

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 280**

51 Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2003 E 03746917 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 1499333**

54 Título: **Monóxido de carbono para su uso en un método para tratar íleo**

30 Prioridad:

15.04.2002 US 372652 P

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

22.09.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (50.0%)
200 Gardner Steel Conference Center, Thackeray
& O'Hara Streets
Pittsburgh, PA 15260-4002, US y
YALE UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OTTERBEIN, LEO E.;
CHOI, AUGUSTINE M. K.;
MOORE, BEVERLEY A. y
BAUER, ANTHONY J.**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 546 280 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

Monóxido de carbono para su uso en un método para tratar íleo

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/372.652 presentada el 15 de abril de 2002.

10 Campo técnico

La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos gastrointestinales.

Antecedentes

15

El gas monóxido de carbono (CO) es venenoso a altas concentraciones. Sin embargo, ahora se ha reconocido como una importante molécula de señalización (Verma et al., *Science* 259:381-384, 1993). También se ha sugerido que el monóxido de carbono actúa de molécula mensajera neuronal en el cerebro (*ibidem*) y como modulador neuroendocrino en el hipotálamo (Pozzoli et al., *Endocrinology* 735:2314-2317, 1994). Al igual que el óxido nítrico (NO), el

20 monóxido de carbono es un relajante de músculo liso (Utz et al., *Biochem Pharmacol.* 47:195-201, 1991; Christodoulides et al., *Circulation* 97:2306-9, 1995) e inhibe la agregación de plaquetas (Mansouri et al., *Thromb Haemost.* 48:286-8, 1982). Se ha mostrado que la inhalación de bajos niveles de monóxido de carbono tiene efectos antiinflamatorios en algunos modelos.

25 El íleo es una afección caracterizada por una falta de motilidad intestinal, y es una de las formas más comunes de obstrucción intestinal (véase, por ejemplo, *Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). Frecuentemente, el íleo se produce a lo largo del tubo digestivo (por ejemplo, tanto en el intestino grueso como en el delgado), pero algunas veces puede implicar solo uno o varios segmentos del mismo. La manipulación intestinal durante la cirugía abdominal con frecuencia conduce a íleo.

30

Se han propuesto diversos enfoques farmacéuticos para tratar el íleo (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.362.756 (fedotozina); 5.929.035 (neuropéptidos); 6.214.843 (pirazolopiridina); y 5.958.407 (por ejemplo, receptor-2 activado por proteínasa antagonizante)).

35 Resumen

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de CO puede atenuar el íleo.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención caracteriza el uso de monóxido de carbono para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de íleo en un paciente. También se describe en el presente documento monóxido de carbono para su uso en un método para tratar íleo en un paciente, que incluye identificar un paciente que padece o en riesgo de íleo y administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz o concentración de monóxido de carbono.

45 El íleo puede ser íleo de cualquier porción del tubo gastrointestinal, por ejemplo, el estómago, intestino delgado y/o el colon. El íleo puede resultar de cualquier factor que produzca íleo, por ejemplo, cirugía, por ejemplo, cirugía abdominal tal como cirugía de trasplante (por ejemplo, trasplante del intestino delgado (SITx)) o cirugía abdominal distinta de cirugía de trasplante (por ejemplo, cirugía abdominal que implica laparotomía o que no implica laparotomía, por ejemplo, procedimientos laparoscópicos); cirugías ortopédicas (por ejemplo, cirugía de cadera); parto; isquemia intestinal; hematoma retroperitoneal; sepsis intrabdominal; inflamación intraperitoneal, por ejemplo, apendicitis aguda, colecistitis, pancreatitis; fracturas de la columna vertebral; cólico ureteral; lesiones torácicas; neumonía basal; fracturas de costillas; infarto de miocardio; alteraciones metabólicas; o cualquier combinación de los mismos.

55 La composición farmacéutica puede administrarse al paciente por cualquier método conocido en la técnica para administrar gases, líquidos y/o sólidos a pacientes, por ejemplo, mediante inhalación, insuflación, infusión, inyección y/o ingestión. Por ejemplo, en una realización de la presente invención, la composición farmacéutica se administra al paciente por inhalación. En otra realización, la composición farmacéutica se administra al paciente por vía oral. En otra realización más, la composición farmacéutica se administra directamente a la cavidad abdominal del paciente.

60

El uso y método pueden incluir adicionalmente administrar al paciente al menos uno de los siguientes tratamientos además de CO: inducir HO-1 o ferritina en el paciente; expresar HO-1 recombinante o ferritina en el paciente; y administrar una composición farmacéutica que comprende HO-1, bilirrubina, biliverdina, ferritina, desferoxamina, hierro dextrano, o apoferritina al paciente.

65

En otro aspecto, la invención caracteriza un uso que implica tratar íleo posquirúrgico en un paciente. El uso incluye identificar un paciente que padece íleo posquirúrgico y administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de monóxido de carbono eficaz para tratar íleo en el paciente. La cirugía según el uso reivindicado o el método descrito en el presente documento puede ser cualquier cirugía que produzca y/o ponga al

5 paciente en riesgo de íleo. Por ejemplo, la cirugía puede implicar manipulación (por ejemplo, tocar (directamente o indirectamente)) el tubo gastrointestinal, por ejemplo, el estómago y/o intestinos, por ejemplo, intestino delgado o grueso (por ejemplo, el colon), y puede ser una cirugía que implica laparotomía o que no implica laparotomía (por ejemplo, cirugías que implican laparoscopia). En ciertas realizaciones, la cirugía puede ser cirugía de trasplante o cirugía no de trasplante, por ejemplo, cirugía que implica cualquier órgano(s) o tejido(s) en el abdomen, por ejemplo,

10 cirugía del aparato genitourinario (por ejemplo, riñones, uréter y/o vejiga; y órganos reproductores (por ejemplo, útero, ovario y/o trompas de Falopio)); el aparato digestivo (por ejemplo, el estómago, intestino delgado, intestino grueso (por ejemplo, el colon), apéndice, vesícula biliar, hígado, bazo y/o páncreas); el sistema linfático; el aparato respiratorio (por ejemplo, los pulmones); el diafragma; cirugía para tratar cáncer de cualquier órgano o tejido dentro del abdomen; cirugía endometrial; y cirugías ortopédicas, por ejemplo, cirugía de la cadera. El íleo puede ser íleo de

15 cualquier parte del tubo gastrointestinal, por ejemplo, el estómago, intestino delgado y/o intestino grueso (por ejemplo, el colon). La composición farmacéutica puede administrarse al paciente mediante cualquier vía descrita en el presente documento, por ejemplo, mediante inhalación (de composiciones gaseosas); por vía oral; y/o por administración directa a la cavidad abdominal del paciente.

20 La invención también caracteriza un uso que implica tratar íleo en un paciente que padece o en riesgo de íleo no producido por cirugía abdominal, por ejemplo, íleo producido por cualquier factor descrito en el presente documento distinto de cirugía abdominal. El uso incluye identificar un paciente que padece o en riesgo de íleo no producido por cirugía abdominal y administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de monóxido de carbono eficaz para tratar íleo en el paciente.

25 En otro aspecto, la invención caracteriza un uso que implica tratar íleo en un paciente, que incluye las etapas de proporcionar un recipiente que contiene un gas presurizado que comprende gas monóxido de carbono, identificar un paciente que padece o en riesgo de íleo, liberar el gas presurizado del recipiente para formar una atmósfera que incluye gas monóxido de carbono, y exponer el paciente a la atmósfera, en el que la cantidad de monóxido de

30 carbono en la atmósfera es suficiente para tratar íleo en el paciente.

En el presente documento también se describe que el gas CO puede estar en mezcla con gas nitrógeno, con óxido nítrico y gas nitrógeno, o con un gas que contiene oxígeno. El gas CO puede estar presente en mezcla a una concentración de al menos aproximadamente el 0,025 %, por ejemplo, de al menos aproximadamente el 0,05 %,

35 0,10 %, 0,50 %, 1,0 %, 2,0 %, 10,0 %, 50 % o el 90 %.

En otro aspecto más, la invención proporciona un uso que implica tratar íleo en un paciente, que incluye identificar un paciente que padece o en riesgo de íleo y administrar al paciente al menos uno de los siguientes tratamientos conjuntamente con el tratamiento con CO: inducir HO-1 o ferritina en el paciente; expresar HO-1 recombinante o

40 ferritina en el paciente; y administrar una composición farmacéutica que comprende HO-1, bilirrubina, biliverdina, ferritina, o apoferritina al paciente. También se contempla el uso de CO y cualquier de los agentes anteriormente enumerados en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de íleo.

También está dentro de la invención el uso de CO en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o

45 prevención de una afección descrita en el presente documento, por ejemplo, íleo. El medicamento también puede usarse en un método para tratar íleo en un paciente y/o para tratar donantes, órganos y/o receptores en procedimientos de trasplante. El medicamento puede estar en cualquier forma descrita en el presente documento, por ejemplo, una composición de CO líquida o gaseosa.

50 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Métodos adecuados y materiales se describen a continuación, aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.

55 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y de las reivindicaciones.

60 Descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de líneas que ilustra el efecto del trasplante de intestino delgado (SITx) y tratamiento con CO sobre la contractilidad de músculo circular del intestino delgado espontánea y estimulada con betanecol. ▲ = control; ◇ = control + CO; X = SITx; ■ = SITx + CO.

65

La Fig. 2A es un gráfico de barras que ilustra el efecto de CO sobre el tránsito intestinal en animales de control (animales no sometidos a SITx). Barras negras = control; barras rayadas = control + CO (250 ppm); estom = estómago; id = intestino delgado.

5 La Fig. 2B es un gráfico de barras que ilustra el efecto de CO sobre el tránsito intestinal en animales que se han sometido a SITx. Barras negras = SITx; barras rayadas = SITx + CO (250 ppm); estom = estómago; id = intestino delgado; y col = colon.

La Fig. 2C es un gráfico de barras que ilustra que el CO mejoró significativamente el tránsito intestinal en ratas que se han sometido a SITx. El gráfico resume mediciones del centro geométrico del tránsito calculadas. Control = animales de control expuestos a aire; control + CO = animales de control expuestos a CO; SITx = animales que reciben SITx y expuestos a aire; SITx + CO = animales que reciben SITx y expuestos a CO.

La Fig. 3 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de CO sobre el reclutamiento de leucocitos en el músculo intestinal tras SITx. Control = animales de control expuestos a aire; control + CO = animales de control expuestos a CO; SbTx = animales que reciben SITx y expuestos a aire; SbTx + CO = animales que reciben SITx y expuestos a CO.

La Fig. 4A es un gráfico de líneas que ilustra la expresión de ARNm de IL-6 en la mucosa y músculo en diversos momentos de tiempo después de SITx, como se mide por ensayo de protección de RNasa.

■ = músculo; ○ = mucosa.

La Fig. 4B es un gráfico de líneas que ilustra la expresión de ARNm de IL-1β en la mucosa y músculo en diversos momentos de tiempo después de SITx, como se mide por ensayo de protección de RNasa.

■ = músculo; ○ = mucosa.

La Fig. 5 es un conjunto de gráficos de barras que ilustran el efecto de CO sobre la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS), IL-6, IL-1β y IL-10 en los músculos externos de injertos intestinales cuatro horas después de la reperusión, como se mide por análisis de RT-PCR en tiempo real. Normal = animales de control expuestos a aire; Normal + CO = animales de control expuestos a CO; SITx = animales que reciben SITx y expuestos a aire; SITx + CO = animales que reciben SITx y expuestos a CO.

La Fig. 6 es un conjunto de gráficos de barras que ilustran el efecto de CO sobre las concentraciones de IL-6 y nitrato/nitrito en suero en animales que se sometieron a SITx como se mide una (SITx + CO (1 h)) y cuatro (SITx + CO (4 h)) horas después de la reperusión. Normal = animales de control expuestos a aire; Normal + CO = animales de control expuestos a CO; SITx (1 h) y SITx (4 h) = animales que se sometieron a SITx como se mide una y cuatro horas después de la reperusión, respectivamente.

40

La Fig. 7A es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la manipulación intestinal (MI) sobre la expresión de HO-1 en extractos de músculo como se determina usando análisis de RT-PCR de dos etapas en tiempo real. Las muestras se analizaron 3 (MI 3 h), 6 (MI 6 h), 12 (MI 12 h) y 24 (MI 24 h) horas después de la laparotomía. La expresión de HO-1 pico se produjo 3 a 6 h posoperatoriamente. Los datos representan el aumento de veces medio con respecto al control ± EEM, n=6. * $P = 0,001$; ** $P = 0,0001$.

La Fig. 7B es una fotografía de un montaje completo de músculo que ilustra la inmunorreactividad de tipo HO-1 en polimorfoleucocitos que infiltran el músculo tras MI.

La Fig. 7C es una fotografía de un montaje completo de músculo que ilustra la inmunorreactividad de tipo HO-1 en células de tipo macrófago que infiltran el músculo tras MI.

La Fig. 7D es una fotografía de un montaje completo de músculo que ilustra la inmunorreactividad de tipo HO-1 en células que contienen gránulos que infiltran el músculo tras MI. Los sitios de inmunofluorescencia borrosa en la mitad inferior de la imagen son células por debajo del plano del foco.

La Fig. 7E es una fotografía de un montaje completo de músculo que ilustra la falta de inmunorreactividad de tipo HO-1 en el músculo de animales de control.

La Fig. 8A es un gráfico de barras que ilustra los efectos del CO inhalado (exposición de 24 h) sobre el tránsito intestinal en ratones no sometidos a MI. estom = estómago; id = intestino delgado; y col = colon. Barras negras = animales no expuestos a CO; barras rayadas = animales expuestos a CO. La mayoría de la señal de fluorescencia está localizada en el ciego y el colon proximal.

La Fig. 8B es un gráfico de barras que ilustra los efectos del CO inhalado (24 h exposición) sobre el tránsito

intestinal en ratones sometidos MI. Estom = estómago; id = intestino delgado; y col = colon. Barras negras = animales no expuestos a CO; barras rayadas = animales expuestos a CO. Después de MI, el tránsito se retrasa significativamente. La inhalación de CO produjo una distribución más distal del dextrano marcado (MI-CO).

5 La Fig. 8C es un gráfico de barras que ilustra el resultado de cálculos del centro geométrico (CG).

Números mayores se corresponden con una distribución más distal de dextrano marcado. Control = animales de control; Control + CO = animales de control expuestos a CO; MI = animales sometidos a MI; MI + CO = animales sometidos a MI y expuestos a CO. * En el grupo de MI, CG estuvo sustancialmente alterado en comparación con los
10 controles, $P < 0,0001$; $n=6$. † La inhalación de CO (MI + CO) produjo un aumento significativo en CG con respecto a MI, $P = 0,001$; $n=6$.

La Fig. 9A son trazos representativos que ilustran el efecto de CO sobre la actividad contráctil espontánea. Control: Contracciones rítmicas características de ratones sin operar. Control + CO: La inhalación de monóxido de carbono
15 (CO) durante 24 h por ratones de control no tuvo efecto sobre la contractilidad espontánea. MI: La contractilidad rítmica se pierde tras la manipulación quirúrgica del intestino delgado. MI + CO: La ritmicidad se restaura en animales manipulados tratados con CO.

La Fig. 9B es un gráfico de líneas (curva de dosis-respuesta) que ilustra el efecto de CO sobre la magnitud de
20 contracciones tónicas en tiras de músculo liso circular de animales no sometidos a MI. Las contracciones se indujeron por exposición de las tiras a concentraciones crecientes de betanecol (0,1 a 300 $\mu\text{mol/l}$). La inhalación de CO por animales de control no tuvo efecto sobre la actividad contráctil inducida por betanecol. ■ = control; ▲ = Control + CO.

25 La Fig. 9C es un gráfico de líneas (curva de dosis-respuesta) que ilustra el efecto de CO sobre la magnitud de las contracciones tónicas en tiras de músculo liso circular de animales sometidos a MI. Las contracciones se indujeron por exposición de las tiras a concentraciones crecientes de betanecol (0,1 a 300 $\mu\text{mol/l}$). La capacidad del músculo circular para contraerse en respuesta a betanecol se alteró significativamente después de MI. La inhalación de CO restauró la actividad contráctil a niveles de control (MI + CO). ■ = MI; ▲ = MI + CO.

30 La Fig. 10 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre el número de leucocitos positivos para mieloperoxidasa (MPO) que infiltran el músculo intestinal de ratones de control y después de la manipulación intestinal (MI). Control = animales de control; Control + CO = animales de control expuestos a CO; MI = animales sometidos a MI; MI + CO = animales sometidos a MI y expuestos a CO. Los datos se expresan como
35 media \pm EEM. * $P < 0,0001$; $n = 4$.

La Fig. 11A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis de RT-PCR de dos etapas en tiempo real de los efectos de la anestesia quirúrgica y MI sobre el transcurso de tiempo de la expresión de ARNm de IL-6. Las muestras se analizaron a 3 (MI 3 h), 6 (MI 6 h), 12 (MI 12 h) y 24 (MI 24 h) horas. La expresión alcanzó el pico 3
40 y 6 horas después de la cirugía. Los datos se expresan como media \pm EEM. * $P < 0,0001$ con respecto al control.

La Fig. 11B es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la expresión de ARNm de IL-6 a 3 (MI + CO 3 h) y 6 (MI + CO 6 h) horas después de la cirugía. MI 3 h y MI 6 h = animales de control de MI a 3 h y 6 h, respectivamente. Los datos se expresan como media \pm EEM.

45 La Fig. 11C es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la liberación de proteína IL-6 de extractos de músculo recogidos 24 h después de la cirugía. La liberación de proteína IL-6 se atenuó significativamente por inhalación de CO. Control = animales de control; Control + CO = animales de control expuestos a CO; MI = animales sometidos a MI; MI + CO = animales sometidos a MI y expuestos a CO. Los datos
50 se expresan como media \pm EEM. * $P < 0,0001$ con respecto al control; y † $P = 0,001$ con respecto a MI; $n=6$.

La Fig. 12A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis de RT-PCR de dos etapas en tiempo real de los efectos de la anestesia quirúrgica y MI sobre el transcurso de tiempo de la expresión de ARNm de IL-1 β . Expresión de ARNm después de la manipulación intestinal (MI). Las muestras se analizaron a las 3 (MI 3 h), 6 (MI 6
55 h), 12 (MI 12 h) y 24 (MI 24 h) horas. La expresión del pico se produjo 6 h posoperatoriamente. Los datos se expresan como media \pm EEM. * $P = 0,001$ y ** $P < 0,0001$ con respecto al control, $n=6$.

La Fig. 12B es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la expresión de ARNm de IL-1 β a las 3 (MI + CO 3 h) y 6 (MI + CO 6 h) horas después de la cirugía. CO inhibió significativamente la expresión de ARNm de IL-1 β pico. MI 3 h y MI 6 h = animales de control de MI a 3 h y 6 h, respectivamente. Los datos se expresan
60 como media \pm EEM. * $P = 0,001$ con respecto a MI 6 h, $n=6$.

La Fig. 12C es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la liberación de proteína de IL-1 β de extractos de músculo recogidos 24 h después de la cirugía. La liberación de proteína de IL-1 β se atenuó significativamente por inhalación de CO. Control = animales de control; Control + CO = animales de control
65 expuestos a CO; MI = animales sometidos a MI; MI + CO = animales sometidos a MI y expuestos a CO. Los datos

se expresan como media \pm EEM. ND = ninguno detectado. * $P = 0,001$ con respecto al control; † $P = 0,001$ con respecto a MI; n=6.

La Fig. 13A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis de RT-PCR de dos etapas en tiempo real de los efectos de la anestesia quirúrgica y MI sobre el transcurso de tiempo de la expresión de ARNm de iNOS. Las muestras se analizaron a 3 (MI 3 h), 6 (MI 6 h), 12 (MI 12 h) y 24 (MI 24 h) horas. La expresión del pico se produjo 6 horas después de la cirugía. Los datos se expresan como media \pm EEM. * $P = 0,001$; ** $P < 0,0001$ con respecto al control; n=6.

La Fig. 13B es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la expresión de ARNm de iNOS a 3 (MI + CO 3 h) y 6 (MI + CO 6 h) horas después de la cirugía. MI 3 h y MI 6 h = animales de control de MI a 3 h y 6 h, respectivamente. Los datos se expresan como media \pm EEM. † $P = 0,001$ con respecto a MI 6 h; n=6.

La Fig. 13C es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la liberación de nitrito total de extractos de músculo recogidos 24 horas después de la cirugía. La liberación de nitrito total se determinó como un índice de actividad de iNOS. La inhalación de CO inhibió significativamente el aumento quirúrgicamente inducido en la liberación de nitrito de músculo manipulado. Se logró una reducción similar en nitrito por incubación de extractos de músculo en presencia del inhibidor de iNOS selectivo L-Nil (30 μ M; MI + L-Nil). Control = animales de control; Control + CO = animales de control expuestos a CO; MI = animales sometidos a MI; MI + CO = animales sometidos a MI y expuestos a CO. * $P = 0,001$ con respecto al control; † $P = 0,001$ con respecto a MI; n=6. Los datos se expresan como media \pm EEM.

La Fig. 14A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis de RT-PCR de dos etapas en tiempo real de los efectos de la anestesia quirúrgica y MI sobre el transcurso de tiempo de la expresión de ARNm de COX-2. Las muestras se analizaron a 3 (MI 3 h), 6 (MI 6 h), 12 (MI 12 h) y 24 (MI 24 h) horas. La expresión del pico se produjo 3-12 h después de la cirugía. Los datos se expresan como media \pm EEM. * $P = 0,01$; ** $P = 0,0001$ con respecto al control; n=6.

La Fig. 14B es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la expresión de ARNm de COX-2 a 3 (MI + CO 3 h) y 6 (MI + CO 6 h) horas después de la cirugía. MI 3 h y MI 6 h = animales de control de MI a 3 h y 6 h, respectivamente. Los datos se expresan como media \pm EEM.

La Fig. 14C es un gráfico de barras que ilustra que la inhalación de CO por animales de control aumentó significativamente la expresión de ARNm de COX-2 3 h (CO 3 h) después del tratamiento. CO 6 h = expresión 6 h después del tratamiento. Los datos se expresan como media \pm EEM. * $P = 0,01$.

La Fig. 14D es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la liberación de proteína PGE₂ de extractos de músculo recogidos 24 horas después de la cirugía. La liberación de proteína PGE₂ se determinó como un índice de la actividad de COX-2. La inhalación de CO aumentó significativamente la liberación de proteína de músculo de control, pero no tuvo efecto sobre el aumento quirúrgicamente inducido en la liberación de PGE₂ de músculo manipulado. Control = animales de control; Control + CO = animales de control expuestos a CO; MI = animales sometidos a MI; MI + CO = animales sometidos a MI y expuestos a CO. Los datos se expresan como media \pm EEM. * $P = 0,01$ y ** $P = 0,0001$ con respecto al control; n=6.

