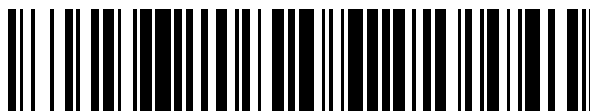


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 875**

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 11167695 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015** **EP 2394673**

54 Título: **Procedimiento de preparación de tejidos biológicos para prótesis biológicas**

30 Prioridad:

09.06.2010 IT TO20100487

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

ROLANDO, GIOVANNI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 547 875 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 preparación de tejidos biológicos para prótesis biológicas

Campo de la invención

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

Antecedente técnico

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 grasa 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 con cara a 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 determina igualmente al menos una esterilización parcial.

- 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.

- 35 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 sobre el tejido proteináceo, dando lugar a un proceso de, por ejemplo en el caso de válvulas cardíacas biológicas, a una de las causas originales de fallo de la válvula. Los depósitos de calcio pueden causar flexibilidad reducida 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. El mecanismo responsable de la calcificación no se conoce aún completamente y se atribuye a numerosos factores, pero se sabe que, después del proceso de fijación del glutaraldehído, los grupos aldehído libres que permanecen sobre el tejido pueden crear sitios de unión para el calcio.

- 40 Además, los fosfolípidos que comprenden las membranas celulares de las células o restos celulares procedentes del animal donante que permanecen retenidos en la estructura del tejido, constituyen igualmente sitios para la unión y acumulación de calcio.

- 45 Para limitar el proceso de calcificación en tejidos destinados a la realización de prótesis biológicas, se ha adoptado el recurso de diversos tratamientos para neutralizar los restos de aldehído que permanecen libres después de la etapa de fijación y para eliminar los fosfolípidos de membrana. Por ejemplo, el Documento US-A-2006/0193885 describe el uso de dos soluciones, la primera conteniendo alcoholes inferiores para eliminar los fosfolípidos de membrana y la segunda conteniendo arginina, histidina, lisina o sales de ácido aspártico o glutámico, para neutralizar los grupos aldehído presentes sobre el tejido biológico después de la fijación. El Documento US-B-6.479.079 describe el tratamiento de tejido biológico para la eliminación de los fosfolípidos de membrana con soluciones que

comprenden alcoholes constituidos por un cierto número de átomos de carbono variable entre 4 y 36. El Documento US-A-5.873.812 describe el uso de aminoácidos carboxílicos, por ejemplo ácido homocistéico, para neutralizar los restos de aldehído que permanecen libres sobre el tejido biológico después del proceso de fijación.

5 Pettenazzo y otros, describen estrategias de anticalcificación del tejido de xenoinjerto fijado con glutaraldehído para extraer lípidos o para neutralizar aldehídos tóxicos residuales. Los lípidos se eliminaron mediante un tratamiento con octanodiol (5%) en una solución etanólica (40%). El tratamiento de post-fijación se realizó en una cámara estéril durante 68 horas a 37°C.

10 No obstante, dichos procedimientos no son soluciones ideales dado que los sitios de unión para calcio permanecen sobre el tejido biológico, en particular, la neutralización de los grupos aldehído libres presentes después del proceso de fijación con glutaraldehído es frecuentemente parcial.

Sumario de la invención

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.

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

Una realización descrita en la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de un tejido biológico para prótesis biológicas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas:

- fijación del tejido biológico mediante un tratamiento con una solución de fijación que contiene glutaraldehído;
- 20 - eliminación de los fosfolípidos procedentes del tejido biológico mediante un tratamiento con una solución de eliminación que contiene 1,2-octanodiol y etanol;
- desintoxicación del material biológico fijado mediante un tratamiento con una solución desintoxicante que contiene taurina o ácido homocistéico a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, preferiblemente por encima de 30°C.

25 Los resultados mostrados más adelante demuestran que el procedimiento para el tratamiento de un tejido biológico tiene claramente ventajas si este comprende una etapa de eliminación de los fosfolípidos a través de tratamiento con una solución acuosa que contiene 1,2-octanodiol y etanol.

El mismo procedimiento de tratamiento de un tejido biológico tiene ventajas adicionales cuando la etapa de desintoxicación se realiza a una temperatura por encima de la temperatura ambiente.

30 Los mejores resultados, es decir, la reducción la más eficaz del número de los grupos aldehído libres presentes sobre el tejido fijado, se obtienen cuando se contempla el procedimiento que conduce tanto a la etapa de eliminación de los fosfolípidos como la etapa de desintoxicación a una temperatura por encima de la temperatura ambiente.

35 Llevando a cabo el procedimiento descrito en la presente invención, es posible obtener un tejido biológico para prótesis biológicas que es mucho menos susceptible al proceso de calcificación, cuando se implanta en un organismo huésped, con respecto al tejido tratado con el procedimiento de estado de la técnica anteriormente citado.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá a continuación en detalle, a modo de ejemplo no limitativo únicamente, con referencia a los dibujos anexos, en los cuales:

