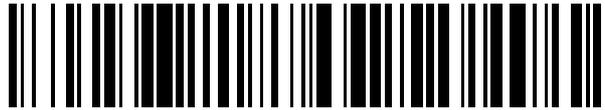


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 924**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2016 PCT/JP2016/075297**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17038805**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2016 E 16841837 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3345479**

54 Título: **Agente de conservación para órganos o tejidos y método de conservación para órganos o tejidos**

30 Prioridad:

**31.08.2015 JP 2015171012
09.05.2016 JP 2016093546**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2021

73 Titular/es:

**ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD. (100.0%)
3-15 Edobori 1-chome Nishi-ku
Osaka-shi, Osaka 550-0002, JP**

72 Inventor/es:

**KATO, FUMINORI y
YOTSUYA, SHUICHI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 807 924 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

Agente de conservación para órganos o tejidos y método de conservación para órganos o tejidos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un agente de conservación para órganos o tejidos, una disolución de conservación para órganos o tejidos que comprende el agente de conservación y un método de conservación para órganos o tejidos.

Antecedentes de la técnica

10 Una célula tiene diferentes composiciones de iones dentro y fuera de la misma separadas por la membrana celular, y la diferencia de distribución resultante de iones cargados trae una diferencia de potencial. Generalmente, el interior de una célula tiene un potencial negativo (potencial de membrana) con respecto al exterior de la célula, y todos los animales y plantas tienen este potencial de membrana como el principio básico común a los organismos vivos. El mecanismo de regulación del potencial de membrana es indispensable para mantener la vida y ejercer funciones celulares, y su falla conduce directamente a la terminación de la vida o la muerte celular.

15 Por esta razón, varias bombas de iones y canales de iones están presentes en la membrana celular interior y exterior y regulan constantemente el equilibrio iónico. La bomba de sodio ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa) es el mecanismo regulador de equilibrio iónico más importante en las células animales y la bomba de protones ($\text{H}^+\text{-ATPasa}$) es el mecanismo regulador de equilibrio iónico más importante en las células vegetales. Estas bombas de iones son proteínas de membrana que realizan el transporte activo de iones específicos utilizando energía ATP. Si el ATP se agota debido a alguna causa o cuando la temperatura ambiente se desvía del intervalo óptimo, la función de la bomba de iones disminuirá o se detendrá.

20 En una célula animal en condiciones fisiológicas, se bombean tres iones de sodio de la célula a la vez, principalmente por la acción de la bomba de sodio, y, a la inversa, se bombean dos iones potasio a la célula desde el exterior de la célula. Por lo tanto, generalmente, el interior de la célula tiene una alta concentración de potasio (una baja concentración de sodio) y el exterior de la célula tiene una alta concentración de sodio (una baja concentración de potasio). La función de la bomba de sodio en una celda disminuye si la temperatura cae por debajo de cierto nivel; en consecuencia, el sodio no se puede bombear fuera de la célula y aumenta la concentración de sodio en la célula. A medida que aumenta la concentración de sodio, también aumenta la presión osmótica intracelular; como resultado, la célula se hincha debido a la entrada de moléculas de agua, y eventualmente sufre ruptura celular (daño celular).

30 El mecanismo antes mencionado se considera una de las principales causas de daño celular cuando un órgano o tejido se conserva a baja temperatura para el trasplante de órganos o tejidos en un sitio médico. Por lo tanto, se ha desarrollado una disolución de conservación para órganos o tejidos cuya composición electrolítica básica es una composición de tipo intracelular con una baja concentración de sodio y una alta concentración de potasio. Los ejemplos típicos de tales disoluciones de conservación incluyen la disolución Euro-Collins (EC) y la disolución UW (Universidad de Wisconsin). En comparación con las disoluciones de conservación de tipo extracelular previamente conocidas (alta concentración de sodio, baja concentración de potasio), como la disolución de Ringer, estas disoluciones de conservación son capaces de extender en gran medida el período de conservación de órganos o tejidos para trasplantes; por lo tanto, estas disoluciones de conservación se han utilizado clínicamente como disoluciones de conservación importantes para órganos o tejidos para trasplantes tanto en Japón como en otros países. Sin embargo, por otro lado, estas disoluciones de conservación de tipo intracelular presentan un riesgo de causar citotoxicidad cuando se incrementa la temperatura de conservación. Además, estas disoluciones de conservación no se pueden aplicar a todos los órganos o tejidos para trasplantes. Por lo tanto, se espera una mejora adicional en el rendimiento de las disoluciones de conservación, incluyendo una mayor extensión del período de conservación.