La Fig. 15A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis de RT-PCR de dos etapas en tiempo real de los efectos de la anestesia quirúrgica y MI sobre el transcurso de tiempo de la expresión de ARNm de IL-10. Las muestras se analizaron a 3 (MI 3 h), 6 (MI 6 h), 12 (MI 12 h) y 24 (MI 24 h) horas. La expresión del pico se produjo 3 a 6 h después de la cirugía. Los datos se expresan como media \pm EEM. * $P \leq 0,001$ con respecto al control; n=6.

La Fig. 15B es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la expresión de ARNm de IL-10 a 3 (MI + CO 3 h) y 6 (MI + CO 6 h) horas después de la cirugía. La inhalación de CO aumentó el mensajero de IL-10 a las 3 h pero no 6 h después de la cirugía. MI 3 h y MI 6 h = MI animales de control a 3 h y 6 h, respectivamente. Los datos se expresan como media \pm EEM. † $P = 0,001$ con respecto a MI 3 h; n=6.

La Fig. 15C es un gráfico de barras que ilustra que la inhalación de CO por animales de control aumentó significativamente la expresión de ARNm de IL-10 3 (CO 3 h) y 6 h (CO 6 h) después del tratamiento. Los datos se expresan como media \pm EEM. * $P \leq 0,001$ con respecto al control; n=6.

La Fig. 16A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis de RT-PCR de dos etapas en tiempo real de los efectos de la anestesia quirúrgica y MI sobre el transcurso de tiempo de la expresión de ARNm de HO-1 3 y 6 h después de la cirugía (MI). La inhalación de CO aumentó significativamente la expresión de ARNm de HO-1 a las 3 h (MI + CO 3 h), pero no a las 6 h (MI + CO 6 h) posoperatoriamente. MI 3 h y MI 6 h = animales de control de MI a 3 h y 6 h, respectivamente. † $P < 0,001$ con respecto a MI 3 h; n=6.

65

La Fig. 16B es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la inhalación de CO sobre la expresión de ARNm de HO-1 3 h (CO 3 h) y 6 h (CO 6 h) después del tratamiento. La inhalación de CO por animales de control aumentó la expresión de ARNm de HO-1 6 h después del tratamiento. * $P < 0,05$ con respecto al control; $n=6$.

5 Descripción detallada

El término “monóxido de carbono” (o “CO”), como se usa en el presente documento, describe monóxido de carbono molecular en su estado gaseoso, comprimido en forma líquida o disuelto en disolución acuosa. El término “composición de monóxido de carbono” o “composición farmacéutica que comprende monóxido de carbono” se usa en toda la memoria descriptiva para describir una composición gaseosa o líquida que contiene monóxido de carbono que puede administrarse a un paciente y/o un órgano, por ejemplo, un intestino delgado. El médico habitual reconocerá qué forma de la composición farmacéutica, por ejemplo, formas gaseosas, líquidas, o tanto gaseosas como líquidas, se prefiere para una aplicación dada.

Los términos “cantidad eficaz” y “eficaz para tratar”, como se usan en el presente documento, se refieren a la administración de monóxido de carbono en una cantidad o concentración y durante un periodo de tiempo que incluye administración aguda o crónica y administración periódica o continua que es eficaz dentro del contexto de su administración para causar un efecto o desenlace fisiológico previsto. Cantidades eficaces de CO para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, cantidades que previenen o reducen íleo tras un procedimiento, por ejemplo, trasplante de intestino delgado.

Para gases, cantidades eficaces de CO generalmente entran dentro del intervalo de aproximadamente el 0,000001 % a aproximadamente el 0,3 % en peso, por ejemplo, 0,0001 % a aproximadamente 0,25 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente 0,001 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,005 %, 0,010 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,08 %, 0,10 %, 0,15 %, 0,20 %, 0,22 %, o 0,24 % en peso de CO. Para disoluciones líquidas de CO, cantidades eficaces generalmente entran dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,0044 g de CO/100 g de líquido, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,0001, 0,0002, 0,0004, 0,0006, 0,0008, 0,0010, 0,0013, 0,0014, 0,0015, 0,0016, 0,0018, 0,0020, 0,0021, 0,0022, 0,0024, 0,0026, 0,0028, 0,0030, 0,0032, 0,0035, 0,0037, 0,0040 o 0,0042 g de CO/100 g de disolución acuosa. Intervalos preferidos incluyen, por ejemplo, aproximadamente 0,0010 a aproximadamente 0,0030 g de CO/100 g de líquido, aproximadamente 0,0015 a aproximadamente 0,0026 g de CO/100 g de líquido, o aproximadamente 0,0018 a aproximadamente 0,0024 g de CO/100 g de líquido. Un médico habitual apreciará que pueden usarse cantidades fuera de estos intervalos dependiendo de la aplicación.

El término “paciente” se usa en toda la memoria descriptiva para describir un animal, humano o no humano, al que se proporciona tratamiento según los métodos de la presente invención. Aplicaciones veterinarias son claramente esperadas por la presente invención. El término incluye, pero no se limita a, mamíferos, por ejemplo, seres humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, cobayas, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. El término “tratar (tratamiento)” se usa en el presente documento para describir retrasar la aparición de, inhibir, prevenir o aliviar los efectos de una afección, por ejemplo, íleo. El término “donante” o “paciente donante”, como se usa en el presente documento, se refiere a un paciente (humano o no humano) del que puede obtenerse un órgano o tejido para los fines de trasplante a un paciente receptor. El término “receptor” o “paciente receptor” se refiere a un paciente (humano o no humano) al que puede transferirse un órgano o tejido.

El término “íleo”, como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a la parálisis parcial o completa o dismotilidad del tubo gastrointestinal. El íleo puede producirse a lo largo del tubo gastrointestinal, o puede implicar solo una o varias secciones del mismo, por ejemplo, estómago, intestino delgado o colon. El médico habitual apreciará que el íleo puede producirse por un gran número de factores que incluyen, por ejemplo, cirugía (por ejemplo, cualquier cirugía que implique laparotomía, por ejemplo, trasplante de intestino delgado (SITx); o cualquier cirugía que implique laparoscopia); isquemia intestinal; hematoma retroperitoneal; sepsis intrabdominal; inflamación intraperitoneal; apendicitis aguda; colecistitis; pancreatitis; cólico ureteral; lesiones torácicas; neumonía basal; infarto de miocardio; alteraciones metabólicas, por ejemplo, aquellas que producen disminución de los niveles de potasio; fármacos, por ejemplo, uso prolongado de opiáceos; y traumatismos, por ejemplo, fracturas de la columna vertebral y fracturas de costillas (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). El término también incluye íleo posparto, que es un problema común para las mujeres en el periodo tras el parto, por ejemplo, tras el parto vaginal (“parto natural”) o parto quirúrgicamente asistido. Como se usa en el presente documento, el término “íleo posquirúrgico” se refiere al íleo sufrido por un paciente tras cualquier procedimiento quirúrgico, por ejemplo, cirugía abdominal. El término “intervenciones no quirúrgicas” se refiere a tratamientos médicos que no implican cirugía. El término “íleo resultante de afecciones que no implican cirugía” se refiere a íleo producido por factores distintos de cirugía, por ejemplo, factores descritos en el presente documento.

Los individuos considerados en riesgo de desarrollar íleo pueden beneficiarse particularmente de la invención, principalmente debido a que el tratamiento profiláctico puede empezar antes de que haya cualquier evidencia de íleo. Los individuos “en riesgo” incluyen, por ejemplo, pacientes en necesidad de cirugía abdominal, tanto

médicamente necesaria como opcional, y/o individuos que padecen cualquiera de las afecciones o lesiones descritas en el párrafo precedente. El médico habitual apreciará que pueda determinarse que un paciente está en riesgo de íleo por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por un diagnóstico médico.

- 5 El término “trasplante” se usa en toda la memoria descriptiva como un término general para describir el proceso de transferir un órgano o tejido (por ejemplo, un intestino delgado) a un paciente. El término “trasplante” se define en la materia como la transferencia de tejidos vivos o células de un donante a un receptor, con la intención de mantener la integridad funcional del tejido trasplantado o células en el receptor (véase, por ejemplo, The Merck Manual, Berkow, Fletcher, y Beers, Eds., Merck Research Laboratories, Rahway, N.J., 1992). El término incluye todas las categorías de trasplantes conocidos en la técnica. Los trasplantes se clasifican por sitio y relación genética entre donante y receptor. El término incluye, por ejemplo, autotrasplante (extirpación y transferencia de células o tejido de una localización en un paciente a la misma u otra localización en el mismo paciente), alotrasplante (trasplante entre miembros de las mismas especies) y xenotrasplante (trasplantes entre miembros de diferentes especies).

15 Preparación de composiciones gaseosas

Una composición de CO puede ser una composición de monóxido de carbono gaseosa. Puede obtenerse gas comprimido o presurizado útil en los métodos de la invención de cualquier fuente comercial, y en cualquier tipo de recipiente apropiado para guardar el gas comprimido. Por ejemplo, pueden obtenerse gases comprimidos o presurizados de cualquier fuente que suministre gases comprimidos, tales como oxígeno, para uso médico. El término gas “de calidad médica”, como se usa en el presente documento, se refiere a gas adecuado para la administración a pacientes como se define en el presente documento. El gas presurizado que incluye monóxido de carbono usado en los métodos de la presente invención puede proporcionarse de forma que todos los gases de la composición final deseada (por ejemplo, CO, He, NO, CO₂, O₂, N₂) estén en el mismo recipiente, excepto que el NO y el O₂ no pueden almacenarse juntos. Opcionalmente, los métodos de la presente invención pueden realizarse usando múltiples recipientes que contienen gases individuales. Por ejemplo, puede proporcionarse un único recipiente que contiene monóxido de carbono, con o sin otros gases, cuyo contenido puede mezclarse opcionalmente con aire ambiente o con el contenido de otros recipientes, por ejemplo, recipientes que contienen oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, aire comprimido, o cualquier otro gas adecuado o mezclas de los mismos.

Las composiciones gaseosas administradas a un paciente según la presente invención normalmente contienen 0 % a aproximadamente 79 % en peso de nitrógeno, aproximadamente 21 % a aproximadamente 100 % en peso de oxígeno y aproximadamente 0,000001 % a aproximadamente 0,3 % en peso (correspondiente a aproximadamente 1 ppb o 0,001 ppm a aproximadamente 3.000 ppm) de monóxido de carbono. Preferentemente, la cantidad de nitrógeno en la composición gaseosa es aproximadamente 79 % en peso, la cantidad de oxígeno es aproximadamente 21 % en peso y la cantidad de monóxido de carbono es aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 0,25 % en peso. La cantidad de CO es preferentemente al menos aproximadamente 0,001 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,005 %, 0,010 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,08 %, 0,10 %, 0,15 %, 0,20 %, 0,22 %, o 0,24 % en peso. Intervalos preferidos incluyen aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,24 %, aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,22 %, aproximadamente 0,015 % a aproximadamente 0,20 %, aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 0,20 %, y aproximadamente 0,025 % a aproximadamente 0,1 % en peso. Se observa que las composiciones de monóxido de carbono gaseosas que tienen concentraciones de monóxido de carbono superiores al 0,3 % (tal como 1 % o mayor) pueden usarse durante cortos periodos (por ejemplo, una o algunas inhalaciones), dependiendo de la aplicación.

Puede usarse una composición de monóxido de carbono gaseosa para crear una atmósfera que comprende gas monóxido de carbono. Puede crearse una atmósfera que incluye niveles apropiados de gas monóxido de carbono, por ejemplo, proporcionando un recipiente que contiene un gas presurizado que comprende gas monóxido de carbono y liberando el gas presurizado del recipiente en una cámara o espacio para formar una atmósfera que incluye el gas monóxido de carbono dentro de la cámara o espacio. Alternativamente, los gases pueden liberarse en un aparato que culmina en una máscara de respiración o tubo de respiración, creando así una atmósfera que comprende gas monóxido de carbono en la máscara de respiración o tubo de respiración, asegurando que el paciente sea la única persona en la habitación expuesta a niveles significativos de monóxido de carbono.

Los niveles de monóxido de carbono en una atmósfera pueden medirse o monitorizarse usando cualquier método conocido en la técnica. Tales métodos incluyen detección electroquímica, cromatografía de gases, recuento de radioisótopos, absorción de infrarrojos, colorimetría y métodos electroquímicos basados en membranas selectivas (véase, por ejemplo, Sunderman et al., Clin. Chem. 28:2026-2032, 1982; Ingi et al., Neuron 16:835-842, 1996). Los niveles de monóxido de carbono en sub-partes por millón pueden detectarse, por ejemplo, por cromatografía de gases y recuento de radioisótopos. Además, se conoce en la técnica que los niveles de monóxido de carbono en el intervalo sub-ppm pueden medirse en tejido biológico por un sensor de gases del infrarrojos medio (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol 280:H482-H488, 2001). Los sensores de monóxido de carbono y los sistemas de detección de gases están ampliamente disponibles de muchas fuentes comerciales.

65 Preparación de composiciones líquidas

Una composición de monóxido de carbono también puede ser una composición de monóxido de carbono líquida. Un líquido puede transformarse en una composición de monóxido de carbono por cualquier método conocido en la técnica para hacer que los gases se disuelvan en líquidos. Por ejemplo, el líquido puede ponerse en una llamada
 5 “estufa de incubación de CO₂” y exponerse a un flujo continuo de monóxido de carbono, preferentemente equilibrado con dióxido de carbono, hasta que se alcance una concentración deseada de monóxido de carbono en el líquido. Como otro ejemplo, puede “burbujearse” gas monóxido de carbono directamente en el líquido hasta que se alcance la concentración deseada de monóxido de carbono en el líquido. La cantidad de monóxido de carbono que puede disolverse en una disolución acuosa dada aumenta al disminuir la temperatura. Como otro ejemplo más, un líquido
 10 apropiado puede pasarse a través de un tubo que permite la difusión de gas, en el que el tubo pasa a través de una atmósfera que comprende monóxido de carbono (por ejemplo, utilizando un dispositivo tal como un oxigenador por membrana extracorpórea). El monóxido de carbono difunde en el líquido para crear una composición de monóxido de carbono líquida.

15 Es probable que una composición líquida tal pretenda introducirse en un animal vivo que estará a o aproximadamente 37 °C en el momento en el que se introduce en el animal.

El líquido puede ser cualquier líquido conocido por aquellos expertos en la materia por ser adecuado para administración a pacientes, o preservar y/o lavar y/o perfundir órganos de interés (véase, por ejemplo, Oxford
 20 Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). En general, el líquido será una disolución acuosa. Ejemplos de disoluciones apropiadas incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS), Celsior™, Perfadex™, disolución de Collins, disolución de citrato y disolución de la Universidad de Wisconsin (UW) (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). En una realización de la presente invención, el líquido es disolución de Ringer, por ejemplo, disolución de Ringer con lactato, o cualquier otro
 25 líquido que pueda usarse infundido en un paciente. En otra realización, el líquido incluye sangre, por ejemplo, sangre completa.

Puede saturarse cualquier líquido adecuado a una concentración fija de monóxido de carbono mediante difusores de gas. Alternativamente, pueden usarse disoluciones previamente preparadas cuya calidad se ha controlado para
 30 contener niveles fijos de monóxido de carbono. El control preciso de la dosis puede lograrse mediante mediciones con una membrana impermeable a líquidos permeable a gases conectada a un analizador de monóxido de carbono. Las disoluciones pueden saturarse a concentraciones eficaces deseadas y mantenerse a estos niveles.

Tratamiento de pacientes con composiciones de monóxido de carbono

35 Un paciente puede tratarse con una composición de monóxido de carbono por cualquier método conocido en la técnica de administrar gases y/o líquidos al paciente. Las composiciones de monóxido de carbono pueden administrarse a un paciente diagnosticado con, o que se ha determinado que está en riesgo de íleo, por ejemplo, pacientes quirúrgicos, que incluyen pacientes que experimentan SITx. La invención contempla la administración
 40 sistémica de composiciones de monóxido de carbono líquidas o gaseosas a pacientes (por ejemplo, por inhalación y/o ingestión), y la administración tópica de las composiciones al tubo gastrointestinal del paciente (por ejemplo, por ingestión, insuflación y/o introducción en la cavidad abdominal).

Administración sistémica de monóxido de carbono

45 Pueden administrarse composiciones de monóxido de carbono gaseosas por vía sistémica a un paciente, por ejemplo, a un paciente quirúrgico o donante y/o a receptores de trasplante de intestino delgado. Las composiciones de monóxido de carbono gaseosas normalmente se administran por inhalación por la boca o fosas nasales a los pulmones, donde el monóxido de carbono puede ejercer su efecto directamente o ser fácilmente absorbido en la
 50 circulación sanguínea del paciente. La concentración de compuesto activo (CO) utilizada en la composición gaseosa terapéutica dependerá de las tasas de absorción, distribución, inactivación y eliminación (generalmente, por la respiración) del monóxido de carbono, además de otros factores conocidos para aquellos expertos en la materia. También debe entenderse que, para cualquier sujeto particular, las pautas de dosificación específicas deben ajustarse con el tiempo, según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o
 55 supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son solo a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o realización práctica de la composición reivindicada. En la presente invención se contempla la administración aguda, sub-aguda y crónica, de monóxido de carbono, que depende, por ejemplo, de la gravedad o persistencia de íleo en el paciente. El monóxido de carbono puede administrarse al paciente durante un tiempo (incluyendo indefinidamente) suficiente para tratar la afección y
 60 ejercer el efecto farmacológico o biológico previsto.

A continuación se indican ejemplos de algunos métodos y dispositivos que pueden utilizarse para administrar a pacientes composiciones de monóxido de carbono gaseosas.

65 *Respiradores*

El monóxido de carbono de calidad médica (las concentraciones pueden variar) puede adquirirse mezclado con aire u otro gas que contiene oxígeno en un tanque estándar de gas comprimido (por ejemplo, 21 % de O₂, 79 % de N₂).

No es reactivo, y las concentraciones que se requieren para los métodos de la presente invención están muy por debajo del intervalo de combustible (10 % en aire). En un ámbito hospitalario, el gas supuestamente se administrará al lado de la cama donde se mezclará con oxígeno o aire del hospital en una mezcladora a una concentración deseada en ppm (partes por millón). El paciente inhalará la mezcla de gases mediante un respirador, que se fijará a una velocidad de flujo basándose en la comodidad y necesidades del paciente. Esto se determina por gráficas pulmonares (es decir, frecuencia respiratoria, volúmenes corrientes, etc.). Pueden diseñarse mecanismo(s) protegido(s) para prevenir que el paciente reciba innecesariamente más de una cantidad deseada de monóxido de carbono en el sistema de administración. El nivel de monóxido de carbono del paciente puede monitorizarse estudiando (1) carboxihemoglobina (COHb), que puede medirse en sangre venosa, y (2) monóxido de carbono exhalado recogido de un puerto lateral del respirador. La exposición de monóxido de carbono puede ajustarse basándose en el estado de salud del paciente y basándose en los marcadores. Si fuera necesario, el monóxido de carbono puede lavarse del paciente cambiando a inhalación de 100 % de O₂. El monóxido de carbono no se metaboliza; así, cualquiera que sea inhalado será por último lugar exhalado, excepto un porcentaje muy pequeño que se convierte en CO₂. El monóxido de carbono también puede mezclarse con cualquier nivel de O₂ para proporcionar administración terapéutica de monóxido de carbono sin afecciones hipóxicas relevantes.

20 *Máscara y tienda facial*

Se prepara una mezcla de gases que contiene monóxido de carbono como antes para permitir la inhalación pasiva por el paciente usando una máscara facial o tienda. La concentración inhalada puede cambiarse y puede lavarse cambiando simplemente a 100 % de O₂. La monitorización de los niveles de monóxido de carbono se produciría en o cerca de la máscara o tienda con un mecanismo protegido que prevendría que se inhalara una concentración demasiado alta de monóxido de carbono.

Inhalador portátil

El monóxido de carbono comprimido puede envasarse en un dispositivo inhalador portátil e inhalarse en una dosis medida, por ejemplo, para permitir el tratamiento intermitente de un receptor que no está en un ámbito hospitalario. Podrían envasarse diferentes concentraciones de monóxido de carbono en los recipientes. El dispositivo podría ser tan simple como un pequeño tanque (por ejemplo, menos de 5 kg) de CO apropiadamente diluido con una válvula todo-nada y un tubo del que el paciente toma una bocanada de CO según una pauta estándar o según se necesite.

35 *Pulmón artificial intravenoso*

Puede usarse un pulmón artificial (un dispositivo de catéter para el intercambio de gas en la sangre) diseñado para la administración de O₂ y eliminación de CO₂ para la administración de monóxido de carbono. El catéter, cuando se implanta, reside en una de las grandes venas y sería capaz de administrar monóxido de carbono a concentraciones dadas tanto para administración sistémica como en un sitio local. La administración puede ser una administración local de una alta concentración de monóxido de carbono durante un corto periodo de tiempo en el sitio del procedimiento, por ejemplo, en proximidad al intestino delgado (esta alta concentración se diluiría rápidamente en la circulación sanguínea), o una exposición relativamente más larga a una menor concentración de monóxido de carbono (véase, por ejemplo, Hattler et al., *Artif. Organs* 18(11):806-812 (1994); y Golob et al., *ASAIO J.*, 47(5):432-437 (2001)).

Cámara normobárica

En ciertos casos, se desearía exponer al paciente completo a monóxido de carbono. El paciente estaría dentro de una cámara estanca al aire que sería inundada con monóxido de carbono (a un nivel que no pone en peligro al paciente, o a un nivel que posee un riesgo aceptable sin el riesgo de exponer a testigos). Tras completarse la exposición, la cámara podría lavarse con aire (por ejemplo, 21 % de O₂, 79 % de N₂) y podrían analizarse muestras por analizadores de monóxido de carbono para garantizar que no queda monóxido de carbono antes de permitir que el paciente salga del sistema de exposición.

Administración sistémica de composiciones de CO líquidas

La presente invención contempla adicionalmente que pueden crearse composiciones de CO líquidas para administración sistémica a un paciente, por ejemplo, por infusión en un paciente. Por ejemplo, pueden infundirse composiciones de CO líquidas, tales como disolución de Ringer saturada con CO, en un paciente antes, durante y/o después de un procedimiento quirúrgico. Alternativamente o además, puede infundirse sangre completa (o parcial) parcialmente o completamente saturada con CO al paciente. La presente invención también contempla que pueden utilizarse agentes que pueden administrar dosis de CO gas o líquido (por ejemplo, gomas, cremas, pomadas o parches que liberan CO).

