

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 988**

51 Int. Cl.:

A61M 1/16 (2006.01)

B01D 69/00 (2006.01)

B01D 71/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2013 PCT/US2013/046042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13188861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2013 E 13733175 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2861272**

54 Título: **Sistemas para reducir la concentración de dióxido de carbono en la sangre**

30 Prioridad:

15.06.2012 US 201261660013 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (100.0%)
200 Gardner Steel Conference Center Thackeray
& O'Hara Streets
Pittsburgh, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**FEDERSPIEL, WILLIAM, J.;
ARAZAWA, DAVID, T. y
KIMMEL, JEREMY, D.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 645 988 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

Sistemas para reducir la concentración de dióxido de carbono en la sangre

Referencias cruzadas con las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/660.013, presentada el 15 de junio de 2012.

Interés gubernamental

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno bajo la subvención N° HL70051 otorgada por el National Institute of Health: National Heart, Lung, and Blood Institute. El gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes

10 La siguiente información se proporciona para ayudar al lector a comprender los dispositivos, sistemas, métodos y otras tecnologías que se divulgan a continuación y el entorno en el que normalmente se utilizarán. Los términos que se usan aquí no tienen la intención de limitarse a ninguna interpretación particular específica a menos que se indique claramente lo contrario en este documento. Las referencias que se establecen en este documento pueden facilitar la comprensión de los dispositivos, métodos de sistemas y otras tecnologías que se divulgan a continuación o sus
15 antecedentes.

En casos de insuficiencia respiratoria, la eliminación de dióxido de carbono (CO₂), en lugar de la administración de oxígeno (O₂), es a menudo un obstáculo principal en el tratamiento. El potencial terapéutico de la eliminación de dióxido de carbono extracorpóreo (ECCO₂R) para facilitar las estrategias de ventilación pulmonar se ha establecido a través de dispositivos ECCO₂R parciales tales como el dispositivo de asistencia pulmonar intervencionista
20 NOVALUNG® (un ventilador de membrana/pulmón artificial extracorpóreo) disponible en Novalung GmbH de Heilbronn, Alemania y el sistema de asistencia respiratoria HEMOLUNG® (un sistema de asistencia respiratoria/pulmón artificial extracorpóreo) disponible en ALung Technologies de Pittsburgh, Pennsylvania, EE. UU. Dichos dispositivos, que se denominan a veces pulmones artificiales, se emplean para oxigenar la sangre y eliminar el CO₂. Los pulmones artificiales a base de membrana de fibra hueca (HFM) comenzaron a reemplazar a los
25 oxigenadores de burbujas en la década de 1980. En ese sentido, los pulmones artificiales que se basan en HFM exhiben un mejor rendimiento de intercambio de gases en comparación con los oxigenadores de burbujas. El primer pulmón artificial de tipo HFM se desarrolló en 1971. Sin embargo, el rendimiento de los primeros oxigenadores era inaceptable como resultado de la humectación de la fibra y problemas de fuga de plasma.

Las fibras compuestas, que se construyen con una capa de membrana verdadera entre las paredes microporosas,
30 están disponibles comercialmente. Aunque la fibra compuesta tuvo una excelente resistencia a la humectación del plasma, la permeabilidad de la membrana era insuficiente para la oxigenación intravenosa. Los avances recientes en la tecnología de membranas, sin embargo, han permitido el desarrollo de membranas nobles tales como la membrana de fibra hueca que se basa en poliolefinas, que exhiben tanto una buena permeabilidad a los gases como una alta resistencia a la humectación del plasma.

Los dispositivos de pulmón artificial disponibles actualmente incluyen típicamente haces de membranas microporosas de fibra hueca a través de las cuales pasa el oxígeno mientras se perfunde sangre alrededor de las
35 fibras. En *Federspiel WJ, Henchir KA. 2004. Lung, Artificial: Basic principles and current applications. Encyclo Biomat Biomed Eng 910-921.*, se proporciona una revisión de la tecnología de membrana de fibras huecas y pulmones artificiales. En general, el oxígeno se transfiere desde el lumen de las fibras a la sangre; mientras que el CO₂ se transfiere de la sangre al lumen de las fibras y se elimina del dispositivo. En el modelo de pulmón artificial actual, que se basa en la difusión pasiva, la eficiencia del intercambio de gases de CO₂ y O₂ está limitada por la
40 relación del área de superficie de la fibra al volumen de sangre. El intercambio de gases se puede mejorar aumentando esta relación a costa de aumentar el tamaño total del dispositivo pulmonar artificial. Además, las tasas de eliminación de CO₂ se limitan a tasas de flujo sanguíneo más bajas.

45 Se describe un oxigenador intravenoso en US2003/0133835.

Resumen

La invención se define por las características de la reivindicación independiente 1. Los métodos que se describen no forman parte de la materia reivindicada.

50 En un aspecto, un método para eliminar al menos una porción de dióxido de carbono de un fluido acuoso incluye colocar una primera superficie de al menos una membrana a través de la cual puede pasar al fluido dióxido de

carbono y al menos un gas ácido distinto del dióxido de carbono en contacto con el fluido. La membrana limita o impide el paso del fluido/líquido a través de la misma. Un transportador o gas de barrido que incluye el gas ácido distinto del dióxido de carbono pasa sobre una segunda superficie (la cual se opone típicamente a la primera superficie) de la membrana para que el gas ácido distinto del dióxido de carbono pueda pasar al fluido a través de la membrana, y el dióxido de carbono del fluido puede pasar del líquido fluido a través de la membrana y al gas de barrido.

En varias realizaciones, el fluido es un fluido sanguíneo. El término "fluido sanguíneo" como se usa en este documento incluye sangre o sangre completa, un componente de la sangre, mezclas de componentes sanguíneos, así como sangre, un componente sanguíneo o una mezcla de componentes sanguíneos que se han tratado y/o alterado en cualquier manera (por ejemplo, mediante la adición de uno o más componentes no sanguíneos).

En varias realizaciones, el gas ácido es biocompatible. Como se usa en aquí, el término "biocompatible" se refiere generalmente a la compatibilidad con tejido vivo o un sistema vivo. El gas ácido y/o cualquier subproducto del mismo pueden, por ejemplo, ser de origen natural y/o metabolizable en el cuerpo. Los gases ácidos se seleccionan adicionalmente por su capacidad de liberar un protón H⁺ tras disolverse en un ambiente acuoso. Ejemplos de gases ácidos adecuados incluyen dióxido de azufre (SO₂), sulfuro de hidrógeno (H₂S), dióxido de nitrógeno (NO₂), óxido nítrico (NO), yoduro de hidrógeno (HI), cloruro de hidrógeno (HCl), fluoruro de hidrógeno (HF) y/o bromuro de hidrógeno (HBr). En el caso de, por ejemplo, el SO₂, los subproductos, incluidos el ácido sulfuroso, el bisulfito y el sulfito, se producen naturalmente y se metabolizan en el cuerpo. En una serie de estudios representativos del presente documento, se utilizó el SO₂ como gas ácido en un gas de barrido. Mientras que el bisulfito y otros productos de gas ácido son de origen natural, dichos productos y/u otros productos o subproductos pueden ser tóxicos si se introducen por encima de cierta concentración. En algunos casos, se puede usar un sistema tal como un sistema de diálisis u otro sistema de eliminación/separación para eliminar productos ácidos de un fluido sanguíneo antes de que el fluido sanguíneo se devuelva al cuerpo.

La membrana incluye anhídrida carbónica inmovilizada en o cerca de la primera superficie de la misma, de manera que la anhídrida carbónica inmovilizada entre en contacto con el fluido. La primera superficie puede, por ejemplo, exhibir una actividad de anhídrida carbónica de al menos 20%, 40%, 60%, 80% o 100% de la actividad teórica máxima de la primera superficie de la membrana, que se basa en la cobertura superficial en monocapa de anhídrida carbónica, para el caso de que la anhídrida carbónica se encuentre inmovilizada en la primera superficie. En varias realizaciones, la primera superficie exhibe una actividad de anhídrida carbónica que excede la actividad teórica máxima de la primera superficie de la membrana en base a la cobertura de la superficie en monocapa de la anhídrida carbónica.

