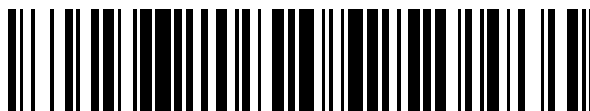


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 874**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011** **E 11167681 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015** **EP 2394672**

54 Título: **Procedimiento de desintoxicación de un tejido biológico**

30 Prioridad:

09.06.2010 IT TO20100486

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

09.10.2015

73 Titular/es:

SORIN GROUP ITALIA S.R.L. (100.0%)
Via Crescentino sn
13040 Saluggia (VC), IT

72 Inventor/es:

STRASLY, MARINA y
CASSOLARO, VINCENZO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 547 874 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).

DESCRIPCION

Procedimiento de desintoxicación de un tejido biológico

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a un procedimiento para la desintoxicación de un tejido biológico para prótesis biológicas, tales como, por ejemplo, válvulas protésicas, preferiblemente válvulas cardíacas protésicas.

Antecedentes de la técnica

Las prótesis biológicas son dispositivos médicos, cuya realización se basa en el uso de tejidos animales procedentes de diversas especies, por ejemplo, bovina, porcina, ovina o equina. Dependiendo de los diversos usos médicos, el tejido biológico puede comprender válvulas cardíacas, pericardio, tendones, ligamentos *dura mater*, piel, venas, etc.

10 Los tejidos destinados a la realización de prótesis biológicas están constituidos fundamentalmente de colágeno, una proteína con una unidad estructural representada por tres cadenas polipeptídicas que se asocian para formar una triple hélice. Las moléculas de colágeno se unen para formar microfibrillas, las cuales, a su vez, se unen para formar fibrillas que, dispuestas en haces corrugados o paralelos, dan lugar a verdaderas fibras de colágeno. Dichos tejidos tienen buena resistencia a la tracción, son flexibles, pero substancialmente inextensibles.

15 Los tejidos destinados para la realización de prótesis biológicas son sometidos, en primer lugar, a numerosos lavados para eliminar trazas de sangre y una cuidadosa eliminación de partes adiposas y ligamentos. No obstante, las células o restos celulares procedentes del animal donante pueden permanecer retenidas en la estructura del propio tejido. Por ello, en este caso, es posible que el sistema inmune del huésped dé lugar a un fenómeno de rechazo que puede conducir a la destrucción del tejido que constituye la prótesis biológica.

20 La degradación del tejido biológico colagenoso una vez implantado en el organismo del huésped es un problema adicional a afrontar en la realización de prótesis biológicas. Por esta razón, los tejidos biológicos son sometidos a un tratamiento de fijación que tiene el objeto de proteger el tejido de dichos fenómenos de degradación y contribuir a prevenir el fenómeno de rechazo anteriormente mencionado.

25 Entre las sustancias usadas para la fijación de tejidos biológicos, la más común es el glutaraldehído. Esta molécula bifuncional, que porta dos grupos aldehído, es capaz de unir conjuntamente de manera estable los grupos amino libres de los aminoácidos que constituyen las cadenas polipeptídicas, tanto de dentro de una molécula de colágeno como de entre moléculas de colágeno adyacentes. De esta manera, el glutaraldehído forma estructuras puente intracadena e inter-cadena, dando lugar a la reticulación del tejido biológico. Dicha reticulación protege al tejido de la degradación por el huésped y confiere propiedades mecánicas favorables tales como, por ejemplo, una mejor resistencia a la tracción con respecto al tejido no tratado.

30 El glutaraldehído es una sustancia altamente bactericida y viricida; por ello, además de la reticulación del tejido, la etapa de fijación proporciona igualmente al menos una esterilización parcial.

35 Además, el glutaraldehído es capaz de unirse a los restos amino libres de las proteínas de membrana de los componentes celulares aún presentes, enmascarando su potencial antigénico e impidiendo los fenómenos de activación inmunes y de rechazo por el huésped.

40 A pesar de la difusión de su uso, el glutaraldehído tiene la desventaja de ser uno de los factores que favorecen la calcificación patológica de los tejidos implantados. El calcio, presente en los fluidos corporales del organismo huésped, se acumula en el tejido proteináceo, dando lugar, por ejemplo en el caso de válvulas cardíacas biológicas, a un proceso que puede representar una de las causas originarias del fallo de la válvula. Los depósitos de calcio pueden reducir la flexibilidad de la porción de tejido biológico que constituye la válvula (o las denominadas hojillas o cúspides de las válvulas) y conducir a la laceración del propio tejido, causando una pérdida parcial o total de función de la válvula.

45 El mecanismo responsable de la calcificación no se conoce aún completamente y se atribuye a numerosos factores; sin embargo, se sabe que, después de la fijación del glutaraldehído, los grupos aldehído libres que permanecen sobre el tejido pueden crear sitios de unión para el calcio.