Tratamiento tópico del tubo gastrointestinal con monóxido de carbono

Alternativamente o además, las composiciones de monóxido de carbono pueden aplicarse directamente al tubo gastrointestinal, por ejemplo, al interior y/o exterior del tubo gastrointestinal entero, o a cualquier porción del mismo. Una composición gaseosa puede aplicarse directamente al tubo gastrointestinal de un paciente, por ejemplo, un paciente quirúrgico o donante o receptor de trasplante de intestino delgado, por cualquier método conocido en la técnica para insuflar gases en un paciente. Por ejemplo, frecuentemente se insuflan gases, por ejemplo, dióxido de carbono, en el tubo gastrointestinal y la cavidad abdominal de pacientes para facilitar el examen durante procedimientos endoscópicos y laparoscópicos, respectivamente (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). El médico habitual apreciará que podrían usarse procedimientos similares para administrar composiciones de monóxido de carbono directamente al tubo gastrointestinal de un paciente. Se contempla que la presente invención puede aplicarse para ayudar a prevenir íleo resultante de laparoscopia y endoscopia, por ejemplo, colonoscopia y esofagogastroduodenoscopia.

También pueden administrarse composiciones de monóxido de carbono acuosas tópicamente al tubo gastrointestinal de un paciente. Formas acuosas de las composiciones pueden administrarse por cualquier método conocido en la técnica para administrar líquidos a pacientes. Al igual que con composiciones gaseosas, pueden aplicarse composiciones acuosas directamente al interior y/o exterior del tubo gastrointestinal. Por ejemplo, la forma acuosa puede administrarse por vía oral, por ejemplo, haciendo que el paciente ingiera una dosis encapsulada o sin encapsular de la composición de monóxido de carbono acuosa. Como otro ejemplo, pueden inyectarse líquidos, por ejemplo, soluciones salinas que contienen CO disuelto, en el tubo gastrointestinal y la cavidad abdominal de pacientes durante procedimientos endoscópicos y laparoscópicos, respectivamente. En el contexto de SITx, pueden realizarse exposiciones *in situ* por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, lavando *in situ* el órgano con una composición de monóxido de carbono líquida antes de extraerlo del donante (véase Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)).

Preservación de órganos para trasplante de intestino delgado ex vivo

Las composiciones de monóxido de carbono pueden usarse para tratar pacientes que se someten a trasplante de cualquier porción del tubo gastrointestinal, por ejemplo, trasplante del intestino delgado (SITx). En el contexto de los procedimientos de trasplante, las composiciones de monóxido de carbono pueden usarse para tratar donantes, receptores y/o el propio órgano en cualquier etapa del proceso de recogida, almacenamiento y trasplante del órgano. Un órgano gastrointestinal puede recogerse de un donante, tratarse con una composición de monóxido de carbono *ex vivo* según la presente invención y trasplantarse en un receptor. Alternativamente o además, el órgano puede tratarse *in situ*, mientras que todavía está en el donante. Opcionalmente, una composición de monóxido de carbono puede administrarse al receptor antes de, durante y/o después de la cirugía: por ejemplo, después de reperfundirse el órgano con la sangre del receptor. La composición de monóxido de carbono puede administrarse al donante antes de o durante el proceso de recogida del órgano del donante.

La exposición *ex vivo* del intestino delgado (o porción del mismo) a monóxido de carbono puede producirse exponiendo el intestino delgado a una atmósfera que comprende gas monóxido de carbono, a una composición de monóxido de carbono líquida, por ejemplo, un perfundido líquido, disolución de almacenamiento, o disolución de lavado que tiene monóxido de carbono disuelto en ella, o ambos.

La exposición del intestino delgado a composiciones gaseosas de monóxido de carbono puede realizarse en cualquier cámara o área adecuada para crear una atmósfera que incluye niveles apropiados de gas monóxido de carbono. Tales cámaras incluyen, por ejemplo, estufas de incubación y cámaras construidas con el fin de acomodar un órgano en una disolución de preservación. Una cámara apropiada puede ser una cámara en la que solo los gases alimentados en la cámara están presentes en la atmósfera interna, de forma que la concentración de monóxido de carbono puede establecerse y mantenerse a una concentración y pureza dadas, por ejemplo, si la cámara es estanca al aire. Por ejemplo, puede usarse una estufa de incubación de CO₂ para exponer un órgano a una composición de monóxido de carbono, en la que el gas monóxido de carbono se suministra en un flujo continuo de un recipiente que contiene el gas.

La exposición de un órgano a una composición de monóxido de carbono líquida puede realizarse *ex vivo* por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la exposición puede realizarse *ex vivo* en cualquier cámara o espacio que tenga volumen suficiente para sumergir el órgano, completamente o parcialmente, en la composición de monóxido de carbono. Como otro ejemplo, el órgano puede exponerse a una composición de monóxido de carbono colocando el órgano en cualquier recipiente adecuado y haciendo que la composición de monóxido de carbono "lave" el órgano, de forma que el órgano se expone a un flujo continuo de la composición de monóxido de carbono.

Como otro ejemplo, el órgano puede perfundirse con una composición de monóxido de carbono. El término "perfusión" es un término reconocido en la materia y se refiere al paso de un líquido, por ejemplo, una composición de monóxido de carbono, a través de los vasos sanguíneos del órgano. Con respecto al tubo gastrointestinal, el

término incluye lavar la luz intestinal con una composición de monóxido de carbono. Métodos para perfundir órganos *ex vivo* e *in situ* son muy conocidos en la técnica. Un órgano puede perfundirse con una composición de monóxido de carbono *ex vivo*, por ejemplo, por perfusión con máquina hipotérmica continua (véase Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). Opcionalmente, en perfusiones *in situ* o *ex vivo*, el

5 órgano puede perfundirse con una disolución de lavado, por ejemplo, disolución UW sin monóxido de carbono, antes de la perfusión con la composición de monóxido de carbono, para eliminar la sangre del donante del órgano. Podría realizarse un proceso tal para evitar la competición por el monóxido de carbono por la hemoglobina del donante. Como otra opción, la disolución de lavado puede ser una composición de monóxido de carbono.

10 Como otro ejemplo, el órgano puede colocarse, por ejemplo, sumergirse, en un medio o disolución que no incluye monóxido de carbono, y colocarse en una cámara de forma que el medio o disolución pueda transformarse en una composición de monóxido de carbono mediante exposición a una atmósfera que contiene monóxido de carbono como se describe en el presente documento. Como otro ejemplo aún, el órgano puede sumergirse en un líquido que no incluye monóxido de carbono, y el monóxido de carbono puede entonces “burbujearse” en el líquido.

15 Puede recogerse un intestino delgado de un donante y trasplantarse por cualquier método conocido para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). El médico habitual reconocerá que los métodos para trasplantar y/o recoger órganos para trasplante pueden variar dependiendo de muchas circunstancias, tales como la edad del donante/receptor.

20 La presente invención contempla que cualquiera o todos de los métodos anteriores para exponer un órgano a una composición de monóxido de carbono líquida, por ejemplo, lavado, inmersión o perfusión, pueden usarse en un procedimiento dado, por ejemplo, usarse en un procedimiento de SITx único.

25 Uso de hemoxigenasa-1 y otros compuestos

También se contempla por la presente invención la inducción o expresión de hemoxigenasa-1 (HO-1) conjuntamente con la administración de monóxido de carbono. En el contexto de SITx, la HO-1 puede inducirse opcionalmente en el

30 Por ejemplo, puede inducirse HO-1 en el donante, por ejemplo, antes de o durante la extirpación del órgano, en el órgano *ex vivo* y/o en el receptor antes de, durante, o tras el trasplante. En el contexto de otras intervenciones (es decir, no relacionadas con el trasplante) que probablemente producen íleo, la HO-1 se induciría en el intestino poco antes, durante, o poco después de la intervención. Como se usa en el presente documento, el término “inducir (inducido)” significa producir un aumento de la producción de una proteína, por ejemplo, HO-1, en células aisladas o

35 las células de un tejido, órgano o animal usando el gen endógeno de las propias células (por ejemplo, no recombinante) que codifica la proteína.

HO-1 puede inducirse en un paciente por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la producción de HO-1 puede inducirse por hemina, por protoporfirina de hierro, o por protoporfirina de cobalto. Una variedad de

40 agentes no hemo que incluyen metales pesados, citocinas, hormonas, óxido nítrico, COCl₂, endotoxina y choque térmico también son fuertes inductores de la expresión de HO-1 (Otterbein et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279:L1029-L1037, 2000; Choi et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15:9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37:517-554, 1997; y Tenhunen et al., J. Lab. Clin. Med. 75:410-421, 1970). HO-1 también se induce altamente mediante una variedad de agentes y condiciones que crean estrés oxidativo, que incluyen peróxido

45 de hidrógeno, eliminadores de glutatión, irradiación con UV e hiperoxia (Choi et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15: 9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37:517-554, 1997; y Keyse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:99-103, 1989). Una “composición farmacéutica que comprende un inductor de HO-1” significa una composición farmacéutica que contiene cualquier agente que pueda inducir HO-1 en un paciente, por ejemplo, cualquiera de los agentes descritos anteriormente, por ejemplo; hemina, protoporfirina de hierro y/o protoporfirina de cobalto.

50 La expresión de HO-1 en una célula puede aumentarse mediante transferencia génica. Como se usa en el presente documento, el término “expresar (expresado)” significa producir una elevada producción de una proteína, por ejemplo, HO-1 o ferritina, en células aisladas o las células de un tejido, órgano o animal usando un gen exógenamente administrado (por ejemplo, un gen recombinante). La HO-1 o ferritina es preferentemente de la

55 misma especie (por ejemplo, humana, ratón, rata, etc.) que el receptor, con el fin de minimizar cualquier reacción inmunitaria. La expresión podría accionarse por un promotor constitutivo (por ejemplo, promotores del citomegalovirus) o un promotor específico de tejido (por ejemplo, promotor del suero de la leche para células mamarias o promotor de albúmina para células del hígado). Un vector de terapia génica apropiado (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de la viruela (por ejemplo, variolovacuna), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus mínimo de ratones, virus de la hepatitis B, virus de la gripe, virus del herpes simple-1 y lentivirus) que codifica HO-1 o ferritina se administraría al paciente por vía oral, por inhalación, o mediante inyección en la pared intestinal, luz intestinal o cavidad abdominal en cualquier momento antes, durante

60 y/o después del procedimiento de inducción de íleo, por ejemplo, aproximadamente 24 horas o inmediatamente antes del procedimiento de inducción de íleo. Similarmente, pueden administrarse vectores plasmídicos que

65 codifican HO-1 o apo-ferritina, por ejemplo, como ADN desnudo, en liposomas, o en micropartículas.

Además, la proteína HO-1 exógena puede administrarse directamente a un paciente por cualquier método conocido en la técnica. La HO-1 exógena puede administrarse directamente además de, o como alternativa, a la inducción o expresión de HO-1 en el paciente como se ha descrito anteriormente. La proteína HO-1 puede administrarse a un paciente, por ejemplo, en liposomas, y/o como una proteína de fusión, por ejemplo, como una proteína de fusión de TAT (véase, por ejemplo, Becker-Hapak et al., Methods 24:247-256, 2001).

Alternativamente o además, cualquiera de los productos del metabolismo por HO-1, por ejemplo, bilirrubina, biliverdina, hierro y/o ferritina, puede administrarse a un paciente conjuntamente con monóxido de carbono con el fin de prevenir o tratar íleo. Además, la presente invención contempla que moléculas de unión a hierro distintas de ferritina, por ejemplo, desferoxamina (DFO), hierro dextrano y/o apoferritina, pueden administrarse al paciente. Adicionalmente aún, la presente invención contempla que, enzimas (por ejemplo, biliverdina reductasa) que catalizan la degradación de cualquiera de estos productos, pueden inhibirse para crear/potenciar el efecto deseado. Cualquiera de lo anterior puede administrarse, por ejemplo, por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, o por administración directa al interior o exterior del intestino.

La presente invención contempla que los compuestos que liberan CO en el cuerpo después de la administración del compuesto (por ejemplo, compuestos que liberan CO, por ejemplo, compuestos que liberan CO fotoactivables), por ejemplo, dimanganeso decarbonilo, dímero de tricarbonilo-diclororutenio (II) y cloruro de metileno (por ejemplo, a una dosis de entre 400 y 600 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 500 mg/kg), también pueden usarse en los métodos de la presente invención, ya que puede sustituirse la carboxihemoglobina y hemoglobina donante de CO.

La administración cualquiera de los anteriores puede administrarse a un paciente de cualquier modo, por ejemplo, por administración oral, intravenosa o intrarterial. Cualquiera de los compuestos anteriores puede administrarse al paciente localmente y/o sistémicamente, y en cualquier combinación.

La presente invención contempla adicionalmente tratar íleo administrando CO al paciente en combinación con estimulación funcional del tubo digestivo del paciente, por ejemplo, administrando ablandadores de heces, laxantes y/o lubricantes al paciente; y/o por hidratación intravenosa y/o descompresión nasogástrica. El CO puede administrarse en combinación con cualquier otro método conocido o compuesto para tratar íleo.

La invención se ilustra en parte por los siguientes ejemplos, que no deben considerarse como limitantes de la invención de ningún modo.

Ejemplo 1. Efecto protector del monóxido de carbono para íleo inducido por trasplante

Animales

Se adquirieron ratas LEW (RT1) macho puras que pesaban 200-300 gramos de Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianápolis, IN) y se mantuvieron en un animalario de flujo laminar en la Universidad de Pittsburgh. Los animales se alimentaron con una dieta estándar a voluntad.

Trasplante de intestino delgado

Para determinar si el CO es protector contra íleo asociado a trasplante de intestino delgado, se realizó SITx ortotópico en ratas Lewis singénicas. El SITx con drenaje cavo se realizó usando un procedimiento previamente descrito. Se aisló todo el intestino delgado del donante desde el ligamento de Treitz hasta la válvula ileocecal sobre un colgajo vascular que consistía en la vena porta y en la arteria mesentérica superior en comunidad con un segmento de aorta. El injerto se perfundió mediante el segmento aórtico con 5 ml de disolución de Ringer con lactato enfriada, y se irrigó la luz intestinal con 20 ml de solución salina fría que contenía 0,5 % de sulfato de neomicina (Sigma, St. Louis, MO). Se realizaron anastomosis de extremo a lado entre la aorta del injerto y la aorta infrarrenal del receptor, y entre la vena porta del injerto y la vena cava del receptor, con sutura 10-0 de Novafil™. El tiempo de isquemia fría fue 1 hora. Se extrajo el intestino entero del receptor y la continuidad entérica se restauró por anastomosis intestinal de extremo a extremo proximal y distal. Los animales receptores se administraron con 20 mg/día de nafato de cefamandol profiláctico durante 3 días posoperatorios. Se dio agua a los receptores trasplantados 3 horas después de la cirugía, y se alimentaron 24 horas después de la cirugía.

Grupos experimentales

En este estudio se examinaron cuatro grupos de animales, dos de los cuales recibieron una SITx. El grupo 1 consistió en ratas normales sin operar. Los animales del grupo 2 se expusieron a CO sin cirugía. En el grupo 3, se realizaron SITx singénicas y los receptores se mantuvieron en aire ambiental. El grupo 4 consistió en receptores de SITx que se colocaron en la cámara de CO durante 1 hora antes de la cirugía y luego volvieron a re-exponerse a CO inmediatamente tras la cirugía hasta que se sacrificaron. En ambos grupos 3 y 4, ratas LEW normales sirvieron de donantes.

Exposición a CO

Los animales se expusieron a CO a una concentración de 250 ppm. Brevemente, se mezcló 1 % de CO en aire con aire (21 % de oxígeno) en un cilindro de mezcla de acero inoxidable y a continuación se dirigió a una cámara de exposición de vidrio de 3,70 ft³ a una velocidad de flujo de 12 l/min. Se usó un analizador de CO (Interscan, Chatsworth, CA) para medir niveles de CO continuamente en la cámara. Las concentraciones de CO se mantuvieron a 250 ppm en todo momento. Los animales se suministraron con comida y agua durante las exposiciones.

Estudios funcionales

El efecto del tratamiento con CO sobre la dismotilidad intestinal en injertos trasplantados se evaluó tanto *in vitro* como *in vivo*. Se recogieron tejidos 24 o 48 horas posoperatoriamente, que se ha mostrado que son los momentos de tiempo durante los cuales alcanza un pico la dismotilidad inducida por trasplante. Se midió la actividad mecánica del músculo circular *in vitro* como se ha descrito previamente (Eskandari et al., Am. J. Physiol. 273(3 Pt 1):G727-34 (1997)). Las ratas se anestesiaron y se sacrificaron por desangrado 24 horas posoperatoriamente. Un segmento del yeyuno medio se sujetó con alfileres en una placa de disección revestida con Silgaard™ que contenía tampón Krebs-Ringer-bicarbonato previamente oxigenado (KRB; en mM: Na⁺ 137,4, K⁺ 5,9, Ca²⁺ 2,5, Mg²⁺ 1,2, Cl⁻ 134, HCO₃⁻ 15,5, H₂PO₄⁻ 1,2 y glucosa 11,5) que se equilibró con 97 % de O₂/3 % de CO₂. El intestino se abrió a lo largo de la frontera mesentérica y se extrajo la mucosa arrancando con pinzas finas. Se cortaron tiras de espesor completo de músculo (1 x 6 mm) paralelas a la capa de músculo circular. Las tiras de músculo se montaron en cámaras de órganos mecánicas horizontales estándar que se perfundieron continuamente con KRB previamente oxigenado mantenido a 37 °C. Un extremo de cada tira se unió por atadura a un poste fijo y el otro a un transductor de fuerza isométrica (WPI, Sarasota, FL). Se dejó que las tiras se equilibraran durante 1 hora, después de lo cual se estiraron incrementalmente hasta la longitud a la que se produjo la máxima contracción espontánea (L₀). Después de un segundo periodo de equilibración de 30 minutos, se generaron curvas de contractilidad-respuesta exponiendo los tejidos a concentraciones crecientes del agonista muscarínico betanecol (0,3 a 300 µM) durante 10 minutos, seguido de un periodo de lavado de 10 minutos. La actividad contráctil se calculó integrando el área bajo el trazo, se normalizó convirtiendo el peso y la longitud de la tira a milímetros cuadrados de tejido (1,03 mg/mm²) y se informó como g/s/mm².

Se midió el tránsito intestinal en controles y animales manipulados 48 horas posoperatoriamente evaluando la distribución intestinal de dextrano marcado con fluoresceína (Molecular Probes). Los animales se sedaron ligeramente con isoflurano inhalado y se alimentaron por vía oral con dextrano marcado (200 µl de 6 mg/ml en solución salina). Dos horas después de la administración, el animal se sacrificó y se recogió el intestino entero desde el estómago hasta el colon distal. Se abrieron el contenido del estómago, intestino delgado (dividido en 10 segmentos de longitud igual), ciego y colon (3 segmentos; proximal, intermedio y distal), se colocaron en 2 ml de solución salina y se agitaron vigorosamente con vórtex para liberar el dextrano presente en cada segmento. Después de la sedimentación del tejido intestinal y quimo, alícuotas del sobrenadante se leyeron por duplicado en un lector de placas (CytroFluor II; longitud de onda de excitación 530 nm y emisión 590 nm) para la cuantificación de la señal de fluorescencia en cada segmento del intestino. Entonces se representó una mediana del histograma de la señal de fluorescencia para demostrar cambios en la distribución de dextrano marcado entre grupos experimentales. El tránsito intestinal se determinó para análisis estadístico calculando el centro geométrico (CG).

Estudios morfológicos

45 Estudio histopatológico

Se fijaron injertos del intestino delgado en 10 % de formalina tamponada y se incorporaron en parafina. Las secciones se cortaron a un espesor de 4 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

50 Histoquímica de mieloperoxidasa

Se prepararon montajes completos de músculo a partir del intestino delgado intermedio recogido 24 horas posoperatoriamente. Los segmentos de intestino se sumergieron en KRB en una placa de vidrio revestida con Silgaard™ y se sujetaron con alfileres sin estirar a lo largo de la frontera mesentérica. La longitud y anchura de los segmentos se midieron con un compás calibrador. Entonces se abrió el colon a lo largo de la frontera mesentérica y se estiró hasta el 150 % de la longitud y el 250 % de la anchura. Se eliminaron la mucosa y submucosa usando pinzas finas, y el tejido restante se fijó en 100 % de etanol desnaturalizado durante 30 minutos. Después de lavar varias veces con PBS, el tejido se trató con reactivo de Hanker-Yates para la detección de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) que presentaban actividad de mieloperoxidasa (MPO) (Sheibani et al., Am. J. Clin. Pathol. 75(3):367-70 (1981)). Los tejidos se montaron sobre portaobjetos de vidrio usando Gel/Mount™ (Biomedica Corp., Foster City, CA), se cubrieron con cubreobjetos y se inspeccionaron por microscopía óptica (Nikon FXA, Fryer, Huntley, IL) a un aumento de 200x. Los números de PMN positivos para MPO que infiltran los músculos externos se determinaron de las cifras medias recogidas de cinco a seis campos ópticos adyacentes centrados entre las fronteras mesentérica y antimesentérica.

Estudios de biología molecular

Ensayo de protección de RNasa (RPA)

5 Para investigar el análisis secuencial de la expresión de ARNm de citocinas en la mucosa y músculo, se realizó el ensayo de protección de RNasa con el kit Riboquant™ (Pharmingen) según el protocolo del fabricante. Se sintetizaron múltiples sondas de ARN antisentido radiomarcadas usando un kit de transcripción *in vitro* y el conjunto de molde de multi-sonda de citocina de rata (rCK-1), que incluyó sondas para citocinas (interleucina (IL)-1 α , IL-1 β ,
10 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TNF- β y IFN- γ) y genes de mantenimiento (L32 y GAPDH). Se hibridaron sondas marcadas con ³²P (8,0 x 10⁵ cpm) y ARN de muestra (5 μ g) a 56 °C durante 12-16 horas, y ARN monocatenarios que incluyen sondas de ARN antisentido se digirieron usando el kit RPA (Pharmingen). Las sondas protegidas se cargaron sobre un 40 % de gel de poliacrilamida. La autorradiografía se realizó usando un sistema PhosphorImager™ (Molecular Dynamics, Krefeld, Alemania). La cuantificación de la radiactividad de bandas de
15 ARNm se realizó con NIH Imagen, se normalizó a GAPDH y se expresó como una relación de citocina /GAPDH (n=3-4).