Por ejemplo, los documentos de patente 1 a 8 detallados a continuación describen técnicas para conservar órganos o tejidos.

45 El documento de patente 1 describe un método para conservar materiales biológicos, que comprende añadir una disolución de conservación que comprende uno o más polifenoles a un material biológico y enfriar el material biológico. Los ejemplos del documento de patente 1 simplemente describen las catequinas como ejemplos de polifenol. Además, aunque el documento de patente 1 describe, como crioprotectores, azúcares, tales como sacarosa, glucosa, trehalosa y similares, solo se usa trehalosa en los ejemplos del documento de patente 1.

50 El documento de patente 2 describe un método de conservación celular a través de refrigeración a una temperatura en la que el agua no se cristaliza, por ejemplo, aproximadamente 4 °C, que comprende añadir un derivado de encefalina a la disolución de cultivo celular. Sin embargo, el documento de patente 2 en ninguna parte describe azúcares.

55 El documento de patente 3 describe una disolución médica de polifenol para uso en un agente de conservación de células, un agente de conservación de tejidos o similar, que comprende polifenol, 0,0001 a 0,05% en peso de ácido ascórbico o un ascorbato metálico. Esta disolución médica de polifenol es capaz de inhibir la descomposición del polifenol, inhibiendo así la generación de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, solo el galato de epigallocatequina

(EGCg) se usa como un polifenol en los ejemplos del documento de patente 3. Además, aunque el documento de patente 3 describe compuestos de monosacárido, disacárido y polisacárido (incluyendo glucosa, manosa y dextrina) como aditivos opcionales; los ejemplos del documento de patente 3 en ninguna parte describen azúcares.

5 El documento de patente 4 describe una composición de conservación que contiene, como ingrediente activo, 90% en masa o más de galato de epigallocatequina, y describe que la composición de conservación que contiene galato de epigallocatequina que se refina a una alta pureza garantiza efectos de conservación celular más constantes. Aunque los ejemplos del documento de patente 4 describen el uso de glucosa en la conservación de islotes pancreáticos a 37 °C, el documento de patente 4 en ninguna parte describe fructosa o sacarosa, que son azúcares utilizados en la presente invención.

10 Los documentos de patente 5 y 6 describen que los glicósidos flavonoides y los compuestos flavonoides no glicósidos tienen efectos protectores contra el daño a baja temperatura. Además, el documento de patente 7 describe que los efectos de protección contra daños a baja temperatura se pueden mejorar aún más usando glicósido flavonoide y flavonoide no glicósido en combinación.

15 El documento de patente 8 describe que un fluido de conservación para células y tejidos que comprende polifenol como ingrediente activo y opcionalmente trehalosa tiene una acción protectora con respecto a células, órganos y tejidos. Los ejemplos del documento de patente 8 simplemente describen un uso combinado de trehalosa y catequina como polifenol.

Lista de citas

Documentos de patente

- 20 Documento de patente 1: JP2007-519712A
Documento de Patente 2: JP2002-335954A
Documento de Patente 3: JP2006-188436A
Documento de Patente 4: JP2003-267801A
Documento de Patente 5: WO2013/047665
25 Documento de Patente 6: WO2013/047666
Documento de Patente 7: WO2014/162910
Documento de Patente 8: WO02/001952

Compendio de la invención

Problema técnico

30 Los documentos de patente 1 a 8 en ninguna parte describen sustancialmente el uso combinado de quercetina y azúcares específicos de la presente invención para una disolución de conservación para órganos o tejidos.

