(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 080 708**

(51) Int. CI.:

A61L 15/28 (2006.01)
A61L 15/40 (2006.01)
A61L 15/42 (2006.01)
A61L 24/00 (2006.01)
A61L 24/08 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2022 PCT/EP2022/075521**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2023 WO23041578**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2022 E 22789191 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2026 EP 4401799**

(54) Título: **Andamiaje de tipo esponja para fomentar hemostasia**

(30) Prioridad:

15.09.2021 EP 21382834

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2026

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA (100,00%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Bizkaia, ES

(72) Inventor/es:

HERNÁNDEZ MARTÍN, ROSA MARÍA;
SANTOS VIZCAÍNO, EDORTA;
IGARTUA OLAECHEA, MANUELA;
LAS HERAS ZAPATA, KEVIN;
JIMÉNEZ MARTÍN, JON;
DE LA CABA CIRIZA, MARÍA CORO;
GUERRERO MANSO, PEDRO MANUEL y
ETXABIDE ETXEBERRIA, ALAITZ

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Andamiaje de tipo esponja para fomentar hemostasia

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un andamiaje de tipo esponja para uso en fomentar hemostasia y el tratamiento de heridas sangrantes. Por tanto, se puede considerar que el campo de la invención es medicina, específicamente preparaciones para fines médicos.

Antecedentes de la invención

La hemostasia es el proceso para prevenir y detener la hemorragia. La hemostasia se produce cuando la sangre está presente fuera del cuerpo o vasos sanguíneos. Es la respuesta innata para que el cuerpo pare la hemorragia y pérdida de sangre. Durante la hemostasia se producen tres etapas en una secuencia rápida: espasmo vascular es la primera etapa en donde los vasos sanguíneos se contraen para permitir que se pierda menos sangre; formación de tapón de plaquetas es la segunda etapa, donde las plaquetas se pegan para formar un sello temporal para cubrir la rotura en la pared del vaso; y la tercera etapa final es coagulación o revestimiento sanguíneo, que refuerza el tapón plaquetario con hebras de fibrina que actúa como un “pegamento molecular”. Se puede lograr hemostasia de varias otras formas si el cuerpo no puede hacerlo de forma natural (o necesita ayuda) durante cirugía o tratamiento médico. Cuando el cuerpo está en choque y tensión, la hemostasia es más difícil de lograr.

Un ejemplo de un proceso de hemostasia se produce durante una hemorragia nasal, también conocido como epistaxis o sangrado de nariz, es una de las urgencias otorrinolaringológicas más comunes en el mundo. Se estima que el 60% de la población mundial experimentará una epistaxis al menos una vez en su vida, aunque solo aproximadamente del 6% al 10% de ellos buscará atención médica. A pesar de ser habitualmente sencilla de tratar, la hemorragia nasal grave podría causar riesgos serios para el paciente, especialmente para esos mayores de 70 años, para los que la incidencia de estos episodios es mayor. Además de esto, la lesión nasal después de cirugía nasal es una consecuencia adversa, para la que el tratamiento debe empezarse rápidamente. Varios métodos están disponibles para tratar epistaxis, entre los cuales electrocauterización, vasoconstrictores, procedimientos quirúrgicos y taponamiento nasal surgen como los más populares.

Se han descrito materiales adecuados para fomentar hemostasia. Por ejemplo, Lu et al (Biomacromolecules 2004, 5:1046) han descrito películas de nanocompuesto comprimido con calor de nanofilamentos de α-quitina. Estas composiciones se producen mediante una serie de condiciones duras que modifican la estructura de la quitina. Estas películas, aunque capaces de fomentar hemostasia no son ideales como dispositivos de taponamiento nasal. Otros materiales con propiedades hemostáticas incluyen péptidos no estructurados obtenidos por tratamiento de proteína de soja (documento WO 2017/015488 A1) o quitosano (quitina desacetilada) (Song et al., 2021, Carbohydrate Polymers, Polymers, Applied Science Publishers, LTD Barking, vol. 73).

Aunque estos materiales tienen propiedades hemostáticas, no son ideales para el tratamiento de hemorragia nasal, o para taponamiento sanitario.

El taponamiento nasal, que implica la inserción de un producto de tipo tampón en la cavidad nasal, es de un interés especial para el tratamiento de epistaxis, ofreciendo tasas elevadas de éxito. No obstante, la elección del tapón nasal más adecuado es vital para el desenlace del tratamiento. El producto de tapón nasal más ampliamente usado es una gasa básica mientras el tapón nasal usado mundialmente como el estándar de referencia es Merocel® (MRC), una esponja deshidratada comprimida compuesta de acetato de polivinilo hidroxilado, que es el tapón nasal no absorbible principal en varios departamentos de urgencias alrededor del mundo.

Mientras el tapón nasal ideal debe fomentar hemostasia mientras es cómodo para el paciente, así como impedir daño a la mucosa, tanto los materiales de gasa como MRC son no absorbibles -produciendo molestia al paciente durante la retirada- y actúan solo por taponamiento de presión física, sin ningún efecto hemostático intrínseco. Por tanto, son necesarias alternativas a los tapones nasales actualmente comercializados.