Además, la toxicidad de dichos restos aldehído puede causar fenómenos de inflamación local que conduce a la necrosis de las células huésped. La destrucción de dichas células muertas da lugar a restos celulares que, a su vez, pueden constituir sitios de unión para el calcio.

50 Para limitar el proceso de calcificación de tejidos, se han usado diversos tipos de moléculas capaces de neutralizar los restos de aldehído que permanecen libres después del proceso de fijación. Por ejemplo, se ha mostrado que el uso de aminoácidos tiene un efecto anti-calcificación; en particular, el Documento US-A-5.873.812 describe el uso de aminoácidos carboxílicos, tal como, por ejemplo ácido homocistéico, en la preparación de tejidos biológicos fijados con aldehído.

Sin embargo, dicho procedimiento no resuelve el problema dado que la neutralización de los grupos aldehído libres presentes sobre el tejido fijado es únicamente parcial.

5 El documento US 2007/269478 divulga un procedimiento de preparación de material implantable biocompatible, que comprende a) fijación de un material implantable biológico con un aldehído (preferiblemente glutaraldehído) y b) tratamiento del material fijado con un aminoácido con una fórmula específica (por ejemplo taurina) para neutralizar el exceso de grupos aldehído y prevenir la calcificación del tejido. La etapa b) se lleva a cabo a un pH de 3,0 a 5,0, el medio de reacción es una solución tamponada (por ejemplo ácido cítrico/fosfato).

Sumario de la invención

10 Considerando estos preámbulos, se experimenta la necesidad, por ello, de soluciones más eficaces, mejoradas, que limiten la calcificación de los tejidos biológicos después de implantación en el huésped.

De acuerdo con la invención, dicho objetivo se logra mediante la solución específicamente recordada en las reivindicaciones adjuntas, las cuales constituyen una parte integral de la presente descripción.

La presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de un tejido biológico para prótesis biológicas que comprende una etapa de fijación del tejido y una etapa de desintoxicación del mismo.

15 En una realización, el procedimiento para el tratamiento de un tejido biológico contempla las operaciones siguientes:

- Fijación del tejido biológico mediante un tratamiento con una solución que contiene glutaraldehído a temperatura ambiente, a un pH comprendido dentro del intervalo de 5 a 8, y durante un período comprendido entre 1 y 20 días, y
- 20 - Desintoxicación del tejido biológico previamente fijado mediante un tratamiento con una solución que contiene taurina,

en el que dicha etapa de desintoxicación se lleva a cabo a una temperatura entre 30°C y 45°C y a pH 7.

25 Los resultados presentados más adelante muestran que el procedimiento descrito en la presente invención reduce fuertemente el número de grupos aldehído libres presentes en el tejido fijado, presentado una clara ventaja con respecto a procedimientos que contemplan la desintoxicación del tejido mediante inmersión en una solución que contiene ácido homocistéico.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá a continuación en detalle, a modo de ejemplo no limitativo únicamente, con referencia a las figuras adjuntas, en las cuales:

- 30 - **Figura 1: Teñido con fucsina de tejidos biológicos desintoxicados de acuerdo con el procedimiento descrito en la presente invención.** Muestras de control fijadas y no desintoxicadas (A); muestras fijadas y desintoxicadas de acuerdo con la técnica conocida con una solución que contiene ácido homocistéico (B); muestra fijada y desintoxicada con una solución que contiene taurina (C).
- 35 - **Figura 2: Teñido con fucsina de tejidos biológicos desintoxicados con taurina de acuerdo con otra realización del procedimiento descrito en la presente invención.** Muestra de control fijada y no desintoxicada (A); muestra fijada y desintoxicada a temperatura ambiente (B); muestra fijada y desintoxicada a 40°C (C); muestra fijada y desintoxicada a 50°C (D).

Descripción detallada de algunas realizaciones

40 La invención se describirá a continuación en detalle, a modo de ejemplo no limitativo únicamente, con referencia a la realización de válvulas cardíacas protésicas biológicas. Es evidente que el procedimiento descrito en la presente invención puede usarse para la desintoxicación de cualquier otro tejido biológico destinado para la realización de otras prótesis biológicas que usen, por ejemplo, tendones, ligamentos, *dura mater*, piel, venas, etc.

45 La invención se describirá a continuación en detalle, a modo de ejemplo no limitativo únicamente, con referencia a la realización de válvulas cardíacas protésicas biológicas. Es evidente que el procedimiento descrito en la presente invención puede usarse para la preparación de cualquier otro tejido biológico para la realización de otras prótesis biológicas que usen, por ejemplo, tendones, ligamentos, *dura mater*, piel, venas, etc.