RT-PCR en tiempo real con SYBR Green

20 Los efectos de la inhalación de CO sobre la expresión génica pro-inflamatoria y antiinflamatoria inducida por trasplante se evaluaron en extractos de músculo por RT-PCR. Se recogió músculo externo de intestino normal e injertos trasplantados 4 horas posoperatoriamente y se congelaron criogénicamente en nitrógeno líquido. Este momento de tiempo entra dentro del intervalo de la máxima expresión del mediador inflamatorio que se produce entre 3 y 6 horas tras la incisión abdominal. Se realizó extracción de ARN total usando el método de extracción con
25 tiocianato de guanidinio fenol-cloroformo como se ha descrito previamente (Eskandari et al., Am. J. Clin. Pathol. 75(3):367-370 (1997)). Los sedimentos de ARN se resuspendieron en disolución de resuspensión segura para ARN (Ambion Inc., Austin, TX), seguido de eliminación de ADN posiblemente contaminante mediante tratamiento con DNasa I (kit DNA-Free, Ambion Inc., Austin, TX). Se cuantificaron alícuotas iguales (5 μ g) de ARN total de cada muestra mediante espectrofotometría (longitud de onda 250 nm) y se tomaron alícuotas a una concentración de 40
30 ng/ μ l. La expresión de ARNm pico se cuantificó por duplicado por RT-PCR en tiempo real de dos etapas con SYBR Green. Se usó GAPDH como referencia endógena. ARN en alícuotas se sometió a síntesis de ADN complementario (ADNc) de la primera hebra usando hexámeros al azar (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y Super Script II™ (Life Technologies, Rockville, MD). Las secuencias de cebadores se obtuvieron de la bibliografía o se diseñaron según secuencias publicadas (Tabla 1). Se preparó una mezcla de reacción de PCR usando reactivos SYBR Green
35 PCR Core (PE Applied Biosystems). Cada muestra se estimó por duplicado usando las condiciones recomendadas por el fabricante. La reacción se incubó a 50 °C durante 2 min para activar la uracil N'-glicosilasa y a continuación durante 12 min a 95 °C para activar la polimerasa Amplitaq Gold™ seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min en un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos de PCR en tiempo real se representaron como la señal de fluorescencia ΔR_n frente al número
40 de ciclos. Se fijó un umbral arbitrario para la porción lineal intermedia de la representación de ciclos por log ΔR_n . El ciclo umbral (C_T) se definió como el número de ciclos al que ΔR_n cruza este umbral. La cuantificación de la expresión de ARNm se normalizó a GAPDH y se calculó con respecto al control usando el método comparativo de C_T (Schmittgen et al., J. Biochem. Biophys. Methods 46(1-2):69-8 (2000)).

45 Para excluir la amplificación por PCR de ADN genómico contaminante, controles negativos con RT (muestras que contienen ARN que no se transcribió de forma inversa) se incluyeron en cada reacción de PCR. Se realizaron análisis de la curva de fusión para cada reacción para garantizar la amplificación del producto específico. Además, los cebadores se sometieron a electroforesis en gel para confirmar la ausencia de bandas no específicas y para confirmar que los amplicones fueron del tamaño correcto. La eficiencia de la amplificación por PCR de ADNc diana
50 se examinó para medir la colinealidad de la dilución: se realizaron diluciones sucesivas triples de ADNc por triplicado. Las curvas patrón se generaron representando el valor de C_T contra el número de copias de entrada relativo. Se consideró que las pendientes de las curvas patrón de $-3,2 \pm 0,3$ con coeficientes de correlación de 0,99 eran aceptables, teniendo eficiencias correspondientes del 100 ± 10 %.

55

Tabla 1. Resumen de cebadores

Cebador	Secuencia 5' a 3'	SEC ID N°	Fuente
GAPDH	ATGGCACAGTCAAGGCTGAGA	1	NM_017008
	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT	2	
IL-6	GCCCTTCAGGAACAGCTATGA	3	M26744
	TGCAACAACATCAGTCCCAAGA	4	
IL-1 β	CACCTCTAAGCAGAGCACAG	5	Li & Wang, Brain Research Protocols 2000; 5, 211-217
	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	6	
TNF α	GGTGATCGGTCCCAACAAGGA	7	Fink et al. Nature Med 1998; 4: 1329-1333.
	CACGCTGGCTCAGCCACTC	8	
ICAM-1	CGTGGCGTCCATTTACACCT	9	NM_012967
	TTAGGGCCTCCTCCTGAGC	10	
iNOS	GGAGAGATTTTTCACGACACCC	11	NM_012611
	CCATGCATAATTTGGACTTGCA	12	
COX-2	CTCTGCGATGCTCTTCCGAG	13	AF233596
	AAGGATTTGCTGCATGGCTG	14	
IL-10	TGCAACAGCTCAGCGCA	15	Harness et al., J. Neurol. Sci. 2001; 187,7-16.
	GTCACAGCTTTCGAGAGACTGGAA	16	

Transferencia Northern de HO-1

- 5 Se realizó transferencia Northern como se ha descrito previamente (Camhi et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 13:387-398 (1995)). Brevemente, 10 μ g de ARN total extraídos del tejido como se ha descrito anteriormente se sometieron a electroforesis en un 1 % de gel de agarosa y a continuación se transfirieron a membranas de nailon por acción capilar. A continuación, las membranas de nailon se prehibridaron en tampón de hibridación [1 % de albúmina de suero bovino (BSA), 7 % de SDS, tampón PO₄ 0,5 M, pH 7,0, y EDTA 1 mM] a 65 °C durante 2 h,
- 10 seguido de hibridación con sondas de oligonucleótidos de ADNc de HO-1 de rata marcado con ³²P, L-ferritina de rata marcada con ³²P o de H-ferritina de rata marcada con ³²P a 65 °C durante 24 h. Entonces, las membranas de nailon se lavaron en tampón A (0,5 % de BSA, 5 % de SDS, tampón PO₄ 40 mM, pH 7,0, y EDTA 1 mM) durante 15 min dos veces a 65 °C, seguido de lavados en tampón B (1 % de SDS, tampón PO₄ 40 mM, pH 7,0, y EDTA 1 mM) durante 15 min tres veces a 65 °C.

15

Sonda de ADNc de HO-1

- El Dr. S. Shibahara de la Universidad de Tohoku (Sendai, Japón) proporcionó amablemente un ADNc de rata de longitud completa (pHO1). pHO1 se subclonó en el vector pBluescript, y se realizó una digestión con HindIII/EcoRI
- 20 para aislar el inserto de ADNc de HO-1 de 0,9 kb del vector pBluescript. Para controlar la variación en cualquier cantidad de ARN en diferentes muestras o errores de carga, se hibridaron transferencias con una sonda de oligonucleótidos correspondiente al ARNr 18S. Se sintetizó un oligonucleótido de 24 pares de bases (5'-ACGGTATCTGATCGTCTTCAACC-3'; SEC ID N°: 17) complementario al ARN 18S usando un sintetizador de ADN (Applied Biosystems, Foster City, CA). El ADNc de HO-1 se marcó con [³²P]-CTP usando el kit de cebadores
- 25 aleatorios de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania). Todas las sondas de oligonucleótidos se marcaron con [³²P]-ATP en el extremo 3' con desoxinucleotidiltransferasa terminal (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD). Se compararon las señales de las autorradiografías con ARNr 18S obtenido de la misma transferencia.

Determinación de niveles de citocinas en suero

30

Se tomaron muestras de suero secuencialmente 1, 4 y 24 horas después de la reperusión y se guardaron a -80 °C hasta la evaluación. Las concentraciones de citocinas en suero, que incluyen IL-6, IL-10 y TNF α , se determinaron usando kits de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) de rata como se describe por el fabricante (R & D, Cambridge, MA).

35

Medición de niveles de nitrito/nitrato en suero

- Para monitorizar los productos finales estables del metabolismo del NO, se midieron los niveles de nitrito/nitrato en suero 1, 4 y 24 h usando un kit de prueba comercialmente disponible (Cayman, Ann Arbor, MI) y se cuantificaron
- 40 según las indicaciones del fabricante. En este sistema de ensayo, el nitrato se reduce a nitrito usando nitrato reductasa, y la concentración de nitrito de la muestra se mide posteriormente usando la reacción de Griess.

Cultivo de células de músculo

Se extrajo el intestino delgado de ratas de control y trasplantadas (bajo condiciones estériles) 24 horas posoperatoriamente. El colon se dejó *in situ*. El intestino se transfirió a un vaso de precipitados estéril que contenía solución salina equilibrada de Hank (Sigma, St. Louis, MO) con 200 U/ml de penicilina G y 200 µg/ml de estreptomicina (HBSS). Se aislaron los músculos como se ha descrito anteriormente y se transfirieron sobre gasa estéril. Se determinó el peso húmedo de las muestras, y se crearon alícuotas de 150-200 miligramos de tejido. Los tejidos se lavaron dos veces en HBSS. Las alícuotas se transfirieron a placas de cultivo de pocillos de 35 milímetros que contenían 3 ml de DMEM libre de suero que contenía penicilina/estreptomicina, como antes, y se incubaron durante 24 h en una estufa de incubación con 5 % de CO₂ a 37 °C. Después del período de incubación, alícuotas de 1 ml de sobrenadante se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. Los niveles de proteínas citocinas se midieron por ELISA y se normalizaron al peso húmedo del tejido. Se usaron kits de ELISA comercialmente disponibles según las instrucciones del fabricante.

15 Análisis de datos

Los resultados se expresan como media más o menos el error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se realizó usando la prueba de la t de Student o análisis de variaciones (ANOVA) cuando corresponda. Un nivel de probabilidad de $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

20 CO suprime el desarrollo de disfunción intestinal asociada a SITx

Se investigaron los efectos de SITx y el tratamiento con CO sobre la contractilidad de músculo circular del intestino delgado espontánea y estimulada con betanecol en experimentos en baño de órganos *in vitro*. Los tejidos se recogieron 24 horas después de la reperfusión del injerto intestinal trasplantado. Tiras de músculo de intestino de control generaron contracciones regulares (datos no mostrados). El tratamiento con CO durante 24 horas no tuvo efecto sobre la actividad contráctil espontánea en ratas de control sin operar (datos no mostrados). Después de SITx, la actividad contráctil espontánea se perdió (datos no mostrados). El tratamiento con CO restauró la actividad contráctil espontánea en ratas trasplantadas (datos no mostrados).

La adición de betanecol (0,3 a 300 µM) al perfusado del baño provocó contracciones tónicas dependientes de la concentración. Las respuestas contráctiles integradas normalizadas al área de tejido obtenida en respuesta a la dosis creciente de betanecol se muestran en la Fig. 1. En animales de control, la fuerza contráctil fue dependiente de la concentración durante el intervalo de betanecol 10 a 300 µM, con una fuerza pico de $3,5 \pm 0,7$ g/mm²/s generada en respuesta a betanecol 100 µM. El tratamiento con CO no tuvo efecto sobre la contractilidad en animales sin operar (fuerza contráctil pico $3,2 \pm 0,5$ g/mm²/s). SITx condujo a una reducción en la fuerza contráctil generada en toda la curva de dosis-respuesta en comparación con controles que alcanzaron significación estadística a concentraciones de betanecol superiores a 10 µM. A betanecol 100 µM, las fuerzas contráctiles pico se redujeron al 49 % a $1,7 \pm 0,4$ g/mm²/s. El tratamiento con CO previno el efecto inhibitorio de SITx en toda la curva de dosis-respuesta, restaurando la fuerza contráctil pico a niveles de control ($3,6 \pm 0,7$ g/mm²/s).

Se midió el tránsito intestinal en controles y animales trasplantados 48 horas posoperatoriamente evaluando la distribución intestinal de dextrano marcado con fluoresceína alimentado por vía oral. Las Figs. 2A-2B son histogramas del tránsito que ilustran la distribución de dextrano marcado con FITC no absorbible a lo largo del tubo gastrointestinal (del estómago al colon) 2 horas después de la administración por vía oral. Una mediana del histograma de la fluorescencia en cada segmento del intestino, 2 horas después de la alimentación oral, de ratas de control sin operar y de ratas de control tratadas con CO se representa en la Fig. 2A. En ambos grupos, la mayoría de la marca fluorescente se localizó en los segmentos del intestino delgado 9 y 10, y en el ciego. Esto es a diferencia del patrón de distribución observado en ratas trasplantadas (Fig. 2B), en el que la marca fluorescente se encontró principalmente en el estómago, entrando algo de marca en el intestino delgado proximal. En animales trasplantados tratados con CO, la distribución de marca fue más distal, acumulándose principalmente dentro de los segmentos del intestino delgado 6, 7 y 8. Los análisis estadísticos de los resultados del cálculo del centro geométrico, resumidos en la Fig. 2C, demuestran que la inhalación de CO mejoró significativamente el tránsito intestinal en ratas que se sometieron a trasplante del intestino delgado.

55 Reclutamiento de leucocitos

Se caracterizaron acontecimientos inflamatorios celulares en el músculo del intestino delgado 24 horas después de la SITx. Se usó la actividad de mieloperoxidasa (MPO), como se ha determinado por histoquímica de Harker-Yates, para cuantificar el infiltrado de leucocitos en tejidos de animales de control y trasplantados, con y sin tratamiento con CO. En ratas de control sin operar y de control tratadas con CO, las células positivas para MPO fueron raras (datos no mostrados). Los SITx produjeron un reclutamiento significativo de leucocitos en el músculo intestinal (datos no mostrados). Las cifras de células por 200X de campo se resumen en la Fig. 3, que muestra que el tratamiento con CO disminuyó el número medio de células positivas para MPO; sin embargo, esta reducción no alcanzó significación estadística ($p = 0,08$, $n=6$).

Análisis de secuencias de citocinas en capas de mucosa y musculares

Los ensayos de protección de RNAsas demostraron que SITx causó una regulación por incremento significativa de tanto ARNm de IL-6 como de IL-1 β , que alcanzó el pico 3 - 6 horas dentro del injerto trasplantado (Figs. 4A y 4B).

5 Por consiguiente, los niveles de ARNm de mediador inflamatorio se analizaron 4 horas después de la reperfusión.

Respuesta inflamatoria molecular

La Fig. 5 es un conjunto de gráficos de barras que ilustran el efecto de CO sobre la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS), IL-6, IL-1 β y IL-10 en los músculos externos de injertos intestinales cuatro horas después de la reperfusión. El análisis por PCR en tiempo real reveló un aumento significativo en la expresión de ARNm de citocinas pro-inflamatorias (IL-6 (3400 veces) e IL-1 β (38 veces)) en los músculos externos de injertos intestinales. TNF α también se reguló significativamente por incremento, pero a un menor grado (3 veces). La expresión génica de ICAM-1, una molécula de adhesión que desempeña una función importante en el reclutamiento de células inflamatorias circulantes, aumentó 14 veces. En ratas receptoras tratadas con CO, la expresión de IL-6 y IL-1 β relativa media se redujo (el 40 % y 50 %, respectivamente), mientras que la expresión de TNF α e ICAM-1 no cambió. Debido a la gran desviación estándar entre los grupos trasplantados, la disminución en la expresión de ARNm de IL-6 en ratas tratadas con CO no alcanzó significación estadística ($p = 0,084$, $n=6$), mientras que la expresión de IL-1 β se redujo significativamente ($p = 0,046$, $n=6$). La expresión génica de las formas inducibles de ciclooxigenasa (COX-2) y óxido nítrico sintasa (iNOS) también se reguló significativamente por incremento en el músculo de injertos trasplantados (5 veces y 48 veces, respectivamente). La expresión de ARNm relativa media de ambas enzimas se redujo aproximadamente el 50 % en ratas tratadas con CO. Una vez más, la reducción en la expresión de iNOS no fue bastante significativa ($p = 0,060$, $n=6$), mientras que la reducción en la expresión de COX-2 fue bastante significativa ($p=0,26$, $n=6$). La inhalación de CO solo no tuvo efecto sobre la expresión de ninguno de los mediadores estudiados.

La Fig. 6 es un conjunto de gráficos de barras que ilustran el efecto de CO sobre las concentraciones de IL-6 y nitrato/nitrito en suero en animales que recibieron injertos intestinales una y cuatro horas después de la reperfusión. Para generar estos datos, se tomaron muestras de suero en diversos momentos de tiempo tras el trasplante y se guardaron a -80 °C hasta la evaluación. Las concentraciones de IL-6 en suero se determinaron usando un kit de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) de rata (R&D, Cambridge, MA). Los niveles de nitrato/nitrito en suero, los productos finales estables del metabolismo del NO, se midieron usando un kit de prueba comercialmente disponible (Cayman, Ann Arbor, MI). En este sistema de ensayo, el nitrato se reduce a nitrito usando nitrato reductasa, y la concentración de nitrito de la muestra se midió posteriormente usando la reacción de Griess. Los niveles de IL-6 y nitrato/nitrito en suero en animales sometidos a SITx y tratados con aire aumentaron con el tiempo. Los animales sometidos a SITx y tratados con CO (SITx + CO) mostraron niveles en suero significativamente reducidos de tanto IL-6 como nitrato/nitrito.

Datos que demuestran que el CO protege de la disfunción intestinal inducida por trasplante se tabulan en la Tabla 2, a continuación. Pronto (<48 horas) después del SITx, los injertos intestinales sufrieron un retraso significativo en el tránsito intestinal, reducción de la contractilidad del músculo e infiltrados inflamatorios masivos. Estos cambios se redujeron en receptores tratados con CO. Las concentraciones de IL-6 en suero (4 horas después de la reperfusión) fueron significativamente menores en SITx con CO en comparación con SITx sin CO. El CO previno la inflamación del injerto intestinal y la lesión I/R asociada a SITx regulando por disminución las citocinas IL-6 y IL-1 pro-inflamatorias.

Tabla 2: CO suprime la disfunción intestinal asociada a SITx

	Tránsito intestinal	Fuerza contráctil (g/s/mm ²)	Infiltrados inflamatorios (/200x campo)	ARNm de IL-1 β (% de GAPDH)	ARNm de IL-6 (% de GAPDH)	IL-6 en suero (pg/ml)
Normal	normal	2,5 \pm 0,1	4,2 \pm 1,1	0	0,8 \pm 0,1	273
SITx	retrasado	1,0 \pm 0,3	37 \pm 8,4	12,2 \pm 2,7	41,9 \pm 3,8	6042
SITx+CO	normal	3,0 \pm 0,4	21 \pm 3,2	6,6 \pm 0,1	22,3 \pm 1,8	1439

Ejemplo 2. El CO suprime el desarrollo de íleo asociado a la manipulación quirúrgica del intestino delgado

50

Animales

Se obtuvieron ratones macho no mutantes C57B16 (20-25 g) de Harlan (Indianápolis, IN). Los ratones se alojaron en una instalación libre de patógenos, se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y se alimentaron con pienso para roedores comercialmente disponible y agua de grifo a voluntad.

55

Grupos experimentales y procedimientos operativos

Ratones de la misma edad se dividieron en cuatro grupos experimentales: controles sin tratamiento previo (Control); controles tratados con CO (Control + CO); ratones sometidos a manipulación quirúrgica del intestino delgado (MI); y 5 ratones sometidos a manipulación quirúrgica y tratamiento con CO (MI + CO).

Manipulación quirúrgica. Los ratones se anestesiaron con isoflurano inhalado y se abrió el abdomen por laparotomía de la línea media. El intestino delgado se eventró y se comprimió suavemente a lo largo de su longitud entera usando aplicadores de algodón estéril humedecido. Este procedimiento se diseña para simular la “ejecución” del 10 intestino comúnmente realizada durante la cirugía abdominal en el ámbito clínico. El intestino se volvió a colocar en la cavidad abdominal y la incisión se cerró por dos capas de suturas continuas. La duración del procedimiento fue aproximadamente 15 minutos y los animales se movieron libremente alrededor de su jaula en el plazo de 20 minutos desde la retirada del anestésico.

15 **Tratamiento de inhalación de CO.** Los ratones alojados en jaulas se colocaron en cámaras de Plexiglass que se ventilaban continuamente con aire o con aire que contenía CO (250 ppm). Se proporcionó un puerto de muestreo para monitorizar continuamente las concentraciones de monóxido de carbono dentro de la cámara. Los animales tuvieron acceso libre a comida y agua en todo momento. Los ratones se expusieron a CO o aire 1 hora antes de la laparotomía, se sacaron para la manipulación quirúrgica y luego se devolvieron a la cámara durante 24 horas. Los 20 ratones que no se sometieron a cirugía se sacaron de la cámara durante una longitud de tiempo similar y luego se devolvieron a la cámara durante 24 horas.

Estudios morfológicos

25 **Histoquímica de MPO.** Se prepararon montajes completos de músculo a partir del yeyuno medio recogido 24 h posoperatoriamente. Los segmentos de intestino se sumergieron en KRB en una placa de vidrio revestida con Silgard (Midland, MI) y se sujetaron con alfileres sin estirar a lo largo de la frontera mesentérica. La longitud y anchura de los segmentos se midieron con un compás calibrador. Entonces se abrió el segmento del yeyuno a lo largo de la frontera mesentérica y se estiró hasta el 150 % de la longitud y el 250 % de la anchura. Se eliminó la 30 mucosa usando pinzas finas, y el tejido restante se fijó en 100 % de etanol desnaturalizado durante 30 min. Después de lavar varias veces con PBS, el tejido se trató con reactivo de Hanker-Yates (Polysciences, Warrington, PA) para la detección de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) que presentaban actividad de mieloperoxidasa (MPO). Los tejidos se montaron sobre portaobjetos de vidrio usando Gel/Mount™ (Biomedica Corp., Foster City, CA), se cubrieron con cubreobjetos y se inspeccionaron por microscopía óptica (Nikon Microphot-FXA, Fryer, Huntley, IL) a un 35 aumento de 200x. Se contaron PMN en cinco a seis campos ópticos adyacentes centrados entre las fronteras mesentérica y antimesentérica.

Inmunohistoquímica de HO-1. Montajes completos de músculo preparados como antes se fijaron en fijador de Zamboni durante 1 hora, se limpiaron con DMSO. Después de lavar varias veces con PBS, los tejidos se trataron 40 con PBS que contenía 10 % de suero de burro normal y 0,1 de % Triton-X. Entonces, los montajes completos se incubaron durante la noche con anticuerpo de conejo anti-HO-1 de rata (1:500, Stressgen, Vancouver, Canadá), se lavaron y se incubaron durante 2 h con conjugado de burro anti-IgG de conejo-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). Los tejidos se montaron con Gel/Mount™ como antes y se inspeccionaron por 45 microscopía de fluorescencia (Nikon Microphot-FXA, Huntley, IL).