La anhídrida carbónica puede inmovilizarse, por ejemplo, en la membrana mediante adsorción, enlace covalente, enlace iónico o quelación. En varias realizaciones, la anhídrida carbónica se une covalentemente a la membrana.

La membrana puede incluir, por ejemplo, un material polimérico. El material polimérico puede ser, por ejemplo, microporoso o permeable de manera que el CO₂ y al menos un gas ácido distinto del CO₂ pueda pasar a través del mismo. En varias realizaciones, el material polimérico es microporoso y suficientemente hidrófobo de modo que sus poros permanecen llenos de gas después de poner en contacto la sangre u otros fluidos acuosos. En varias realizaciones, el material polimérico es un material polimérico olefínico.

En varias realizaciones, la anhídrida carbónica se une covalentemente a una primera superficie de una fibra hueca polimérica microporosa. La primera superficie puede ser, por ejemplo, una superficie exterior de la fibra hueca. Un lumen interior de la fibra hueca se puede adaptar, por ejemplo, para tener flujo de oxígeno a través del mismo. El gas de barrido puede incluir, por ejemplo, más oxígeno. La fibra hueca se puede adaptar, por ejemplo, para pasar oxígeno al fluido sanguíneo y al menos un gas ácido distinto del dióxido de carbono mientras que el dióxido de carbono pasa desde el fluido sanguíneo al lumen interior de la fibra hueca. En varias realizaciones, la anhídrida carbónica se une covalentemente a una capa polimérica no porosa permeable sobre una superficie exterior de una fibra hueca polimérica microporosa. Una pluralidad de membranas que se forman por una pluralidad de fibras huecas se puede poner, por ejemplo, en contacto con el fluido. La capa polimérica no porosa permeable puede incluir, por ejemplo, silicona permeable al CO₂.

En varias realizaciones, la membrana incluye una capa porosa y una capa no porosa permeable a los gases, adyacente a la capa porosa.

El método puede incluir además, por ejemplo, poner en contacto el fluido sanguíneo con la anhídrida carbónica libre. El dióxido de carbono puede estar presente en el fluido, por ejemplo, en forma de ion bicarbonato.

En otro aspecto, un dispositivo o sistema del mismo para la eliminación de al menos una porción de dióxido de carbono de un fluido acuoso, incluye al menos una membrana que incluye una primera superficie y una segunda superficie. La membrana se adapta para pasar a través de la misma, dióxido de carbono y al menos un gas ácido

5 distinto del dióxido de carbono. La membrana se adapta adicionalmente para limitar o evitar el paso del fluido a través de la misma. El dispositivo y/o sistema incluye además un gas de barrido que incluye el gas ácido distinto del dióxido de carbono. El gas de barrido pasa sobre la segunda superficie de al menos una membrana para que el gas ácido distinto del dióxido de carbono pueda pasar al líquido a través de la membrana y el dióxido de carbono del líquido pueda pasar del líquido a través de la membrana y al gas de barrido.

En varias realizaciones, el fluido es un fluido sanguíneo (por ejemplo, sangre completa o un componente de sangre tal como plasma sanguíneo, etc.). En varias realizaciones, la membrana incluye anhídrida carbónica inmovilizada en o cerca de la primera superficie de la misma, de manera que la anhídrida carbónica inmovilizada entre en contacto con el fluido.

10 Todavía en un aspecto adicional, un dispositivo de asistencia respiratoria o un sistema de asistencia respiratoria para la eliminación de al menos una porción de dióxido de carbono de un fluido sanguíneo del mismo incluye una pluralidad de membranas de fibra hueca. Cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca incluye una primera superficie o superficie interna y una segunda superficie o superficie exterior. Cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca se adapta para pasar a través de la misma, dióxido de carbono, oxígeno y al menos un
 15 gas ácido distinto del dióxido de carbono. Cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca se adapta adicionalmente para limitar o evitar el paso del fluido sanguíneo a través de la misma. El dispositivo y/o sistema incluye además un gas de barrido que incluye el gas ácido distinto del dióxido de carbono y el oxígeno. El gas de barrido pasa a través de cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca para que el gas ácido distinto del dióxido de carbono y el oxígeno pueda pasar a través de cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca en
 20 el fluido sanguíneo, y el dióxido de carbono del fluido sanguíneo puede pasar desde el líquido a través de cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca y al gas de barrido. Cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca puede incluir, por ejemplo, anhídrida carbónica inmovilizada en o cerca de la primera superficie de la misma de manera que la anhídrida carbónica inmovilizada entre en contacto con el fluido sanguíneo.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 ilustra una comparación de la eliminación de CO₂ para un sistema que incluye anhídrida carbónica o CA inmovilizada sobre membranas de fibra hueca (HFM) con oxígeno o gas de barrido de O₂, un sistema que incluye HFM sin CA (HFM no modificada) y un gas de barrido que incluye O₂ y 1% de SO₂ (porcentaje en volumen) y un sistema que incluye CA inmovilizada sobre la HFM y un gas de barrido que incluye O₂ y 1% de SO₂.

30 La Figura 2A ilustra un diagrama esquemático de una realización de un dispositivo de prueba o un dispositivo de asistencia respiratoria del mismo que se usa para medir las tasas de eliminación de CO₂.

La Figura 2B ilustra una realización de un sistema experimental que se usa en evaluaciones de intercambio de gases de CO₂ in vitro del mismo.

Las Figuras 3A ilustran esquemáticamente la eliminación de CO₂ a través de una membrana de fibra hueca que incluye CA inmovilizada con un gas de barrido de O₂.

35 La Figura 3B ilustra esquemáticamente la introducción de gas ácido diluido en la corriente de gas de barrido para aumentar la concentración de H⁺ en una capa límite líquida adyacente a la membrana de fibra hueca para cambiar el equilibrio y aumentar la catálisis del CO₂.

La Figura 4 ilustra el efecto sobre el pH de la sangre de la concentración de SO₂ en el gas de barrido.

La Figura 5 ilustra el efecto sobre la pCO₂ de la concentración de SO₂ en el gas de barrido.

40 La Figura 6 ilustra el efecto de la concentración de SO₂ en el gas de barrido sobre la tasa de eliminación de CO₂ para la HFM no modificada y la HFM modificada con CA inmovilizada.

La Figura 7A ilustra el efecto de la concentración de SO₂ en el gas de barrido sobre el incremento porcentual en la eliminación de CO₂ para la HFM no modificada y la HFM modificada con CA inmovilizada.

45 La Figura 7B ilustra el efecto de la concentración de SO₂ dentro de un gas de barrido de oxígeno sobre la concentración de sulfito en el fluido que sale del dispositivo.

La Figura 8A ilustra la unión covalente de CA directamente a una capa de siloxano aminado permeable y no poroso de una HFM.

La Figura 8B ilustra la unión covalente de CA a una capa de siloxano aminado permeable y no poroso de una HFM a través de un grupo espaciador de polímero.

Descripción detallada

5 Se entenderá fácilmente que los componentes de las realizaciones, tal como se describen e ilustran en general en las figuras de este documento, se pueden disponer y diseñar en una amplia variedad de configuraciones diferentes además de las realizaciones de ejemplo que se describen. Por lo tanto, la siguiente descripción más detallada de las realizaciones de ejemplo, tal como se representa en las figuras, no pretende limitar el alcance de las realizaciones, como se reivindica, sino que es meramente representativo de las realizaciones de ejemplo.

10 La referencia en toda esta especificación a "una realización" o "alguna realización" (o similar) significa que un rasgo, estructura o característica particular que se describe en conexión con la realización se incluye en al menos una realización. Por lo tanto, la aparición de las frases "en una realización" o "en alguna realización" o similares en diversos lugares a lo largo de esta especificación, no se refiere necesariamente a la misma realización.

15 Además, los rasgos, estructuras o características que se describen se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones. En la siguiente descripción, se proporcionan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones. Un experto en la técnica relevante reconocerá, sin embargo, que las diversas realizaciones se pueden poner en práctica sin uno o más de los detalles específicos, o con otros métodos, componentes, materiales, etcétera. En otros casos, para evitar la confusión, no se muestran o se describen en detalle las estructuras, materiales u operaciones bien conocidos.

20 Como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un gas ácido" incluye una pluralidad de tales gases ácidos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y demás, y la referencia a "gas ácido" es una referencia a uno o más de tales gases ácidos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y demás.