50 En la descripción siguiente, se dan numerosos detalles específicos a fin de proporcionar un conocimiento completo de las realizaciones. Las realizaciones pueden ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos, o con otros procedimientos, componentes, materiales, etc. En otros casos, no se muestran o describen con detalle estructuras, materiales u operaciones bien conocidas a fin de evitar crear confusión en ciertos aspectos de las realizaciones.

5 La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a “una realización” o “la realización” indica que un aspecto, estructura o característica particular descrita en conexión con la realización, está incluida en al menos una realización. Así, la frase “en una realización” o “en la realización” en varios lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva no se refiere del todo necesariamente a la misma realización. Además, los detalles de aspectos, estructuras o características, pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Los epígrafes proporcionados en la presente invención son únicamente por conveniencia y no interpretan el ámbito o significado de las realizaciones.

La presente descripción se refiere a un procedimiento para el tratamiento de un tejido biológico que consiste en dos etapas:

- 10 i) Fijación del tejido biológico mediante tratamiento con una solución que contiene glutaraldehído a temperatura ambiente, a un pH comprendido dentro del intervalo de 5 a 8 y durante un período comprendido entre 1 y 20 días, y
- ii) Desintoxicación del tejido biológico previamente fijado mediante tratamiento con una solución que contiene taurina,

15 en el que dicha etapa de desintoxicación se lleva a cabo a una temperatura entre 30°C y 45°C y a pH 7.

La etapa de fijación contempla la inmersión del tejido en una solución que contiene glutaraldehído durante un período que varía entre un minuto y 3 días y un máximo de 13 días. La fijación reticula el tejido, lo cual le confiere resistencia a la degradación y propiedades mecánicas favorables.

20 La etapa de desintoxicación contempla la inmersión del tejido previamente fijado en una solución que contiene taurina durante un período que varía dentro de un intervalo de desde un minuto hasta unas pocas horas y un máximo de varios días.

25 La taurina (también conocida como ácido aminoetanosulfónico) tiene un grupo amino (NH₂) disponible para unirse con los grupos aldehído del glutaraldehído que permanecen libres después de la etapa de fijación. En particular, los autores de la presente invención han descubierto que el uso de taurina en la etapa de desintoxicación, en lugar del ácido homocistéico, proporciona mayor eficacia para la neutralización de los grupos aldehído que permanecen libres después de la fijación del glutaraldehído, reduciendo, por ello, de una forma altamente eficaz, el número de sitios de unión y de acumulación de calcio sobre el tejido biológico.

30 Los tejidos biológicos destinados para válvulas cardíacas protésicas biológicas, o pericardio bovino, equino o posiblemente pericardio de otras especies animales o válvulas porcinas, son recogidos de los mataderos autorizados y, transportados al laboratorio, sumergidos en solución salina mantenida en hielo para evitar daños al tejido antes de su uso.

35 Los tejidos son lavados con solución salina para eliminar posibles trazas de sangre, separados de posibles partes adiposas y ligamentosas adherentes y, a continuación, cuidadosamente seleccionados en base a su espesor y en base a la ausencia de defectos evidentes, tales como falta de homogeneidad en el espesor, presencia de cortes, abrasiones, etc.

Los tejidos son inicialmente prefijados en una solución de glutaraldehído a una concentración v/v comprendida dentro del intervalo de 0,05% a 0,30%, preferiblemente 0,20% en tampón de fosfato a pH 7,4, durante un periodo que varía dentro del intervalo de 3 a 13 horas a temperatura ambiente.

40 Después de la etapa de prefijación, viene la etapa de cortado y conformado, de acuerdo con técnicas conocidas, para realizar, por ejemplo, válvulas cardíacas. Esta etapa de conformado del tejido es irrelevante para los objetivos del procedimiento objeto de la presente descripción.

El procedimiento de fijación que sigue se lleva a cabo mediante la inmersión del tejido en una solución que comprende glutaraldehído a una concentración dentro del intervalo de 0,30% a 1,00%, más preferiblemente 0,5%.

45 La solución que contiene glutaraldehído está constituida, preferiblemente, por una solución acuosa que contiene un tampón seleccionado entre fosfato, citrato, acetato, HEPES, borato, más preferiblemente fosfato.

El pH de la solución a base de glutaraldehído está comprendido dentro del intervalo de 5 a 8, más preferiblemente de 7,4.

50 El procedimiento de fijación se lleva a cabo a una temperatura comprendida dentro del intervalo de 4°C a 30°C, más preferiblemente a temperatura ambiente (20°C). El período de exposición del tejido a la solución que contiene glutaraldehído puede variar dentro del intervalo de 1 a 20 días, preferiblemente de 3 a 13 días.