SONG XIAOQIANG ET AL: "Effects of degree of deacetylation on haemostatic performance of partially deacetylated chitin sponges", CARBOHYDRATE POLYMERS, APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD BARKING, GB, vol. 273, 28 agosto 2021, ISSN: 0144-8617, DOI:10.1016/ J.CARBPOL.2021.11865 divulga las propiedades hemostáticas de esponjas de quitina.

Compendio de la invención

Los inventores de la presente invención han desarrollado un andamiaje de tipo esponja que comprende proteína de soja, quitina y un plastificante que tiene propiedades fisicoquímicas y mecánicas ideales para ser usado como un promotor hemostático. Por tanto, un primer aspecto se refiere a un andamiaje de tipo esponja que comprende proteína de soja (SPI), quitina (CH) y un plastificante para uso en fomentar hemostasia.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un producto hemostático que comprende un andamiaje de tipo esponja como se define en el aspecto previo de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización fisicoquímica. (A) Distribución de tamaño de poro de los materiales. (B) Porosidad (%) de cada material. Barras de error, media ± DE. * indica p < 0,05; *** indica p < 0,001 en comparación con el grupo de gasa. N.S., no significativo (p > 0,05). (C) Micrografías de MEB de materiales secos. (D) Perfiles de hinchamiento. Barras de error, media ± DE. N.S., no significativo (p > 0,05). (E) Proporción de retención de líquido a presiones diferentes. Barras de error, media ± DE. &&& indica p < 0,001 al comparar entre los grupos de gasa y MRC. # indica p < 0,05; ## indica p < 0,01; ### indica p < 0,001 comparando entre grupos MRC y SP-CH. *** indica p < 0,001 comparando entre los grupos de gasa y SP-CH. (F) Degradación hidrolítica. Barras de error, media ± DE. N.S., no significativo (p > 0,05).

Figura 2. Caracterización mecánica. (A) esquema del procedimiento llevado a cabo para la prueba de compresión cíclica. (B-D) Curvas de tensión-deformación de compresión cíclica de gasa (B), MRC (C) y SP-CH (D). (E) Tensión relativa (%) de los materiales para 10 compresiones cíclicas. Barras de error, media ± DE. && indica p < 0,01 comparando entre los grupos de gasa y MRC. ** indica p < 0,01 comparando entre los grupos de gasa y SP-CH. (F) Módulo de Young de los materiales a diferentes deformaciones. (G) Coeficientes de amortiguación del material para los ciclos 1 y 10. Barras de error, media ± DE. &&& indica p < 0,001 comparando entre los grupos de gasa y MRC. *** indica p < 0,001 al comparar SP-CH a los otros grupos. $$$ indica p < 0,001 comparando entre el ciclo 1 y el ciclo 10 del mismo grupo. (H) Esquema del procedimiento llevado a cabo para la prueba de fuerza de expansión. (I) Curvas de fuerza de expansión relativa de los materiales. * indica el momento en que se añadió agua a cada material. (J) Fuerza de expansión relativa de los materiales. Barras de error, media ± DE. *** indica p < 0,001 al comparar SP-CH al resto de los grupos. N.S., no significativo (p > 0,05).

Figura 3. Estudios de citotoxicidad. (A) Citotoxicidad directa. (B) Citotoxicidad indirecta. La línea marca el 70% de viabilidad celular. Barras de error, media ± DE. N.S., no significativo (p > 0,05). * indica p < 0,05; ** indica p < 0,01; *** indica p < 0,001 en comparación con el grupo control. # indica p < 0,05 comparando entre grupos. (C) Micrografías vivo/muerto de los materiales con células cultivadas, con tinción de calceína-etidio. Las barras de escala son 100 y 40 µm en las filas superior e inferior, respectivamente.

Figura 4. Rendimiento en sangre. (A) Degradación en sangre. Barras de error, media ± DE. && indica p < 0,01 comparando entre los grupos de gasa y MRC. # indica p < 0,05; ## indica p < 0,01; ### indica p < 0,001 comparando entre grupos MRC y SP-CH. * indica p < 0,05; ** indica p < 0,01; *** indica p < 0,001 comparando entre los grupos de gasa y SP-CH. (B) Imágenes de las placas correspondientes a la degradación en sangre después de 2, 3, 4, y 7 días. (C) Capacidad de hinchamiento máxima en sangre. Barras de error, media ± DE. * indica p < 0,05 comparando entre grupos. (D) Ensayo de hemólisis. La línea marca el 5% de hemólisis. Barras de error, media ± DE. N.S., no significativo (p > 0,05). * indica p < 0,05 comparando entre grupos. (E) Índice de coagulación sanguínea de los materiales. Barras de error, media ± DE. *** indica p < 0,001 comparando entre grupos. (F) Imagen del método de inversión de tubo para evaluar visualmente la coagulación sanguínea.