35 Se ha realizado comúnmente un método para conservar células, tejidos, partes del cuerpo, órganos y similares simplemente a baja temperatura. Sin embargo, se sabe que las condiciones de baja temperatura causan daños incluso cuando la conservación no implica la congelación del objeto objetivo. Las técnicas de conservación previamente conocidas eran incapaces de conservar todo tipo de células, tejidos, partes del cuerpo u órganos. Por lo tanto, se ha esperado durante mucho tiempo una mejora adicional en el rendimiento, incluida una mayor extensión del período de conservación.

40 La presente invención se realizó para resolver tales problemas de daños a baja temperatura y similares, y un objeto de la invención es proporcionar un agente de conservación para órganos o tejidos, una disolución de conservación para órganos o tejidos que comprende el agente de conservación y una conservación Método para órganos o tejidos.

Solución al problema

45 Los presentes inventores descubrieron que es posible obtener un efecto protector contra el daño a baja temperatura usando una combinación de quercetina y azúcares específicos, y conservar las células a una temperatura que varía desde una temperatura baja sin congelación hasta una temperatura de refrigeración general. La presente invención se realizó en base a este hallazgo, y proporciona el siguiente agente de conservación, disolución de conservación y método de conservación.

(I) Agente de conservación

(I-1) Un agente de conservación para órganos o tejidos, que comprende (A) quercetina; y (B) al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa.

5 (I-2) El agente de conservación según el artículo (I-1), en donde el órgano o tejido es corazón, hígado, riñón, páncreas o islote pancreático.

(I-3) El agente de conservación según el artículo (I-1) o (I-2), en donde el agente de conservación se usa para la conservación a baja temperatura.

(I-4) Un agente de protección contra daños a baja temperatura para órganos o tejidos, que comprende (A) quercetina; y (B) al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa.

10 (II) Disolución de conservación

(II-1) Una disolución de conservación para órganos o tejidos, que comprende el agente de conservación de cualquiera de los artículos (I-1) a (I-3).

(II-2) La disolución de conservación según el artículo (II-1), en donde la disolución de conservación se usa para la conservación a baja temperatura.

15 (III) Método de conservación

(III-1) Un método de conservación para órganos o tejidos, que comprende la etapa de sumergir un órgano o tejido en una mezcla líquida que comprende (A) quercetina; y (B) al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa.

20 (III-2) El método según el artículo (III-1), en donde el órgano o tejido es corazón, hígado, riñón, páncreas o islote pancreático.

(III-3) El método según el artículo (III-1) o (III-2), en donde la mezcla líquida se mantiene a baja temperatura en la etapa de inmersión.

Efectos ventajosos de la invención

25 El agente de conservación y el método de conservación de la presente invención proporcionan un efecto de protección contra daños a baja temperatura con respecto a los órganos o tejidos. Por lo tanto, la presente invención es adecuada para la conservación de órganos o tejidos, y permite la conservación de órganos o tejidos durante un largo período de tiempo en condiciones que inhiben el daño a baja temperatura.

Por lo tanto, se espera que la presente invención se aplique en los campos de trasplantes de órganos, trasplantes de tejidos y similares.

30 **Descripción de las realizaciones**

La presente invención se explica específicamente a continuación.

El agente de conservación para órganos o tejidos de la presente invención se caracteriza por comprender (A) quercetina; y (B) al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa.

35 Además, el método de conservación para órganos o tejidos de la presente invención se caracteriza por comprender la etapa de sumergir un órgano o tejido en una mezcla líquida que comprende (A) quercetina; y (B) al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa.