Después de la etapa de fijación, el tejido se lava para eliminar el glutaraldehído residual no conjugado con el tejido. La solución de lavado está constituida por una solución salina o tampón de fosfato a pH 7-7,4 y se cambia tres ve-

ces. El lavado se realiza durante un período comprendido dentro del intervalo de 30 minutos a 6 horas, con agitación suave, a temperatura ambiente.

5 A continuación, el tejido fijado se desintoxica usando una solución acuosa que contiene taurina a una concentración en p/v comprendida dentro del intervalo de 0,10% hasta saturación de la solución, preferiblemente 0,20% a 1,00%, más preferiblemente 0,70% p/v.

La solución de taurina acuosa contiene un tampón seleccionado entre fosfato, citrato, acetato, HEPES, borato, más preferiblemente fosfato. El pH de la solución está comprendido dentro del intervalo de 4 a 9, preferiblemente de 5 a 8, más preferiblemente de 7.

10 La etapa de desintoxicación se lleva a cabo a una temperatura comprendida dentro del intervalo de temperatura ambiente (20°C) a 50°C, preferiblemente de 30°C a 45°C, más preferiblemente a 40°C; el período de inmersión del tejido en la solución que contiene taurina puede variar dentro del intervalo de 2 a 96 horas, preferiblemente de 12 a 48 horas, más preferiblemente es de 24 horas.

Al final de la etapa de desintoxicación, el tejido desintoxicado se somete a lavado a temperatura ambiente, en tampón de fosfato a pH 7, durante aproximadamente tres horas, cambiando la solución de lavado tres veces.

15 Finalmente, el tejido desintoxicado se transfiere a una solución de conservación sin aldehídos en tampón de fosfato a pH 7, que contiene conservantes, preferiblemente parabenos.

20 La eficacia del procedimiento descrito en la presente invención y, por ello, la aparición de la reacción entre los grupos amino de la molécula de desintoxicación y los grupos aldehído libres presentes sobre el tejido fijado, se evaluó mediante el tñido de los grupos aldehído que permanecen libres. Cuanto mayor es la intensidad del tñido, más numerosos son los grupos aldehído libres y, por el contrario, cuanto más débil (o su ausencia) del tñido, menos numerosos (o ausencia) son los grupos aldehído libres sobre el tejido fijado. Un ejemplo de tñido ventajosamente útil para dicha determinación es la fucsina.

25 Los resultados presentados más adelante demuestran que la taurina se une a los grupos aldehído libres presentes sobre el tejido fijado de manera más eficaz que el ácido homocistéico. Además, los autores de la presente invención han observado que se obtienen mejores resultados realizando la etapa de desintoxicación a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, es decir, el número de grupos aldehído libres presentes sobre el tejido fijado se reducen grandemente.

A continuación, se describirá en detalle las diversas realizaciones preferidas de la presente invención.

Materiales y procedimientos

30 *Recogida y fijado de tejido biológico*

El tejido biológico, constituido por piezas de pericardio de bovino recogidas de mataderos autorizados, se introdujo en una solución fisiológica mantenida sobre hielo y se transportó al laboratorio.

35 Los tejidos se lavaron con solución salina par eliminar las posible trazas de sangre, se separaron de todo ligamento adherente y partes adiposas y se seleccionaron en base al espesor correcto y a la ausencia de efectos, tales como falta de homogeneidad de espesor, presencia de vascularizaciones, cortes, abrasiones, etc.

Los tejidos se prefijaron en una solución de glutaraldehído al 0,20% v/v en tampón de fosfato a pH 7,4, durante un tiempo variable dentro del intervalo de 3 a 13 horas a temperatura ambiente.

40 Después de la etapa de prefijación, viene la etapa de cortado y conformado del tejido, de acuerdo con técnicas conocidas, para la realización de, por ejemplo, válvulas cardíacas. A continuación, los tejidos se fijaron durante un período comprendido dentro del intervalo de 3 a 13 días a temperatura ambiente, en una solución acuosa de 0,50% v/v de glutaraldehído en tampón de fosfato a pH 7.4.

Desintoxicación del tejido

45 El tejido biológico a desintoxicar se lavó, para eliminar la solución de glutaraldehído residual, en solución salina o en tampón de fosfato a pH 7,4 o pH 7, durante aproximadamente tres horas, con agitación suave, a temperatura ambiente. Dicha solución de lavado se cambió tres veces, usando aproximadamente 300 ml de solución cada vez para cada pieza de tejido con dimensiones de aproximadamente 10 x 5 cm.

La solución fijada se desintoxicó, a continuación, usando una solución acuosa que contenía taurina a una concentración (p/v) de aproximadamente 0,70% en tampón de fosfato a pH 7.