- 40 - **Figura 1: Teñido con fucsina de tejidos biológicos desintoxicados de acuerdo con una realización del procedimiento descrito en la presente invención.** Muestra de control fijada y no desintoxicada (A); muestra fijada y desintoxicada con una solución de acuerdo con la técnica conocida conteniendo ácido homocistéico a temperatura ambiente (B); muestra fijada y desintoxicada con una solución conteniendo taurina a temperatura ambiente (C); muestra fijada y desintoxicada con una solución conteniendo ácido homocistéico a 40°C (D); muestra fijada y desintoxicada con una solución conteniendo taurina a 40°C (E).
- 45 - **Figura 2: Teñido con fucsina de tejidos biológicos desintoxicados de acuerdo con una realización diferente del procedimiento descrito en la presente invención.** Muestra de control fijada y no desintoxicada (A); muestra fijada y desintoxicada con una solución conteniendo ácido homocistéico a temperatura ambiente (B); muestra sometida a eliminación de los fosfolípidos, fijada y desintoxicada con una solución conteniendo taurina a temperatura ambiente (C); muestra fijada y desintoxicada con una solución conteniendo ácido homocistéico a 40°C (D); muestra sometida a eliminación de los fosfolípidos, fijada y desintoxicada con una solución conteniendo ácido homocistéico a 40°C (E).
- 50

- **Figura 3: Histograma del contenido en fosfolípidos en tejido biológico tratado de acuerdo con otra realización del procedimiento descrito en la presente invención.** Muestra de control fijada y no desintoxicada (A); muestra fijada y desintoxicada con una solución conteniendo ácido homocistéico a 40°C (B); muestra sometida al tratamiento de eliminación de fosfolípidos, fijada y desintoxicada con una solución conteniendo ácido homocistéico a 40°C (C).

Descripción detallada de diversas realizaciones

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 en 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.

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.

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 expresión “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.

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

- i) fijación del tejido biológico mediante tratamiento con una solución fijante que contiene glutaraldehído; y
- ii) desintoxicación del tejido biológico fijado mediante tratamiento con una solución desintoxicante.

Dicho procedimiento se caracteriza porque a) se contempla una etapa de eliminación de los fosfolípidos de la membrana mediante tratamiento con una solución de eliminación que contiene 1,2-octanodiol y etanol y, como alternativa o en combinación, b) porque la etapa de desintoxicación se realiza mediante tratamiento con una solución desintoxicante que contiene taurina o ácido homocistéico a una temperatura por encima de la temperatura ambiente (20°C).

La etapa de eliminación de los fosfolípidos puede realizarse sobre el tejido biológico inmediatamente antes de realizar la etapa de fijación de glutaraldehído o antes de completarse la fijación.

En una realización diferente, el etapa de eliminación de los fosfolípidos puede realizarse en dos fases distintas: una primera fase llevada a cabo antes de la fijación del tejido y una segunda fase llevada a cabo simultáneamente con la etapa de desintoxicación, en la cual la solución que contiene los agentes desintoxicantes (taurina o ácido homocistéico) contienen igualmente 1,2-octanodiol y etanol.

De hecho, la solución acuosa que contiene 1,2-octanodiol y etanol es capaz de solubilizar los fosfolípidos de los cuales están compuestas las membranas de las células del animal donante que permanecen retenidas en el tejido (Pettenazzo y otros, (2008), “Octanediol treatment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: evidence of anticalcification efficacy in the subcutaneous rat model”, *Eur J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 34, (nº 2), págs. 418-422,).

Por ello, dicho tratamiento elimina tanto los fosfolípidos, componentes integrales de las membranas celulares, como los residuos celulares que se forman después de la destrucción de las células debido a la solubilización de los propios fosfolípidos.

La eliminación de los fosfolípidos de la membrana procedentes del tejido reduce el número de sitios disponibles para la unión del calcio y, por ello, dicho tratamiento representa una vía eficaz adicional para la limitación de la calcificación del tejido biológico después de implantación en el organismo huésped.

La presente invención ha verificado igualmente que la eliminación de los fosfolípidos mejora la predisposición del tejido a la fijación con glutaraldehído. De hecho, mediante la eliminación de los fosfolípidos, constituyentes esenciales de las membranas de las células que permanecen retenidas en el tejido, las fibras de colágeno tienen una distribución espacial más homogénea resultante de la penetración mejorada del glutaraldehído y, por ello, una reticulación más eficaz y homogénea del tejido.

Además, se descubrió por los inventores presentes que la eliminación de los fosfolípidos permite una penetración mejorada de las sustancias desintoxicadoras (taurina o ácido homocistéico) dentro del tejido biológico fijado y, en consecuencia, una neutralización más eficaz de los grupos aldehído no conjugados presentes en el tejido después de la fijación.

Además, se ha verificado que la etapa de desintoxicación llevada a cabo a una temperatura por encima de la temperatura ambiente mejora la eficacia de la neutralización de los grupos aldehído que permanecen libres después de la fijación, reduciendo, por ello, de manera muy eficaz el número de sitios para la unión y acumulación de calcio en el tejido biológico.

- 5 A continuación, a modo de ejemplo no limitativo, se describirá una realización del procedimiento para el tratamiento de un tejido biológico objeto de la presente invención.

Los tejidos biológicos destinados para válvulas cardíacas protésicas biológicas, es decir, bovino, equino o posiblemente de pericardio de otras especies animales o válvula porcina, son recogidos de los mataderos autorizados.

- 10 Los tejidos son lavados e inicialmente prefijados, mediante inmersión, en una solución de glutaraldehído a una concentración expresada en v/v comprendida dentro del intervalo de 0,05% a 0,3%, preferiblemente igual a 0,20% en tampón de fosfato a pH7,4, durante un periodo variable comprendido dentro del intervalo de 3 a 13 horas a temperatura ambiente.

Después de la etapa de prefijación, los tejidos son sumergidos en una solución de tratamiento que contiene 1,2-octadienol y etanol, para la eliminación de los fosfolípidos.

