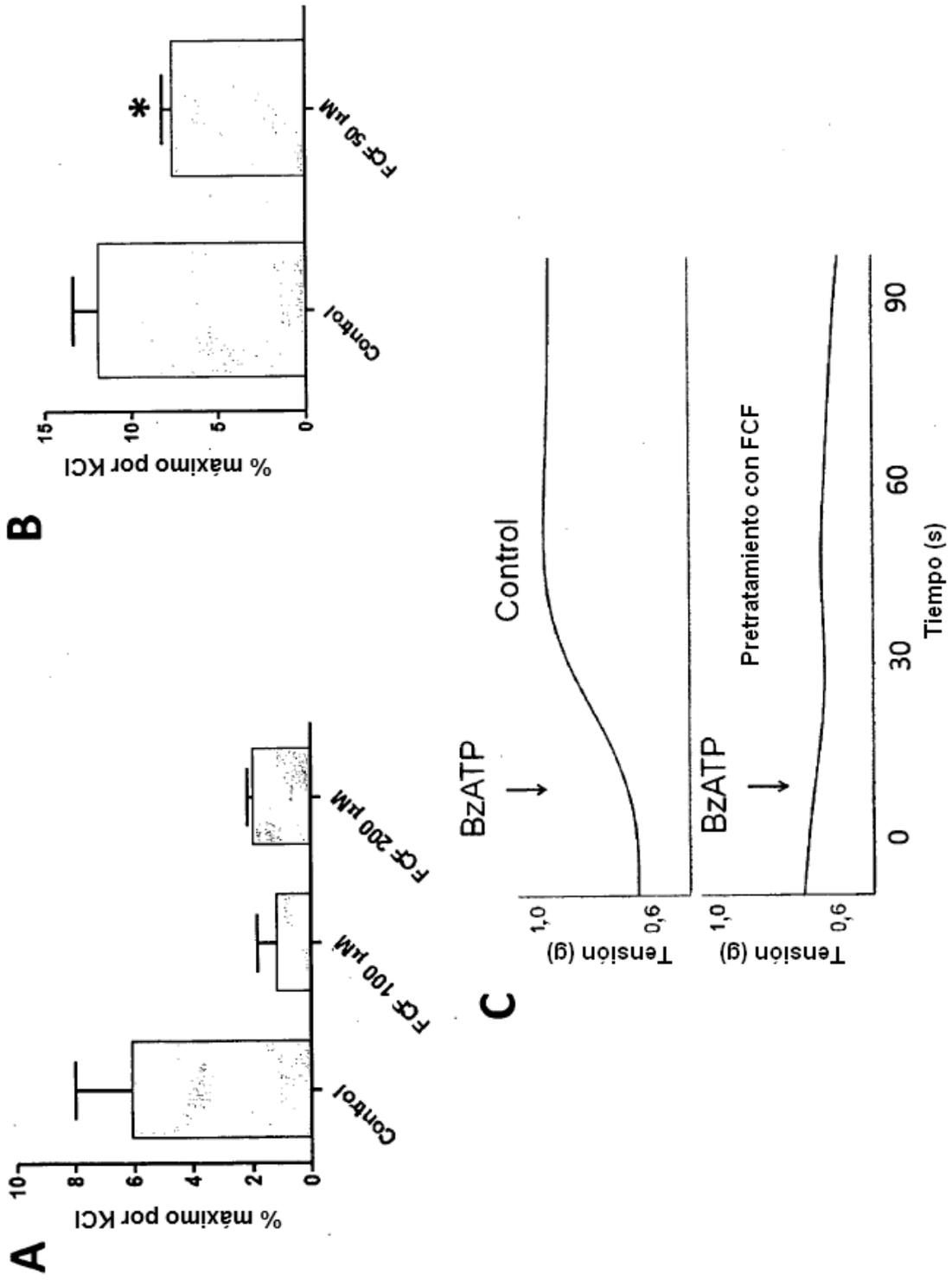


FIG. 13