50 La etapa de desintoxicación se llevó a cabo a temperatura ambiente (20°C), 40°C y 50°C durante un período de tiempo de 24 horas, usando aproximadamente 200 ml de solución para cada tejido.

Al final de la etapa de desintoxicación, el tejido desintoxicado se lavó a temperatura ambiente, en tampón de fosfato a pH 7, durante aproximadamente tres horas, cambiando la solución de lavado tres veces.

Finalmente, los tejidos se transfirieron a una solución de conservación sin aldehídos, que contenía conservantes, preferiblemente parabenos, en tampón de fosfato a pH 7.

- 5 Con el objetivo de demostrar la mejor eficacia del tratamiento de desintoxicación con taurina comparado con la técnica conocida, los autores de la presente invención determinaron semicuantitativamente el número de grupos aldehído libres en tres muestras de tejido biológico tratadas como sigue:

-una primera muestra de control (Figura 1A) constituida por tejido biológico fijado con glutaraldehído pero no desintoxicada;

- 10 -una segunda muestra de control (Figura 1B) fijada con glutaraldehído y desintoxicada con una solución que contiene ácido homocistéico a una concentración (p/v) de 1,00% en tampón de fosfato a pH 7;

-una tercera muestra de control (Figura 1C) fijada con glutaraldehído y desintoxicada con una solución que contiene taurina a una concentración (p/v) igual a 0,70% en tampón de fosfato a pH 7.

- 15 Las muestras de tejido se sumergieron en soluciones desintoxicantes durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente con agitación suave.

Para verificar la eficacia del tratamiento de desintoxicación con taurina con variación de la temperatura de la solución de desintoxicación, los autores de la presente invención determinaron semicuantitativamente el número de grupos aldehído libres en tejidos biológicos tratados como sigue:

- 20 -una primera muestra de control (Figura 2A) constituida por tejido biológico fijado con glutaraldehído pero no desintoxicada;

-una segunda muestra (Figura 2B) fijada con glutaraldehído y desintoxicada con una solución que contiene taurina a una temperatura de 20°C;

-una tercera muestra (Figura 2C) fijada con glutaraldehído y desintoxicada con una solución que contiene taurina a una temperatura de 40°C; y

- 25 -una cuarta muestra (Figura 2D) fijada con glutaraldehído y desintoxicada con una solución que contiene taurina a una temperatura de 50°C.

Las muestras se sumergieron en la solución desintoxicante durante aproximadamente 24 horas con agitación suave, tanto a temperatura ambiente como a 40°C; la cuarta muestra desintoxicada a 50°C se mantuvo sumergida durante 7-8 horas con agitación suave.

- 30 Aproximadamente, se usaron 200 ml de solución desintoxicante para cada muestra.

Al final del tratamiento, todas las muestras se lavaron a temperatura ambiente en tampón de fosfato a pH 7, durante aproximadamente tres horas, cambiando la solución de lavado tres veces y usando aproximadamente 300 ml de solución para cada muestra en cada cambio.

- 35 A continuación, todas las muestras se transfirieron a una solución tampón de fosfato a pH 7, que contenía conservantes, preferiblemente parabenos.

Teñido del tejido con fucsina

El teñido con fucsina para detectar los grupos aldehído libres, usa una solución ácida de hidrocloreuro de rosanilina (fucsina). El teñido aprovecha la formación de enlaces entre los grupos NH₂ del colorante y los grupos aldehído libres sobre el tejido.

- 40 Al principio, la solución es incolora y, en la presencia de grupos aldehído libres, desarrolla un color violeta. Esto es una valoración cualitativa de la disponibilidad de grupos aldehído libres, después de los diversos tratamientos.

Las muestras para teñir se cortaron para obtener piezas con dimensiones de aproximadamente 1,5 x 1,5 cm y, de manera sucesiva, se sumergieron en la solución de teñido, de aproximadamente 10 ml, cada pieza en un tubo ensayo por separado.

- 45 La solución de teñido es 1,00% de hidrocloreuro de rosanilina, 4,00% de metabisulfito sódico en ácido clorhídrico 0,25 M. Las muestras permanecieron sumergidas en el tinte durante 5 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave.

A continuación, cada muestra se transfirió a una solución obtenida mezclando 8 gr de Na_2SO_3 y 30 ml de ácido clorhídrico al 37%, llevada a un litro con agua desmineralizada. Las muestras permanecieron sumergidas en esta solución de lavado durante 10 minutos, con agitación suave.

5 A continuación, se realizaron 2 lavados sucesivos de 10 minutos, con agitación suave, en una solución de lavado que comprendía 700 ml de etanol y 30 ml de ácido clorhídrico al 37%, llevada a un litro con agua desmineralizada.