40 La quercetina y los azúcares usados en la presente invención pueden sintetizarse químicamente por un método conocido. Además, dado que la quercetina y los azúcares están contenidos en organismos como las plantas, pueden obtenerse extrayéndolos de dicho organismo utilizando un método conocido. Además, la quercetina y los azúcares se pueden obtener de proveedores comerciales.

El "daño a baja temperatura" en la presente memoria descriptiva significa daño celular causado por una temperatura baja, y "un efecto de protección contra daño a baja temperatura" significa un efecto para proteger las células de tal daño a baja temperatura. Por lo tanto, a la luz de estos significados, el agente de conservación de la presente invención puede denominarse un "agente de protección contra daños a baja temperatura".

45 En la presente invención, el órgano o tejido puede derivarse de cualquier animal. Entre varios animales, son preferibles los órganos o tejidos derivados de un mamífero (seres humanos, simios, bovinos, cerdos, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratones, ratas o similares).

El órgano o tejido se aplica preferiblemente al trasplante de órganos o al trasplante de tejidos. Ejemplos de órganos incluyen corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas e intestino delgado; ejemplos preferibles incluyen corazón, hígado, riñón y páncreas; y ejemplos particularmente preferibles incluyen corazón e hígado. Los ejemplos de tejido incluyen córnea, piel, huesos, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, membranas amnióticas, islotes pancreáticos y similares; ejemplos preferibles incluyen islotes pancreáticos.

Además de la quercetina y al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa, se pueden incorporar adecuadamente aditivos conocidos en el agente de conservación de la presente invención.

La disolución de conservación para órganos o tejidos de la presente invención se caracteriza por comprender el agente de conservación descrito anteriormente. En la conservación de órganos o tejidos en la presente invención, la quercetina y al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa se usan en forma de una mezcla líquida (es decir, una mezcla fluida, preferiblemente una disolución) (correspondiente a la disolución de conservación en esta memoria descriptiva). La mezcla líquida generalmente contiene un disolvente además de quercetina y al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa. El disolvente no está particularmente limitado, y ejemplos del mismo incluyen una solución salina fisiológica, infusiones (infusión de electrolitos, infusión de nutrientes, infusión de carbohidratos, infusión de aminoácidos, disolución de glucosa, disolución de Ringer, disolución de acetato de Ringer, disolución de lactato de Ringer, etc.), una disolución tampón (PBS, disolución tampón Tris, disolución tampón Hepes, disolución tampón MOPS, disolución tampón PIPES, etc.), una disolución de cultivo celular (RPMI 1640, DMEM, etc.), disolución para conservar órganos o tejidos (solución EC, disolución UW, disolución ET-Kyoto, etc.), una disolución modena, etc.

La concentración de quercetina en la disolución de conservación de la presente invención es generalmente de 0,001 a 1000 µg/ml, preferiblemente de 0,01 a 100 µg/ml. La concentración de azúcar en la disolución de conservación de la presente invención es generalmente de 0,01 a 0,8 M, y preferiblemente de 0,025 a 0,4 M (cuando la disolución de conservación contiene fructosa y sacarosa, la concentración de azúcar significa la concentración total de la misma). La disolución de conservación de la presente invención puede contener otros componentes previamente conocidos, tales como antibióticos, agentes antibacterianos, antioxidantes, sueros, azúcares, lípidos, vitaminas, proteínas, péptidos, aminoácidos, indicadores de pH, agentes quelantes, reguladores de presión osmóticos y similares.

La presente invención se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura (temperatura baja) a la que los órganos o tejidos no se congelan. La temperatura a la cual los órganos o tejidos no se congelan no se puede definir incondicionalmente, ya que varía según los componentes contenidos en el agente de conservación o la disolución de conservación, la composición, el período de conservación, los órganos o tejidos a conservar, y similares. Desde el punto de vista de exhibir el efecto de protección contra daños a baja temperatura de la presente invención, por ejemplo, la temperatura es de -15 °C a 20 °C, preferiblemente de 0 °C a 20 °C, y más preferiblemente de 0 °C a 10 °C.