Figura 5. Adhesión de glóbulos rojos. (A) Hemoglobina fuera de los materiales. Barras de error, media ± DE. N.S., no significativo (p > 0,05). *** indica p < 0,001 comparando con el grupo control; ## indica p < 0,01 comparando entre grupos. (B) Fotografías del aspecto de los materiales en diferentes fases de la determinación de la hemoglobina fuera de los materiales. (C) Hemoglobina en los materiales. Barras de error, media ± DE. N.S., no significativo (p > 0,05). *** indica p < 0,001 comparando entre grupos. (D) Fotografías del aspecto de los materiales en diferentes fases de la determinación de la hemoglobina en los materiales. (E) Micrografías de MEB de glóbulos rojos adheridos a la superficie de los materiales.

Figura 6. Adhesión de plaquetas. (A) Liberación de LDH normalizada (%) de los materiales. Barras de error, media ± DE. N.S., no significativo (p > 0,05). ### indica p < 0,001 comparando entre los grupos. n = 5 muestras independientes por grupo. (B) Micrografías de MEB de plaquetas adheridas a la superficie de los materiales.

Figura 7. Eficacia hemostática in vivo. (A) Puntuación de tiempo de sangrado de los tres materiales. Barras de error, media ± DE. * indica p < 0,05 comparando SP-CH con los otros materiales. (B) Pérdida de sangre (g). Barras de error, media ± DE. N.S., no significativo (p > 0,05).

Descripción detallada de la invención

El ámbito de protección se define por las reivindicaciones. Las referencias a métodos de tratamiento se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia.

La presente descripción se refiere a la invención de un andamiaje de tipo esponja (SLS) que comprende aislado de proteína de soja (SPI), quitina (CH) y un plastificante para uso como un promotor de hemostasia. Los inventores de la presente invención han determinado que las características estructurales del SLS, junto con sus propiedades fisio y químicas hacen el SLS un material ideal para fomentar procesos de hemostasia y como tal para uso en productos diseñados para implementarse en el tratamiento de sucesos de hemorragia.

Uso del andamiaje de tipo esponja

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un SLS que comprende SPI, CH y un plastificante, de aquí en adelante el SLS de la invención, para uso en hemostasia.

El término “andamiaje de tipo esponja”, también denominado por su acrónimo SLS, como se usa en el presente documento se refiere a una estructura compuesta de uno o más componentes que imitan la matriz extracelular (MEC) de un cuerpo animal que proporciona soporte estructural y soporte bioquímico a las células circundantes. Dicho SLS puede caracterizarse por propiedades estructurales tal como porosidad, tamaño de poro, degradación, perfil de hinchamiento, resistencia a la deformación, coeficiente de amortiguación y otras propiedades mecánicas, así como propiedades fisicoquímicas tal como capacidad de hinchamiento y degradabilidad, y por propiedades biomédicas tal como citotoxicidad, y biocompatibilidad, entes otras.

En una forma de realización preferida del uso de la invención el SLS de la invención tiene una porosidad de aproximadamente entre el 65% y el 95%, preferiblemente de aproximadamente entre el 70% y el 80%, más preferiblemente la porosidad media del SLS de la invención es de aproximadamente el 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, o 95%. El término “porosidad” como se usa en el presente documento se refiere a la fracción vacía de un material, es decir, el espacio vacío en un material y es una fracción (o porcentaje) del volumen de huecos sobre el volumen total. Los métodos para medir la porosidad los conoce el experto en el campo. Los ejemplos de tales métodos son, sin limitación, porosimetría de mercurio, adsorción de gas (tal como adsorción de nitrógeno) y desplazamiento líquido usando etanol al 98% como se ejemplifica posteriormente en el ejemplo 1.1.

Otra característica mecánica importante para la función del SLS es el tamaño de poro de dicho andamiaje. El “tamaño de poro” como se usa en el presente contexto se refiere al tamaño de cada hueco individual en el SLS. El tamaño de poros individuales puede determinar las propiedades hemostáticas del SLS y se debe buscar un equilibrio entre tamaño de poro grande, que permite la internalización de glóbulos rojos y plaquetas, y tamaño de poro pequeño que proporciona área de superficie óptima, mejorando la adhesión. Como tal, en una forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS tiene un tamaño de poro de aproximadamente entre 0,5 milímetros (mm) y 1,5 mm, preferiblemente un tamaño de poro medio de aproximadamente 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1 mm, 01,1 mm, 1,2 mm, 1,3 mm, 1,4 mm, 1,5 mm. De forma similar a la porosidad, el experto en el campo también conoce bien métodos para medir el tamaño de poro e incluyen, sin limitación, análisis de imágenes de microscopía electrónica de transmisión o micrografías de microscopía electrónica de barrido como se ejemplifica posteriormente en el ejemplo 1.1.

El SLS de la invención comprende tres componentes, es decir, SPI, CH y un plastificante.