- 15 La solución que contiene 1,2-octadienol y etanol tiene una concentración en v/v de 1,2-octadienol comprendida dentro del intervalo de 1% a 25%, preferiblemente 2% a 10%, más preferiblemente igual a 5% y una concentración en v/v de etanol comprendida dentro del intervalo de 25% a 49%, preferiblemente 30% a 45%, más preferiblemente igual a 40%. El 1,2-octanodiol y etanol están diluidos en solución fisiológica o en una solución acuosa que contiene un tampón tal como fosfato, citrato, acetato, HEPES. El pH de la solución está comprendido dentro del intervalo de 4
20 a 9, preferiblemente 5 a 8, más preferiblemente igual a 7,2.

La etapa de eliminación de los fosfolípidos se lleva a cabo a una temperatura comprendida dentro del intervalo de 15°C a 65°C, preferiblemente 30°C a 40°C, más preferiblemente igual a 37°C. El período de tratamiento del tejido con la solución que contiene 1,2-octanodiol y etanol puede variar dentro del intervalo de desde 2 horas a siete días, preferiblemente está entre 16 a 72 horas.

- 25 Al final de la etapa de eliminación de los fosfolípidos, los tejidos son lavados repetidamente a fin de eliminar tanto los restos de la solución que contiene 1,2-octanodiol y etanol como los fosfolípidos solubilizados y los residuos celulares formados.

- 30 A continuación, 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.

De manera sucesiva, el tejido biológico es sometido a un proceso de fijación mediante la inmersión del tejido en una solución que contiene glutaraldehído a una concentración expresada en v/v comprendida dentro del intervalo de 0,10% a 2,00%, preferiblemente 0,30% a 1,00%, más preferiblemente igual a 0,5%.

- 35 La solución que contiene glutaraldehído está constituida, preferiblemente, por una solución acuosa que contiene un tampón seleccionado entre fosfato, citrato, acetato, HEPES, borato, preferiblemente fosfato. El pH de la solución a base de glutaraldehído está comprendido dentro del intervalo de 5 a 8, más preferiblemente igual a 7,4.

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 3 a 13 días.

- 40 Después de la etapa de fijación, el tejido se lava para eliminar el glutaraldehído residual no conjugado con el tejido.

A continuación, el tejido se desintoxica mediante inmersión en una solución que contiene taurina o ácido homocisteíco.

La solución de desintoxicación contiene:

- 45 i) taurina a una concentración expresada en p/v comprendida dentro del intervalo de 0,10% hasta saturación de la solución, preferiblemente igual a 0,7%, o
ii) ácido homocisteíco a una concentración expresada en p/v comprendida dentro del intervalo de 0,10% hasta saturación de la solución, preferiblemente desde 0,5% a 5%, más preferiblemente igual a 1%.

- 50 La solución que contiene la sustancia de desintoxicación se prepara en un tampón seleccionado entre fosfato, citrato, acetato, HEPES, borato, preferiblemente fosfato. El pH de dicha solución está comprendido dentro del intervalo de 4 a 9, preferiblemente 5 a 8, más preferiblemente igual a 7.

La etapa de desintoxicación se lleva a cabo a una temperatura por encima de 30°C, preferiblemente comprendida dentro del intervalo de 35°C a 45°C, más preferiblemente igual a 40°C. El período de tratamiento del tejido con la solución de desintoxicación puede variar dentro del intervalo de 2 a 96 horas, preferiblemente 12 a 48 horas, más preferiblemente es igual a 24 horas.

- 5 Al final de la etapa de desintoxicación, el tejido se somete a lavado.

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.

- 10 Los resultados de la presente descripción muestran que la etapa de eliminación de los fosfolípidos de la membrana, además de reducir el número de sitios de unión del calcio, conduce a una considerable potenciación de la etapa de desintoxicación, es decir, una neutralización más eficaz de los grupos aldehído no conjugados, mediante la sustancia de desintoxicación.

Además, la eliminación de los fosfolípidos de la membrana y, en consecuencia, de las células retenidas en el tejido, facilita la reticulación más homogénea del colágeno por el glutaraldehído debido a la mejor penetración del glutaraldehído dentro del tejido y a la mejor organización espacial de las fibras de colágeno.

- 15 Al final del proceso, este da como resultado reacciones de desintoxicación más satisfactorias. El ácido homocistéico y la taurina penetran más libremente dentro del tejido y son capaces de desintoxicar el tejido a un grado mayor.

El pretratamiento con una solución de etanol y octanodiol constituye no solamente una eliminación de los fosfolípidos procedentes del tejido, sino también una preparación del tejido para una reticulación más eficaz y posterior desintoxicación, actuando sinérgicamente con el agente de desintoxicación.

- 20 Además, la realización del tratamiento de desintoxicación con taurina y ácido homocistéico a una temperatura por encima de la temperatura ambiente (aproximadamente igual a 20°C) conduce a mayor eficacia del tratamiento, reduciendo, de manera substancial, el número de grupos aldehído no conjugados presentes en el tejido fijado con respecto al tejido sometido al mismo tratamiento a temperatura ambiente.

- 25 A continuación, se describirá en detalle una realización particular del procedimiento descrito en la presente invención.

Materiales y procedimientos

Recogida y prefijado de tejido biológico

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

- 30 Las piezas de pericardio se seleccionaron en base al espesor y a la ausencia de efectos evidentes, tales como falta de homogeneidad o de espesor, la presencia de vascularización, 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.