Estudios funcionales

Se anestesiaron ratones y se sacrificaron por desangrado al final del tratamiento en cámara de 24 horas con CO o aire ambiental. Se midió la actividad mecánica de músculo circular *in vitro* como se ha descrito previamente en 50 Eskandari et al. (Am. J. Physiol. 273:G727-G734 (1997)). Brevemente, un segmento del intestino delgado intermedio se sujetó con alfileres en una placa de disección revestida con Silgaard™ (Midland, MI que contenía tampón Krebs-Ringer-bicarbonato previamente oxigenado (KRB; en mM: Na⁺ 137,4, K⁺ 5,9, Ca²⁺ 2,5, Mg²⁺ 1,2, Cl⁻ 134, HCO₃⁻ 15,5, H₂PO₄⁻ 1,2 y glucosa 11,5), se gasificó con 97 % de O₂/3 % de CO₂ para establecer un pH de 7,4. El intestino se abrió a lo largo de la frontera mesentérica y se extrajo la mucosa arrancando con pinzas finas. Se montaron tiras de 55 espesor completo de músculo (1 x 6 mm) cortadas paralelas a la capa de músculo circular en cámaras de órganos mecánicas horizontales estándar y se perfundieron continuamente con KRB previamente oxigenado mantenido a 37 °C. Un extremo de cada tira se unió por atadura a un poste fijo y el otro a un transductor de fuerza isométrica (WPI, Sarasota, FL). Se dejó que las tiras se equilibraran durante 1 hora, después de lo cual se estiraron incrementalmente hasta Lo (a la que se produce la máxima contracción espontánea). Después de un periodo de registro del nivel inicial 60 de 30 min, se generaron curvas de contractilidad-respuesta exponiendo los tejidos a concentraciones crecientes del agonista muscarínico betanecol (0,3 a 300 μM) durante 10 minutos, seguido de la intervención de periodos lavado de 10 minutos. La actividad contráctil se calculó integrando el área bajo el trazo. La respuesta se normalizó a la cantidad de tejido convirtiendo el peso (1,03 mg/mm²) y la longitud de la tira a milímetros cuadrados de tejido, y se informó como g/s/mm². Se midió el tránsito intestinal en controles y animales manipulados 48 horas 65 posoperatoriamente evaluando la distribución intestinal de un dextrano marcado con fluoresceína no absorbible (MW

70.000). Los animales se sedaron ligeramente con isoflurano inhalado y se alimentaron por vía oral con dextrano marcado (100 µl de 25 mg/ml de disolución madre). Noventa minutos después de la administración, el animal se sacrificó y se recogió el intestino entero desde el estómago hasta el colon distal. Se trituró el contenido de cada uno del estómago, intestino delgado (dividido en 10 segmentos de longitud igual), el ciego y el colon (3 segmentos de longitud igual) en 1 ml de solución salina y se mezclaron vigorosamente para liberar el dextrano presente en cada segmento. Después de la sedimentación del tejido intestinal y quimo, alícuotas del sobrenadante limpio se leyeron por duplicado en un lector de placas (CytoFluor II; longitud de onda de excitación 530 nm y emisión 590 nm) para la cuantificación de la señal de fluorescencia en cada segmento del intestino. La distribución de señal a lo largo del tubo gastrointestinal se determinó calculando el centro geométrico ($CG = \Sigma(\text{porcentaje de la señal de fluorescencia total en cada segmento} \times \text{el número de segmento})$) para comparación estadística cuantitativa entre grupos experimentales.

RT-PCR en tiempo real con SYBR Green

Se determinó la expresión génica pro-inflamatoria y antiinflamatoria por RT-PCR en tiempo real. Se recogió el músculo externo del intestino delgado en 4 momentos de tiempo (3, 6, 12 y 24 h) posoperatoriamente y se congeló criogénicamente en nitrógeno líquido. Se realizó extracción de ARN total usando el método de extracción con tiocianato de guanidinio fenol-cloroformo como se describe en Eskandari et al. (citados anteriormente). Los sedimentos de ARN se resuspendieron en disolución de resuspensión segura para ARN (Ambion Inc., Austin, TX), seguido de eliminación de ADN posiblemente contaminante mediante tratamiento con DNasa I (kit DNA-Free, Ambion Inc., Austin, TX). Se cuantificaron alícuotas iguales (5 µg) de ARN total de cada muestra mediante espectrofotometría (longitud de onda 250 nm). La expresión de ARNm pico se cuantificó por duplicado por RT-PCR en tiempo real de dos etapas con SYBR Green. Se usó β-actina como referencia endógena. ARN en alícuotas (40 ng) se sometió a síntesis de ADN complementario (ADNc) de la primera hebra usando hexámeros al azar (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y Super Script II (Life Technologies, Rockville, MD). Los cebadores se tomaron de la bibliografía o se diseñaron según secuencias publicadas (Tabla 3). Se preparó mezcla de reacción de PCR usando reactivos SYBR Green PCR Core (PE Applied Biosystems). Cada muestra se estimó por duplicado usando las condiciones recomendadas por el fabricante. Los datos de PCR en tiempo real se representaron como la señal de fluorescencia ΔR_n frente al número de ciclos. Se fijó un umbral arbitrario para la porción lineal intermedia de la representación de ciclos por $\log \Delta R_n$. El ciclo umbral (C_T) se define como el número de ciclos al que ΔR_n cruza este umbral. La cuantificación de la expresión de ARNm se normalizó a β-actina y se calculó con respecto al control usando el método comparativo de C_T .

Tabla 3. Resumen de cebadores

SEC. ID del cebador	Fuente	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto (pb) NO.
β-Actina 17 18	Overbergh et al.	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC CAATAGTGATGACCTGGCCGT	138
IL-6 19 20	GenBank M20572	TCAATTCCAGAAACCGCTATGA CACCAGCATCAGTCCCAAGA	78
IL-1β 21 22	GenBank M15131	CAGGTCGCTCAGGGTCACA CAGAGGCAAGGAGGAAACACA	75
IL-10 23 24	GenBank M37897	CACAAAGCAGCCTTGAGAA AGAGCAGGCAGCATAGCAGTG	68
HO-1 25 26	GenBank X13356	CTCACTGGCAGGAAATCATCC ACCTCGTGGAGACGCTTTACA	67
iNOS 27 28	GenBank NM 010927	GTGACGGCAAACATGACTTCAG GCCATCGGGCATCTGGTA	74
COX2 29 30	GenBank NM 011198	CTGGGACCCAACCCTCTGA ACGGTGTGTACCACACGGC	71

Para excluir la amplificación por PCR de ADN genómico contaminante, controles negativos con RT (muestras que contienen ARN que no se transcribió de forma inversa) se incluyeron en cada reacción de PCR. Se realizaron análisis de la curva de fusión para cada reacción para garantizar la amplificación del producto específico. Además, se realizó electroforesis en gel para los cebadores para confirmar la ausencia de bandas no específicas y que los amplicones fueran del tamaño correcto. La eficiencia de la amplificación por PCR de cada ADNc diana se midió determinando la colinealidad de diluciones sucesivas. Se realizaron diluciones sucesivas triples de ADNc por triplicado para todos los cebadores. Se generaron curvas patrón representando valores de C_T contra el número de

copias de entrada relativo para validar los cebadores. Se consideró que las pendientes de las curvas patrón de $-3,2 \pm 0,3$ con coeficientes de correlación de 0,99 eran aceptables, teniendo eficiencias correspondientes del $100 \pm 10 \%$.

Análisis de la liberación de mediador de músculo intestinal

5

Determinaciones de proteína y óxido nítrico. Se extrajo el intestino delgado de ratones de control y sometidos a la manipulación intestinal bajo condiciones estériles, 4 o 24 horas posoperatoriamente, dejando el colon *in situ*. El intestino delgado se transfirió a un vaso de precipitados que contenía solución salina equilibrada de Hank enriada (Sigma, St. Louis, MO) con 200 U/ml de penicilina G y 200 µg/ml de estreptomina (HBSS), se lavó la luz y el tejido se transfirió a un segundo vaso de precipitados de HBSS. El músculo se recogió como se ha descrito anteriormente para RT-PCR en tiempo real. Los tejidos se mantuvieron bajo condiciones estériles a 3 a 5 °C en todo el procedimiento de recogida. El músculo aislado se transfirió sobre gasa estéril, y se determinó el peso húmedo para obtener alícuotas de 40 a 60 mg. Se lavaron alícuotas de tejido dos veces en HBSS, se transfirieron a placas de cultivo de pocillos de 35 milímetros que contenían 3 ml de DMEM libre de suero que contenía penicilina/estreptomina y se incubaron durante 24 h en una estufa de incubación con 5 % de CO₂ a 37 °C. Los agentes farmacológicos añadidos al medio de cultivo se esterilizaron por filtración antes de uso.

Después del periodo de incubación, el tejido de músculo se sedimentó, y las alícuotas de medio de cultivo se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. Los niveles de las proteínas IL-6, IL-1β, PGE₂ y IL-10 secretadas en el medio de cultivo se determinaron usando kits de ELISA comercialmente disponibles (R&D Systems, Mineápolis, MN) según las instrucciones del fabricante. Se estimó el óxido nítrico (NO) liberado en el medio de cultivo midiendo los productos finales estables del metabolismo del NO. Se midieron niveles de nitrito/nitrato 24 h posoperatoriamente usando kit de prueba comercialmente disponible (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) y se cuantificó según las instrucciones del fabricante. En este sistema de ensayo, el nitrato se reduce a nitrito usando cadmio granulado, y la concentración de nitrito total se mide posteriormente usando la reacción de Griess. Todas las mediciones se normalizaron al peso húmedo de tejido.

El CO inhalado suprime el desarrollo de íleo posoperatorio

30 *Observaciones generales*

Todos los animales se recuperaron rápidamente de la cirugía. No se asoció mortalidad o morbilidad al procedimiento quirúrgico o a la pauta de exposición a CO. Aunque los ratones desarrollaron íleo, el aseo posoperatorio y el comportamiento diario fue normal, produciéndose la reanudación de la ingesta de comida y agua oral en el plazo de algunas horas después de la recuperación de la anestesia.

Expresión de HO-1

Las Figs. 7A-7E son gráficos de barras e imágenes que ilustran la expresión de hemoxigenasa (HO)-1 dentro del músculo intestinal tras la manipulación quirúrgica del intestino delgado murino. Para investigar una posible función protectora antiinflamatoria para productos de HO-1 endógenos, las alteraciones en la expresión de ARNm de HO-1 se determinaron por RT-PCR en tiempo real con SYBR Green. La Fig. 7A ilustra los patrones de expresión de ARNm de HO-1 en el músculo intestinal de ratones sin operar de control, y ratones manipulados que se recogieron 3, 6, 12 y 24 h después de laparotomía. La expresión de ARNm de HO-1 aumentó significativamente 35 veces en comparación con los controles 3 h después de la laparotomía, produciéndose la expresión del pico 6 h posoperatoriamente a 45 veces. Aunque los niveles de expresión disminuyeron algo después de 6 h, la expresión siguió siendo elevada (22 veces) hasta el momento de tiempo final medido 24 h posoperatoriamente.

También se investigó si el aumento en ARNm de HO-1 produjo o no la expresión de proteínas dentro del músculo intestinal después de la manipulación quirúrgica. Se realizó inmunohistoquímica de HO-1 sobre montajes completos de músculo de yeyuno medio recogido de ratones sin operar y 24 h posoperatoriamente de ratones sometidos a manipulación quirúrgica del intestino delgado. En animales manipulados, la inmunorreactividad de HO-1 se observó dentro de grandes números de polimorfoleucocitos infiltrantes (Fig. 7B), y en células morfológicamente similares a macrófagos (Fig. 7C). Ocasionalmente, también se encontró que las células que contenían numerosos gránulos citoplásmicos (granulocitos) presentaban intensa inmunorreactividad de HO-1 (Fig. 7D). También se observó una leve inmunorreactividad de HO-1 en una población sin caracterizar de células dispersadas dentro de las capas de músculo. La inmunorreactividad de HO-1 no se detectó en montajes completos de ratones sin operar de control (Fig. 7E). La especificidad de la inmunotinción para HO-1 se confirmó por omisión de los anticuerpos primarios (no mostrado).

60

Estudios funcionales

Se midió el tránsito intestinal en controles y animales manipulados 24 horas posoperatoriamente evaluando la distribución intestinal de dextrano marcado con fluoresceína alimentado por vía oral. Las Figs. 8A-8C son gráficos de barras que ilustran los resultados de estudios del tránsito determinados a partir de la distribución de dextrano

5 marcado con fluoresceína no absorbible 1,5 horas después de la administración por vía oral. Se representa una mediana del histograma de la fluorescencia presente en cada segmento del intestino de ratones de control sin tratamiento previo y ratones tratados con CO en la Fig. 8A. En animales sin tratamiento previo, el dextrano marcado se distribuyó principalmente dentro del intestino delgado terminal, ciego y colon proximal 90 minutos después de ingerir dextrano. El tratamiento de inhalación con CO (250 ppm) solo causó un desplazamiento ligeramente insignificante en el tránsito, con la marca distribuida predominantemente dentro del ciego y el colon. La Fig. 8B compara la distribución de la señal de fluorescencia en ratones que se sometieron a la manipulación intestinal, con o sin tratamiento con CO. Después de la manipulación intestinal, la señal de fluorescencia se confinó al estómago y 3 segmentos proximales del intestino delgado. Cuando los animales se trataron con CO, la marca se distribuyó más distalmente en todo el tubo gastrointestinal. Los resultados de los cálculos del centro geométrico (CG) se resumen en la Fig. 8C para comparación estadística. Mayores valores de CG indican una distribución más distal de la señal fluorescente, y se corresponden con un tránsito más rápido. Los valores en esta figura demuestran que el CO aceleró el tránsito intestinal en ratones sin operar, pero los valores de CG no alcanzaron significación estadística. Adicionalmente, como se muestra previamente, los valores de CG muestran que el tránsito es notablemente más lento después de la manipulación intestinal, pero que esta prolongación en el tránsito mejoró significativamente en ratones tratados con la inhalación de CO.

Se investigaron *in vitro* los efectos de CO sobre la contractilidad de músculo circular del intestino delgado espontánea y estimulada con betanecol en experimentos en baño de órganos 24 horas después de la manipulación quirúrgica del intestino, un momento de tiempo cuando se ha mostrado que el íleo está bien establecido. Las Figs. 9A-9C ilustran la actividad mecánica de tales tiras de músculo liso circular del intestino delgado. La Fig. 9A es un conjunto de trazos representativos que muestran la contractilidad espontánea de músculo circular intestinal. Las tiras de músculo del intestino delgado de ratones sin tratamiento previo generaron contracciones regulares (Fig. 9A; Control), y el tratamiento con CO no tuvo efecto (Fig. 9A; Control + CO). Después de MI, la actividad contráctil espontánea se suprimió significativamente (Fig. 9A; MI). Sin embargo, en ratones con MI tratados con CO, la ritmicidad mejoró significativamente (Fig. 9A; MI + CO). La adición del agonista muscarínico betanecol (0,3 a 300 μM) al superfusado provocó contracciones tónicas dependientes de la concentración. El área bajo la curva de contracción se integró y se normalizó al área superficial de la tira de músculo para obtener una medida de la contractilidad de músculo circular. Las Figs. 9B y 9C son gráficos de líneas que ilustran contractilidad normalizada. En ratones de control, la fuerza contráctil pico ($3,5 \pm 0,7 \text{ g/s/mm}^2$) se generó en respuesta a betanecol 100 μM (Fig. 9B). CO solo no tuvo efecto sobre las contracciones de control ($3,2 \pm 0,5 \text{ g/s/mm}^2$). La manipulación quirúrgica condujo a una reducción en la fuerza contráctil en toda la curva de dosis-respuesta en comparación con controles, alcanzado significación estadística a concentraciones de betanecol superiores a 10 μM (Fig. 9C). La fuerza contráctil pico generada con betanecol 100 μM se redujo al 49 % ($1,7 \pm 0,4 \text{ g/s/mm}^2$) en estos ratones. La inhalación de CO (250 ppm) previno completamente el efecto inhibitorio de la manipulación quirúrgica ($3,6 \pm 0,7 \text{ g/s/mm}^2$).

Histoquímica de MPO

La manipulación quirúrgica del intestino delgado normalmente produce una respuesta inflamatoria celular masiva dentro del músculo. Se usó histoquímica de Harker-Yates para la actividad de mieloperoxidasa (MPO^+) para cuantificar el infiltrado de leucocitos en tejidos de animales de control y manipulados, con y sin tratamiento con CO. La Fig. 10 es un histograma que resume los datos de células MPO^+ que infiltran el músculo intestinal para los cuatro grupos experimentales usados en este estudio. Se contaron los leucocitos a un aumento de 200x. En especímenes de control que no se sometieron a cirugía, las células MPO^+ fueron raras. La anestesia quirúrgica y la manipulación intestinal produjeron un aumento de 250 veces en el número de células MPO^+ que infiltran el músculo a las 24 h. De forma interesante, el tratamiento de inhalación con CO no tuvo efecto sobre la magnitud del infiltrado de leucocitos en ningún grupo.

Expresión de citocinas pro-inflamatorias

Las Figs. 11A-11C son gráficos de barras que ilustran los efectos del CO inhalado sobre la expresión de IL-6. Las figuras muestran el transcurso de tiempo de la expresión génica de IL-6 después de la manipulación del intestino delgado, y los efectos del CO inhalado sobre expresión génica y de proteínas la IL-6. Los análisis del transcurso de tiempo usando RT-PCR en tiempo real mostraron que el ARNm de IL-6 aumentó 300 veces con respecto a ratones de control sin tratamiento previo, 3 y 6 h posoperatoriamente (Figura 11A). La expresión disminuyó rápidamente 12 h, disminuyendo a un aumento de 50 veces en comparación con los controles a las 24 h. La inhalación de CO no tuvo efecto sobre la expresión génica inducida por la manipulación en los momentos de tiempo de 3 y 6 h (Fig. 11B). La liberación de proteína IL-6 del músculo aislado se midió después de la incubación en medio de cultivo celular (Fig. 11C). La proteína IL-6 aumentó masivamente 24 h después de la manipulación intestinal, y a diferencia de los datos de PCR, la liberación de proteína se redujo significativamente el 70 % en ratones tratados con CO.

También se investigó la citocina IL-1 β proinflamatoria. El transcurso de tiempo de la expresión génica de IL-1 β se muestra en las Figs. 12A-12B. Las mediciones de IL-1 β se complicaron por la observación de que los niveles de ARNm en extractos de músculo de ratones de control sin tratamiento previo y en ratones de control tratados con CO estuvieron por debajo de las capacidades de detección del analizador de secuencias. Así, muestras de ratones

manipulados recogidas 6 h posoperatoriamente se diluyeron sucesivamente y los valores del ciclo umbral (C_T) se normalizaron a β -actina determinada de muestras sin diluir. Entonces, los valores de ΔC_T de control se calcularon usando la menor concentración de IL-1 β para la que C_T disminuyó a dentro del intervalo lineal. Entonces se calcularon cambios en la expresión génica para los restantes grupos experimentales con respecto a este control, y por tanto son conservativos en su estimación del aumento de veces actual. A partir de estos cálculos, se encontró que la expresión de ARNm de IL-1 β en respuesta a la anestesia quirúrgica y la manipulación intestinal aumentó 38 veces con respecto al control, 3 h después de la cirugía. La máxima expresión se produjo algo después de la informada anteriormente para IL-6, alcanzado 170 y 150 veces a 6 y 12 h posoperatoriamente, y disminuyendo de nuevo a 40 veces a las 24 h (Fig. 12A). En animales tratados con CO, la expresión de IL-1 β en el momento de tiempo de 6 h se redujo el 60 % (Fig. 12B). La liberación de proteína de IL-1 β de extractos de músculo recogidos 24 h después de la cirugía se midió después de otras 24 horas de incubación en medio de cultivo celular (Fig. 12C). Correlacionando con los datos de RT-PCR, no pudo detectarse proteína IL-1 β en ningún grupo de control, mientras que la concentración de proteína producida por 100 mg de tejido extraído aumentó después de la manipulación intestinal. Esta respuesta se redujo significativamente el 60 % en ratones tratados con inhalación de CO.

15 *Expresión de ciclooxigenasa-2 y óxido nítrico sintasa inducible*

Macrófagos residentes activados y que infiltran leucocitos sintetizan y liberan prostaglandinas derivadas de la isoforma inducible de ciclooxigenasa, COX-2, y óxido nítrico (NO) derivado de la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS), que tienen efectos inhibidores directos y potentes sobre el aparato contráctil del músculo liso intestinal.

El perfil temporal para la expresión de iNOS tras la manipulación se ilustra en las Figs. 13A-13C. El análisis del transcurso de tiempo mostró que la expresión génica aumentó significativamente 3 y 6 h después de la manipulación del intestino delgado (Fig. 13B). La expresión del pico a 6 h se redujo el 60 % en animales tratados con CO (Fig. 14B). La exposición de ratones sin tratamiento previo a CO no tuvo efecto sobre la expresión de iNOS (aumento en veces: Control, $1,06 \pm 0,18$; CO 3 h, $1,04 \pm 0,19$; CO 6 h, $1,26 \pm 0,19$). El nitrito total liberado en el medio de cultivo de extractos de músculo recogidos 24 h posoperatoriamente se midió como un cálculo estimado de la producción de NO (Fig. 13C). Como se ha predicho por los datos de PCR, las mediciones de nitrito aumentaron significativamente después de la manipulación intestinal y este aumento se redujo el 75 % tratando ratones con CO. Se logró una atenuación similar de la respuesta incubando los extractos de músculo en presencia del inhibidor de iNOS selectivo, L-Nil ($50 \mu\text{M}$), que indica que iNOS era la fuente del aumento quirúrgicamente inducido en la producción de NO.

Las Figs. 14A-14D son gráficos de barras que ilustran los efectos de la inhalación de CO sobre la expresión de COX-2. Las figuras muestran el perfil temporal de la expresión de COX-2 inducida por MI. El análisis del transcurso de tiempo mostró que la expresión génica de COX-2 aumentó 8-10 veces, 3 a 6 h después de la cirugía, y siguió siendo elevada hasta 24 h (Fig. 14A). El tratamiento con CO no tuvo efecto sobre expresión génica en los momentos de tiempo de 3 o 6 h (Fig. 14B). La propia inhalación de CO por ratones sin operar de control produjo una inducción relativamente pequeña de 2,5 veces del mensajero de COX-2 3 h posoperatoriamente (Fig. 14C). La liberación de PGE₂ de extractos de músculo recogidos 24 h después de la cirugía se midió como un marcador de actividad de COX-2 (Fig. 14D). De acuerdo con los datos de PCR, tanto la inhalación de CO solo como la manipulación intestinal causaron aumentos significativos en la liberación de PGE₂. Específicamente referente a PGE₂, el tratamiento de ratones manipulados con CO no tuvo efecto sobre la liberación inducida por MI de este prostanoides.

45 *Expresión génica antiinflamatoria*

IL-10 es una citocina pleiotrópica que tiene importantes efectos protectores y antiinflamatorios en el tubo gastrointestinal. Las Figs. 15A-15C ilustran los efectos de la inhalación de CO sobre la expresión de IL-10. Las figuras muestran el perfil de expresión de IL-10 con el tiempo. La expresión génica experimentó un aumento de 12 veces con respecto al control en respuesta a la manipulación intestinal, 3 y 6 h después de la cirugía. La expresión disminuyó a partir de aquí, pero se mantuvo elevada hasta 24 h a aproximadamente 4 veces con respecto a la expresión de control (Fig. 15A). En animales manipulados tratados con CO en el momento de tiempo de 3 h, la expresión génica de IL-10 aumentó a 43 veces en comparación con los controles, una respuesta 300 % superior a la de la manipulación sola (Fig. 15B). En ratones de control, la inhalación de CO sola fue suficiente para inducir un aumento significativo en la expresión de IL-10 (Fig. 15C).