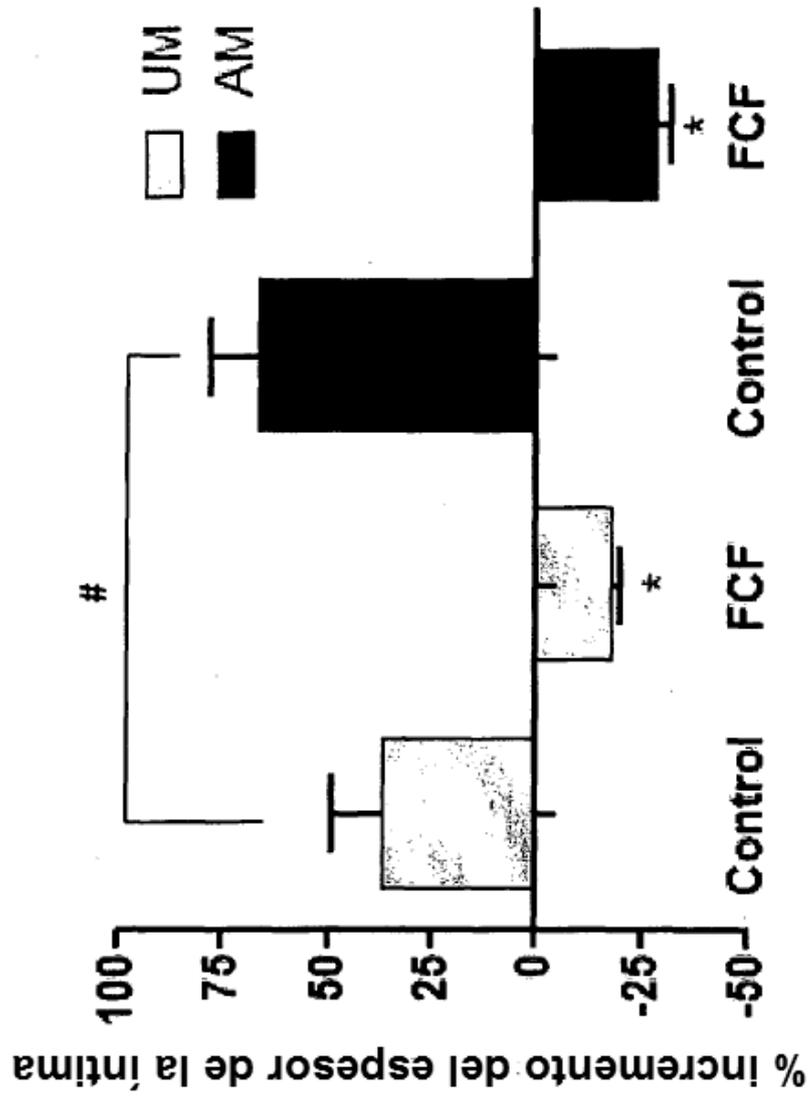


FIG. 14