Tratamiento del tejido para la eliminación de los fosfolípidos

- 35 Después de la prefijación, los tejidos se sumergieron en una solución compuesta de 5% v/v de 1,2-octanodiol, 40% v/v de etanol en tampón de HEPES a pH 7,2. El tratamiento tiene una duración de 16 a 72 horas a 37°C, con agitación suave. Aproximadamente se usaron 200 ml de solución de tratamiento para cada pieza de tejido con dimensiones de aproximadamente 10x 5 cm.

- 40 Al final del tratamiento, los tejidos se lavaron durante 96 horas en solución salina o en HEPES a pH 7,2 o en tampón de fosfato a pH 7,4. El lavado se llevó a cabo a temperatura ambiente, con agitación vigorosa, cambiando el tampón cada 6 a 12 horas, usando 200 ml de solución de lavado para cada pieza de tejido, en cada cambio.

A continuación, se llevó a cabo el cortado y conformado del tejido, de acuerdo con las técnicas conocidas, por ejemplo, para válvulas cardíacas.

Fijación del tejido

- 45 Los tejidos se fijaron durante un período comprendido dentro del intervalo de 3 a 13 días a temperatura ambiente, en una solución de glutaraldehído al 0,50% v/v en tampón de fosfato a pH 7,4.

Al final de la fijación, los tejidos se sometieron a lavado durante 48 horas en tampón de fosfato a pH 7,4 o en solución fisiológica estéril. El lavado se llevó a cabo a temperatura ambiente, con agitación suave, cambiando el tampón aproximadamente cada 12 horas, usando 200 ml de solución de lavado para cada tejido, en cada cambio.

Desintoxicación del tejido

A continuación, el tejido biológico se sometió a desintoxicación mediante inmersión en una solución acuosa que contenía i) taurina a una concentración p/v de aproximadamente 0,70% en tampón de fosfato a pH 7, o ii) ácido homocistéico a una concentración p/v de 1,00% en tapón de fosfato.

- 5 La etapa de desintoxicación se llevó a cabo a una temperatura superior a la temperatura ambiente (20°C), preferiblemente a 40°C durante 24 horas.

Para cada muestra se usaron aproximadamente 200 ml de solución de desintoxicación.

- 10 Al final de la etapa de desintoxicación, los tejidos se sometieron a lavado 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 tejido, en cada cambio.

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

Determinación semicuantitativa de los grupos aldehído libres

- 15 La evaluación de los grupos aldehídos libres y, por ello, de la eficacia del tratamiento descrito en la presente invención, se llevó a cabo sobre dos grupos de muestras, de acuerdo con lo descrito en los puntos a) y b), a continuación.

- a) Para demostrar la mayor eficacia del tratamiento de desintoxicación a una temperatura superior a la temperatura ambiente, los inventores presentes determinaron semicuantitativamente el número de grupos aldehído libres en cinco muestras de tejido biológico tratadas como sigue:

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

-una segunda muestra de control (Figura 1B) fijada con glutaraldehído y desintoxicada con una solución que contiene ácido homocistéico a temperatura ambiente (20°C);

-una tercera muestra de control (Figura 1C) fijada con glutaraldehído y desintoxicada con una solución que contiene ácido homocistéico a 40°C.

- 25 b) Para demostrar que la eficacia de la desintoxicación a una temperatura superior a la temperatura ambiente está potenciada por el tratamiento previo para eliminar los fosfolípidos de la membrana, los inventores presentes determinaron semicuantitativamente el número de grupos aldehído libres en otro grupo de muestras de tejido biológico tratadas como sigue:

-una primera muestra de control fijada y no desintoxicada (Figura 2A);

- 30 -una segunda muestra fijada y desintoxicada con una solución que contiene ácido homocistéico a temperatura ambiente, 20°C (Figura 2B);

-una tercera muestra sometida a un tratamiento para la eliminación de los fosfolípidos, fijada y desintoxicada con una solución que contiene ácido homocistéico a temperatura ambiente, 20°C (Figura 2C);

- 35 -una cuarta muestra fijada y desintoxicada con una solución que contiene ácido homocistéico a 40°C (Figura 2D);

-una quinta muestra sometida a un tratamiento para la eliminación de los fosfolípidos, fijada y desintoxicada con una solución que contiene ácido homocistéico a 40°C (Figura 2E).

Teñido con fucsina del tejido

- 40 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.

La solución de tratamiento es incolora en principio y desarrolla un color violeta en la presencia de los grupos aldehído libres sobre el tejido.

- 45 Las muestras para teñir se cortaron para obtener piezas con dimensiones de aproximadamente 1,5 x 1,5 cm y, a continuación, se sumergieron en el tinte, aproximadamente 10 cm, cada pieza en un tubo ensayo separado.

El tinte es 1,00% de hidrocloreuro de rosanilina, 4,00% de metabisulfito sódico en ácido clorhídrico 0,25 M. Los tejidos permanecieron sumergidos en el tinte durante 5 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave.

A continuación, cada pieza 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 piezas permanecieron sumergidas en esta solución de lavado durante 10 minutos, con agitación suave.

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

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

- 10 Al final, las piezas se transfirieron a tampón de fosfato a pH 7 y se fotografiaron para documentar las diferencias en el teñido.

Espectroscopia de reflectancia

Las muestras teñidas se sometieron a espectroscopia de reflectancia para evaluar semicuantitativamente las diferentes características cromáticas al 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 del contenido en fosfolípidos del tejido

Los inventores presentes han medido la concentración de fosfolípidos en los tejidos biológicos mediante un procedimiento espectrofotométrico para demostrar:

- 25 -la eficacia del tratamiento del tejido con una solución que contiene 1,2-octanodiol y etanol, y
-que la etapa de fijación y desintoxicación llevada a cabo de manera sucesiva al tratamiento del tejido con una solución que contiene 1,2-octanodiol y etanol no interfiere sobre el contenido en fosfolípidos del tejido.