También se evaluó el efecto del CO inhalado sobre la expresión génica de HO-1. Las Figs. 16A-16B ilustran el efecto de la inhalación de CO sobre la expresión de HO-1. La Fig. 16A compara la expresión génica inducida por MI 3 y 6 h después de la cirugía (véase Fig. 7D), con la alcanzada en ratones manipulados tratados con CO. La inhalación de CO también aumentó la expresión génica de HO-1 3 h posoperatoriamente a un nivel 300 % superior al de la manipulación sola (Fig. 16B). En este caso, la inhalación de CO solo por ratones sin operar de control indujo un pequeño aumento, aunque significativo, en la expresión génica de HO-1, pero solo en el momento de tiempo de 6 h.

65 El presente ejemplo proporciona tanto evidencia *in vivo* como *in vitro* de que la inhalación de una baja concentración

de CO (250 ppm) atenúa significativamente la dismotilidad intestinal que caracteriza el íleo posoperatorio. Los datos muestran que el CO puede actuar al nivel de la expresión génica y de proteínas para modular selectivamente elementos específicos de tanto vías pro-inflamatorias como antiinflamatorias que conducen a una mejora significativa en la función intestinal.

5

El íleo posoperatorio es actualmente una consecuencia prácticamente inevitable de procedimientos quirúrgicos abdominales, y puede oscilar de atonía a corto plazo a íleo paralítico grave que puede persistir durante días. El íleo paralítico se caracteriza por estasis intestinal, sobrecrecimiento bacteriano y desequilibrios de electrolitos de líquidos, produciendo morbilidad significativa y frecuentemente mortalidad. La exposición de ratones a CO por inhalación mejoró la supresión inducida por la manipulación en la contractilidad de músculo liso circular espontánea, restauró la capacidad de los músculos para contraerse en respuesta a agonistas colinérgicos y atenuó significativamente la alteración en el tránsito intestinal. Esta mejora en la función contráctil global se logró sin una reducción significativa en el infiltrado de células inflamatorias, sugiriendo que el CO actuó sobre elementos de la cascada inflamatoria distintos de aquellos asociados al reclutamiento de leucocitos. Con el fin de evaluar el efecto del CO sobre la cascada inflamatoria, se evaluó la expresión génica del mediador pro- y antiinflamatorio por RT-PCR en tiempo real.

Niveles elevados de citocinas IL-6 y IL-1 pro-inflamatorias son coherentemente expresados durante inflamación intestinal aguda y crónica en seres humanos y animales, que incluye íleo posoperatorio. La IL-6 activa una variedad de tipos de células para inducir la síntesis de quimioatrayentes y moléculas de adhesión, y así desempeña una función central en iniciar el reclutamiento de leucocitos y la extravasación en el músculo intestinal. En este ejemplo, la inhalación de CO no alteró el aumento temprano quirúrgicamente inducido en la expresión génica de IL-6 medida 3 y 6 h posoperatoriamente, un hallazgo de acuerdo con su falta de efecto sobre la magnitud del infiltrado de células inflamatorias. Sin embargo, la liberación de proteína IL-6 de músculo intestinal aislado determinado 24 h posoperatoriamente se redujo el 60 % de 5000 pg/ml a 2000 pg/ml en ratones tratados con CO, sugiriendo que el CO tiene un efecto postranscripcional sobre la expresión de IL-6. Este nivel de liberación sostenida de proteína fue todavía notablemente elevado con respecto a controles sin tratamiento previo (150 pg/ml), dificultando estimar qué efecto puede tener esto sobre la señalización proinflamatoria de IL-6. Sin embargo, estudios recientes, han mostrado que la IL-6 puede tener también importantes propiedades antiinflamatorias, sugiriendo que la expresión continuada de IL-6 es necesaria para la inducción de ciertas vías protectoras. Éstas incluyen posiblemente la capacidad de inhibir la producción de TNF- α , IL-1 β y proteína-2 inflamatoria de macrófagos, y de aumentar niveles de antagonista de receptor de IL-1 y receptor TNF-soluble *in vitro*. Así, la disminución de las vías proinflamatorias mediadas por IL-6, además del inicio de las vías antiinflamatorias mediadas por IL-6 en etapas posteriores en la cascada inflamatoria, puede contribuir a la contractilidad intestinal mejorada observada 24 h posoperatoriamente.

35

La función desempeñada por la IL-1 β en íleo posoperatorio ha sido menos bien caracterizada; sin embargo, se ha mostrado que la IL-1 β endógena inhibe las respuestas contráctiles de músculo liso intestinal de rata a agonistas colinérgicos y a estimulación eléctrica, sugiriendo que ejerce sus efectos inhibidores alterando vías neuronales. Además, la inmuno-neutralización de la actividad de IL-1 disminuyó enormemente la gravedad de la enfermedad en un modelo murino de colitis, que indica que esta citocina también desempeña una función importante de iniciación en la inflamación intestinal. En ratones manipulados tratados con CO, la expresión génica de IL-1 β se redujo notablemente, con una reducción del 75 % en la expresión génica quirúrgicamente inducida 6 h después de la cirugía, y una reducción correspondiente en la expresión de proteína medida a 24 h. Así, cabría esperar que las actividades pro-inflamatorias de IL-1 β , además de sus posibles efectos inhibidores sobre el aparato neuromuscular, se atenuaran notablemente. Tomados conjuntamente, estos hallazgos sugieren que los efectos protectores de la inhalación de CO se producen, al menos en parte, por un mecanismo que se dirige a elementos selectivos dentro de la cascada pro-inflamatoria mediada por IL-6 y IL-1 β que son independientes del reclutamiento de leucocitos o que se producen después de que se haya iniciado completamente el reclutamiento de leucocitos.

Aunque el número de leucocitos infiltrantes no se alteró en ratones tratados con CO, los datos de citocinas indicaron que hubo una inhibición funcional dependiente de CO de citocinas que se generan clásicamente por leucocitos. Por tanto, se investigó la modulación de los mediadores de músculo liso cinéticamente activos derivados de leucocitos NO y PGE₂ como dianas adicionales para la inhibición por CO. Se ha mostrado que los prostanoideos producidos por COX-2 y óxido nítrico producido por iNOS tienen potentes efectos inhibidores sobre la contractilidad del músculo liso intestinal, y que la inhibición de la enzima COX-2 o la inactivación selectiva del gen iNOS derivado de leucocitos aumenta notablemente la resistencia al desarrollo de íleo posoperatorio. En el presente ejemplo, el examen de la expresión génica de iNOS y COX-2 reveló que ambos fueron significativamente elevados tras la manipulación intestinal. Los aumentos quirúrgicamente inducidos en tanto la expresión génica de iNOS como la producción de NO se redujeron aproximadamente el 75 % en animales tratados con CO, sugiriendo que el CO actuaría al nivel de la transcripción génica para modular la expresión de iNOS. También se ha mostrado *in vitro* que la actividad de iNOS, además de las isoformas endoteliales y neuronales de NOS, pueden inhibirse directamente por CO, posiblemente mediante la unión de CO a restos hemo presentes sobre las proteínas NOS. Tomados conjuntamente, cabría esperar que una reducción en la liberación de NO como resultado de la disminución de la expresión génica y/o actividad enzimática contribuyera significativamente a la función intestinal mejorada inducida por la inhalación de CO. A diferencia de iNOS, la inhalación de CO no tuvo efecto sobre la expresión de ARNm de COX-2

65

quirúrgicamente inducida o la liberación de PGE₂, como se mide en medios de cultivo de músculo incubado recogido 24 h después de la cirugía. De forma interesante, la inhalación de CO por ratones sin tratamiento previo produjo un aumento de 2,5 veces en la expresión de ARNm de COX-2 3 h después de la cirugía con un aumento correspondiente en la liberación de PGE₂ después de 24 h. La inducción de COX-2 por CO no se ha informado previamente, y la consecuencia funcional de esta elevada actividad es desconocida. Los ratones de control tratados con CO no presentaron alteración funcional o elevación de mediadores pro-inflamatorios sugiriendo que, en este caso, la inducción de COX-2 no actúa en una capacidad pro-inflamatoria.

Uno de los espectaculares efectos de la inhalación de CO fue sobre la expresión de genes asociados a vías antiinflamatorias: IL-10 y HO-1. Aunque ambos genes se indujeron después de la manipulación intestinal, la expresión aumentó el 300 % en animales manipulados tratados con CO. Este aumento se observó en el momento de tiempo posoperatorio de 3 h, pero no el momento de tiempo de 6 h, sugiriendo que la exposición a CO produjo la inducción temprana de estos genes, un concepto soportado por resultados que muestran que la inhalación de CO solo por animales sin tratamiento previo produjo inducción significativa de IL-10 y HO-1. La función desempeñada por estos mediadores en íleo posoperatorio no se había caracterizado previamente. Sin embargo, IL-10 es una citocina pleiotrópica con un amplio espectro de efectos biológicos sobre células linfoides y mieloides. Una de sus funciones conocidas es su capacidad para inhibir la producción de mediadores pro-inflamatorios; que incluye la producción de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) IL-6, IL-1, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos y la generación de óxido nítrico por monocitos/macrófagos activados. Recientemente, se encontró que la IL-10 inhibía la producción de NO por macrófagos murinos estimulados por LPS, tanto antagonizando la captación celular de L-arginina, además de la actividad catalítica de la propia iNOS, contribuyendo así posiblemente a la atenuación de los efectos inhibidores de NO sobre el músculo liso intestinal. Además, cada vez ha sido más evidente que la inducción de la vía mediada por HO-1 tiene importantes efectos antiinflamatorios y citoprotectores bajo una variedad de afecciones inflamatorias agudas y crónicas. No hay evidencia que sugiera que la expresión de estos dos mediadores está interrelacionada. Los hallazgos publicados han mostrado que la exposición a CO aumenta la expresión génica de IL-10 y la liberación de proteína de macrófagos estimulados por LPS. Más recientemente, se encontró que IL-10 endógena inducía HO-1 en macrófagos murinos, y la inducción de HO-1 se requirió para los efectos inhibidores de IL-10 sobre la producción de TNF- α inducida por lipopolisacárido. La inducción temprana de HO-1 podría producir elevada salida de CO endógena que cabría esperar que contribuyera a los efectos del gas exógenamente aplicado. Además, la actividad de HO-1 tiene propiedades citoprotectoras y antioxidantes que se han atribuido al secuestro de radicales libres mediante el ciclo redox de biliverdina y bilirrubina. Por tanto, la elevada producción de IL-10 y la potenciada actividad de HO-1 actuarían sincronizadamente para disminuir la cascada inflamatoria temprana en su desarrollo regulando por disminución la expresión de mediadores pro-inflamatorios, potenciando la disponibilidad para el tejido de CO y proporcionando protección del estrés por radicales libres.

En resumen, los datos presentados aquí sugieren que los efectos protectores de la inhalación de CO se producen dirigiendo elementos selectivos dentro de vías pro- y antiinflamatorias. Parece que el CO actúa al nivel de tanto la expresión génica como de proteínas, conduciendo a la inducción de IL-10 y HO-1, regulación por disminución de IL-1 β e inhibición de iNOS. Juntos estos efectos producen la modulación de las respuestas inflamatorias quirúrgicamente inducidas dentro del músculo intestinal, conduciendo a mejorar la función posoperatoria.

Ejemplo 3. El CO suprime el desarrollo de íleo asociado a la manipulación quirúrgica del intestino delgado en el ratón y el cerdo

Se indujo íleo en ratones por la suave manipulación del intestino delgado. Se hizo una incisión para exponer la cavidad abdominal del ratón, y la manipulación del intestino se realizó golpeando y punzando suavemente el intestino delgado (véase, por ejemplo, Schwarz et al., Gastroenterology 121(6):1354-1357 (2001)). La incisión se cerró posteriormente, y se realizaron análisis 24 horas después. Los ratones se expusieron a CO por inhalación (250 y 500 ppm) durante 1 hora inmediatamente antes de la manipulación intestinal y durante el periodo de recuperación de 24 horas entero. La contractilidad intestinal se evaluó *in vitro* midiendo las contracciones de la tira de músculo circular en respuesta a betanecol (0,3-300 μ M) e *in vivo* determinando el tránsito intestinal de la distribución de dextrano marcado con fluoresceína alimentado por vía oral, y calculando el centro geométrico como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente. La expresión de ARNm de HO-1 y IL-10 se determinó por RT-PCR en tiempo real con SYBR Green de extractos de músculos externos, como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente. La liberación de óxido nítrico (NO), un potente inhibidor de la contractilidad de músculo liso, se estimó midiendo nitrito total en suero, también descrito en el Ejemplo 1 anteriormente.

La fuerza contráctil pico generada en respuesta a betanecol (100 μ M) se redujo significativamente por MI ($1,1 \pm 0,2$ g/s/mm²) en comparación con controles ($2,2 \pm 0,5$ g/s/mm²). La supresión inducida por MI de la contractilidad se previno en ratones MI + CO ($1,9 \pm 0,5$ g/s/mm²). El tránsito intestinal también mejoró en ratones tratados con CO (centro geométrico: control = $11,0 \pm 0,5$, MI = $2,7 \pm 0,2$, MI + CO = $6,3 \pm 0,8$). Los datos de RT-PCR mostraron que la MI indujo aumentos significativos en la expresión de HO-1 pico (45 veces) a las 6 h, y la expresión de IL-6 (300 veces) e IL-10 (13 veces) a las 3 h, después de MI frente a controles. En ratones MI-CO, la expresión de HO-1 alcanzó el pico antes, 3 h después de la MI, a un nivel de expresión mayor (150 veces) frente a controles. La

expresión de IL-10 a las 3 h también fue mayor en ratones MI-CO (35 veces). El nitrito en suero aumentó después de MI ($18,3 \pm 3,6 \mu\text{M}$) frente al control ($2,4 \pm 1,0 \mu\text{M}$), y se redujo después de MI-CO ($6,0 \pm 1,6 \mu\text{M}$).

Por tanto, el CO atenúa quirúrgicamente la dismotilidad intestinal inducida, *in vitro* e *in vivo*, mediante mecanismos que pueden implicar la inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 y la disminución de la producción de NO. La inducción temprana de HO-1 (300 % de aumento en la expresión con respecto a MI sola) aumentaría la disponibilidad de CO, potenciando sus efectos antiinflamatorios.

Se realizaron experimentos similares en un modelo de cerdo. Se indujo íleo por manipulación suave del intestino delgado (MI). Los cerdos se expusieron a CO (250 ppm) o a aire (controles) durante un periodo de 3 h antes de la MI. La función gastrointestinal se evaluó *in vivo* observando el tránsito intestinal de rodamientos metálicos colocados dentro del intestino delgado. Se encontró que el CO mejoró el tránsito intestinal tras la manipulación intestinal.

Ejemplo 4. El pre-tratamiento con bajas concentraciones de CO (250 a 75 ppm) durante tres horas antes de una laparotomía protege del desarrollo de íleo posoperatorio

Este ejemplo demuestra que bajas concentraciones de CO administrado durante cortos periodos de tiempo son protectoras del desarrollo de íleo posoperatorio.

Se indujo íleo por la manipulación suave del intestino delgado (MI). Se expusieron ratas a concentraciones decrecientes de CO (250, 125, 75, 30 ppm) en aire durante un periodo de tanto 1 h como 3 h antes de laparotomía (n=6). Los resultados se compararon con aquellos obtenidos usando protocolos previamente establecidos de exposición a CO a 250 ppm 1 h antes y durante 24 h después de laparotomía.

La función gastrointestinal se evaluó *in vivo* determinando el tránsito intestinal de la distribución en todo el tubo GI de dextrano marcado con fluoresceína alimentado por vía oral. La mediana de la distribución del dextrano marcado se determinó para la comparación estadística calculando el centro geométrico (CG).

El centro geométrico disminuyó significativamente en ratas que se sometieron a manipulación quirúrgica en comparación con controles sin operar (CG: control = $9,8 \pm 0,2$, MI = $5,8 \pm 0,4$), que indica un ralentizamiento significativo del tránsito intestinal. Aunque la exposición de ratas sin operar a 250 ppm durante 24 h produjo un ligero retraso en el tránsito intestinal (CG: $8,8 \pm 0,4$), un pretratamiento de 1 h seguido de 24 h después del tratamiento con 250 ppm de CO produjo una mejora significativa en el tránsito intestinal en ratas que se sometieron a manipulación quirúrgica (CG: $8,2 \pm 0,4$). El pretratamiento de ratas manipuladas con 250 ppm durante 1 h solo antes de la cirugía fue menos eficaz en prevenir la inhibición quirúrgicamente inducida del tránsito (CG: $7,2 \pm 0,3$), mientras que el pretratamiento durante 3 h produjo un efecto equivalente al alcanzado con el tratamiento de 24 h (CG: $8,6 \pm 0,3$). Se obtuvo una mejora similar por el pretratamiento con concentraciones de tan solo 125 y 75 ppm (CG: $8,6 \pm 0,4$ y $8,8 \pm 0,1$, respectivamente). Este efecto protector disminuyó cuando la concentración de CO se redujo adicionalmente a 30 ppm (CG: $7,0 \pm 0,2$).

Este ejemplo demuestra que no se requiere la exposición prolongada a CO para obtener el beneficio completo de la protección del desarrollo de íleo posoperatorio. La incorporación de bajas concentraciones de CO en gases de anestesia durante el periodo preoperatorio puede proporcionar una técnica mínimamente invasiva que ayudaría en la reducción de íleo en pacientes susceptibles, acelerando así la recuperación posoperatoria y reduciendo la estancia en el hospital.

Ejemplo 5. Protocolos para el tratamiento de íleo

El siguiente ejemplo ilustra protocolos para su uso en el tratamiento de pacientes antes, durante y/o después de procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, un trasplante (por ejemplo, SITx) o procedimientos no de trasplante (por ejemplo, un procedimiento del que puede resultar íleo). El ejemplo incluye protocolos para tratar íleo, por ejemplo, íleo resultante de procedimientos de trasplante y no de trasplante, y protocolos adicionales para tratar donantes, el tubo gastrointestinal o una porción del mismo, por ejemplo, un intestino delgado, y receptores con CO en un procedimiento de trasplante. Puede usarse uno cualquiera o más de los siguientes procedimientos en un procedimiento quirúrgico dado.

Tratamiento de pacientes

Puede administrarse CO sistémicamente o localmente a un paciente antes de, durante y/o después de realizar un procedimiento quirúrgico en el paciente o después de que un paciente sea diagnosticado con íleo (por ejemplo, íleo resultante de cirugía o resultante de condiciones que no implican cirugía). Los pacientes pueden inhalar CO a concentraciones que oscilan de 10 ppm a 1000 ppm, por ejemplo, aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 600 ppm, o aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 500 ppm. Concentraciones preferidas incluyen, por ejemplo, aproximadamente 30 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm o aproximadamente 1000 ppm. El CO puede

administrarse al paciente intermitentemente o continuamente, empezando 0 a 20 días antes de realizar el procedimiento, por ejemplo, empezando al menos aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 5, 7 o 10 horas, o aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 o 20 días, o superior a 20 días, antes del procedimiento. Alternativamente o además, el CO puede administrarse al paciente durante el procedimiento, por ejemplo, por inhalación y/o administración tópica. Alternativamente o además, el CO puede administrarse al paciente después del procedimiento, por ejemplo, empezando inmediatamente después de completarse el procedimiento, y continuando durante aproximadamente 1, 2, 3, 5, 7 o 10 horas, o aproximadamente 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 o 60 días, indefinidamente, o hasta que se restaure la motilidad intestinal normal, después de completarse el procedimiento.

10

Procedimientos de trasplante

Tratamiento de un donante

15 Antes de recoger un órgano o porción del mismo, el donante puede tratarse con monóxido de carbono inhalado (250 ppm) durante una hora. El tratamiento puede administrarse a dosis que varían de 10 ppm a 1000 ppm para tiempos que varían de una hora a seis horas, o durante todo el periodo desde el momento en el que es posible tratar un donante en muerte cerebral (cadáver) hasta el momento en el que se extrae el órgano. Para un donante humano, el tratamiento debe empezar tan pronto como sea posible tras la declaración de que la muerte del cerebro está presente. En algunas aplicaciones, puede desearse empezar el tratamiento antes de la muerte del cerebro.

Para animales no humanos (por ejemplo, cerdos) que van a usarse como donantes de xenotrasplante, el animal donante puede tratarse con niveles relativamente altos de monóxido de carbono inhalado, según se desee, mientras que la carboxihemoglobina así producida no comprometa la viabilidad y función del órgano que va a trasplantarse.

25 Por ejemplo, podrían usarse niveles superiores a 500 ppm (por ejemplo, 1000 ppm o superiores, y hasta 10.000 ppm, particularmente para tiempos cortos).

Tratamiento del órgano in situ

30 Antes de recoger un órgano de un donante, puede lavarse o perfundirse con una disolución, por ejemplo, un tampón o medio, mientras que todavía está en el donante. El propósito es lavar el órgano con una disolución saturada con monóxido de carbono y mantenerlo en una atmósfera de monóxido de carbono de manera que el contenido de monóxido de carbono permanezca en saturación. El lavado puede tener lugar durante un periodo de tiempo de al menos 10 minutos, por ejemplo, 1 hora, varias horas, o más. La disolución debe administrar idealmente la mayor

35 concentración de monóxido de carbono posible a las células del órgano.

Tratamiento del órgano ex vivo

Un órgano, tal como un intestino delgado, puede preservarse en un medio que incluye monóxido de carbono desde el momento en el que se extrae del donante hasta el momento en el que se trasplanta al receptor. Esto puede realizarse manteniendo el órgano en el medio que comprende CO, o perfundiéndolo con un medio tal. Como esto se produce *ex vivo* en vez de en un animal, pueden usarse concentraciones muy altas de gas CO (por ejemplo, 10.000 ppm) para mantener el medio saturado con CO.

45 *Tratamiento de un receptor*

El tratamiento del receptor con CO puede empezar el día del trasplante al menos 30 minutos antes de que empiece la cirugía. Alternativamente, podría empezar al menos 30 minutos antes de la re-perfusión del órgano en el receptor. Puede continuar durante al menos 30 minutos, por ejemplo, 1 hora. Pueden administrarse dosis de monóxido de carbono entre 10 ppm y 3000 ppm durante tiempos variables, por ejemplo, minutos u horas, y pueden administrarse el día de y en los días siguientes al trasplante. Por ejemplo, el paciente puede inhalar una concentración de monóxido de carbono, por ejemplo, 3000 ppm, durante tres contenciones de la respiración de 10 segundos consecutivas. Alternativamente, una menor concentración del gas puede administrarse intermitentemente o constantemente, durante un periodo de tiempo más largo, con respiración regular en vez de contener la respiración.

50 Pueden utilizarse las concentraciones de carboxihemoglobina como guía para la apropiada administración de monóxido de carbono a un paciente. Normalmente, los tratamientos para receptores no deben aumentar los niveles de carboxihemoglobina por encima de aquellos que se considera que generan un riesgo aceptable de un paciente en necesidad de un trasplante.