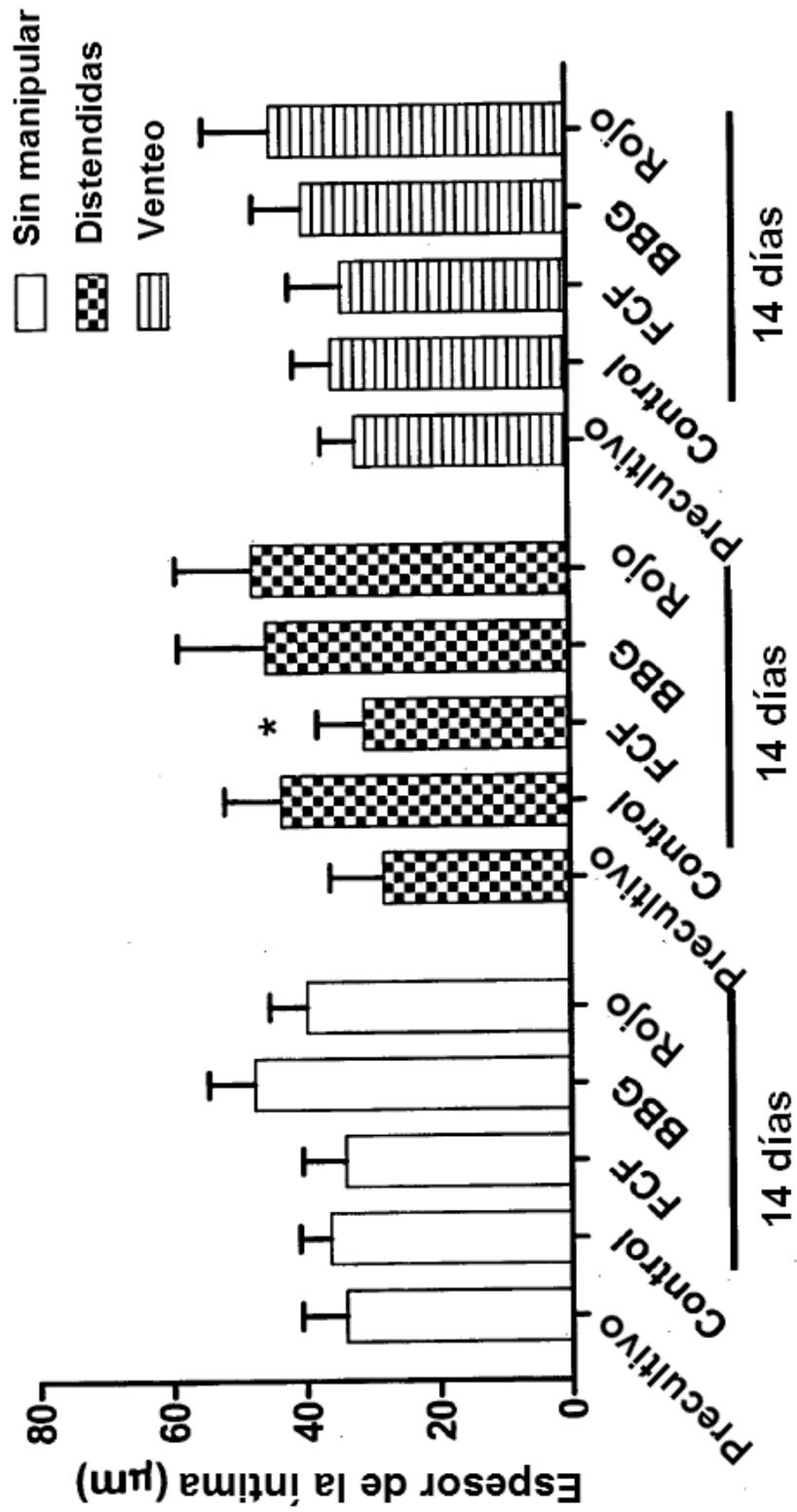


FIG. 15

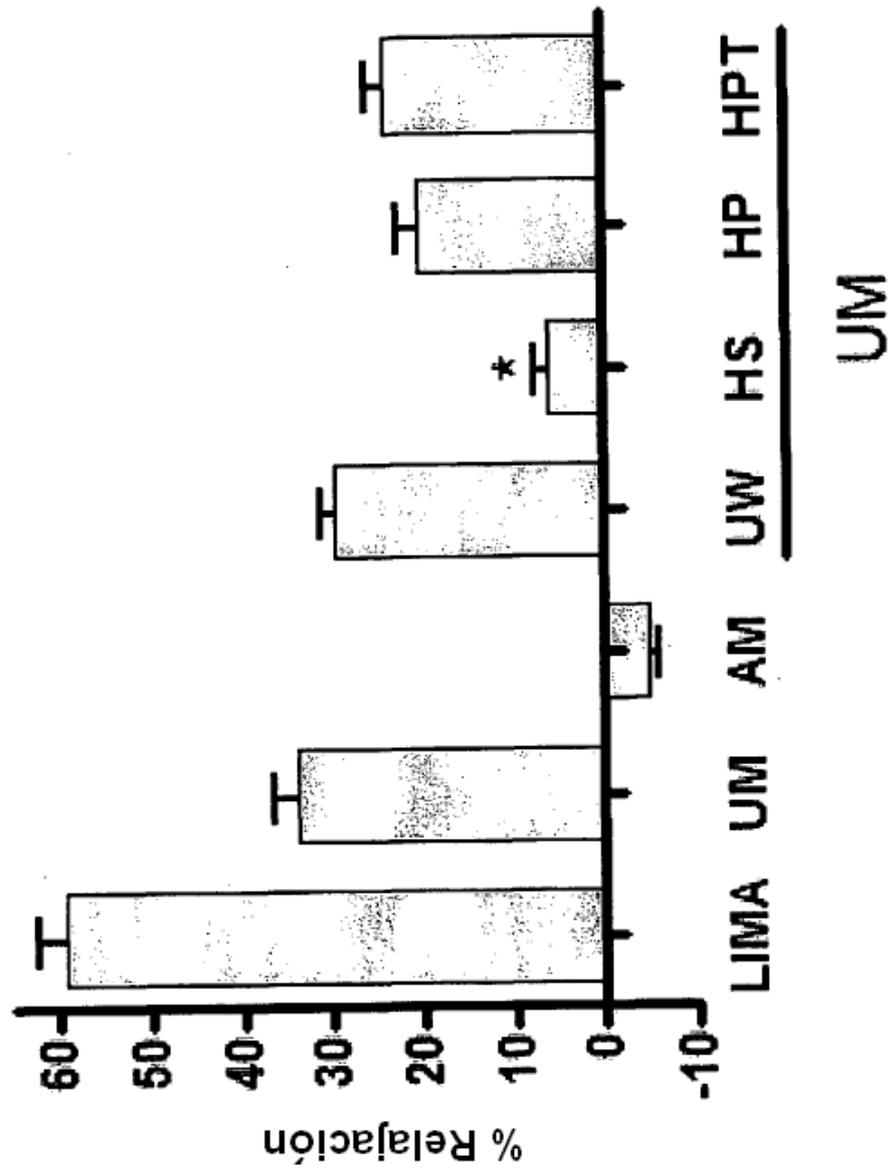