A este fin, los análisis cuantitativos se llevaron a cabo sobre muestras tratadas como sigue:

- 30 -una primera muestra de control fijada y no desintoxicada (Figura 3A);
-una segunda muestra fijada y desintoxicada con una solución que contiene ácido homocistéico a 40°C (Figura 3B);
-una tercera muestra sometida a tratamiento para eliminar los fosfolípidos, fijada y desintoxicada con una solución que contienen ácido homocistéico a 40°C (Figura 3C).

- 35 Para la determinación espectrofotométrica del contenido en fosfolípidos, se recuperó una pieza de 300 mg procedente de cada tejido tratado. Cada pieza se sometió a numerosos lavados en solución salina sin iones fosfato, para eliminar todo el tampón de fosfato residual. A continuación, las piezas se retiraron de la solución salina y se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de solución salina. A continuación, las piezas se pesaron y trituraron. Cada pieza pulverizada de este modo se extrajo en una solución caliente de etanol/éter etílico, 3/1. A continuación, el extracto se secó.

- 40 Los extractos se sometieron a un tratamiento de digestión ácido realizado mediante la adición de 650 ml de ácido perclórico al 60% a cada muestra durante 30 minutos a 160°C. Esta etapa transforma el fósforo presente en el fosfato inorgánico que será determinado espectrofotométricamente. Al final de los 30 minutos, las muestras se dejaron enfriar y se mezclaron con una solución constituida por 3,3 ml de agua destilada. 500 ul de una solución que contenía ácido ascórbico al 10% en agua destilada, 500 ul de molibdato amónico al 1% en agua destilada. Las muestras se
45 llevaron a 100°C durante 5 minutos y se centrifugaron. A continuación, se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 820 nm. La concentración de fosfato se dedujo a partir de una curva patrón construida usando una solución de concentración de fosfato inorgánico conocida, como un patrón. El fosfato determinado los extractos es proporcional a la concentración en fosfolípidos de las muestras.

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:

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

Resultados

Desintoxicación

La eficacia del procedimiento descrito en la presente invención y, en consecuencia, la reacción que tiene lugar entre los grupos amino de la molécula de desintoxicación 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.

Como se ha demostrado mediante la variación en la intensidad de teñido de los tejidos mostrada en la Figura 1, el incremento de temperatura incrementa la eficacia del tratamiento de desintoxicación. Una muestra desintoxicada a 40°C con taurina, muestra E, tiene un teñido mucho más débil con respecto a una muestra de control, muestra A, y con respecto a una muestra desintoxicada con taurina a temperatura ambiente, muestra C.

De la misma manera, se llevó a cabo el tratamiento de desintoxicación con ácido homocistéico a 40°C dando como resultado una intensidad de teñido débil, muestra D, con respecto a la muestra de control A, y con respecto a la muestra tratada con ácido homocistéico a temperatura ambiente, muestra B.

Por ello, estos resultados demuestran la superior eficacia del tratamiento de desintoxicación llevado a cabo a una temperatura superior a la temperatura ambiente, preferiblemente superior a 30°C usando tanto taurina como ácido homocistéico.

Esta observación se confirmó mediante el análisis espectrofotométrico de reflectancia de las muestras. La reflectancia de cada muestra depende de la intensidad del teñido y es posible asociar un valor de porcentaje de reflectancia a cada muestra mediante el análisis espectroscópico de reflectancia.

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

Como puede apreciarse 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 5,8 para la muestra no desintoxicada mostrada en la Figura 1A y valores superiores, 9 y 13, para muestras desintoxicadas con ácido homocistéico y taurina, respectivamente, a temperatura ambiente, mostradas en las Figuras 1B y 1C. Decididamente, se observaron valores superiores para muestras desintoxicadas con soluciones que contenían ácido homocistéico o taurina a 40°C, tal como se observa en las muestras de las Figuras 1D y 1E.

Tabla 1

Muestra	Teñido observado	% de reflectancia a 570 nm
A - fijada, no desintoxicada	Púrpura muy intenso	5,8
B – fijada, ácido homocistéico a temperatura ambiente	Violeta	9
C – fijada, taurina a temperatura ambiente	Violeta pálido	13
D – fijada, ácido homocistéico a 40°C	Rosa oscuro	15
E – fijada, taurina a 40°C	Rosa	19

Estos resultados confirman que el tratamiento con taurina o ácido homocistéico a 40°C es más eficaz que los tratamientos respectivos llevados a cabo a temperatura ambiente para la neutralización de los grupos aldehído libres sobre el tejido fijado.

Igualmente, se demostró que la etapa de eliminación de los fosfolípidos que precede a las etapas de fijación y desintoxicación del tejido, potencia la eficacia de la taurina o del ácido homocistéico en la neutralización de los grupos

aldehydos que permanecen libres en el tejido fijado cuando la desintoxicación se lleva a cabo a temperatura ambiente. La Figura 2 muestra que la intensidad de tñido de las muestras desintoxicadas con ácido homocistéico a temperatura ambiente, muestra C, después de tratamiento con 1,2-octanodiol y etanol, es decididamente inferior que la intensidad de tñido de la muestra desintoxicada con ácido homocistéico a temperatura ambiente, muestra B, sin el tratamiento previo con la solución que contiene 1,2-octanodiol y etanol para eliminar los fosfolípidos.