Los lavados eliminan el tinte que no está específicamente unido al tejido. En cada cambio, se usaron aproximadamente 20 ml de solución de lavado.

Al acabar, las piezas se transfirieron a tampón de fosfato a pH 7 y se fotografiaron para documentar los diferentes teñidos.

10 *Espectroscopia de reflectancia*

Las muestras teñidas se sometieron a espectroscopia de reflectancia para evaluar cuantitativamente las diferentes características cromáticas del teñido con fucsina.

15 La espectroscopia de reflectancia es una técnica para investigación óptica basada en la medición del factor de reflectancia espectral de la superficie de una muestra como una función de la longitud de onda de la radiación incidente. El parámetro de reflectancia se expresa como la relación de la intensidad de la radiación reflejada y la radiación incidente, en función de la longitud de onda.

Las mediciones de reflectancia se llevaron a cabo a una longitud de onda de 570 nm mediante un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35, con un integrador esférico.

20 En una escala de valores, un valor de reflectancia inferior indica un teñido de la muestra más intenso y, al contrario, un valor de reflectancia superior indica una intensidad de teñido débil.

Determinación de la temperatura de contracción

La temperatura de contracción es un índice del nivel de reticulación del tejido fijado y se determinó sobre discos de pericardio de aproximadamente 5 mm de diámetro, usando un calorímetro de escaneado diferencial (DSC) Q100 TA Instruments con los parámetros siguientes:

- 25
- flujo de nitrógeno de 50 ml/min,
 - rampa de calentamiento de 5°C/min,
 - intervalo de temperatura 65°C a 95°C.

Resultados

Desintoxicación

30 La eficacia del procedimiento descrito en la presente invención y, en consecuencia, la reacción que tiene lugar entre los grupos amino de la molécula desintoxicante y los grupos aldehído sobre el tejido fijado, se demostró mediante teñido con fucsina de los grupos aldehído que permanecían libres; un teñido más intenso indica numerosos grupos aldehído libres y, por el contrario, un teñido más débil o su ausencia indica pocos o ningún grupo aldehído libre, sobre el tejido desintoxicado.

35 La Figura 1 muestra una intensidad de teñido diferente de una muestra desintoxicada con una solución que contiene taurina ácido homocistéico, muestra B, y de una desintoxicada con taurina, muestra C. Una muestra no desintoxicada, muestra A, tiene un color púrpura intenso. La intensidad de teñido de la muestra B es menor que la de la muestra de control, pero el teñido de la muestra C es muy débil o hay ausencia del mismo.

40 El número de grupos aldehído libres presentes sobre la muestra expuesta a una solución que contienen taurina es, en consecuencia, decididamente inferior al de una muestra no desintoxicada después de la fijación. Además, el tratamiento con taurina es significativamente más eficaz que el llevado a cabo con ácido homocistéico.

Estas observaciones se confirmaron mediante el análisis espectrofotométrico de reflectancia de las muestras. La reflectancia de cada muestra depende de la intensidad del teñido y, mediante el análisis llevado a cabo con un espectrofotómetro, es posible asociar un valor de porcentaje de reflectancia a cada muestra.

45 Un valor de reflectancia superior está asociado con una intensidad de teñido más débil y viceversa, un valor de reflectancia inferior está asociado con una intensidad de teñido superior.

Tal como puede verse a partir de los resultados presentados en la Tabla 1, la reflectancia, analizada a una longitud de onda de 570 nm y expresada como un porcentaje, muestra un valor de 6,5 para la muestra no desintoxicada mostrada en la Figura 1A, un valor intermedio para la muestra desintoxicadas con ácido homocistéico mostrada en

la Figura 1B y un valor decididamente superior para la muestra desintoxicada con una solución que contiene taurina mostrada en la Figura 1C.

Tabla 1

Muestra	Teñido observado	% de reflectancia a 570 nm
A - no desintoxicada	Púrpura muy intenso	6,5
B – ácido homocistéico a temperatura ambiente	Violeta	9,2
C – taurina a temperatura ambiente	Violeta pálido	13

- 5 Estos resultados confirman que el tratamiento con taurina es más eficaz que el tratamiento con ácido homocistéico en la neutralización de grupos aldehído libres sobre el tejido fijado.

Con referencia al Figura 2, puede observarse cómo la modificación de las condiciones de temperatura bajo las cuales se lleva a cabo la desintoxicación de la muestra con la solución que contienen taurina, incrementa la eficacia del tratamiento. La intensidad de teñido de la muestra desintoxicada a 40°C, muestra C, es más débil con respecto a la de la muestra desintoxicada a temperatura ambiente, muestra B. Se obtuvieron resultados incluso más evidentes realizando el tratamiento de desintoxicación a una temperatura de 50°C; de hecho, la muestra D tiene un teñido de intensidad decididamente inferior que indica que quedan menos grupos aldehído libres y, en consecuencia, menos sitios para la unión y acumulación de calcio, con respecto de los otros tratamientos.