Al enfriar los órganos o tejidos, la mezcla líquida puede enfriarse antes de que los órganos o tejidos se sumerjan en ellos, o después de que los órganos o tejidos se sumerjan en ellos, en la medida en que los órganos o tejidos no se congelen. Además, una vez que la mezcla líquida que contiene un órgano o tejido se enfría, la mezcla líquida se mantiene a la misma temperatura en la medida en que el órgano o tejido no se congele. Sin embargo, no es necesario mantenerlo a una temperatura constante en todo momento; es aceptable que la temperatura pueda caer fuera del intervalo anterior solo por un corto período de tiempo.

Al usar una mezcla líquida que contiene quercetina y al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa de la presente invención, se puede garantizar un efecto de protección contra daños a baja temperatura. Dado que la presente invención permite la conservación de órganos o tejidos en condiciones adecuadas para la conservación, al tiempo que inhibe el daño a baja temperatura derivado de tales condiciones, la presente invención permite la conservación de órganos o tejidos en condiciones apropiadas.

Ejemplos

La presente invención se explica más específicamente a continuación en referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos, etc.

Ejemplo de ensayo 1: Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar en un ensayo de conservación de órganos

Se supuso la acción protectora de una disolución de conservación para órganos o tejidos utilizada en el trasplante de órganos o en el trasplante de tejidos, y se evaluaron las formulaciones de disoluciones de conservación que contenían disolución UW y una combinación de quercetina y azúcar utilizando el grado de daño hepático como índice.

Se usó como una disolución de perfusión de órganos una disolución de Williams solo (GIBCO, N.º 12551-032), disolución de Williams que contiene quercetina (Sigma-Aldrich, 337951-25G) (10 µg/mL), disolución de Williams que contiene quercetina (10 µg/mL) y fructosa (0,05M a 0,4 M) (Kanto Chemical Co., Inc., código N.º 16065-00) (0,05M a 0,4M), o disolución de Williams que contiene quercetina (10 µg/mL) y sacarosa (0,025M a 0,2M) (Nacalai Tesque, Inc., código N.º 30404-45) (0,025M a 0,2M). Posteriormente, se usó como disolución de conservación de órganos, una disolución UW solo (VSP1000, ViaSpan 1000 mL: Astellas Pharma Inc.), una disolución UW que contiene quercetina

(10 µg/mL), una disolución UW que contiene quercetina (10 µg/mL) y fructosa (0,05M a 0,4M), o una disolución UW que contiene quercetina (10 µg/ml) y sacarosa (0,025M a 0,2M).

5 A las ratas SD (machos, peso corporal = 255,4 g a 339,0 g) se les inyectó heparina desde la vena porta bajo anestesia. Posteriormente, se perfundieron con una solución salina fisiológica (8 cm H₂O, aproximadamente 100 ml) a temperatura ambiente, y después se perfundieron con cada disolución de perfusión de órganos (8 cm H₂O, aproximadamente 100 ml) a temperatura ambiente. Posteriormente, el hígado se extirpó, se sumergió en 20 ml de cada disolución de conservación de órganos y se conservó a 4 °C. Una parte de cada disolución de conservación de órganos se recogió 1 día después, 3 días después, 5 días después y 7 días después de que se iniciara la conservación, y se midió la ALT (alanina aminotransferasa) (UI/L) como índice del grado de daño hepático debido a la conservación a baja temperatura. Las ALT medidas se muestran en las tablas 1 y 2 (valor promedio de n = 3 ± desviación estándar).