Se obtuvieron incluso mejores resultados cuando la etapa de eliminación de los fosfolípidos precede a la etapa de desintoxicación llevada a cabo a 40°C, muestra E, sometida a tratamiento de extracción de los fosfolípidos y desintoxicada con ácido homocistéico a 40°C, muestra un mejor resultado con respecto a la muestra D desintoxicada con ácido homocistéico a 40°C, pero no sometida al tratamiento con 1,2-octanodiol y etanol.

La intensidad de tñido de dichas muestras es decididamente menos intensa que la intensidad de tñido de muestras de control no desintoxicadas, muestra A.

Los resultados del análisis espectroscópico de reflectancia para las muestras mostradas en la Figura 2 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Muestra	Tñido observado	% de reflectancia a 570 nm
A - fijada, no desintoxicada	Púrpura muy intenso	5,8
B – fijada, ácido homocistéico a temperatura ambiente	Violeta	9
C – eliminación de fosfolípidos, fijada, ácido homocistéico a temperatura ambiente	Violeta claro	14
D – fijada, ácido homocistéico a 40°C	Rosa oscuro	16
E – eliminación de fosfolípidos, fijada, ácido homocistéico a 40°C	Rosa pálido/incoloro	22

Se obtuvieron Incluso mejores resultados cuando la etapa de desintoxicación se llevó a cabo con taurina, siendo esta más eficaz que el ácido homocistéico para la neutralización de los grupos aldehídos libres previamente a temperatura ambiente, incluso sin la etapa de eliminación de los fosfolípidos, tal como se muestra en la Figura 1.

Contenido en fosfolípidos

El histograma en la Figura 3 muestra que el contenido en fosfolípidos es significativamente inferior en muestras de tejido que se sumergieron en una solución que contenía 1,2-octanodiol y etanol, muestra C, con respecto a una muestra de control no tratada con la misma solución, muestra A.

Además, puede observarse que el contenido en fosfolípidos no está influenciado por la etapa de desintoxicación con ácido homocistéico a 40°C sola, muestra B.

Temperatura de contracción

Con el fin de verificar que el tratamiento para la eliminación de los fosfolípidos y el tratamiento de desintoxicación no altera la reticulación de los tejidos biológicos obtenidos mediante su tratamiento con una solución que contiene glutaraldehído, las temperaturas de contracción para los tejidos tratados se compararon con las temperaturas de contracción de un tejido de control fijado y no tratado.

Las temperaturas de contracción de los tejidos fijados y tratados con taurina o ácido homocistéico, ambos a temperatura ambiente y a temperaturas superiores, son indistinguibles de la temperatura de contracción de los tejidos fijados y no desintoxicados, siendo dicha temperatura a 85-86°C.

Por tanto, los tratamientos de desintoxicación no tienen efectos significativos sobre el nivel de reticulación del tejido.

Realmente, cuando los tejidos son sometidos a la etapa de eliminación de los fosfolípidos, fijados y, a continuación, tratados con soluciones que contienen taurina o ácido homocistéico, se observa un pequeño incremento en la temperatura de contracción. Por tanto, este resultado demuestra que el tejido sometido a la etapa de eliminación de los fosfolípidos, fijados y, a continuación, desintoxicados, tiene mejor reticulación.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de tratamiento de un tejido biológico para prótesis biológicas, comprendiendo dicho procedimiento las etapas:
 - 5 -fijación del tejido biológico mediante un tratamiento con una solución de fijación que contiene glutaraldehído;
 - eliminación de los fosfolípidos procedentes del tejido biológico mediante un tratamiento con una solución de eliminación que contiene 1,2-octanodiol y etanol;
 - 10 -desintoxicación mediante un tratamiento con una solución desintoxicante que contiene taurina o ácido homocistéico a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, preferiblemente por encima de 30°C, en el que la etapa de eliminación de los fosfolípidos se lleva a cabo antes de dicha etapa de fijación.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha solución de eliminación contiene 1,2-octanodiol en una concentración expresada en v/v comprendida dentro del intervalo de 1% a 25%, preferiblemente 2% a 10%, más preferiblemente 5%.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha solución de eliminación contiene etanol en una concentración expresada en v/v comprendida dentro del intervalo de 25% a 49%, preferiblemente 30% a 45%, más preferiblemente 40%.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha solución de eliminación tiene un pH comprendido dentro del intervalo de 4 a 9, preferiblemente 5 a 8, más preferiblemente de 7,4.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa de eliminación de los fosfolípidos se lleva a cabo a una temperatura entre 15°C y 65°C, preferiblemente entre 30°C y 40°C, más preferiblemente a 37°C.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa de eliminación de los fosfolípidos se lleva a cabo durante un período de tiempo comprendido dentro del intervalo de 2 a 7 días, preferiblemente 16 a 72 horas.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa de eliminación de fosfolípidos se lleva a cabo antes de dicha etapa de desintoxicación.
- 40 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha etapa de eliminación de los fosfolípidos se lleva a cabo en dos fases; una primera fase llevada a cabo antes de dicha etapa de fijación y una segunda fase llevada a cabo simultáneamente a dicha etapa de desintoxicación, en el que dicha solución de desintoxicación contiene además 1,2-octanodiol y etanol.
- 45 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha solución de desintoxicación contiene taurina a una concentración expresada en p/v dentro del intervalo de desde 0,10% hasta saturación, preferiblemente desde 0,20% hasta 1,00%, más preferiblemente 0,70%.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha solución de desintoxicación contiene ácido homocistéico a una concentración expresada en p/v dentro del intervalo de desde 0,10% hasta saturación, preferiblemente desde 0,50% hasta 5,00%, más preferiblemente 1,00%.
- 55 11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha etapa de desintoxicación se lleva a cabo a una temperatura mayor de 30°C, preferiblemente entre 35°C y 45°C, más preferiblemente a 40°C.
- 60 12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha solución de desintoxicación tiene un pH comprendido dentro del intervalo de 4 a 9, preferiblemente 5 a 8, más preferiblemente de 7.
- 65 13. 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 36 horas, preferiblemente 12 a 48 horas, más preferiblemente 24 horas.