25 El dióxido de carbono está presente en la sangre en tres formas primarias: CO₂ (disuelto), bicarbonato (HCO₃⁻) o carbamato. Como se conoce en las técnicas químicas, el CO₂ es convertible entre estas formas y las diversas formas pueden estar en equilibrio entre sí como se describe mediante una curva de disociación del CO₂. La mayor parte del CO₂ en la sangre, sin embargo, existe en forma de HCO₃⁻ en el plasma y en los glóbulos rojos. En ese sentido, aproximadamente el 94% del CO₂ del plasma y el 82% del CO₂ de los glóbulos rojos se encuentran en forma de HCO₃⁻. Las dos especies son convertibles entre sí a través de la reacción:



El CO₂ se genera a través de rutas metabólicas en el tejido y se difunde en los glóbulos rojos (RBC), en donde se hidrata en HCO₃⁻ e iones de hidrógeno (H⁺) a través de la anhidrasa carbónica intracelular (CA). Los iones de hidrógeno que se forman se unen a la hemoglobina mientras que el HCO₃⁻ se difunde en el plasma. Sin embargo, muy poco CO₂ se hidrata en el plasma debido a la falta de CA en el plasma. En los pulmones, la reacción se invierte. El HCO₃⁻ se convierte en CO₂ a través de la CA en los glóbulos rojos y luego se exhala. Algo de CA existe en el tejido pulmonar.

40 La anhidrasa carbónica o CA (EC 4.2.1.1, MW 30,000 Da) es una metaloenzima con un solo átomo de zinc, que puede catalizar efectivamente la reacción reversible de hidratación y deshidratación del CO₂ (CO₂ + H₂O ↔ H⁺ + HCO₃⁻). Un ensayo para la actividad de la anhidrasa carbónica y las reacciones que producen gases radiomarcados o pequeñas moléculas sin carga. La enzima aumenta más de 10⁵ veces las tasas de hidratación y deshidratación en comparación con las velocidades de reacción en ausencia de CA, a pesar de que es variable y depende de las isoformas. Una vez más, la CA se encuentra generalmente dentro de glóbulos rojos y el tejido pulmonar (epitelio alveolar).

45 En los métodos, dispositivos y/o sistemas presentes, el dióxido de carbono se elimina de un fluido acuoso (por ejemplo, un fluido sanguíneo) a través de una membrana mediante de un gas de barrido. El gas de barrido se usa como fuente para introducir ácido en la sangre. Sin limitación a ningún mecanismo, a diferencia de la adición masiva de ácido a sangre, solo el microambiente que rodea la membrana (por ejemplo, una membrana de fibra hueca o HFM) se acidifica significativamente, mientras que las propiedades de sangre a gran volumen permanecen sustancialmente intactas. En general, solo la presión de CO₂ directamente por fuera (es decir, adyacente a la primera superficie) de la membrana impulsa la eliminación de CO₂.

El (los) gas(es) ácido(s) en los métodos, dispositivos y/o sistema presente se pueden introducir en el gas de barrido desde cualquier fuente y de cualquier número de maneras. Por ejemplo, uno o más gases ácidos se pueden infundir directamente en el gas de filtración de uno o más tanques de gas o depósitos. Alternativamente, se puede infundir una combinación de gases en el gas de barrido, tras lo cual la mezcla en las condiciones apropiadas, da como resultado la creación de uno o más gases ácidos en el gas de barrido. Por ejemplo, el óxido nítrico y el gas oxígeno pueden reaccionar para crear dióxido de nitrógeno, que forma ácido nítrico en un ambiente acuoso (HNO_3). Además, se pueden combinar diversos gases de manera que, tras la solvatación en un entorno acuoso, reaccionen para producir un ácido. Por ejemplo, en un entorno acuoso, el óxido nítrico puede reaccionar con oxígeno y agua para formar ácido nitroso (HNO_2). En un enfoque alternativo, se podría evaporar el ácido líquido en su forma de vapor como un medio para introducirlo en el gas de barrido. Al usar una bomba de vacío uno podría extraer el vapor de un ácido de su forma líquida e introducirlo en el gas de barrido. Finalmente, se puede pasar el gas de barrido a través de un cartucho que contiene un material que puede eluir un producto ácido en la corriente de gas de barrido.

En estudios de acidificación en el volumen de la sangre para aumentar la eliminación de CO_2 en donde un ácido (por ejemplo, el ácido láctico) se infunde directamente en el volumen sanguíneo, la acidificación requiere una cantidad de ácido mucho mayor que la requerida en los métodos, dispositivos y/o sistema de los mismos. Además, en la acidificación en volumen, se puede requerir una etapa de desacidificación para eliminar la carga de ácido que se infunde en la sangre. Aunque la acidificación en el volumen de la sangre aumenta la eliminación de CO_2 , los dispositivos ECCO₂R, que incluyen la infusión de ácido en el volumen, son incapaces de soportar la producción metabólica de CO_2 en reposo de adultos.

Las membranas de fibra hueca bioactivas (HFM) inmovilizadas por la CA que convierten el bicarbonato en CO_2 directamente en la superficie de las HFM, aceleran las tasas de eliminación de CO_2 de la sangre en los dispositivos de intercambio de gases. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 7.763.097, la Patente de los Estados Unidos N° 8.043.411, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2012/0040429 y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2010/0331 767. Sin embargo, incluso con tales revestimientos bioactivos, los dispositivos ECCO₂R actuales pueden ser incapaces de soportar la producción metabólica de CO_2 en reposo de adultos. Los inventores presentes han descubierto que el efecto combinado/sinérgico de incluir un gas ácido en el gas de barrido e incluir la anhidrasa carbónica inmovilizada en o cerca de la primera superficie de la membrana para eliminar el CO_2 , es mucho mayor que el uso de un gas ácido en el barrido de gas o la CA inmovilizada sola.

En una variedad de estudios representativos de este documento, se usaron membranas de fibra hueca. La Figura 1 ilustra una comparación de la eliminación del CO_2 mediante un dispositivo de intercambio de gases que incluye la HFM que incluye la CA inmovilizada con un gas de barrido que incluye solo oxígeno, un dispositivo de intercambio de gases que incluye la HFM no modificada (es decir, sin CA inmovilizada) con un gas de barrido que incluye oxígeno y 1% (volumen) de SO_2 y un dispositivo de intercambio de gases que incluye la HFM con la CA inmovilizada con un gas de barrido que incluye oxígeno y 1% de SO_2 . Como se ve en la Figura 1, cuando se emplea independientemente el recubrimiento de la CA bioactiva (CAHFM) y el gas de barrido ácido diluido (Control-HFM + 1% de SO_2), se incrementó la eliminación de CO_2 en un 34% y 29% respectivamente. Cuando tanto el revestimiento de la CA bioactiva como el gas de barrido ácido diluido se emplean conjuntamente (CA-HFM + 1% de SO_2), se observa un aumento del 149% en la eliminación del CO_2 . Estos hallazgos demuestran que el gas de barrido ácido diluido puede aumentar la eliminación de CO_2 . Cuando se usa en combinación con CA-HFM bioactivos, el gas de barrido ácido diluido proporciona un efecto sinérgico que aumenta significativamente la eliminación de CO_2 , al tiempo que mantiene el pH fisiológico como se analiza más adelante.

Un controlador de flujo en masa se puede usar, por ejemplo, para controlar la cantidad de gas ácido en el barrido. Los porcentajes de gas ácido que se proporcionan aquí se proporcionan como % en volumen. El rango de porcentaje en volumen para los gases ácidos varía para cada gas ácido en función de su acidez y solubilidad. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un intervalo adecuado de % en volumen para un gas ácido particular (considerando, por ejemplo, acidez, solubilidad, biocompatibilidad del gas ácido y/o subproductos, y/o eficacia para facilitar la eliminación de CO_2). Para el SO_2 , se puede usar un rango de 0-2%, por ejemplo. En varias realizaciones, el % en volumen de SO_2 en el gas de barrido no es más del 1%. En varias realizaciones, el % en volumen de SO_2 está en el intervalo de 0,5 a 1%.