El término “aislamiento de proteína de soja” o su acrónimo “SPI”, como se usa en el presente documento se refiere al compuesto obtenido de harina de soja, un subproducto del proceso de fabricación de la industria de la soja. SPI, en general se obtiene de harina de soja desgrasada con una solubilidad en agua por extracción en una solución con un pH inferior a 9. Una vez el extracto se recupera, se clarifica para eliminar el material insoluble y el líquido sobrenadante se acidifica a un intervalo de pH de 4-5. El cuajo de proteína precipitada se recoge y separa del suero por centrifugación. En una forma de realización preferida del andamiaje para uso según la invención el compuesto SPI comprende al menos el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de proteína, preferiblemente el 90% de proteína. SPI es un biomaterial abundante que muestra biocompatibilidad y baja inmunogenicidad, en parte, debido a su composición de aminoácidos y química. Por tanto, en otra forma de realización del uso de la invención, el compuesto SPI comprende ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp), leucina (Leu), glicina (Gly), alanina (Ala) y prolina (Pro), en un porcentaje con respecto a los residuos de aminoácidos totales presentes en el SPI, de al menos el 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, o 11% cada uno, al menos el 6% cada uno. El experto en la materia sabrá cómo determinar el contenido de aminoácidos de SPI, así como la composición elemental. Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para determinar el contenido de aminoácidos en un material dado son cromatografía de intercambio iónico acoplada con detección de aminoácidos en una derivación de columna posterior con reactivo ninhidrina (analizador de aminoácidos) y espectroscopía infrarroja de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).

El SPI también posee azufre que tiene una función importante formando enlaces disulfuro intercadena e intracadena y por tanto es importante para la estabilidad estructural del SLS. En una forma de realización preferida del uso de la invención, el compuesto SPI tiene un contenido de azufre de aproximadamente menos del 2%, preferiblemente de aproximadamente menos del 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, preferiblemente aproximadamente el 1%.

Para determinar la composición elemental de SPI, la combustión espontanea con separación cromatográfica posterior es un ejemplo no limitante de una técnica que puede usarse.

En una forma de realización, el SPI para uso según la invención comprende Glu, Asp, Leu, Ser, Gly, Ala y Pro, en un porcentaje con respecto a los residuos de aminoácidos totales presentes en el SPI, de al menos el 6% cada uno.

SPI contiene elementos que fomentan la hemostasia por medio de su interacción química con componentes celulares y humorales de la ruta de coagulación. En particular, SPI es una fuente de filoquinona o vitamina K1 que sirve como un cofactor para la enzima endoplásmica γ-glutamato carboxilasa (GGCX), que es esencial para la carboxilación de ciertos residuos de glutamato unidos a proteína a γ-carboxiglutamato (Gla). Además, el SPI presente en la esponja tiene motivos RGD que permite su unión a plaquetas.

Es, por tanto, evidente que propiedades del SLS de la invención dependen de sus características químicas/moleculares de sus componentes, además de su estructura de tipo esponja, que afecta sus propiedades hemostáticas.

El término “quitina” o el acrónimo “CH” como se usa en el presente documento se refiere a un polímero de cadena larga de β-(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, con una estructura $(C_8H_{13}O_5NH_2O)_n$ con unidades monoméricas de 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucosa (NAG), que están unidas entre sí a través de enlaces β(1→4).

CH se produce como microfibrillas cristalinas en la naturaleza que forman elementos estructurales de los exoesqueletos de artrópodos, paredes celulares fúngicas entre otros. Por tanto, en una forma de realización preferida del uso de la invención, la CH se obtiene de pluma de calamar. El término “pluma de calamar” como se usa en el presente documento se refiere al gladius, también conocido como “pluma”, una parte del cuerpo interna dura encontrada en muchos cefalópodos del superorden Decapodiformes, particularmente calamar, que está compuesto de principalmente quitina.

CH tiene tres formas cristalinas diferentes: formas α, β y γ. Estas se diferencian en la orientación de las microfibrillas. La forma más común de quitina es α-quitina, cuyas microfibrillas están orientadas de una manera antiparalela. β-quitina es una forma menos común de quitina cuyas microfibrillas están orientadas de una manera paralela. Por último, γ-quitina posee microfibrillas en orientaciones tanto paralela como antiparalela. En una forma de realización preferida del uso de la invención, la CH se selecciona de un grupo que consiste en: α-quitina, β-quitina, γ-quitina o cualquier combinación de las mismas. En una forma de realización más preferida la CH contiene β-quitina.

Para obtener el SLS de la invención el contenido de CH se determina en relación al contenido de SPI. Por tanto, en una forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS de la invención tiene un contenido de CH de aproximadamente entre el 20% al 40% peso a peso (p/p) con respecto al contenido de SPI seco, preferiblemente aproximadamente entre el 25% al 35% p/p con respecto al contenido de SPI seco, más preferiblemente aproximadamente el 30% p/p con respecto al contenido de SPI seco.

La CH natural tiene diferentes niveles de desacetilación, dando un continuo de estructura entre quitina (acetilada por completo) y quitosano (desacetilado por completo). Aunque se pueden usar o ácidos o álcalis para desacetilar CH, el hecho de que los enlaces glucosídicos son más susceptibles a ácido que destruiría la cadena, el proceso de desacetilación con álcali se usa más frecuentemente. En una forma de realización preferida del uso de la invención la CH se obtiene por una hidrólisis alcalina a temperatura ambiente.