FIG. 16

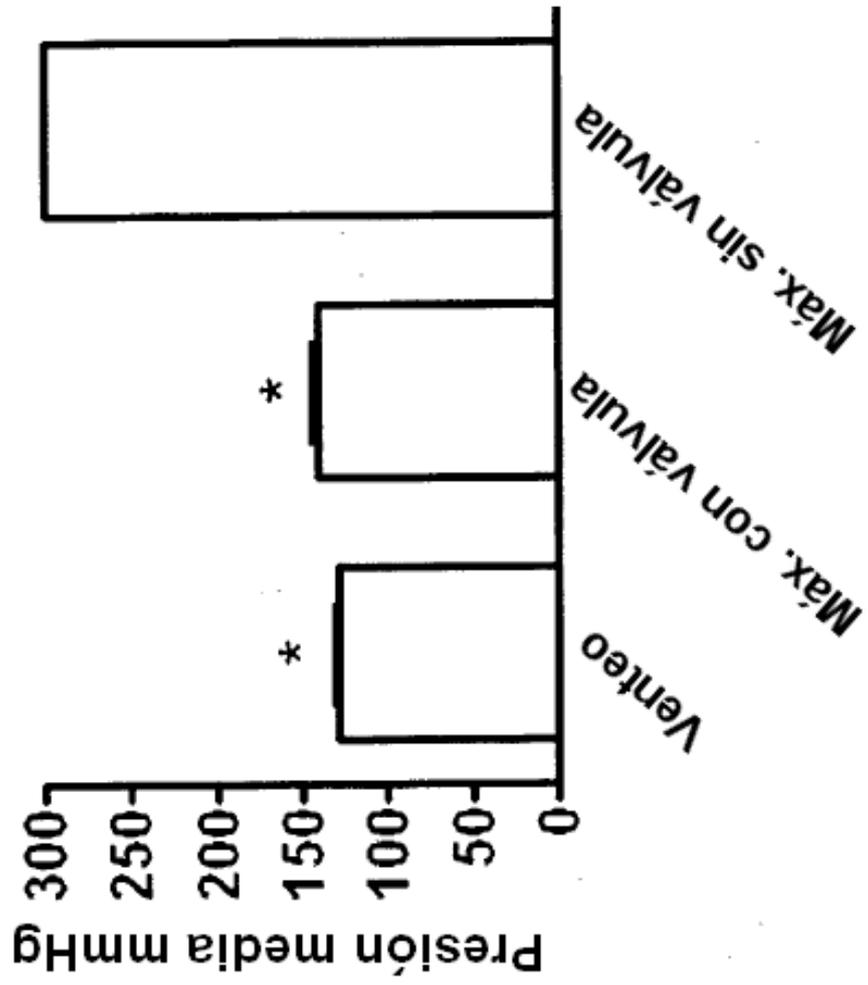