15 Los resultados del análisis espectroscópico de reflectancia para las muestras mostradas en la Figura 2 se muestran en la Tabla 2. El valor de reflectancia más alto, igual a 22, que procede de una muestra que tiene casi ausencia de intensidad de teñido, es decir, la muestra tratada con taurina a 50°C. La muestra no desintoxicada, la cual tiene teñido muy intenso, tiene el valor de reflectancia más bajo. La muestra tratada con taurina a temperatura ambiente tiene un valor superior a la del control no desintoxicado, pero inferior al de la muestra tratada con taurina a 40°C.

Tabla 2

Muestra	Teñido observado	% de reflectancia a 570 nm
A - no desintoxicada	Púrpura muy intenso	6,5
B – taurina a temperatura ambiente	Violeta pálido	12
C – taurina a 40°C	Rosa	17
D – taurina a 50°C	Completamente incoloro	22

20 También en este caso, los resultados de la espectroscopia de reflectancia confirman que el tratamiento con taurina tiene una capacidad de desintoxicación mayor cuando se lleva a cabo a una temperatura superior a la temperatura ambiente.

Temperatura de contracción

25 Con el fin de verificar que el tratamiento de desintoxicación no altera la reticulación del tejido biológico obtenido mediante inmersión en una solución que contiene glutaraldehído, se comparó la temperatura de contracción del tejido desintoxicado mediante tratamiento con una solución que contenía taurina, con la temperatura de contracción del tejido de control fijado y no desintoxicado.

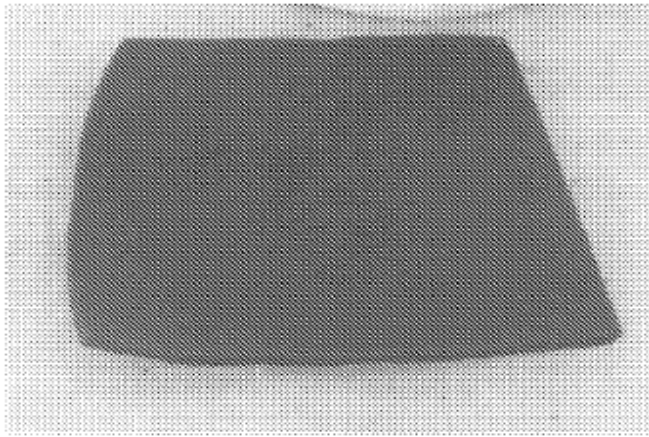
30 La temperatura de contracción de los tejidos sumergidos en la solución que contiene taurina a temperatura ambiente o a 40°C, son indistinguibles de la temperatura de contracción de los tejidos no desintoxicados, siendo dicha temperatura de 85-86°C. Por tanto, ningún tratamiento tiene efectos significativos sobre el nivel de reticulación del tejido.

La temperatura de contracción del tejido sumergido en la solución que contiene taurina a 50°C se mantiene igual que la del tejido no desintoxicado (85-86°C), si el período de tratamiento no excede de 7-8 horas.

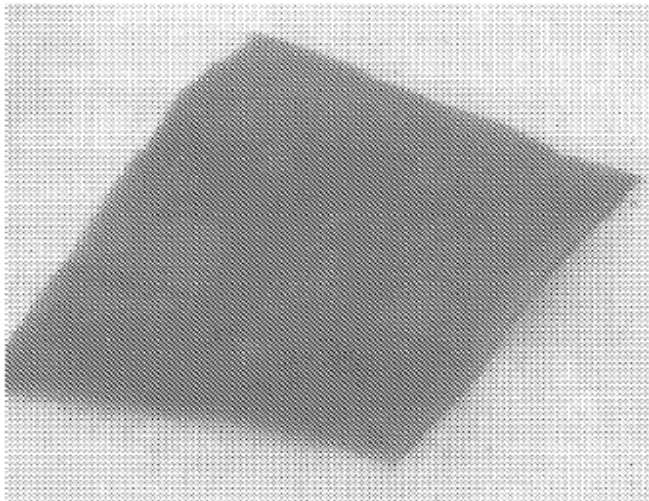
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de tratamiento de un tejido biológico para prótesis biológicas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas:
- 5 i) fijación del tejido biológico mediante un tratamiento con una solución de fijación que contiene glutaraldehído a temperatura ambiente, un pH comprendido dentro del intervalo de 5 a 8 y durante un período comprendido entre 1 y 20 días, y
- ii) desintoxicación del tejido biológico fijado mediante un tratamiento con una solución que contiene taurina, en el que dicha etapa de desintoxicación se lleva a cabo a una temperatura de entre 30°C y 45°C y un pH de 7.
- 10 **2.** Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución que contiene taurina, contiene taurina a una concentración dentro del intervalo desde 0,10% p/v hasta saturación, preferiblemente desde 0,20% hasta 1,00%, más preferiblemente de 0,7%.
- 3.** Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha solución que contiene taurina, contiene un tampón seleccionado entre un tampón de fosfato, citrato, acetato, HEPES, borato, más preferiblemente un tampón de fosfato.
- 15 **4.** Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha etapa de desintoxicación se lleva a cabo a una temperatura de 40°C.
- 5.** Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa de desintoxicación se lleva a cabo durante un período comprendido dentro del intervalo de 2 a 96 horas, preferiblemente de 12 a 48 horas, más preferiblemente de 24 horas.