La CH natural, en general, tiene un grado de acetilación de aproximadamente el 90%, mientras el quitosano es un derivado completa o parcialmente N-desacetilado con un grado típico de desacetilación de más del 65%. La quitina completamente desacetilada se vuelve soluble en ácidos acético y fórmico diluidos. En una forma de realización preferida del uso de la invención, la CH tiene un grado de acetilación de al menos el 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%, preferiblemente el 97%. En otra forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS carece sustancialmente de quitosano. La expresión “carece sustancialmente de quitosano” como se usa en el presente documento se refiere al hecho de que la CH usada en el SLS de la invención tiene un contenido mínimo de quitosano de menos del 10%, preferiblemente menos del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%.

El nivel de acetilación de CH se puede determinar por varias técnicas de las que el experto en la materia será consciente, tal como, y sin limitación, espectroscopía IR, cromatografía de gas por pirólisis, cromatografía de penetración en gel, espectrometría UV-vis, espectroscopía de H RMN, RMN de estado sólido de C, análisis térmico y análisis de rayos X.

El término “plastificante” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia química que aumenta la propiedad reológica del SLS, tal como viscosidad y elasticidad/flexibilidad. El contenido del plastificante en el SLS se determina en relación al contenido de SPI. Por tanto, en una forma de realización preferida del uso de la invención, el

SLS de la invención tiene un contenido de plastificante de aproximadamente entre el 10% al 50% peso a peso (p/p) con respecto al contenido de SPI seco, preferiblemente aproximadamente el 20% p/p con respecto al contenido de SPI seco, más preferiblemente aproximadamente el 30% p/p con respecto al contenido de SPI seco.

En una forma de realización preferida el plastificante es un poliol. El término “poliol” en el presente contexto es sinónimo con “alcohol de azúcar”, “alcohol polihídrico”, y “polialcohol” y se refiere a una forma hidrogenada de hidrato de carbono, cuyo grupo carbonilo (aldehído o cetona, azúcar reductor) se ha reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario (de ahí, el alcohol), tal como, por ejemplo, manitol de manosa, xilitol de xilosa, y lactitol de lactulosa. Los polioles tienen la fórmula general $H(HCHO)_n + 1H$. Tanto monosacáridos como disacáridos pueden formar polioles; sin embargo, los polioles derivados de disacáridos no están completamente hidrogenados porque solo un grupo aldehído está disponible para reducción. Los ejemplos no limitantes de polioles incluyen glicerol, eritritol, treitol, arabitol, eritritol, ribitol, xilitol, galactitol (o dulcitol), gluctiol (o sorbitol), iditol, inositol, manitol, isomalt, lactitol, maltitol, y poliglicitol. Por tanto, en una forma de realización preferida del uso de la invención el plastificante es un poliol seleccionado de un grupo consistente en: glicerol, eritritol, treitol, arabitol, eritritol, ribitol, xilitol, galactitol, gluctiol, iditol, inositol, manitol, isomalt, lactitol, maltitol, poliglicitol o cualquier combinación de los mismos. En otra forma de realización del uso de la invención el plastificante es glicerol.

El área de superficie del SLS se refiere a la capacidad que tiene un material de absorber fluidos tal como agua o sangre presente en hemorragias, es decir, su “capacidad de hinchamiento”. En otra forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS tiene una capacidad de hinchamiento máxima de aproximadamente entre el 1000% al 1800% de su peso inicial, preferiblemente de aproximadamente el 1050%, 1100%, 1150%, 1200%, 1250%, 1300%, 1350%, 1400%, 1450%, 1500%, 1550%, 1600%, 1650%, 1700%, 1750%, o 1800% de su peso inicial, más preferiblemente de aproximadamente el 1442% de su peso inicial. En otra forma de realización preferida el SLS tiene un perfil de capacidad de hinchamiento de aproximadamente entre el 1000% al 1800% de su peso inicial en 5 segundos, preferiblemente de aproximadamente el 1050%, 1100%, 1150%, 1200%, 1250%, 1300%, 1350%, 1400%, 1450%, 1500%, 1550%, 1600%, 1650%, 1700%, 1750%, o 1800% de su peso inicial en 5 segundos, más preferiblemente 1.383 de su peso inicial en 5 segundos. La capacidad de hinchamiento se puede determinar como se ejemplifica posteriormente en la sección de ejemplos.

Los términos “degradabilidad” o “degradación hidrolítica” como se usan en el presente documento se refiere a la propiedad del material que se reabsorbe por o pierde al tejido circundante mientras realiza su función. Es una propiedad relevante para el momento de extraer el material del sujeto, tal como un tapón nasal que se retira del orificio nasal, ya que reduce tanto el malestar del paciente como sangrado recurrente tras la retirada, entre otras ventajas. La degradabilidad o degradación hidrolítica se puede determinar como se explica en el ejemplo 2.3 de la presente descripción. En una forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS tiene una degradabilidad de aproximadamente el 15 al 30% de su peso inicial después de 48 h, preferiblemente de aproximadamente el 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, o 30% de su peso inicial después de 48 h.