FIG. 17

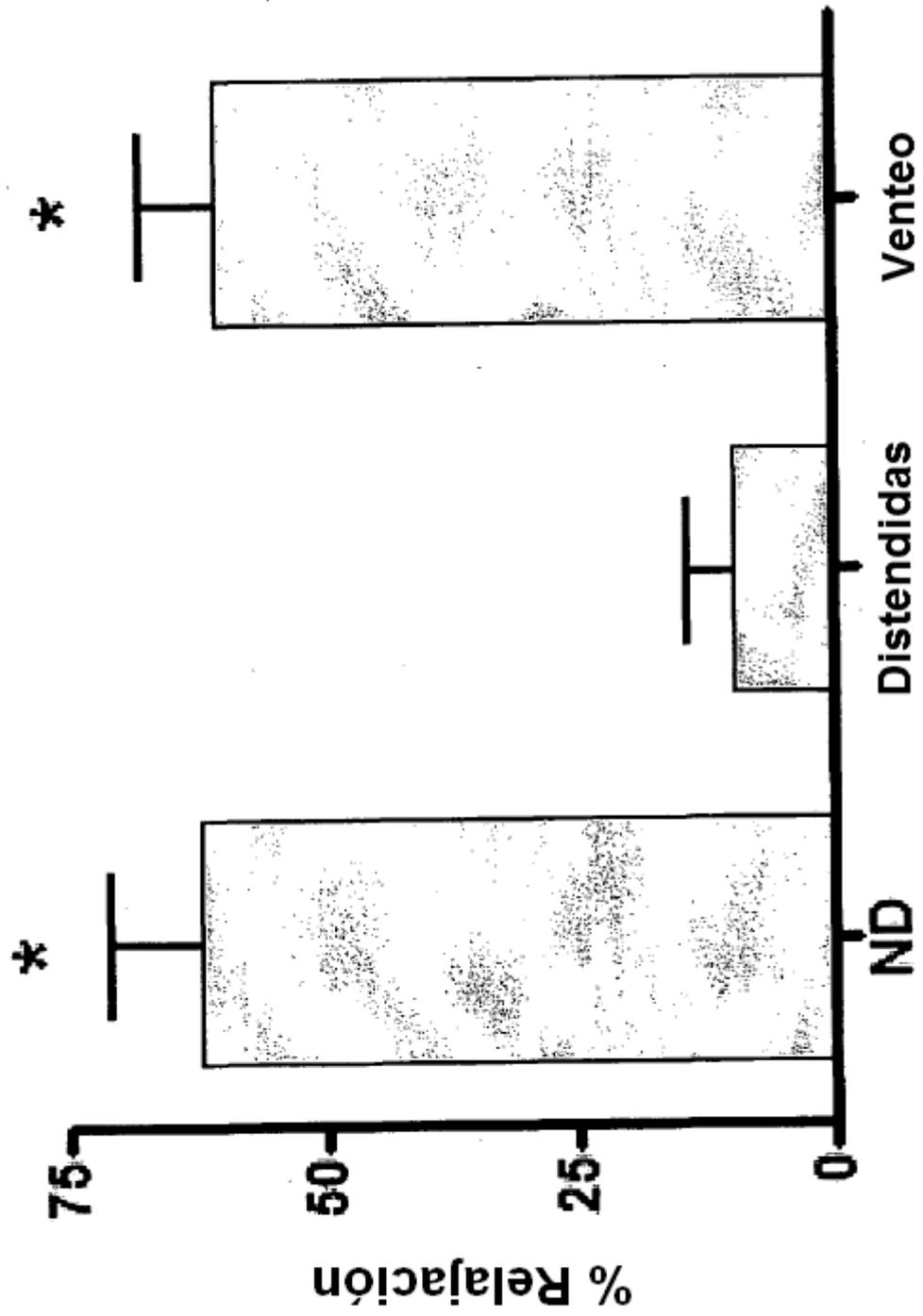