La Figura 2A ilustra un diagrama esquemático de una realización de un sistema 10 de prueba (por ejemplo, un dispositivo de asistencia respiratoria) del mismo, que se usa para medir las tasas de eliminación de CO_2 de las HFM no modificadas y modificadas por la CA. En los estudios del presente documento, la sangre bovina (que se introduce a través de una entrada 22 en un alojamiento 20) se perfundió en el exterior de las fibras 30 mientras que el gas de barrido de oxígeno pasaba a través de los lúmenes de fibra en la dirección opuesta. El gas de barrido se introdujo a través de una entrada 26 de gas y salió del sistema 10 a través de una salida 28 de gas. La sangre salió del sistema 10 a través de una salida 24 de gas. La Figura 2B ilustra una realización de un sistema experimental que se usa en las evaluaciones *in vitro* de intercambio de gases de CO_2 . Tanto el depósito de sangre como el desoxigenador incluían un intercambiador de calor en conexión operativa con el mismo para mantener la temperatura de la sangre a 37 ° C. El gas de barrido que incluye oxígeno y uno o más gases (que se suministran por una o más fuentes de gas

tales como uno o más tanques presurizados) que aumentan la concentración de H⁺ en la capa límite líquida adyacente a las HFM 30 se introdujeron a través de la entrada 26 de gas.

Los estudios del mismo demostraron que el dióxido de azufre diluido (1% SO₂) y otros gases ácidos en un gas de barrido con oxígeno pueden aumentar aún más las tasas de eliminación de CO₂ creando, por ejemplo, un microambiente ácido en la superficie de la HFM, que facilita la deshidratación del bicarbonato a CO₂, mientras mantiene en el rango fisiológico el pH del volumen sanguíneo. Además del SO₂, también se encontró que los gases ácidos de NO₂ y HCl aumentan las tasas de eliminación de CO₂. El NO₂ requirió un porcentaje de volumen relativamente alto (por ejemplo, aproximadamente un 20%) para aumentar significativamente las tasas de eliminación de CO₂. Como se ilustra esquemáticamente en las Figuras 3A y 3B, la introducción de gas ácido diluido en la corriente de gas de barrido puede aumentar la concentración de H⁺ en la capa límite líquida y desplazar el equilibrio para aumentar la catálisis de CO₂. En general, los "gases ácidos" son gases o combinaciones de gases en los gases de barrido del mismo que aumentan la concentración de H⁺ en la capa límite líquida adyacente a las membranas (por ejemplo, HFM) de la misma. Sin limitación a ningún mecanismo, la mejora catalítica de la deshidratación de bicarbonato a CO₂ puede ocurrir en el microambiente ácido mediante un recubrimiento de anhídrida carbónica. Como resultado de este recubrimiento, el microambiente ácido que se crea mediante el gas de barrido ácido puede dar como resultado una conversión más rápida de bicarbonato a CO₂, mejorando significativamente el efecto del microambiente ácido alrededor de la membrana (por ejemplo, una membrana de fibra hueca).

La Tabla 1 expone una comparación en la literatura de estudios de acidificación del volumen sanguíneo (en la que se añade ácido láctico al volumen sanguíneo) con estudios del mismo que usan SO₂ en un gas de barrido de O₂ dentro de la HFM modificada por la CA. Para los estudios de infusión de ácido láctico, sin infusión de ácido, hay un aumento del 0% en la eliminación de CO₂ y el pH sanguíneo es normal a 7.39. En la tasa de infusión de ácido láctico más alta, el pH cae a 6.91 y la eliminación de CO₂ aumenta en un 70%. En comparación, la infusión de gas ácido de SO₂ de la HFM logra una alta mejora de la eliminación de CO₂ con un aumento del 99% en la eliminación de CO₂ mientras que disminuye el pH solo a 7.31. Un mayor aumento en la concentración de gas de barrido de SO₂ puede producir hasta un aumento del 168% en la eliminación de CO₂, mientras que disminuye el pH solo a 7.05. Se midió la concentración de sulfito en el fluido que sale del sistema de prueba de los estudios presentes. Las velocidades de infusión de ácido efectivas que se establecen en la Tabla 1 se calcularon multiplicando la concentración del producto ácido por el caudal de sangre a través del dispositivo. La velocidad de infusión de ácido al cuerpo es igual a la concentración de ácido multiplicada por la velocidad de flujo del fluido. El gas de barrido ácido se probó en un sistema que usa una velocidad de flujo de 45 ml/min. Para comparar las tasas de infusión de ácido con la tasa de infusión del volumen ácido que usa ácido láctico, multiplicamos su concentración de ácido por la velocidad de flujo que se usa en esos estudios (500 ml/min). De esta manera, las velocidades de infusión de ácido efectivas son directamente comparables. Los datos para la infusión del volumen de ácido láctico que se exponen en la Tabla 1 se encuentran en *Zanella, Alberto, et al. , "Blood Acidification Enhances Carbon Dioxide Removal of Membrane Lung: An Experimental Study." Intensive Care Medicine 35, no. 8 (2009): 1484-1487. doi:10.1007/s00134-009-1513-5.*

Tabla 1

Adición del volumen de ácido láctico	Tasa de infusión de ácido (mmol/min)	0	1	2	5
	pH	7.39	7.30	7.20	6.91
	% de aumento de eliminación de CO ₂	0	11	23	70
CA-HFM + SO ₂	Tasa de infusión de ácido (mmol/min)	0	0.24	1.27	3.99
	pH	7.40	7.31	7.21	7.05
	% de aumento de eliminación de CO ₂	34	99	148	168

La Figura 4 ilustra un estudio del cambio en el pH de la sangre con el aumento de la concentración de SO₂ (% en volumen) en el gas de barrido de O₂. La Figura 5 presenta los resultados de estudios que demuestran que el aumento de la concentración de SO₂ dentro del gas de barrido de O₂ aumenta la pCO₂ del volumen sanguíneo, dejando el dispositivo en el rango de concentraciones estudiadas. La Figura 6 expone los resultados de estudios que

demuestran que el aumento de la concentración de SO₂ en el gas de barrido de O₂ aumenta significativamente la velocidad de eliminación de CO₂ al usar las HFM modificadas por la CA y las HFM no modificadas. Sin embargo, el aumento es sustancialmente mayor en el caso de las HFM modificadas por la CA. La Figura 7A expone los resultados de estudios que demuestran que el aumento de la concentración de SO₂ dentro del gas de barrido de O₂ aumenta significativamente el porcentaje de eliminación de CO₂ al usar las HFM modificadas por la CA y las HFM no modificadas. Una vez más, el aumento es sustancialmente mayor en el caso de las HFM modificadas por la CA. La Figura 7B ilustra que el aumento de la concentración de SO₂ dentro de un gas de barrido de oxígeno aumenta la concentración de sulfito en el fluido que sale del dispositivo.

Como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 7.763.097, en varias realizaciones, las membranas de la misma (por ejemplo, HFM) incluyen o se forman de un material polimérico. El material polimérico puede ser microporoso o permeable de manera que el CO₂ y al menos un gas ácido distinto del CO₂ puedan pasar/transportarse a través del mismo. El material polimérico puede ser, por ejemplo, microporoso y suficientemente hidrófobo de modo que sus poros permanezcan llenos de gas después de poner en contacto la sangre u otros fluidos acuosos. El material polimérico puede ser, por ejemplo, un material polimérico olefínico. En varias realizaciones, la membrana incluye una capa porosa o microporosa (por ejemplo, una primera capa polimérica) y una capa no porosa permeable a los gases adyacente a la capa porosa (por ejemplo, una segunda capa polimérica). Una capa polimérica no porosa permeable puede, por ejemplo, incluir silicona permeable al CO₂ (un siloxano o polisiloxano polimerizado). Se pueden incluir elementos para mejorar la hemocompatibilidad (por ejemplo, heparina) en la primera superficie o de contacto con la sangre de la membrana.

La anhidrasa carbónica se puede inmovilizar, por ejemplo, en la membrana mediante adsorción, enlace covalente, enlace iónico o quelación. La anhidrasa carbónica libre también se puede poner en contacto con el fluido. En varias realizaciones, la CA se une covalentemente a la primera superficie de la membrana. La anhidrasa carbónica se puede unir covalentemente, por ejemplo, a la capa polimérica no porosa permeable sobre una superficie exterior de una membrana polimérica microporosa (por ejemplo, una HFM) directamente o mediante un grupo espaciador. También se pueden proporcionar capas múltiples de CA inmovilizada, por ejemplo, uniendo la CA a sí misma en forma de multicapa.