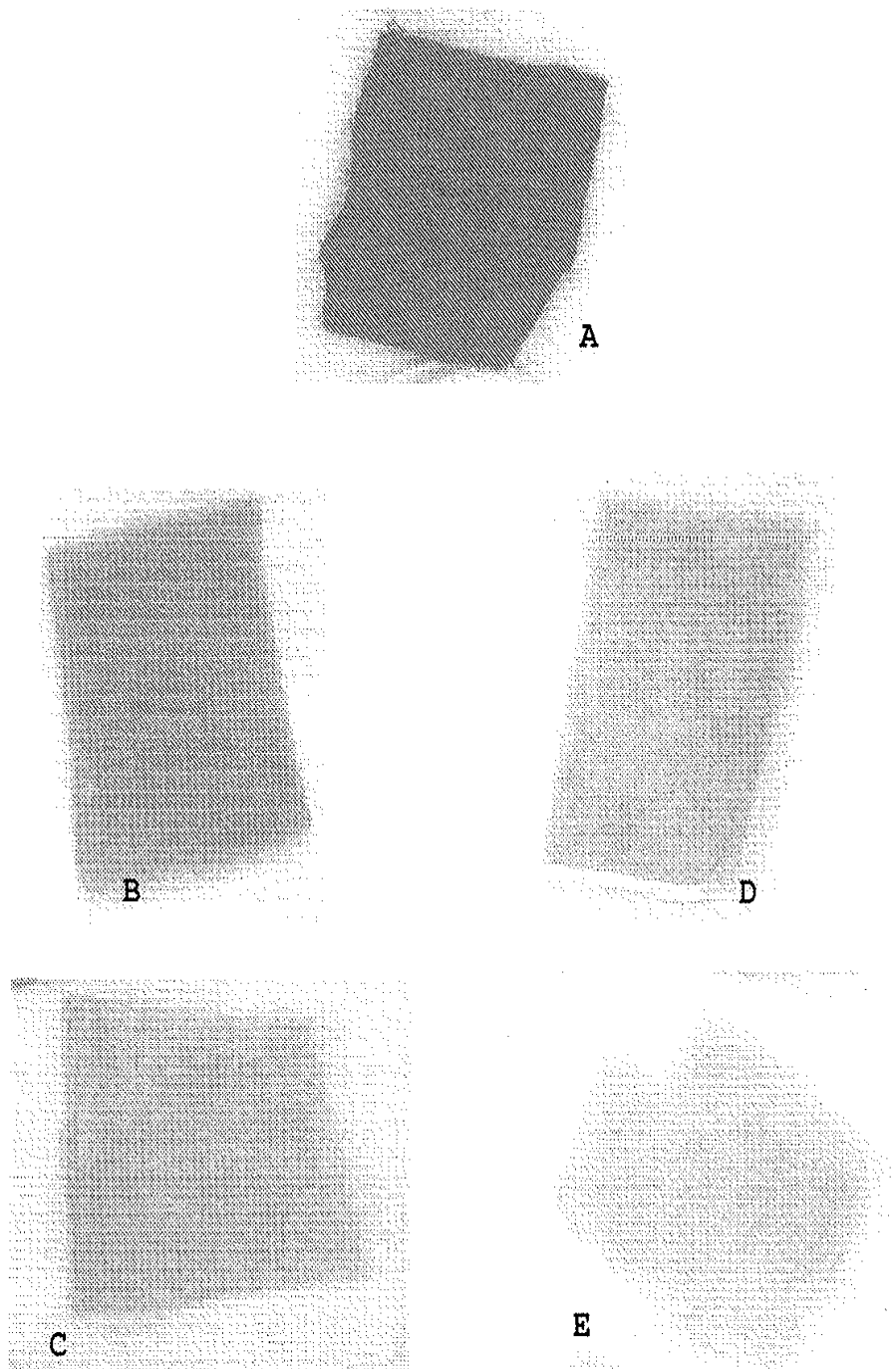


Figura 1

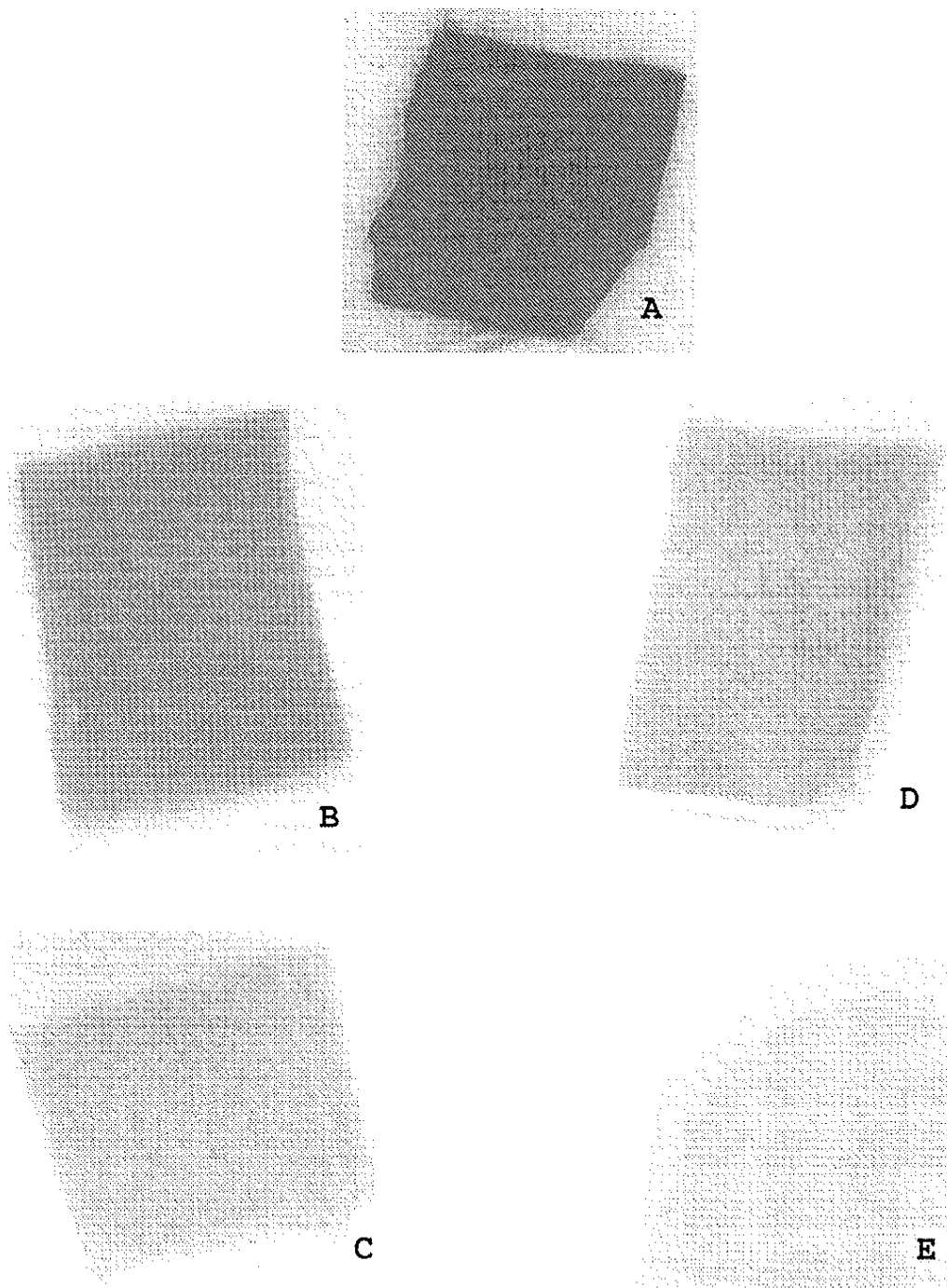