Tabla 1

Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar (efectos de conservación del hígado)					
Concentración en adición		Valor ALT en disolución de inmersión en órganos (UI/L)			
Quercetina	Azúcar	1 día después	3 días después	5 días después	7 días después
(1) -	-	292±100	404±172	416±166	440±172
(2) 10 µg/mL	-	65±71	90±82	98±77	117±71
(3) 10 µg/mL	Fructosa 0,05M	18±8	37±13	55±3	83±13
(4) 10 µg/mL	Fructosa 0,1M	30±21	57±23	84±52	128±93
(5) 10 µg/mL	Fructosa 0,2M	24±8	49±13	59±12	92±15
(6) 10 µg/mL	Fructosa 0,4M	21±8	43±16	53±14	72±10

Tabla 2

Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar (efectos de conservación del hígado)					
Concentración en adición		Valor ALT en disolución de inmersión en órganos (UI/L)			
Quercetina	Azúcar	1 día después	3 días después	5 días después	7 días después
(1) -	-	399±125	577±207	583±211	616±215
(2) 10 µg/mL	-	62±68	108±121	126±135	148±144
(3) 10 µg/mL	Sacarosa 0,025M	18±16	35±33	58±64	79±72
(4) 10 µg/mL	Sacarosa 0,05M	28±5	53±12	62±15	84±21
(5) 10 µg/mL	Sacarosa 0,1M	21±15	40±35	52±44	82±74
(6) 10 µg/mL	Sacarosa 0,2M	34±21	55±22	77±20	134±56

15 La ALT en la conservación en la disolución UW que contenía quercetina y trehalosa fue mayor que la ALT en la conservación en la disolución UW que contenía quercetina y fructosa o en la disolución UW que contenía quercetina y sacarosa.

Ejemplo de ensayo 2: Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar en un ensayo de conservación de órganos

20 El mismo ensayo que en el ejemplo de prueba 1 se realizó usando corazón en lugar de hígado, y las formulaciones de disoluciones de conservación que contienen disolución UW, y una combinación de quercetina y azúcar se evaluaron usando el grado de daño cardíaco como índice.

25 Solo se usó una disolución de Williams, una disolución de Williams que contiene quercetina (10 µg/ml) y fructosa (0,2M), o una disolución de Williams que contiene quercetina (10 µg/ml) y sacarosa (0,1M) como disolución para perfusión de órganos. Posteriormente, solo se usó disolución UW, disolución UW que contiene quercetina (10 µg/ml) y fructosa (0,2M), o disolución UW que contenía quercetina (10 µg/ml) y sacarosa (0,1M) como disolución para conservar los órganos.

A las ratas SD (machos, peso corporal = 257,4 g a 280,3 g) se les inyectó heparina de la vena grande debajo de la porción suprahepática bajo anestesia. Posteriormente, se perfundieron con una solución salina fisiológica (8 cm H₂O,

aproximadamente 100 ml) a temperatura ambiente, y después se perfundieron con cada disolución de perfusión de órganos (8 cm H₂O, aproximadamente 100 ml) a temperatura ambiente. Posteriormente, se extirpó el corazón, se sumergió en 20 ml de cada disolución de conservación de órganos y se conservó a 4 °C. Se recogió una parte de cada disolución de conservación de órganos 1 día después, 2 días después, 3 días después y 4 días después de que se iniciara la conservación, y se midió la LDH (lactasa deshidrogenasa) (UI/L) como un índice del grado de daño cardíaco debido a la conservación a baja temperatura. Las LDH medidas se muestran en la tabla 3 (valor promedio de n = 3 ± desviación estándar).

Tabla 3

Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar (efectos de conservación del corazón)					
Concentración en adición		Valor LDH en disolución de inmersión en órganos (1U/L)			
Quercetina	Azúcar	1 día después	2 días después	3 días después	4 días después
(1) -	-	213±54	312±71	403±83	528±113
(2) 10 µg/mL	Fructosa 0,2M	134±56	190±76	238±78	287±81
(3) 10 µg/mL	Sacarosa 0,1M	116±15	172±12	248±40	319±40

10 Ejemplo de ensayo 3: Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar en un ensayo de conservación de órganos o tejidos, cambio histopatológico

Las formulaciones de disoluciones de conservación que contienen disolución UW, y una combinación de quercetina y azúcar se evaluaron utilizando un cambio histopatológico hepático como índice.