Los grupos espaciadores tales como los grupos espaciadores poliméricos se usan a menudo para unir biomoléculas a superficies artificiales. Tales polímeros pueden amplificar la densidad de los grupos funcionales reactivos para la inmovilización covalente de la biomolécula, y reducir el impedimento estérico entre las moléculas inmovilizadas vecinas y la superficie artificial. La Figura 8A ilustra la unión covalente de la CA directamente a una capa de siloxano y/o heparina permeable y no porosa de una HFM. La heparina no se usó en las realizaciones que se estudiaron. La Figura 8B ilustra la unión covalente de la CA a una capa de siloxano y/o heparina permeable y no porosa de una HFM a través de un grupo espaciador de polímero. En varios estudios del mismo, se usó quitosano (un polisacárido lineal compuesto de D-glucosamina β-(1-4) enlazada que se distribuye al azar (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada)) como espaciador polimérico para enlazar la CA a la superficie de membranas de fibra hueca. Se usó el glutaraldehído para enlazar los grupos amina en el polímero de quitosano a los grupos amina en la superficie de la HFM. Después de lavar el quitosano no unido, se usa un segundo paso de glutaraldehído para enlazar los grupos amina libres en el polímero de quitosano inmovilizado a los grupos amina en la molécula de la CA. Se demostró un aumento significativo en la actividad de la enzima CA inmovilizada en la superficie de la fibra mediante el uso del anclaje de quitosano. El recubrimiento de quitosano/CA se usó para todas las pruebas de intercambio de gases. La CA también se inmovilizó con alginato y polímeros hialurónicos como espaciadores.

La primera superficie de la membrana puede presentar, por ejemplo, actividad de la anhidrasa carbónica de al menos 20% de la actividad teórica máxima de la primera superficie de la membrana que se basa en la cobertura de superficie en monocapa de la anhidrasa carbónica en el caso de que la anhidrasa carbónica se inmovilice en la primera superficie. En varias realizaciones, la primera superficie exhibe actividad de la anhidrasa carbónica de al menos 40% de la actividad teórica máxima de las fibras que se basa en la cobertura de la superficie en monocapa de la anhidrasa carbónica. Además, la primera superficie puede exhibir actividad de la anhidrasa carbónica de al menos 60% de la actividad teórica máxima de la primera superficie de las membranas que se basa en la cobertura de la superficie en monocapa de la anhidrasa carbónica. Además, la primera superficie puede exhibir actividad de la anhidrasa carbónica de al menos 80% o 100% de la actividad teórica máxima de la primera superficie de la membrana que se basa en la cobertura de la superficie en monocapa de la anhidrasa carbónica. Incluso actividades más altas son posibles. Además, actividades que exceden la actividad teórica máxima de la primera superficie de la membrana que se basa en la cobertura de superficie en monocapa de la anhidrasa carbónica en, por ejemplo, las realizaciones de inmovilización multicapa. En las realizaciones multicapa, las cadenas químicas que incluyen más de un grupo de anhidrasa carbónica se inmovilizan en la primera superficie.

Experimental

1. HFM inmovilizada por la ca

1a. Materiales

Tabla 2

Ítem	Descripción del ítem	Cantidad
Anhidrasa Carbónica	CAII humana	20 ml (20 mg)
Regulador de Fosfato (0.1M, pH 8.5)	Regulador de unión	1 Litro
Membrana de Fibra Hueca Alung Hemolung	183 fibras/alfombrilla	1
Glutaraldehído (5%, pH 8.5 .1M regulador de fosfato)	Reticulante de regulador de Fosfato	40 ml
1% de quitosano (p/v) en ácido acético al 1% (v/v)	Solución de brazo espaciador	20 ml
Mezclador centrípeto		1
Medidor de pH (digital)	Thermo-Fisher	1
Pipetas y boquillas	Fisher	Varios
Tubo de vidrio Corning de 25 ml	Tubo de vidrio con tapa de rosca	3

1B. Preparación de la muestra. Se prepararon alfombrillas de fibra HFM contando 186 fibras o 93 circuitos. Se extrajo una fibra de un extremo de la alfombrilla y dos fibras del otro extremo.

- 5 Se preparó una solución reguladora de fosfato 100 mM que tenía un pH de 8,5. También se preparó como solución de glutaraldehído al 5% (v/v) o GA en regulador de fosfato 100 mM (pH 8,5). También se preparó una solución al 1% de quitosano (p/v) en ácido acético al 1% (v/v). Además, se preparó una solución de CA (1 mg/ml) en regulador de fosfato 100 mM, pH 8,5.

- 10 1C. Activación e inmovilización de la anhidrasa carbónica. Cada alfombrilla se dobló en estilo acordeón (en lugar de enrollarla) y se coloca dentro de un tubo (una alfombrilla por tubo). Se añadieron a cada tubo 20 ml de GA al 5%, y los tubos se agitaron durante 1 hora en un mezclador centrípeto (ajuste de velocidad #10). Esto se continuó por 10 minutos de enjuague con regulador de fosfato 100 mM, pH 8,5 a una velocidad de 20 rpm. El enjuague por 10 minutos se repitió tres veces. Luego se agregaron a cada uno de los tubos 20 ml de quitosano al 1%, y los tubos se agitaron durante 1 hora en el mezclador centrípeto (ajuste de velocidad #10). Esto se continuó por 10 minutos de enjuague con regulador de fosfato 100 mM, pH 8,5 a una velocidad de 20 rpm. El enjuague por 10 minutos se repitió tres veces. Posteriormente, se añadieron a cada uno de los tubos 20 ml de GA al 5%, y los tubos se agitaron durante 1 hora en el mezclador centrípeto (ajuste de velocidad #10). Esto se continuó por 10 minutos de enjuague con regulador de fosfato 100 mM, pH 8,5 a una velocidad de 20 rpm. El enjuague por 10 minutos se repitió tres veces. Luego se agregaron a cada uno de los tubos 20 ml de solución de CA, y los tubos se agitaron durante la noche (aproximadamente 12 horas) en el mezclador centrípeto (ajuste de velocidad #10). Esto se continuó por 20 minutos de enjuague con regulador de fosfato 100 mM, pH 8,5 a una velocidad de 20 rpm. El enjuague por 20 minutos se repitió tres veces.

- 25 2. Módulo de intercambio de gas y sistema de prueba. Se fabricó un módulo de intercambio de gas modelo a escala mediante la inserción de las HFM (183 fibras) en un tubo de policarbonato con un diámetro interno de 1/4 de pulgada (McMaster Carr, Elmhurst, IL) en el que los cierres luer individuales se pegaron con luz ultravioleta a 1,25 pulgadas desde cada extremo en direcciones opuestas. Ambos extremos de las HFM se fijaron a la tubería con un adhesivo epoxi (Devcon, Danvers, MA) y luego se recortaron a la longitud de la tubería para exponer los lúmenes HFM, produciendo 6,9 cm de HFM descubiertos dentro del módulo para un área de superficie activa total de 0.0119 m². Se utilizó un circuito de prueba de recirculación in vitro para evaluar las tasas de intercambio de CO₂ usando HFM inmovilizadas y no modificadas con gas de barrido de SO₂.
- 30

5 El circuito incluía un depósito de fluido, una bomba peristáltica, un oxigenador, una bomba de vacío y el dispositivo de intercambio de gas modelo. El fluido de prueba (1000 ml de sangre bovina) fluyó desde una bomba peristáltica MasterFlex L/S (Vernon Hills, IL) a un oxigenador Baby RX Terumo CAPIOX RX05 (Ann Arbor, Michigan), luego al módulo de prueba de intercambio de gas modelo y finalmente de vuelta al depósito. La presión parcial de entrada de CO₂ (PCO₂) se ajustó a 50 mmHg y se midió con un analizador de gases sanguíneos RAPIDLAB 248 (Siemens, Deerfield, IL). El dióxido de azufre puro (SO₂) (y/u otros gases para aumentar la acidez en la capa límite por fuera de la HFM) y el gas oxígeno puro se extrajo por vacío a través de dos controladores de flujo de masa de gas serie GR (Fathom, Round Rock, TX) y se mezcló en un conector en T a una línea central de gas de barrido que fluyó a través del módulo de prueba de intercambio de gas de lúmenes HFM, del condensador de humedad que se sumerge en hielo, de la Bomba de vacío (EE.UU.) KNF Lab UN811KV.45P y finalmente un analizador de CO₂ WMA-4 (PP Systems, Amesbury, MA). La concentración de SO₂ en el gas de barrido se reguló ajustando el flujo de oxígeno y SO₂ a través de sus respectivos controladores de flujo de masa.