Figura 2

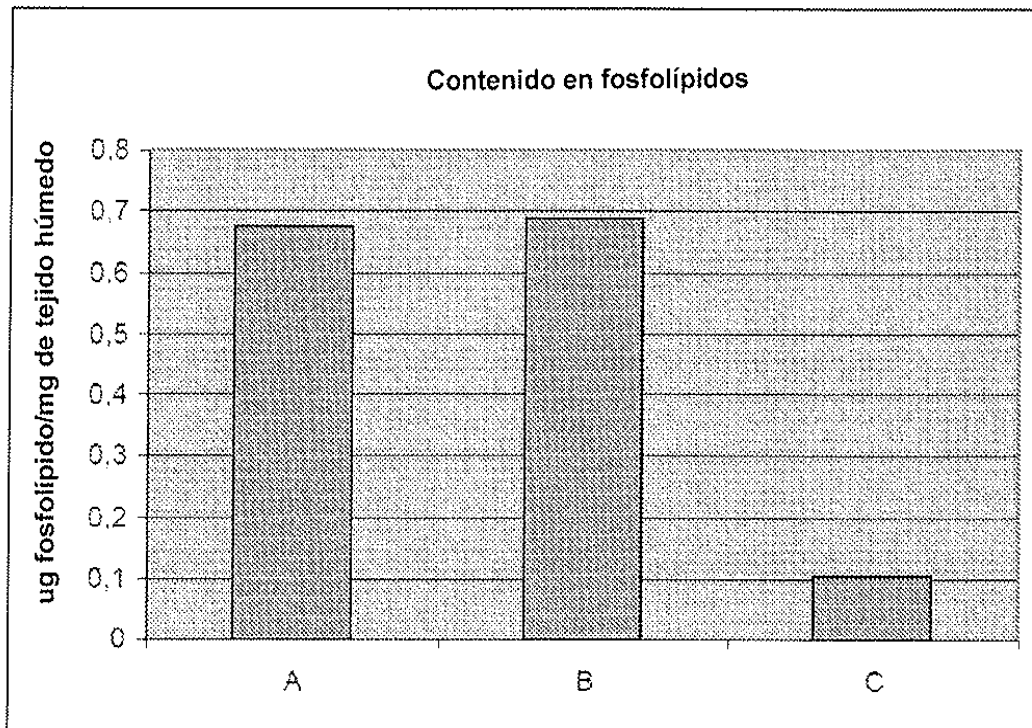


Figura 3