El término “resistencia a la deformación” en el contexto de la presente invención se refiere a la capacidad del SLS de mantener su fuerza y viscoelasticidad sin perder resistencia en ciclos repetidos de compresión, que puede medirse por una prueba de compresión cíclica en donde el material se somete a una fuerza de degradación durante 10 ciclos y la pérdida de resistencia a la deformación puede medirse como un porcentaje de la tensión máxima requerida para deformar el material en el ciclo 1 en comparación con el ciclo 10 -tensión máxima relativa. En una forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS tiene una tensión relativa de aproximadamente entre el 80% y el 95% después de 10 ciclos, preferiblemente la porosidad media del SLS de la invención es de aproximadamente el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, o 95% después de 10 ciclos.

El SLS puede someterse a compresión mecánica y como tal su capacidad para disipar energía vibracional, y por tanto proteger de ondas de compresión de impacto, es relevante para la función del material. Esta propiedad se mide por el “coeficiente de amortiguación”, que de nuevo se mide durante ciclos de deformación del material como una parte de disipación de energía. En una forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS tiene un coeficiente de amortiguación de aproximadamente 0,65 y 0,80 en el primer ciclo de compresión, preferiblemente 0,65, 0,66, 0,67, 0,68, 0,69, 0,7, 0,71, 0,72, 0,73, 0,74, 0,75, 0,76, 0,77, 0,78, 0,79, o 0,80 en el primer ciclo de compresión. En otra forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS tiene un coeficiente de amortiguación de aproximadamente 0,50 y 0,60 en el décimo ciclo de compresión, preferiblemente 0,50, 0,51, 0,52, 0,53, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, o 0,6 en el décimo ciclo de compresión, más preferiblemente 0,57 en el décimo ciclo de compresión.

Otra propiedad mecánica de SLS es la capacidad de expandirse hacia fuera cuando absorbe líquido, denominado “fuerza de expansión” en la presente descripción. La fuerza de expansión se determina por una prueba de fuerza de expansión (véase el ejemplo 1.4) y se presenta como un porcentaje de una fuerza inicial del material. En una forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS tiene una fuerza de expansión de aproximadamente entre el 225% al 275% en respecto a la fuerza del material inicial, preferiblemente de aproximadamente el 225%, 230%, 235%, 240%, 245%, 250%, 250%, 255%, 265%, 270%, o 275% de su peso inicial, más preferiblemente de aproximadamente el 250% de su peso inicial.

Los métodos para determinar las propiedades mecánicas del SLS de la invención, es decir, tamaño de poro, porosidad, capacidad de hinchamiento, degradabilidad, resistencia a la deformación, coeficiente de amortiguación y fuerza de expansión, se ejemplifican en la sección de ejemplos de la presente descripción.

El SLS de la invención además tiene buenas propiedades de hemocompatibilidad como se indica por su grado de hemólisis. El término " hemólisis" como se usa en el presente documento se refiere a la destrucción de glóbulos rojos (RBC) debido a tensión cortante o cambios en la presión osmótica. En una forma de realización preferida del uso de la invención el SLS tiene una tasa de hemólisis de menos del 5%, preferiblemente menos del 4%.

El SLS de la invención se usa para fomentar hemostasia y por tanto fomenta la coagulación sanguínea. Por tanto, en una forma de realización preferida del uso de la invención el SLS tiene un índice de coagulación sanguínea (BCI) de aproximadamente entre el 15% y el 55%, preferiblemente de aproximadamente el 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, o 55%, más preferiblemente el 37%.

Método para obtener el SLS (no según la invención reivindicada)

Como se ha mencionado previamente el SLS de la invención está compuesto por los compuestos SPI, CH y plastificante. Según esto, en una forma de realización preferida del uso de la invención el SLS se ha obtenido por un método, de aquí en adelante el método de la invención, que comprende:

(i) Formar una mezcla que comprende SPI, CH y un plastificante a un pH básico,
(ii) Formar una estructura 3D vertiendo la mezcla obtenida en la etapa (ii) en moldes o impresión 3D y
(iii) Liofilizar el material obtenido en la etapa (ii).

La expresión "Formar una mezcla que comprende SPI, CH y un plastificante a un pH básico" de la etapa (i) del método de la invención como se usa en el presente documento se refiere al proceso de juntar los tres compuestos que forman el SLS, es decir, SPI, CH y plastificante, en una mezcla o combinación tal como una solución donde el solvente puede ser el plastificante mismo o cualquier otro solvente adecuado, tal como agua destilada, agua de tipo I o tipo II. En una forma de realización preferida del uso de la invención, la etapa (i) del método de la invención además comprende un solvente, preferiblemente agua destilada.

Una vez mezclados, el pH de la mezcla se ajusta para ser mayor de 6,5. En una forma de realización preferida del uso de la invención, en la etapa (i) del método de la invención el pH es mayor de 6,5, preferiblemente al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14, más preferiblemente el pH es 10.