15 La velocidad de flujo del fluido a través del módulo se ajustó a 45 ml/min y el gas de barrido a través de los lúmenes HFM se ajustó de manera que el CO₂ en el gas de barrido que salía del dispositivo era constante a 3000 ppm. La temperatura del fluido se mantuvo a 37 °C mediante baño maría. La tasa de eliminación de CO₂ (VCO₂) para cada dispositivo oxigenador modelo se calculó usando la tasa de flujo de gas de barrido (Qbarrido) y la fracción de CO₂ (FCO₂) que sale del dispositivo de asistencia respiratoria modelo y luego se normalizó a 50 mmHg para corregir pequeñas desviaciones en la entrada PCO₂:

$$\mathbf{VCO_2 = Qbarrido \cdot FCO_2 \cdot 50/PCO_2}$$

20 La descripción anterior y los dibujos adjuntos establecen varias formas de realización representativas en este momento. Diversas modificaciones, adiciones y diseños alternativos serán, por supuesto, evidentes para los expertos en la materia a la luz de las enseñanzas anteriores sin apartarse del alcance de la misma, que se indica mediante las siguientes reivindicaciones en lugar de por la descripción anterior. Todos los cambios y variaciones que caen dentro del significado y rango de equivalencia de las reivindicaciones se deben incluir dentro de su alcance.

25

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (10) para eliminar al menos una porción de dióxido de carbono de un fluido acuoso, que comprende: al menos una membrana (30) que comprende una primera superficie y una segunda superficie, estando la al menos una membrana (30) adaptada para pasar dióxido de carbono y al menos un gas ácido distinto del dióxido de carbono a través de la misma, estando adaptada la membrana adicionalmente para limitar o evitar el paso del fluido a través de la misma, comprendiendo el sistema además al menos una fuente de un gas de barrido que comprende al menos un gas ácido distinto del dióxido de carbono, estando adaptada la al menos una fuente de gas de barrido para colocarse en conexión fluida con la segunda superficie de la al menos una membrana (30) para pasar gas de barrido sobre la segunda superficie de la al menos una membrana (30) de manera que el al menos un gas ácido distinto del dióxido de carbono pueda pasar al fluido a través de la al menos una membrana (30) y el dióxido de carbono del fluido pueda pasar desde el fluido acuoso a través de la al menos una membrana y al gas de barrido; y caracterizado porque la al menos una membrana (30) comprende anhídrida carbónica inmovilizada en o cerca de la primera superficie de la misma de manera que la anhídrida carbónica inmovilizada entre en contacto con el fluido.
2. El sistema de la reivindicación 1, en el que el fluido es un fluido sanguíneo.
3. El sistema de la reivindicación 2, en el que el fluido es sangre.
4. El sistema de la reivindicación 1, en el que la membrana comprende un material polimérico.
5. El sistema de la reivindicación 4, en el que la anhídrida carbónica se inmoviliza en la membrana mediante adsorción, enlace covalente, enlace iónico o quelación.
6. El sistema de la reivindicación 4, en el que la anhídrida carbónica se une covalentemente al material polimérico.
7. El método de la reivindicación 4, en el que el material polimérico es microporoso o permeable de manera que el CO₂ y al menos un gas ácido distinto de CO₂ pueden pasar a través del mismo.
8. El sistema de la reivindicación 7, en el que el material polimérico es microporoso y suficientemente hidrófobo de modo que sus poros permanecen llenos de gas después de entrar en contacto con la sangre u otros fluidos acuosos.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el material polimérico es un material polimérico olefínico.
10. El sistema de la reivindicación 7, en el que la anhídrida carbónica se une covalentemente a la primera superficie de una fibra hueca polimérica microporosa.
11. El sistema de la reivindicación 7, en el que la primera superficie es una superficie exterior de la fibra hueca y un lumen interior de la fibra hueca se adapta para tener flujo de oxígeno a través del mismo, comprendiendo el gas de barrido además oxígeno y estando adaptada la fibra hueca para pasar al fluido sanguíneo oxígeno y al menos un gas ácido distinto del dióxido de carbono mientras que el dióxido de carbono pasa desde el fluido sanguíneo al lumen interior de la fibra hueca.
12. El sistema de la reivindicación 11, en el que la anhídrida carbónica se une covalentemente a una capa polimérica no porosa permeable sobre una superficie exterior de una fibra hueca polimérica microporosa.
13. El sistema de la reivindicación 11, en el que una pluralidad de membranas que se forman por una pluralidad de fibras huecas se ponen en contacto con el fluido.
14. El método de la reivindicación 12, en el que la capa polimérica no porosa permeable comprende silicona permeable al CO₂.
15. El sistema de la reivindicación 1, en el que la membrana comprende una capa porosa y una capa no porosa permeable a los gases, adyacente a la capa porosa.
16. El sistema de la reivindicación 1, en el que al menos un gas ácido distinto del CO₂ es dióxido de azufre, sulfuro de hidrógeno, dióxido de nitrógeno, óxido nítrico, cloruro de hidrógeno, fluoruro de hidrógeno o yoduro de hidrógeno.
17. El sistema de cualquier reivindicación precedente, en el que el sistema es un componente de un sistema de asistencia respiratoria para la eliminación de al menos una porción de dióxido de carbono de un fluido sanguíneo.

18. El sistema de la reivindicación 17 en el que la membrana comprende una pluralidad de membranas de fibra hueca, comprendiendo cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca una primera superficie o interna y una segunda superficie o externa, y en donde cada una de la pluralidad de membranas de fibra hueca comprende anhidrasa carbónica inmovilizada en o cerca de la primera superficie de la misma de manera que la anhidrasa carbónica inmovilizada entre en contacto con el fluido sanguíneo.
- 5