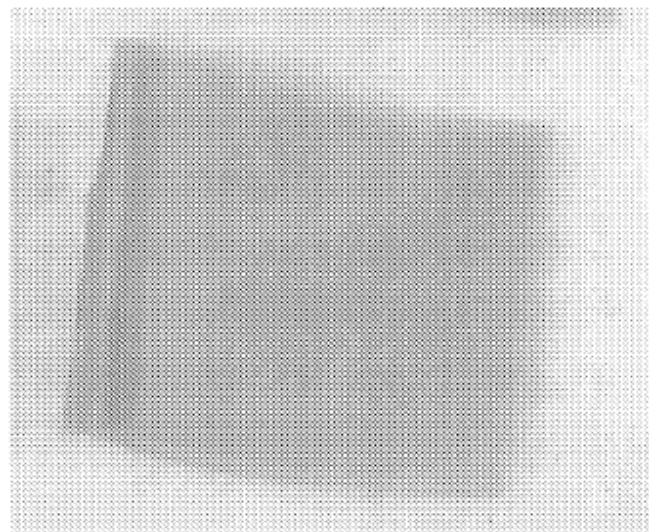
20



A

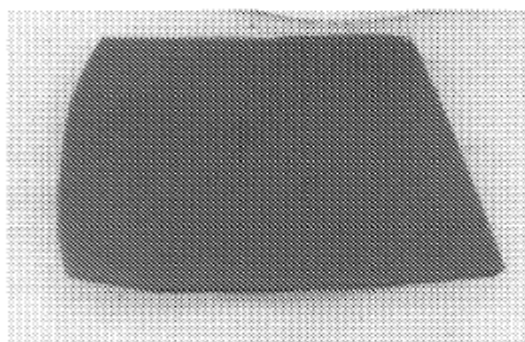


B

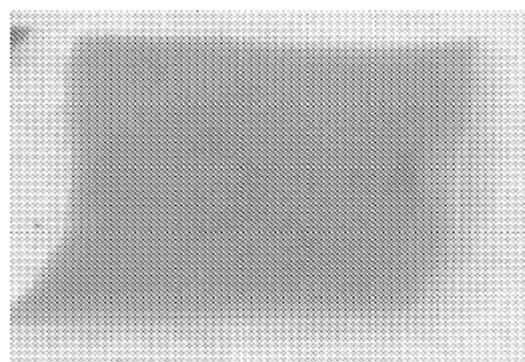


C

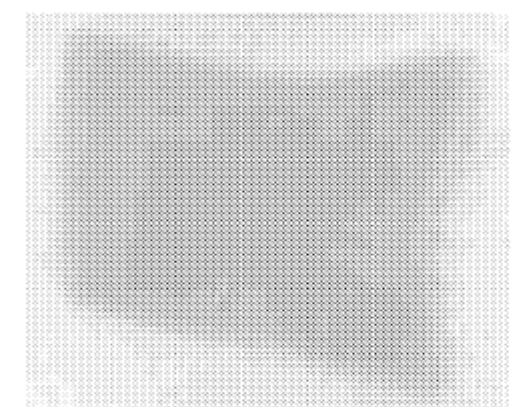
Figura 1



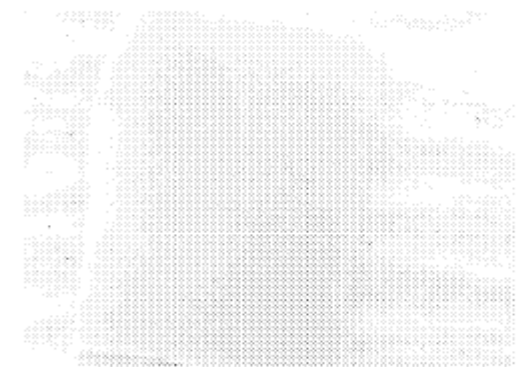
A



B



C



D

Figura 2