Con el fin de obtener una mezcla homogénea, dicha mezcla se puede incubar y agitar. En una forma de realización preferida del uso de la invención, en la etapa (i) del método de la invención la mezcla se calienta a aproximadamente 60 grados (ºC) a 90ºC durante 15 minutos (min) a 45 min, preferiblemente 80ºC durante 30 min, con agitación, preferiblemente agitación magnética. En una forma de realización más preferida del uso de la invención en la etapa (i) del método de la invención, el proceso de calentamiento y agitación se puede repetir una o dos veces.

La expresión "formar una estructura 3D vertiendo la mezcla obtenida en la etapa (ii) en moldes o impresión 3D" como se usa en el presente documento se refiere al proceso de obtener un objeto tridimensional usando la mezcla obtenida en la etapa (i) del método de la invención, mediante lo cual ese proceso implica dar formar a la mezcla colocándola en un envase hueco, es decir, un molde, que tiene la estructura deseada y dejarlo solidificar o impresión 3D a la estructura deseada.

El término "impresión 3D" como se usa en el presente documento se refiere a métodos de fabricación aditiva que emplean un cabezal de impresora y/o etapa de traslación controlada por ordenador, que mueve un dispositivo generador de patrón en forma de una o más boquilla(s) de deposición para fabricar materiales según una forma predeterminada (preprogramada).

Una vez obtenida la mezcla deseada y habiéndola vertido en moldes o imprimido en 3D para obtener la forma 3D deseada, la siguiente etapa del proceso es liofilizar el material obtenido. El término "secar congelando", también conocido como liofilización o criodesecación, como se usa en el presente documento se refiere al proceso de deshidratación a baja temperatura, que implica congelar el producto, disminuir la presión y después eliminar el hielo por sublimación. En una forma de realización preferida del uso de la invención, la etapa (iii) del método de la invención se realiza colocando en primer lugar el material obtenido en la etapa (ii) a una temperatura de aproximadamente entre -30ºC a -10ºC durante de 24 horas a 72 horas, preferiblemente -22ºC durante 48 horas, seguido por dejar el material a una temperatura de aproximadamente entre -30ºC a -10ºC durante de 48 h a 96h, preferiblemente -22ºC durante 72 h.

En una forma de realización preferida del uso de la invención, el SPI usado en la etapa (i) del método de la invención comprende al menos el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de proteína, preferiblemente el 90% de proteína.

En una forma de realización preferida del uso de la invención, el SPI usado en la etapa (i) del método de la invención comprende Glu, Asp, Leu, Gly, Ala y Pro, en un porcentaje con respecto a los residuos de aminoácidos totales presentes en el SPI, de al menos el 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, o 11% cada uno. En otra forma de realización preferida del uso de la invención, el SPI usado en la etapa (i) del método de la invención para obtener el SLS tiene un contenido de azufre de aproximadamente menos del 2%, preferiblemente de aproximadamente menos del 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, preferiblemente aproximadamente el 1%.

En otra forma de realización preferida del uso de la invención, la CH usada en la etapa (i) del método de la invención se selecciona de un grupo que consiste en: α-quitina, β-quitina, γ-quitina o cualquier combinación de las mismas, preferiblemente β-quitina.

En otra forma de realización preferida del uso de la invención, la CH usada en la etapa (i) del método de la invención tiene un grado de acetilación de al menos el 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%, preferiblemente el 97%.

En otra forma de realización preferida del uso de la invención, la CH usada en la etapa (i) del método de la invención es la obtenida de una pluma de calamar.

En otra forma de realización preferida del uso de la invención, la CH usada en la etapa (i) del método de la invención se obtiene de una pluma de calamar por un método que comprende:

(i) tratar la pluma de calamar en condiciones alcalinas, y
(ii) lavar la fracción sólida.

La expresión “tratar la pluma de calamar con una solución alcalina” en la etapa (i) del método de obtener la CH de una pluma de calamar, como se usa en el presente documento se refiere al proceso de obtener CH de la pluma de calamar por una hidrólisis alcalina. Dicha hidrólisis alcalina produce la desacetilación de CH. El término “solución alcalina” como se usa en el presente documento se refiere a una solución que tiene un álcali, es decir, una sal básica, iónica de un metal alcalino disuelto en agua y cuyo pH de la solución es mayor que pH 7. Los ejemplos de dichas sales iónicas, sin limitación son hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$), e hidróxido de magnesio ($Mg(OH)_2$). En una forma de realización preferida del uso de la invención, la solución alcalina de la etapa (i) del método de obtener CH de una pluma de calamar comprende una sal iónica seleccionada de: hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$), hidróxido de magnesio ($Mg(OH)_2$) y cualquier combinación de las mismas, preferiblemente NaOH. La concentración necesaria de dicha sal iónica en una solución es la suficiente para lograr el efecto deseado de obtener CH. En una forma de realización preferida del uso de la invención, la solución alcalina de la etapa (i) del método para obtener CH de una pluma de calamar comprende una sal iónica a 1 molar (1 M), preferiblemente NaOH a 1 M.