FIG. 18

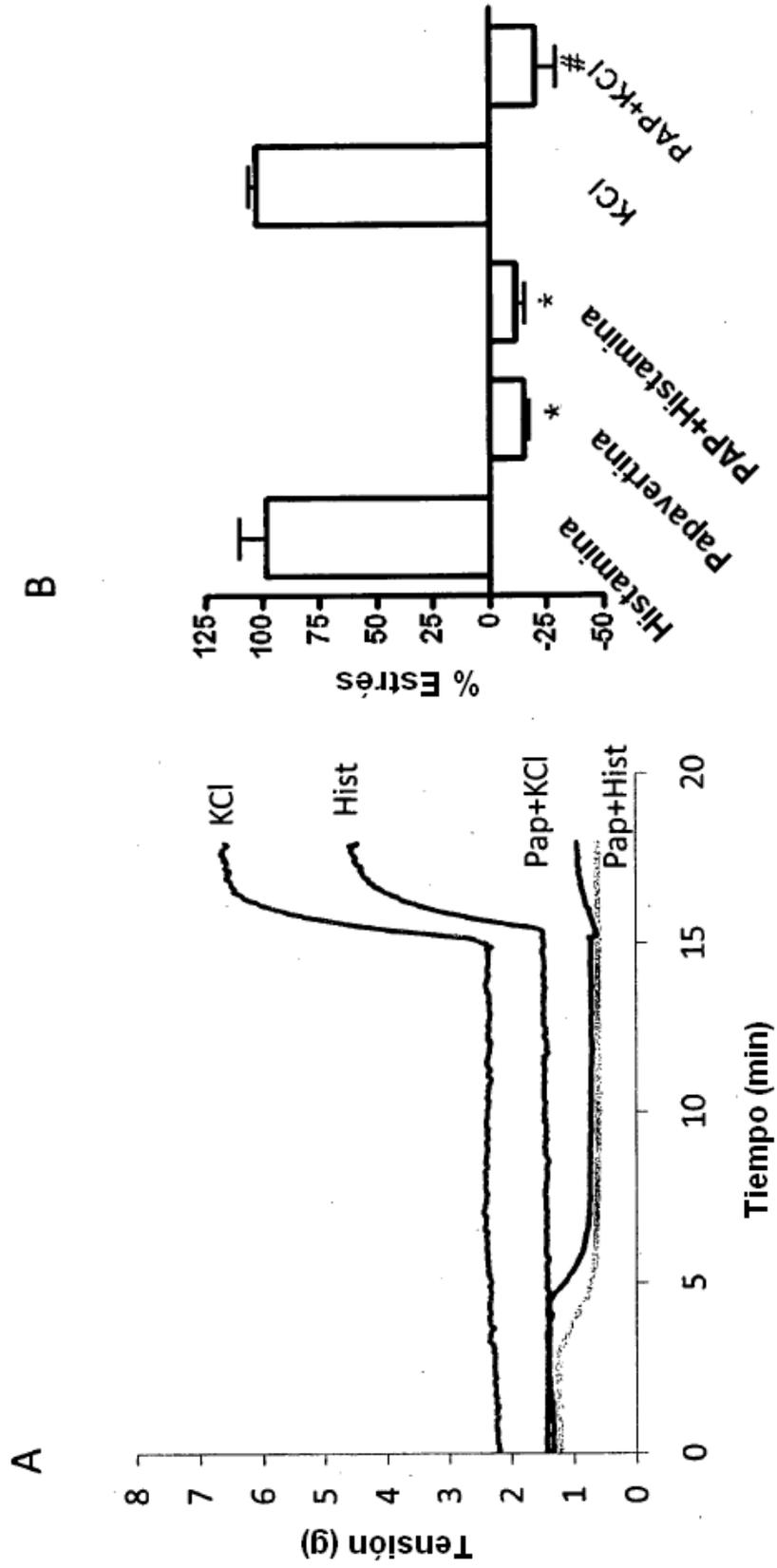


FIG. 19