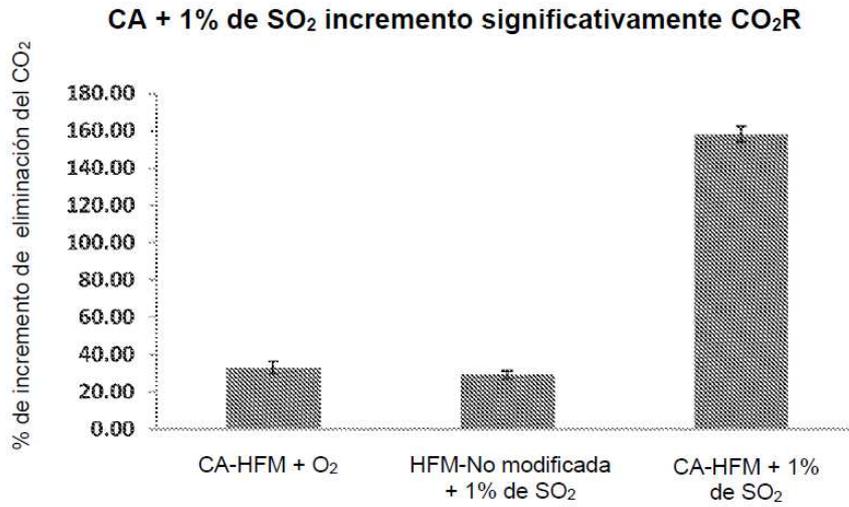


Figura 1

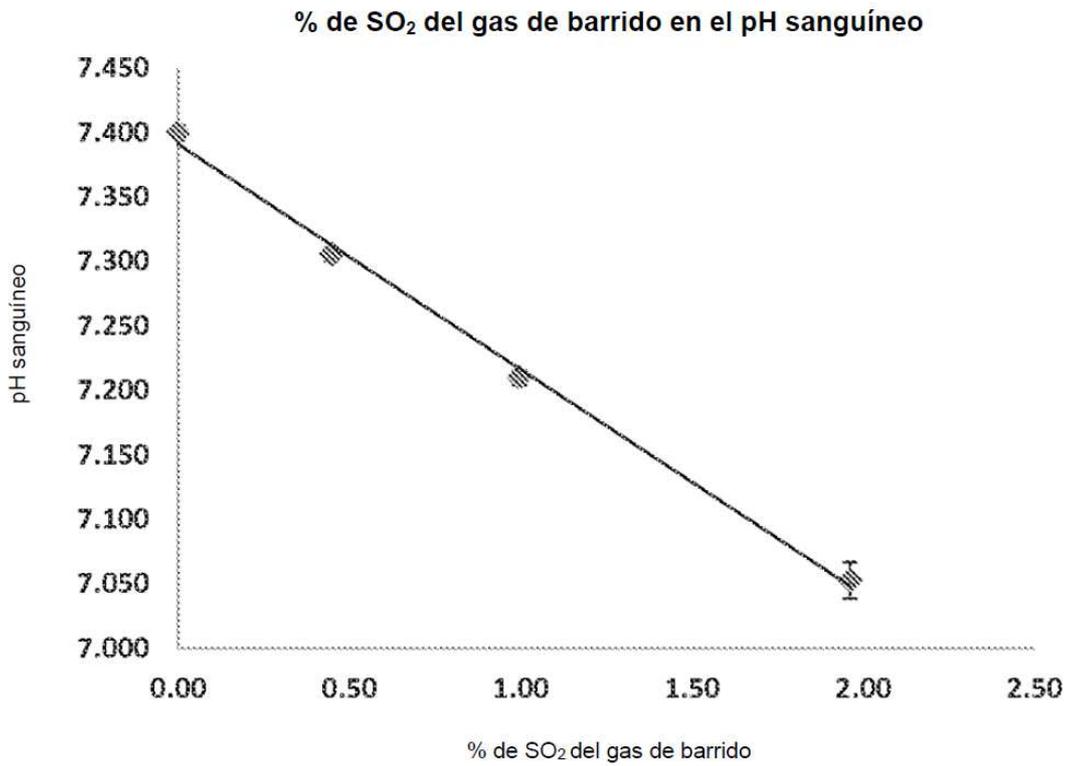


Figura 4

Figura 2A

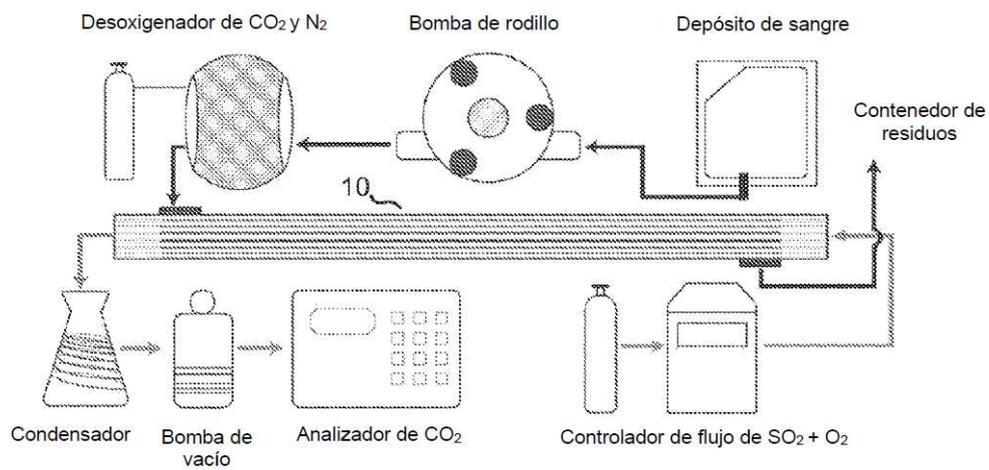
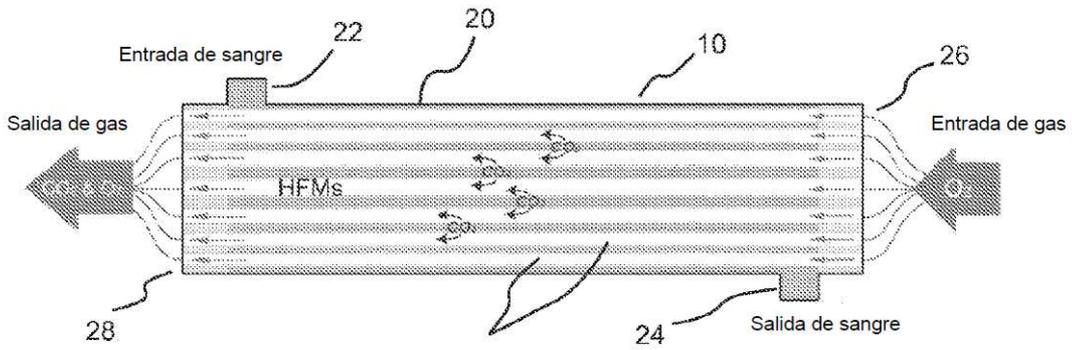