60

REIVINDICACIONES

1. Monóxido de carbono para su uso en un método de tratamiento o la prevención de íleo en un paciente.
- 5 2. Uso de monóxido de carbono para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de íleo en un paciente.
3. El monóxido de carbono para su uso o el uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el íleo es íleo posquirúrgico.
- 10 4. El monóxido de carbono para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el íleo es íleo del tubo gastrointestinal.
5. El monóxido de carbono para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el íleo se produce por una cirugía abdominal.
- 15 6. El monóxido de carbono para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el íleo es íleo del intestino delgado o íleo del colon.
7. El monóxido de carbono para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición farmacéutica
20 (a) se administra al paciente mediante inhalación;
(b) está en forma líquida y se administra al paciente por vía oral;
(c) se administra directamente a la cavidad abdominal del paciente.
- 25 8. El monóxido de carbono para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 o 7 en el que el íleo es íleo no producido por cirugía.
9. El monóxido de carbono para su uso o el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición farmacéutica se administra mediante un método que comprende:
30 (a) liberar gas presurizado de un recipiente que contiene un gas presurizado que comprende gas monóxido de carbono, para formar una atmósfera que comprende gas monóxido de carbono; y
(b) exponer el paciente a la atmósfera.
10. El monóxido de carbono para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el
35 paciente es un ser humano.
11. El monóxido de carbono para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la composición farmacéutica está en forma gaseosa.
- 40 12. El monóxido de carbono para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la composición farmacéutica está en forma líquida.

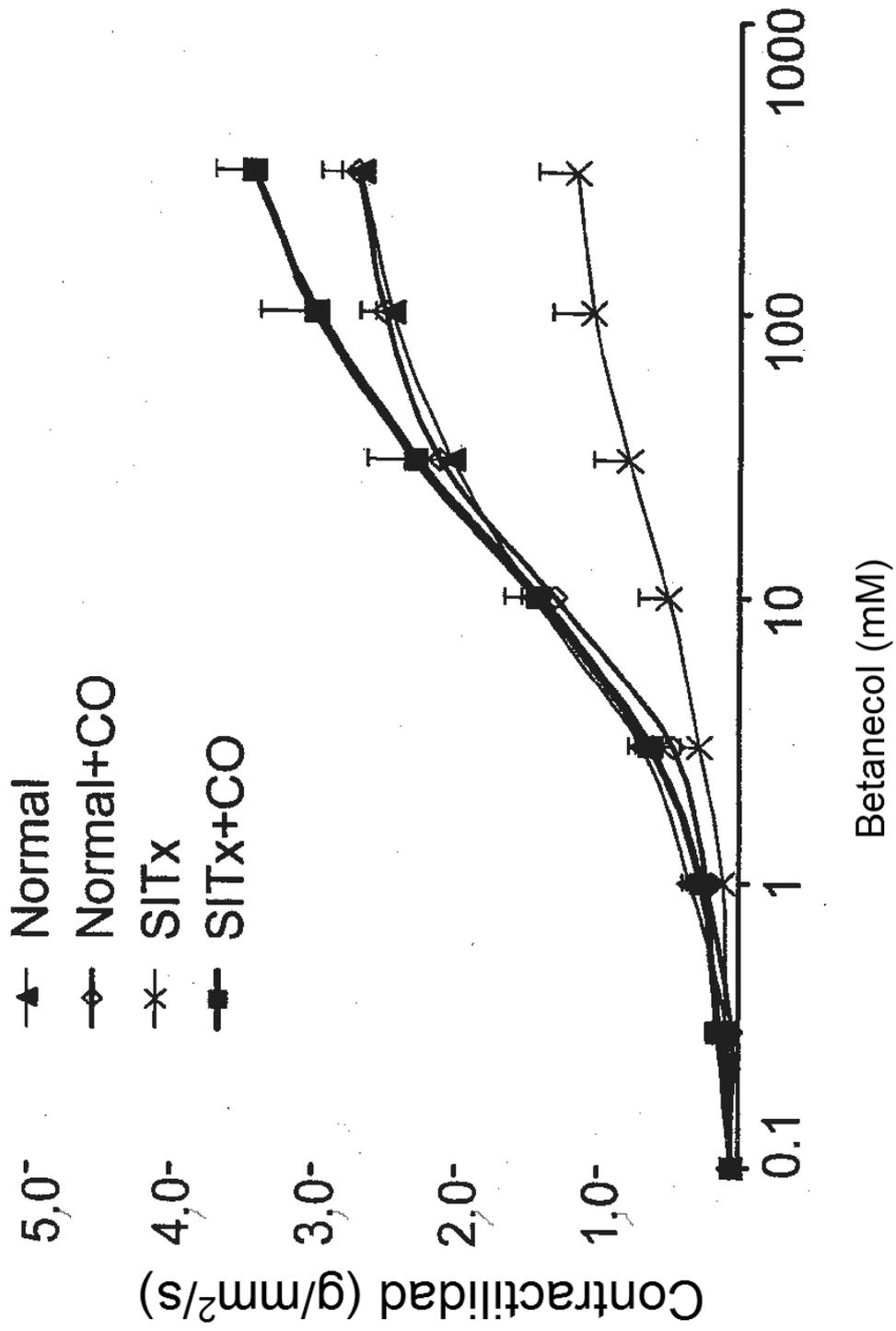


FIG. 1

FIG. 2A

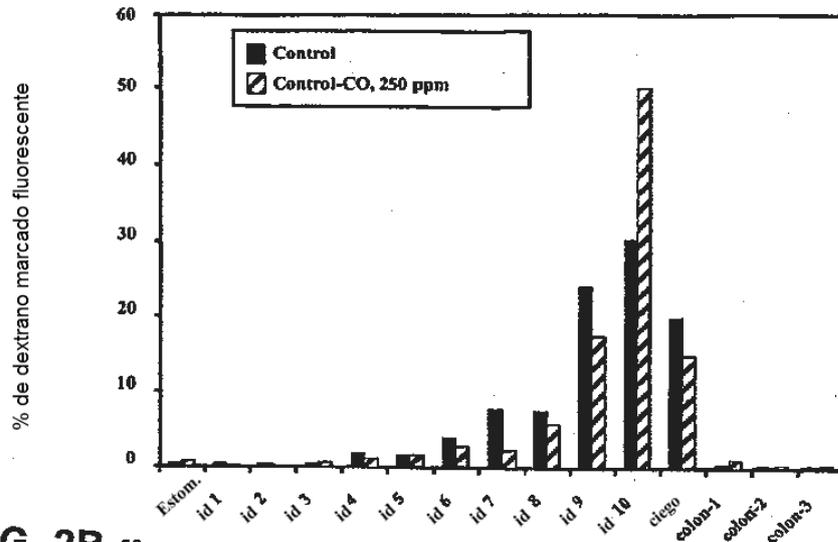


FIG. 2B

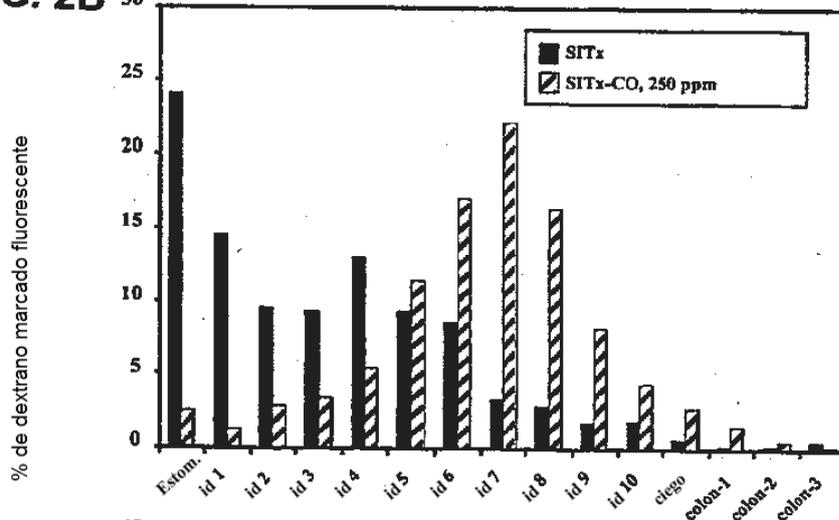
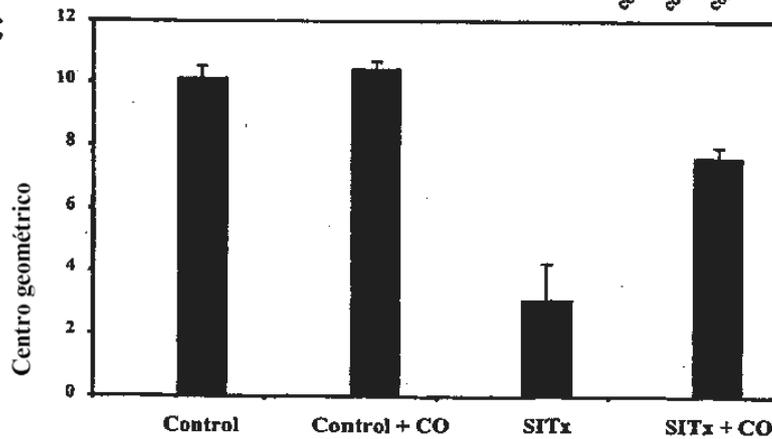


FIG. 2C



FIGS. 2A-2C

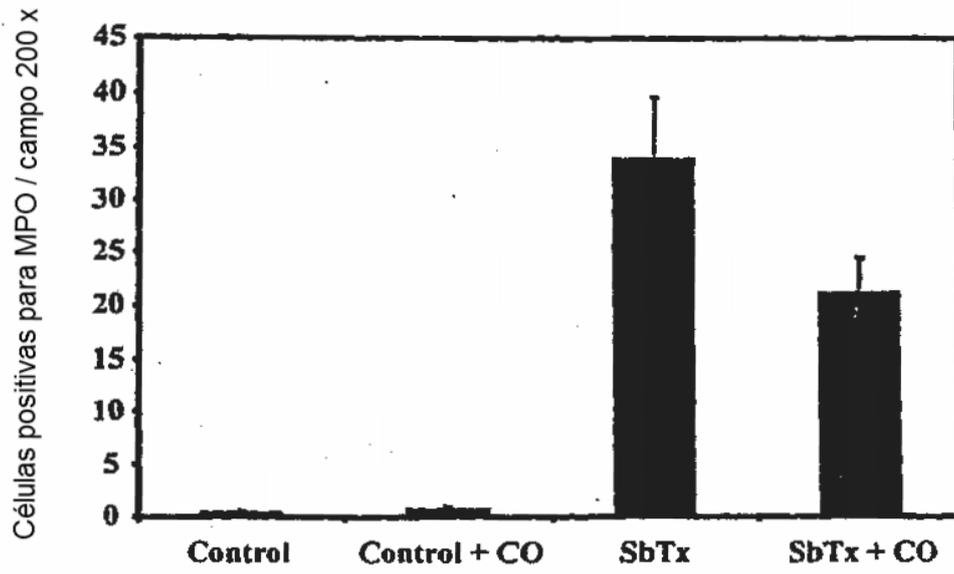


FIG. 3

FIG. 4B IL-1 β

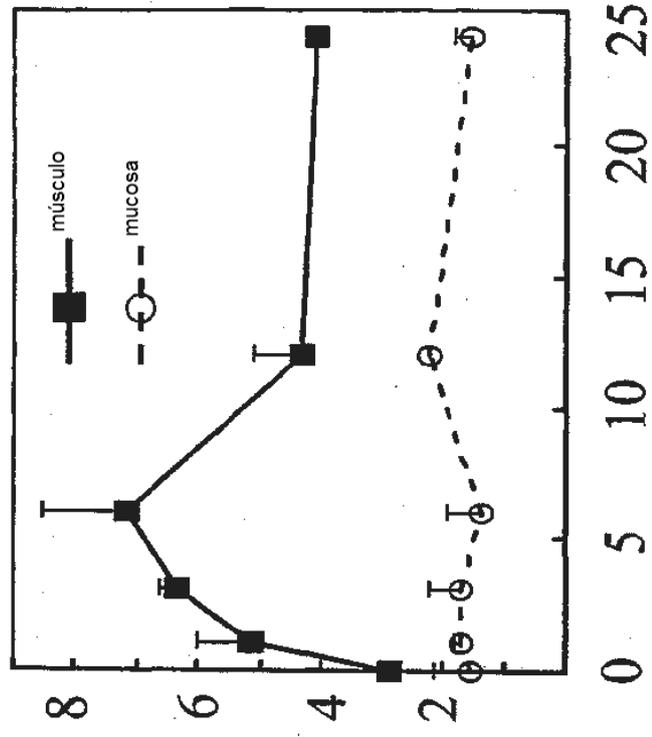
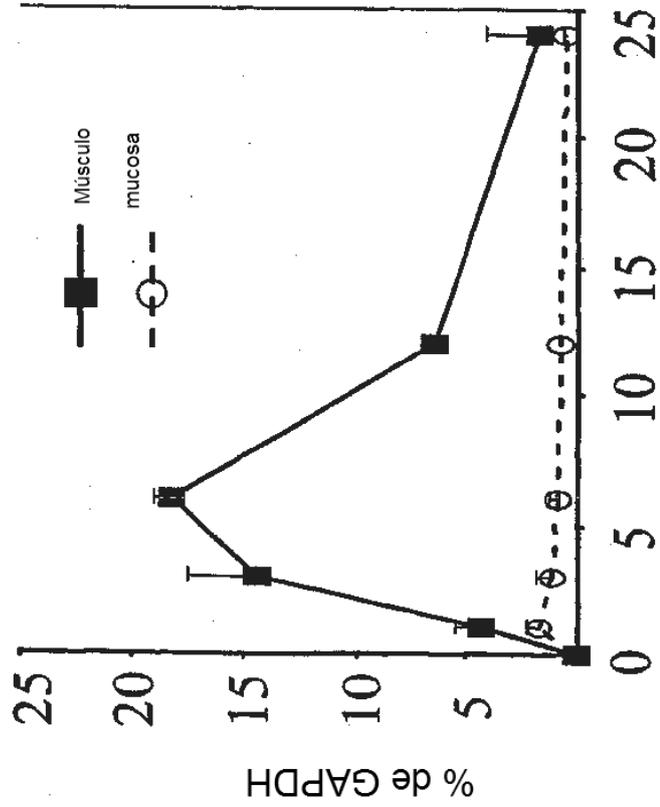


FIG. 4A IL-6



Tiempo después de la reperusión (horas)