15 Solo disolución de Williams, disolución de Williams que contiene solo quercetina (10 µg/mL), disolución de Williams que contiene solo fructosa (0,2M), disolución de Williams que contiene solo sacarosa (0,1M), disolución de Williams que contiene quercetina (10 µg/mL) y fructosa (0,2 M), o se usó una disolución de Williams que contiene quercetina (10 µg/ml) y sacarosa (0,1 M) como disolución de perfusión de órganos. Posteriormente, como una disolución para conservar órganos, solo disolución UW, disolución UW que contiene solo quercetina (10 µg/mL), disolución UW que contiene solo fructosa (0,2M), disolución UW que contiene solo sacarosa (0,1M), disolución UW que contiene quercetina (10 µg/ml) y fructosa (0,2M) o disolución UW que contenía quercetina (10 µg/ml) y sacarosa (0,1M).

20 A las ratas SD (machos, peso corporal = 264,1 g a 317,2 g) se les inyectó heparina desde la vena porta bajo anestesia. Posteriormente, se perfundieron con una disolución salina fisiológica (8 cm H₂O, aproximadamente 100 ml) a temperatura ambiente, y después se perfundieron con cada disolución de perfusión de órganos (8 cm H₂O, aproximadamente 100 ml) a temperatura ambiente. Posteriormente, el hígado se extirpó, se sumergió en 20 ml de cada disolución de conservación de órganos y se conservó a 4 °C. 1 día después y 2 días después de que se iniciara la conservación, todas las muestras de hígado se inmovilizaron usando una disolución acuosa de tampón fosfato al 10% y se embebieron en parafina según el método estándar. Cada muestra se cortó en aproximadamente 6 µm y se preparó una muestra de tinción hematoxilina-eosina, seguida de un examen microscópico. Los grados del cambio histopatológico observado se convirtieron en puntuaciones como se muestra a continuación y se sumaron como valores acumulativos. Las tablas 4 y 5 muestran los resultados.

25 Puntuación 0: no se observó ningún cambio, puntuación 0,5: se observó un ligero cambio, puntuación 1,0: se observó un pequeño cambio, puntuación 2,0: se observó un cambio intermedio, puntuación 3,0: se observó un gran cambio.

Tabla 4

Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar (1 día después de comenzar la conservación a 4 °C)				
Concentración en adición		Cambio histopatológico (puntuación acumulativo de n = 3)		
Quercetina	Azúcar	Degeneración vacuolar difusa	Tumefacción turbia esporádica de una sola célula	Necrosis esporádica de células individuales
(1) -	-	3,0	7,0	4,0
(2) 10 µg/mL	-	3,0	1,5	0,0
(3) -	Fructosa 0,2M	2,0	2,5	1,0
(4) -	Sacarosa 0,1M	3,0	2,0	0,5
(5) 10 µg/mL	Fructosa 0,2M	0,0	0,0	0,0
(6) 10 µg/mL	Sacarosa 0,1M	0,0	0,0	0,0

Tabla 5

Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar (2 días después de comenzar la conservación a 4 °C)				
Concentración en adición		Cambio histopatológico (puntuación acumulativo de n = 3)		
Quercetina	Azúcar	Degeneración vacuolar difusa	Tumefacción turbia esporádica de una sola célula	Necrosis esporádica de células individuales
(1) -	-	3,0	8,0	5,0
(2) 10 µg/mL	-	3,0	2,0	0,5
(3) -	Fructosa 0,2M	1,5	1,0	0,5
(4)	Sacarosa 0,1M	3,0	2,5	1,0
(5) 10 µg/mL	Fructosa 0,2M	0,0	0,0	0,0
(6) 10 µg/mL	Sacarosa 0,1M	0,0	0,0	0,0

Ejemplo de ensayo 4: (Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar en un ensayo de conservación de órganos o tejidos, trasplante ortotópico de hígado de rata)

- 5 Las formulaciones de disoluciones de conservación que contienen disolución UW y una combinación de quercetina y azúcar se evaluaron mediante un trasplante ortotópico de hígado de rata.