Figura 2B

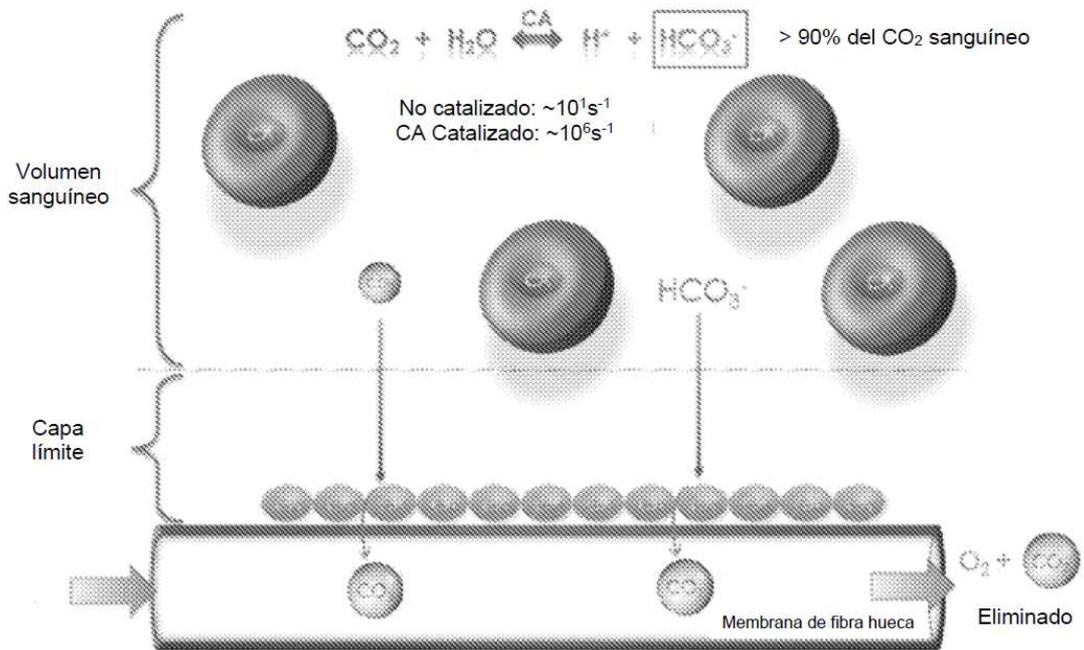


Figura 3A

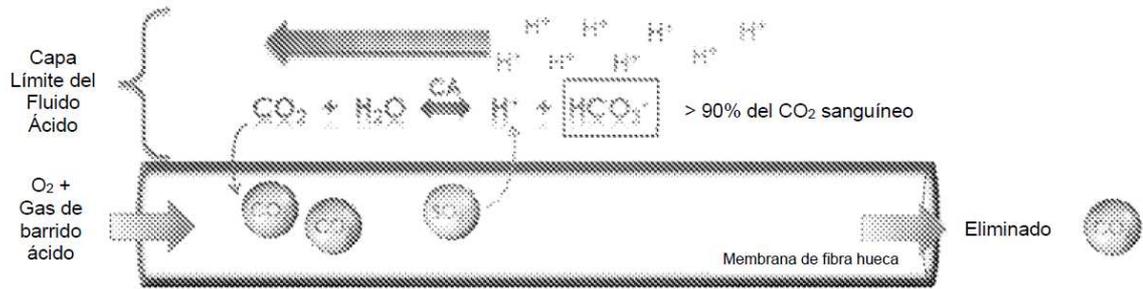


Figura 3B

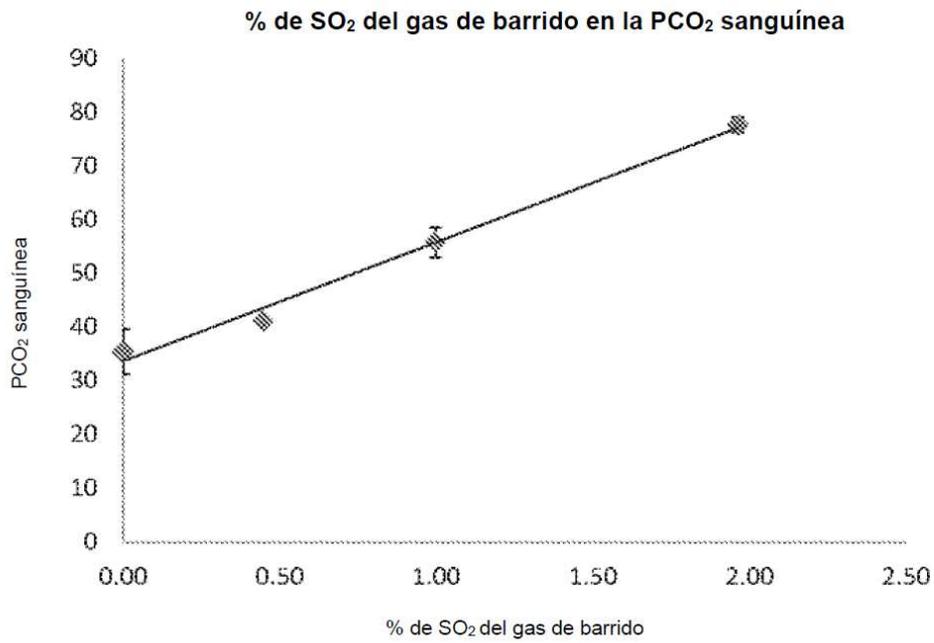


Figura 5

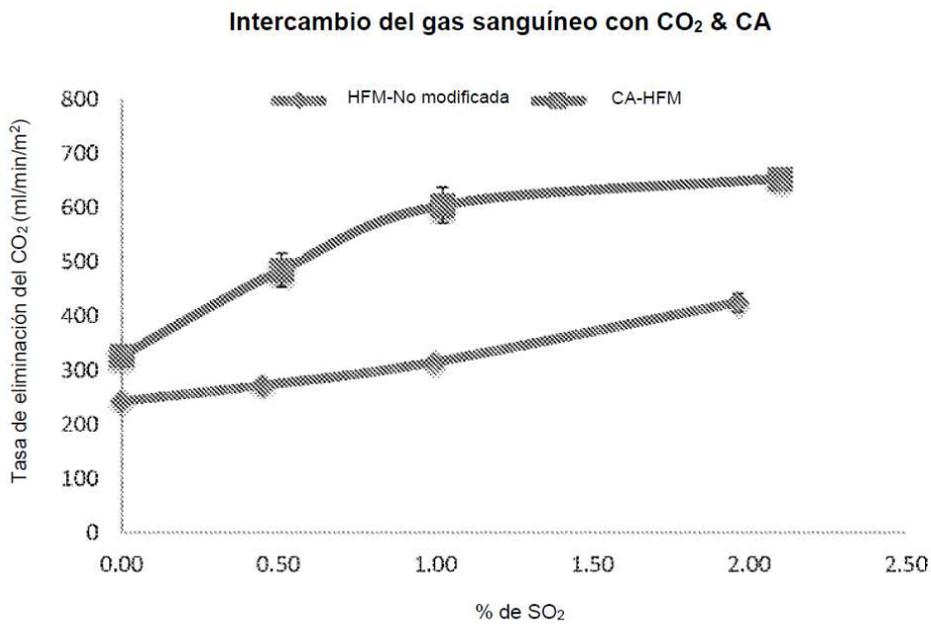


Figura 6

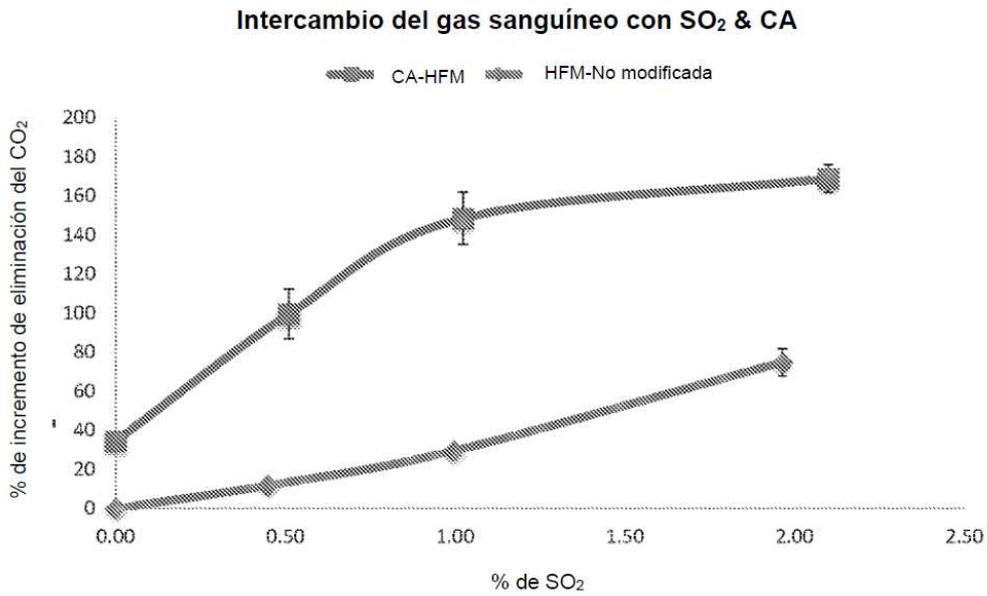


Figura 7A

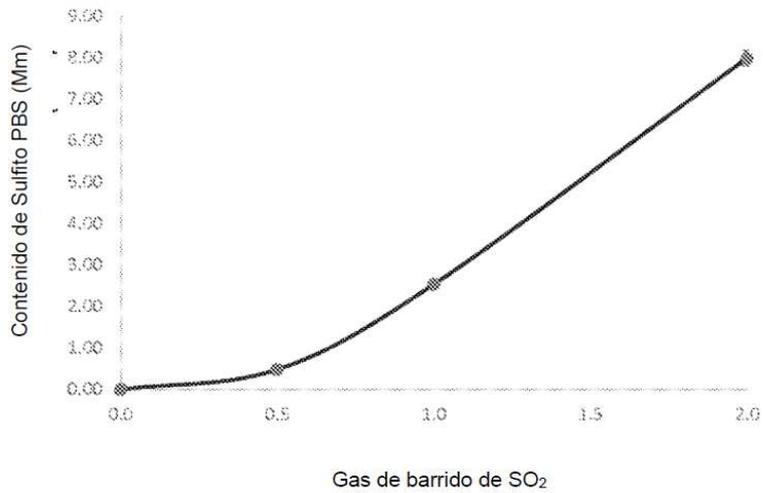


Figura 7B

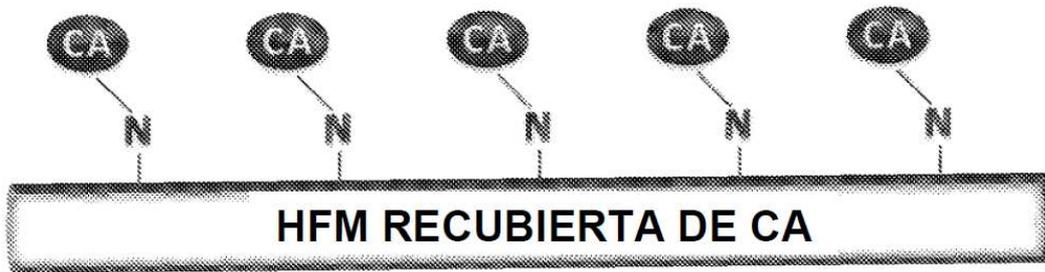


Figura 8A



Figura 8B