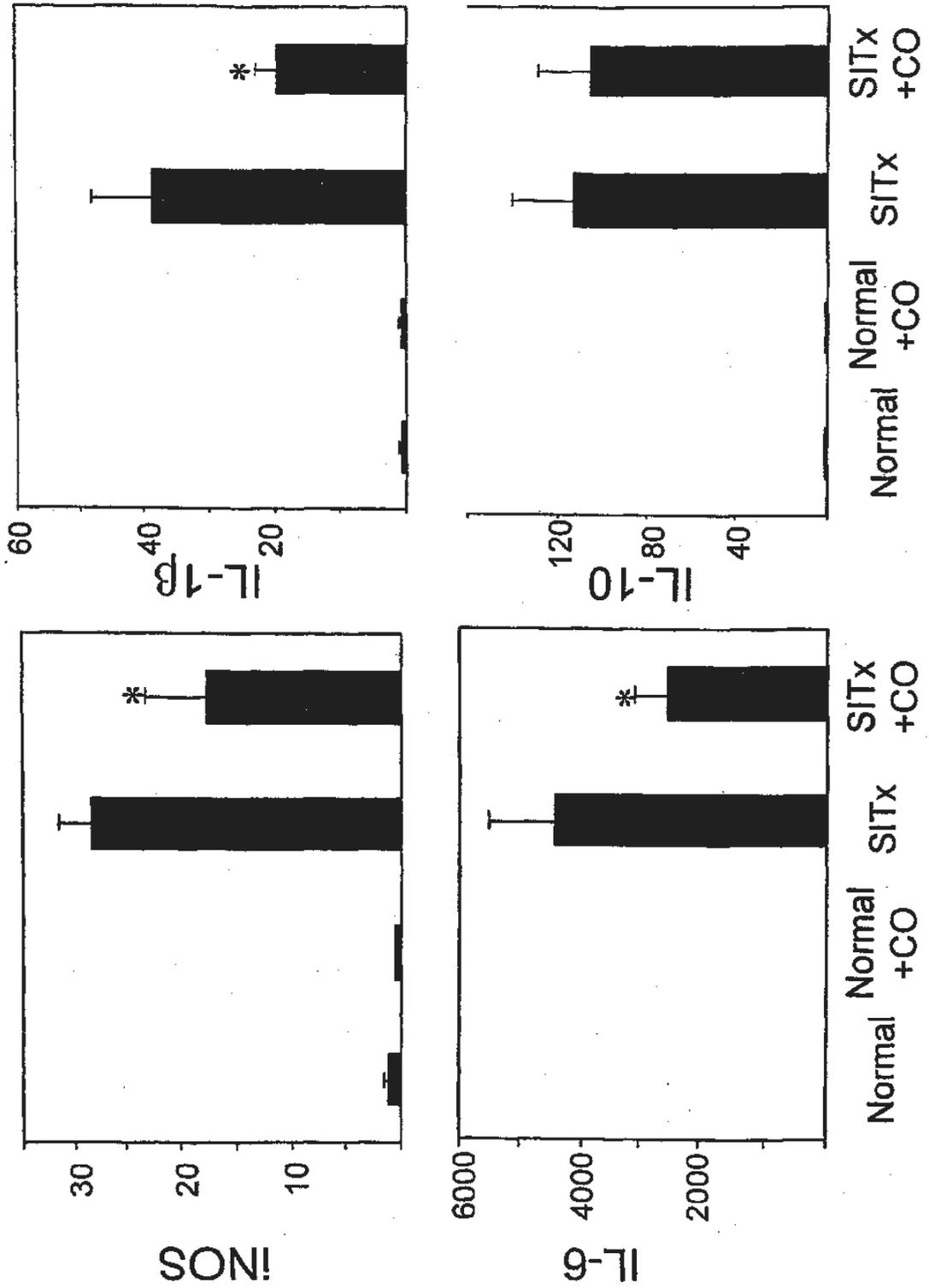


FIG. 5

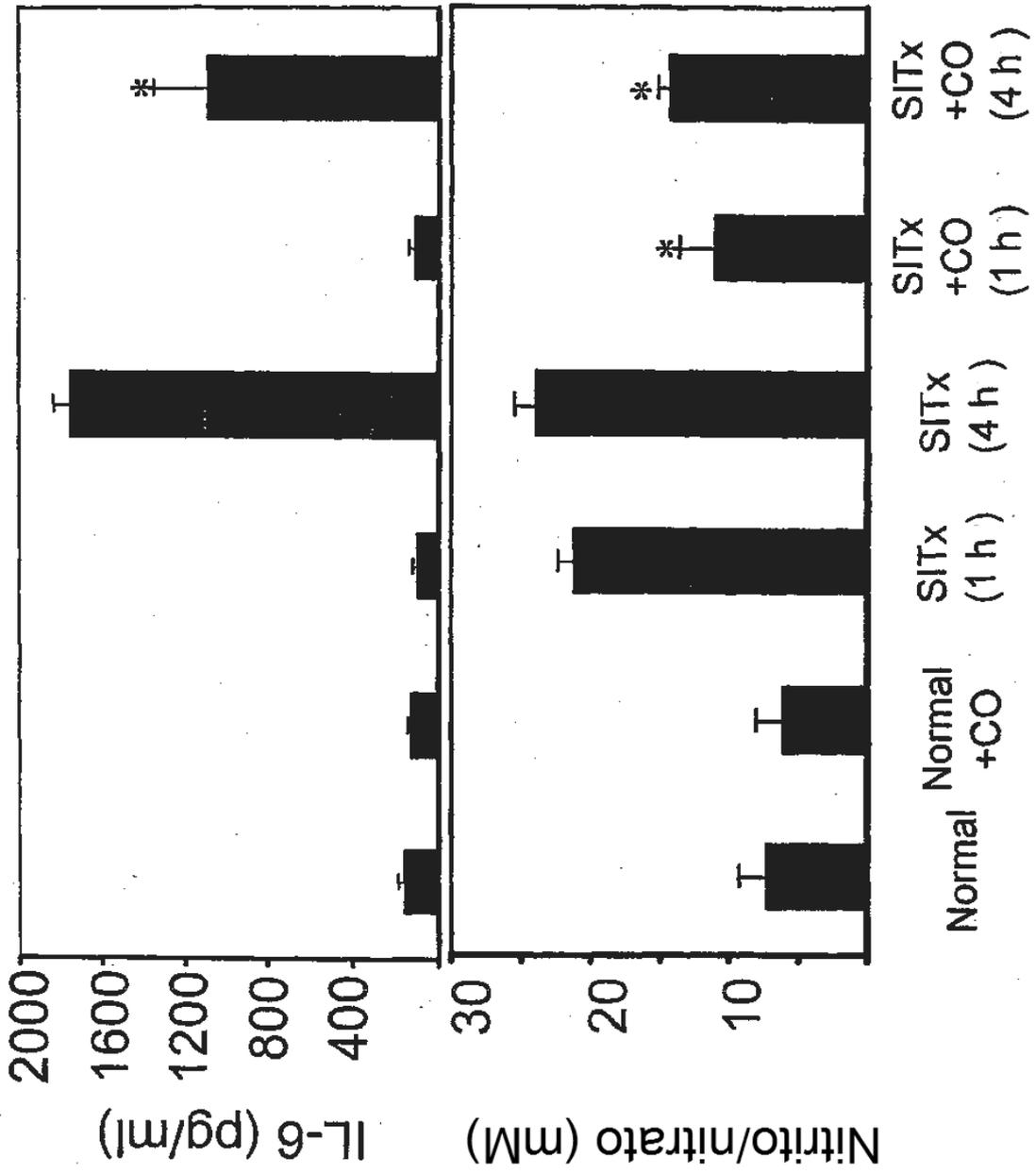
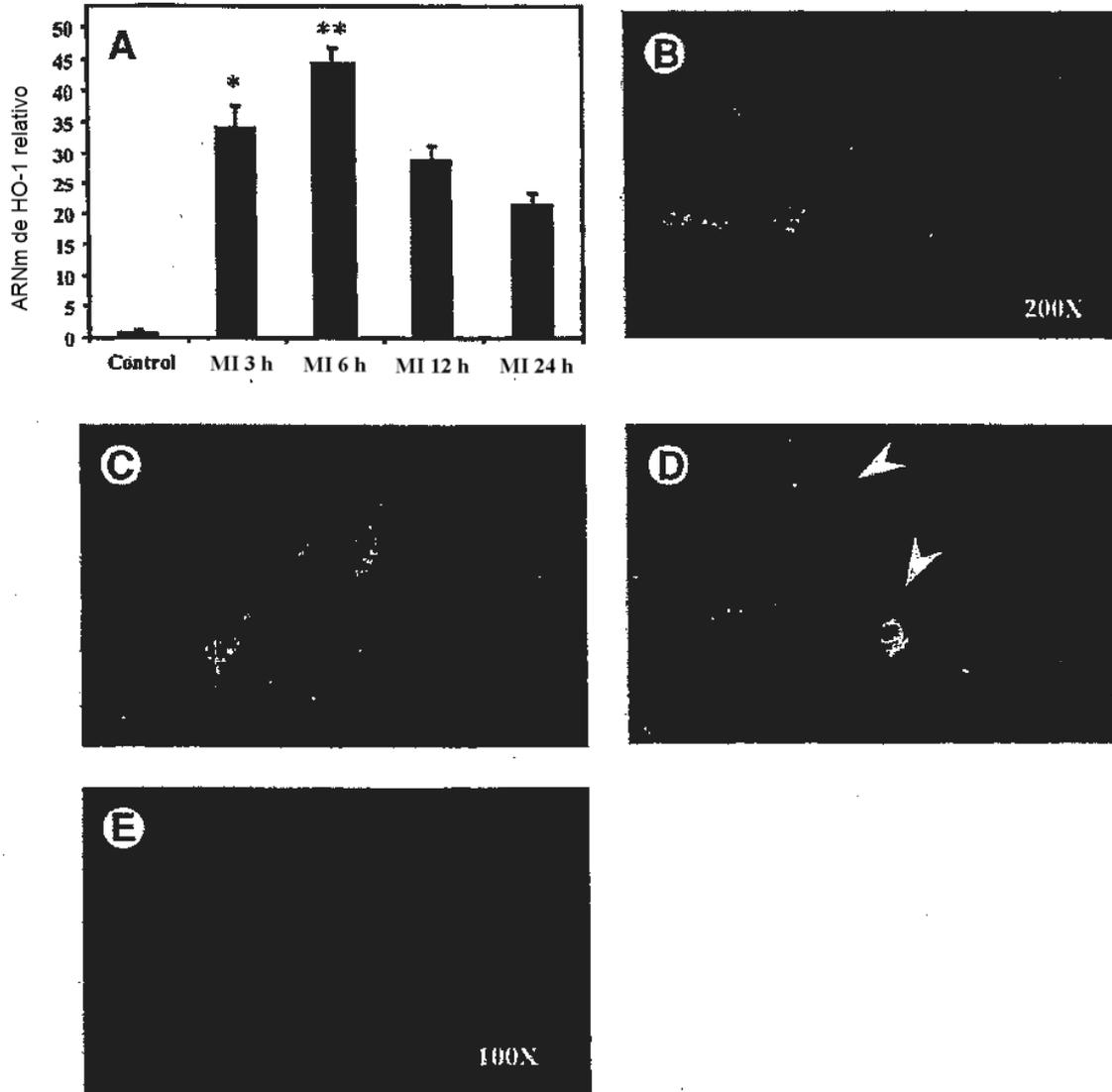
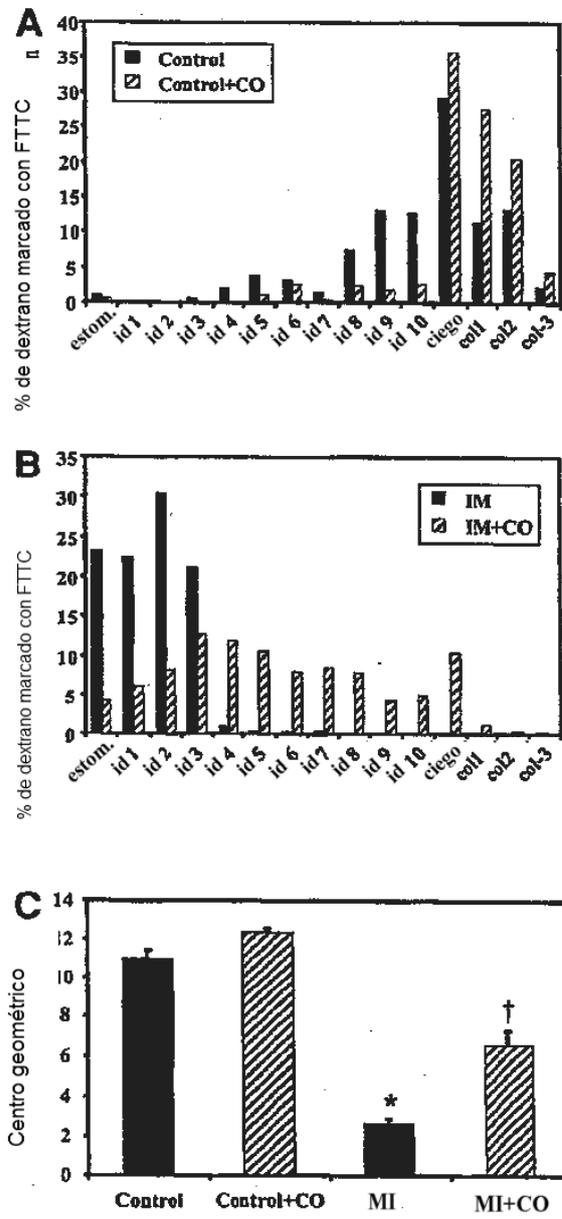


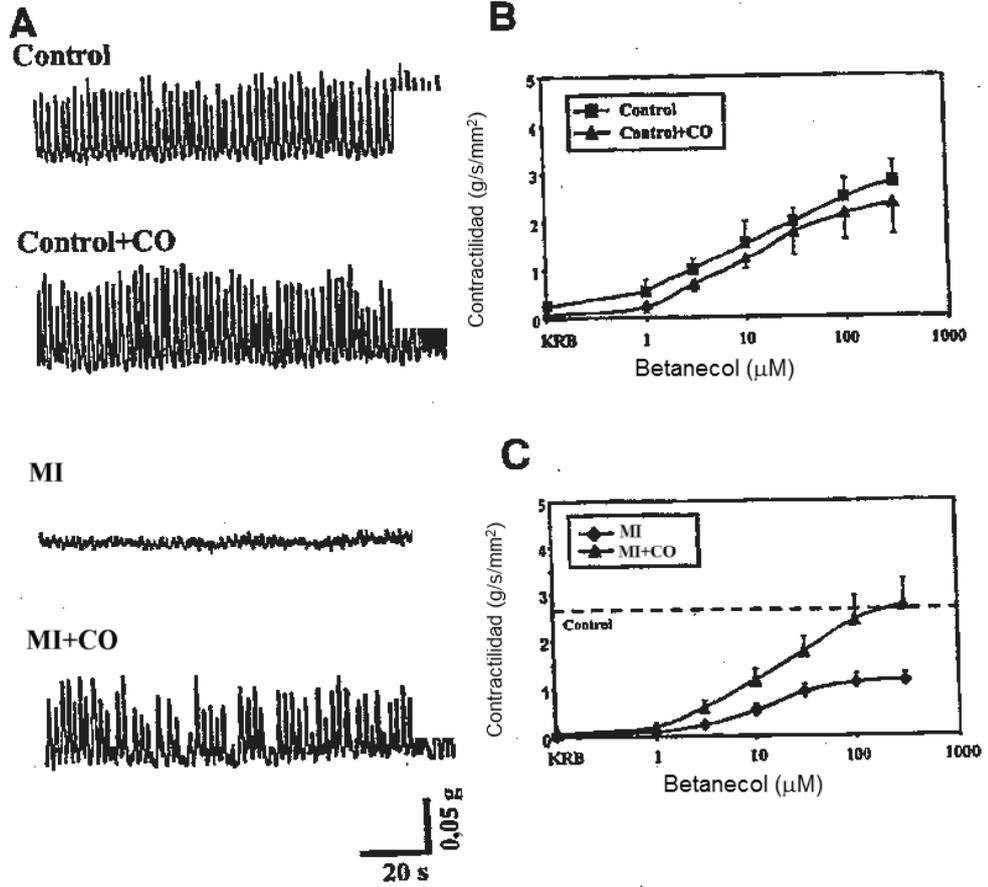
FIG. 6



FIGS. 7A-7E



FIGS. 8A-8C



FIGS. 9A-9C

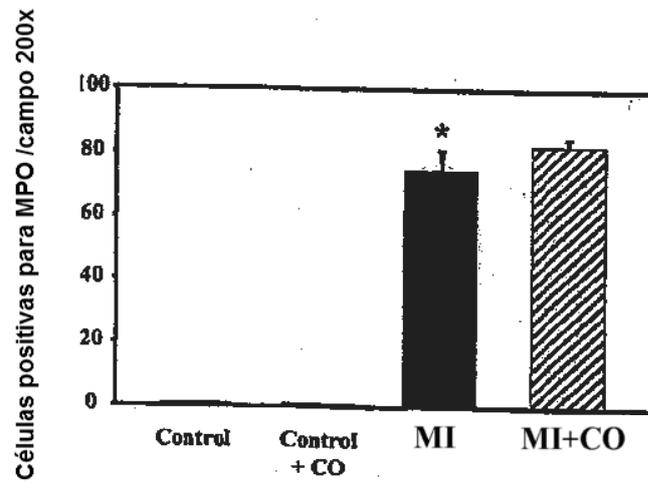
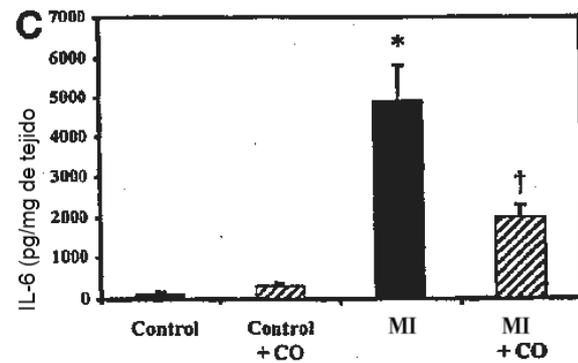
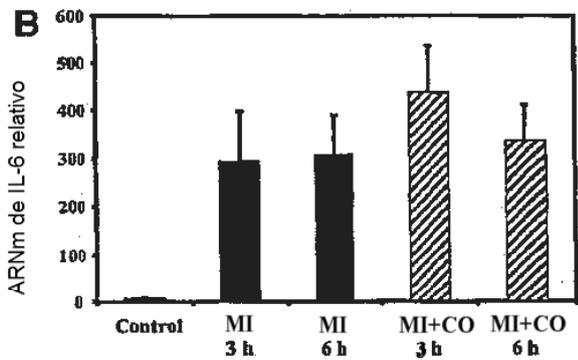
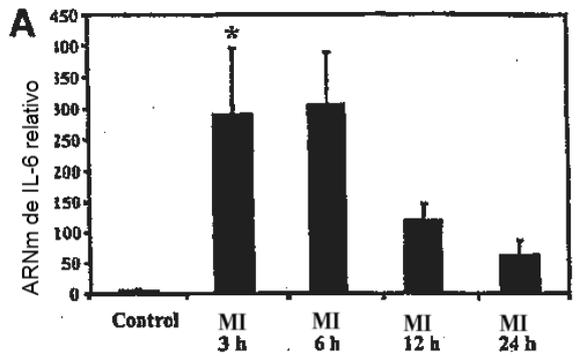
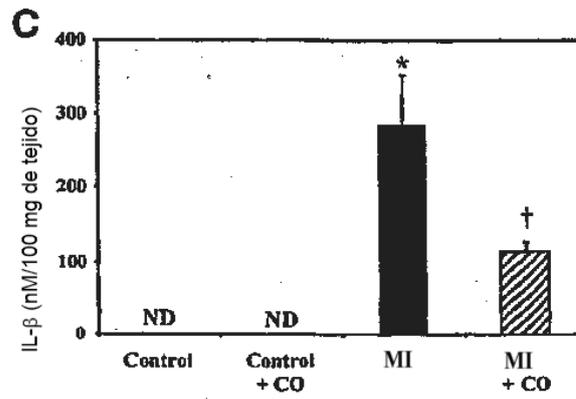
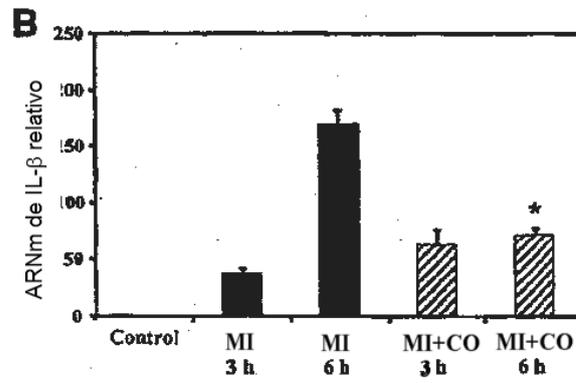
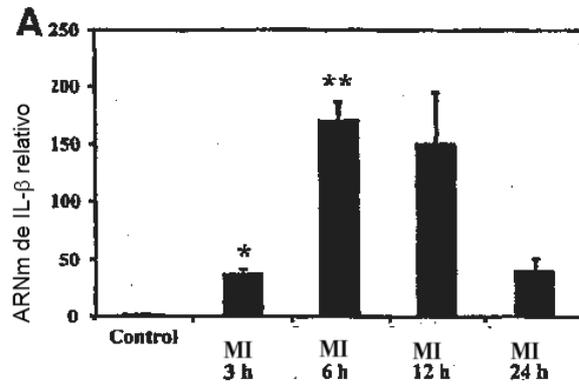


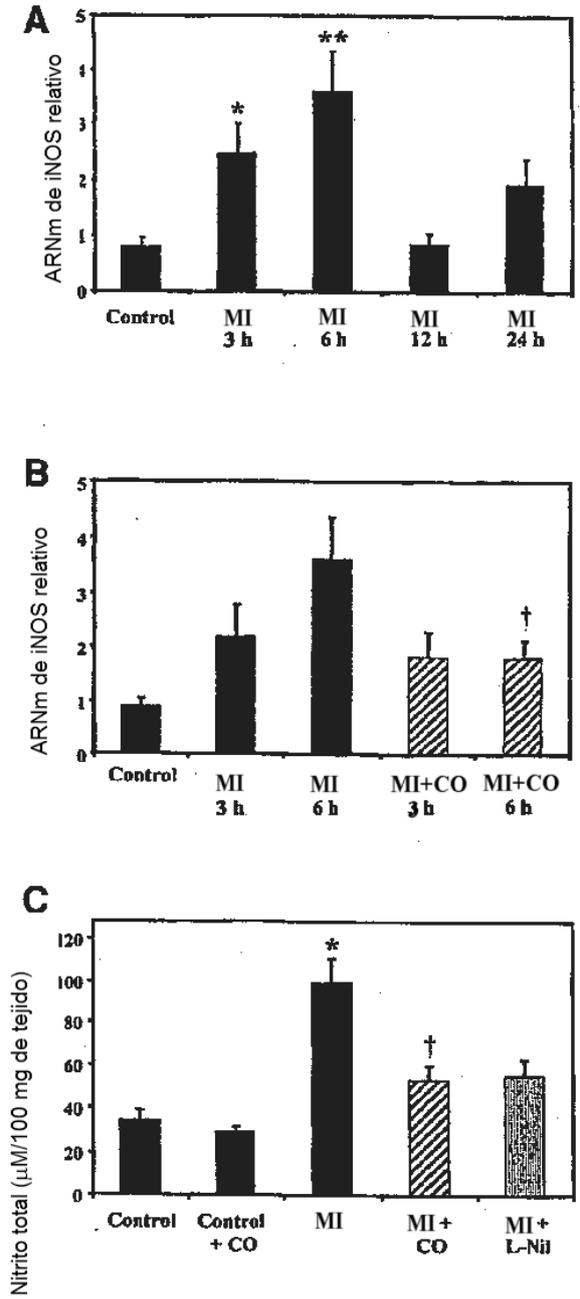
FIG. 10



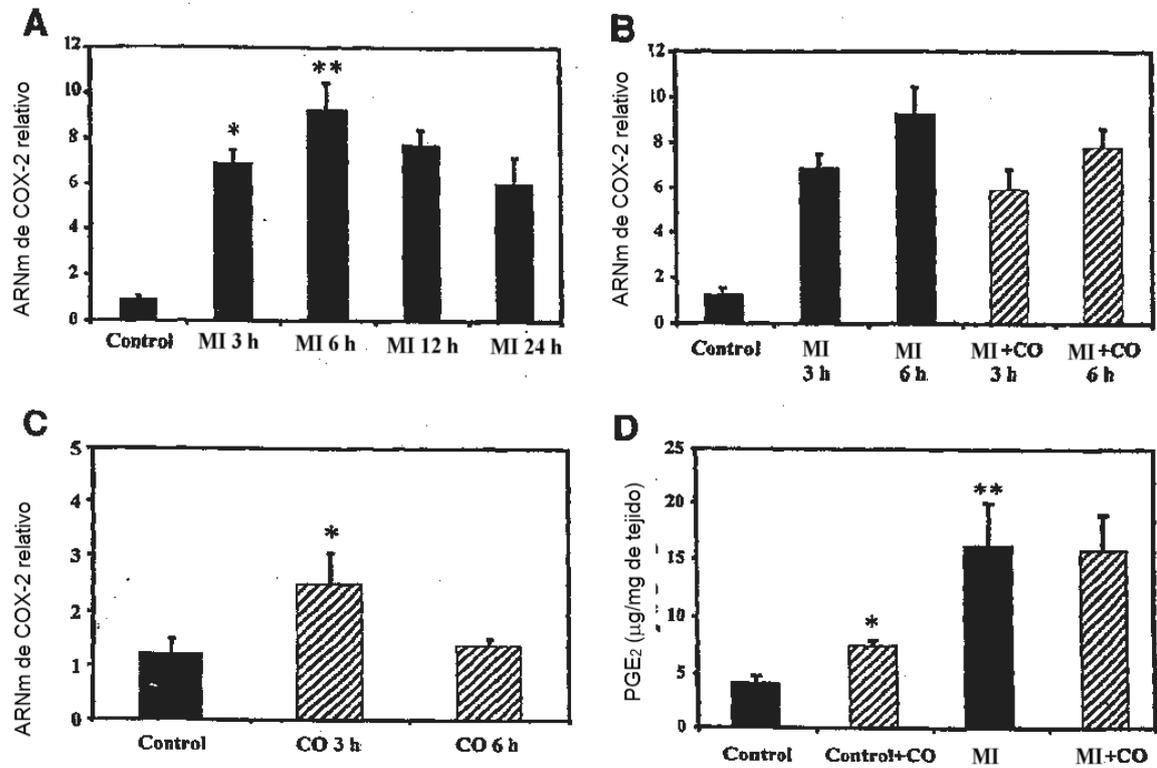
FIGS. 11A-11C



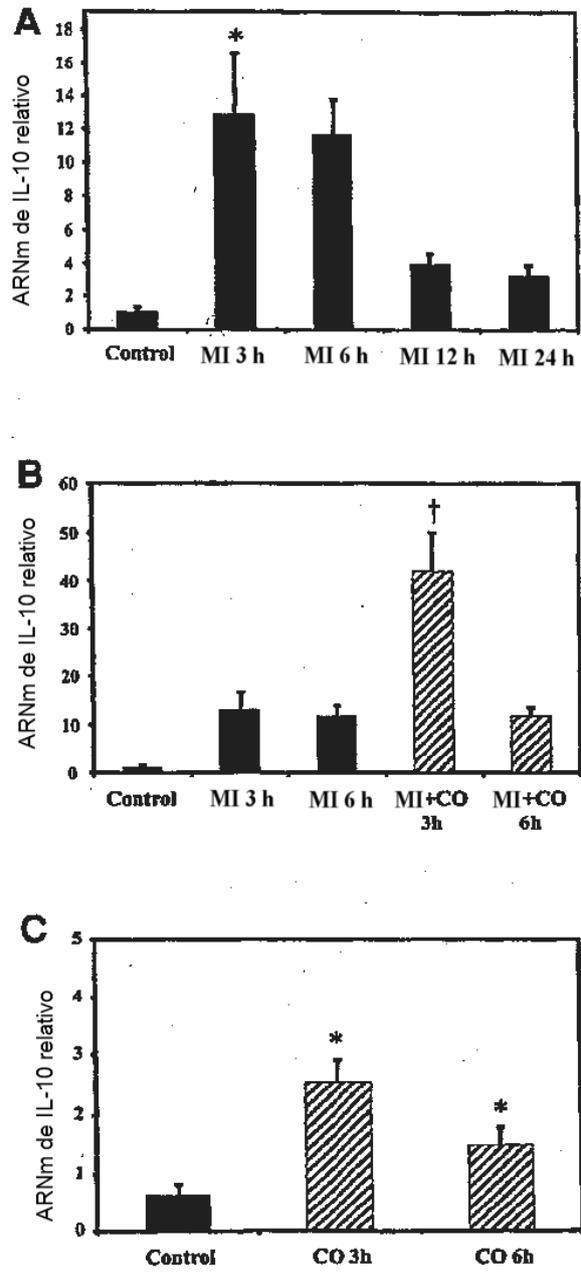
FIGS. 12A-12C



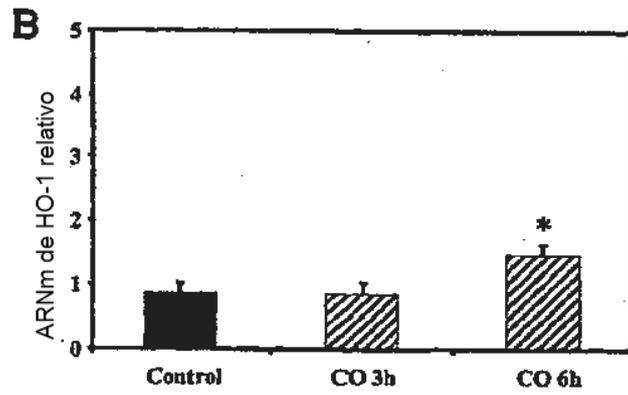
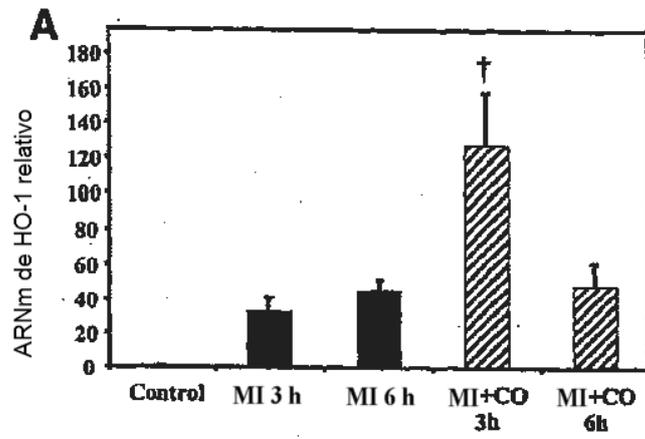
FIGS. 13A-13C



FIGS. 14A-14D



FIGS. 15A-15C



FIGS. 16A-16B