La disolución de Williams sola, y la disolución de Williams que contiene quercetina (10 µg/mL) y sacarosa (0,1M) se usaron como disoluciones de perfusión de órganos. Posteriormente, la disolución de UW sola, y la disolución de UW que contiene quercetina (10 µg/ml) y sacarosa (0,1M) se usaron como disoluciones para conservar órganos.

- 10 Se inyectó heparina a las ratas SD donantes (macho, peso corporal = 273,8 g a 335,7 g) de la vena porta bajo anestesia. Posteriormente, se perfundieron con una solución salina fisiológica (8 cm H₂O, aproximadamente 100 ml) a temperatura ambiente, y después se perfundieron con cada disolución de perfusión de órganos (8 cm H₂O, aproximadamente 100 ml) a temperatura ambiente. Posteriormente, el hígado se extirpó, se sumergió en 20 ml de cada disolución de conservación de órganos y se conservó a 4 °C. 1 día después de comenzar la conservación, los
- 15 hígados se trasplantaron ortotópicamente a las ratas receptoras. Dos horas después del trasplante, la ALT en sangre se midió como un índice del grado de daño hepático debido a la conservación a baja temperatura. La ALT sanguínea se muestra en la tabla 6 (valor promedio de n = 3 ± desviación estándar). Además, todos los hígados se inmovilizaron simultáneamente usando una disolución acuosa de tampón fosfato al 10% y se embebieron en parafina según el
- 20 método estándar. Cada muestra se cortó en aproximadamente 6 µm, y se preparó una muestra de tinción con hematoxilina-eosina, seguida de un examen microscópico. Los grados del cambio histopatológico observado se convirtieron en puntuaciones como se muestra a continuación y se sumaron como valores acumulativos. La tabla 7 muestra los resultados.

Puntuación 0: no se observó ningún cambio, puntuación 0,5: se observó un ligero cambio, puntuación 1,0: se observó un pequeño cambio, puntuación 2,0: se observó un cambio intermedio, puntuación 3,0: se observó un gran cambio.

25

Tabla 6

Efectos del uso combinado de quercetina y azúcar (ALT en sangre de trasplante ortotópico de hígado de rata (UI/L))	
Agente de conservación	ALT en sangre (UI/L)
(1) UW	119±13
(2) UW + Quercetina 10 µg/mL + Sacarosa 0,1M	78±8

Tabla 7

Cambio histopatológico hepático (puntuación acumulativo de n = 3)			
Agente de conservación	Sangrado parcial	Degeneración parcial de células endoteliales sinusoidales	Necrosis esporádica de células individuales
(1) UW	4,0	3,0	3,0
(2) UW + 10 µg/mL Quercetina + 0,1M Sacarosa	0,0	0,0	0,0

REIVINDICACIONES

1. Un agente de conservación para órganos o tejidos, que comprende (A) quercetina; y (B) al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa.
- 5 2. El agente de conservación según la reivindicación 1, en donde el órgano o tejido es corazón, hígado, riñón, páncreas o islote pancreático.
3. Una disolución de conservación para órganos o tejidos, que comprende el agente de conservación según la reivindicación 1.
- 10 4. Un método de conservación ex vivo para órganos o tejidos, que comprende la etapa de sumergir un órgano o tejido en una mezcla líquida que comprende (A) quercetina; y (B) al menos un azúcar seleccionado del grupo que consiste en fructosa y sacarosa.
5. El método según la reivindicación 4, en donde el órgano o tejido es corazón, hígado, riñón, páncreas o islote pancreático.