Asimismo, con el fin de minimizar la desacetilación de la CH nativa, el volumen y condiciones de incubación requeridos de la solución alcalina también es la suficiente para obtener CH de la pluma de calamar, y el experto en el campo será capaz de determinar fácilmente tal volumen usando técnicas experimentales comunes. En una forma de realización preferida del uso de la invención, la solución alcalina de la etapa (i) del método para obtener CH de una pluma de calamar se usa M en una relación de 1/15 a 1/25 peso a volumen (p/v) respecto al peso de la pluma de calamar, preferiblemente 1/16 p/v, 1/17 p/v, 1/18 p/v, 1/19 p/v, 1/20 p/v, 1/21 p/v, 1/22 p/v, 1/23 p/v, o 1/24 p/v, más preferiblemente 1/20 p/v. En otra forma de realización preferida del uso de la invención, la etapa (i) del método para obtener CH de una pluma de calamar se lleva a cabo a temperatura ambiente durante de aproximadamente 12 h a 36 h, preferiblemente 24 h, con agitación continua. El término “temperatura ambiente” como se usa en el presente documento y parte del conocimiento general para un experto en la materia, se refiere a una temperatura en el intervalo de 20ºC a 25ºC.

En otra forma de realización preferida del uso de la invención, la etapa (ii) del método para obtener CH de una pluma de calamar se lleva a cabo con agua destilada hasta pH neutro. El término “pH neutro” como se usa en el presente documento se refiere a un pH que es aproximadamente entre 6,5 y 7,5, preferiblemente el pH es 7.

En el contexto del uso de la invención el SLS de la invención se puede usar en una variedad de formas y disposiciones. En una forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS se proporciona en una forma seleccionada de un grupo consistente en: seco, liofilizado, completamente hidratado, parcialmente hidratado o impregnado, preferiblemente liofilizado.

El término “seco” como se usa en el presente documento se refiere a la eliminación de todo el contenido de agua presente en el SLS por métodos que conoce bien el experto en la materia, tal como, y sin limitación, secador de pelo caliente, secado por contacto, secado por rociado y secado al vacío.

El término “liofilizado” como se usa en el presente documento se refiere al proceso de liofilización que se ha descrito previamente.

Los términos “completamente hidratado” y “parcialmente hidratado” como se usan en el presente documento se refieren a SLS cuyo contenido de agua es máximo, es decir, completo en donde el material no puede absorber más agua, o el contenido es superior a cero e inferior al máximo contenido de agua, es decir, parcial.

El término “impregnado” como se usa en el presente documento se refiere al remojo o saturación del SLS con una solución que contiene un agente de interés. Dicho agente puede ser solución salina sencilla o un agente terapéutico que, por ejemplo y sin limitación, fomenta hemostasia, reducción de inflamación, es un biocida, virucida o fungicida, etc. Por tanto, en una forma de realización preferida del uso de la invención, el SLS se proporciona en una forma impregnado con una solución con un agente de interés, en donde dicho agente se selecciona de un grupo consistente en: analgésicos, esteroides, antihistamínicos, anestésicos, bactericidas, desinfectantes, fungicidas, vasoconstrictores, hemostáticos, fármacos quimioterapéuticos, antibióticos, queratolíticos, agentes cauterizantes, fármacos antivíricos, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento transformantes, glucoproteínas, colágeno, fibrinógeno, fibrina, humectantes, conservantes, linfoquinas, citoquinas, materiales de control del olor, vitaminas, factores de coagulación o cualquier combinación de los mismos.

Usos terapéuticos en hemostasia

El SLS de la invención encuentra uso en fomentar hemostasia, el proceso de parar una hemorragia. Por tanto, en una forma de realización del uso de la invención el fomento de hemostasia es en el tratamiento de una herida sangrante.

El término “tratamiento” como se usa en el presente documento se refiere a una intervención (por ejemplo, la administración del SLS de la invención) que cura, mejora o reduce los síntomas de una enfermedad o elimina (o reduce el impacto de) su(s) causa(s) (por ejemplo, la reducción o parada de hemorragia nasal). En este caso, el término se usa de forma sinónima con el término “terapia”. En el contexto de la presente invención el uso de la invención en el tratamiento de una herida sangrante el SLS se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en el presente documento define una cantidad que se puede administrar o aplicar a un sujeto sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable, pero una que es suficiente para proporcionar el efecto deseado, por ejemplo, el tratamiento o profilaxis manifestado por una mejora permanente o temporal en el estado del sujeto. La cantidad variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad, estado general del individuo, modo de administración y otros factores. Por tanto, mientras no es posible especificar una cantidad eficaz exacta, los expertos en la materia serán capaces de determinar una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual usando experimentación rutinaria y conocimiento general de fondo. Un resultado terapéutico en este contexto incluye erradicación o reducción de síntomas, dolor o malestar reducido, supervivencia prolongada, movilidad mejorada, reducción o parada de sangrado y otros marcadores de mejora clínica. Un resultado terapéutico no necesita ser una cura completa.

El término “sangrado” como se usa en el presente documento se refiere a la pérdida de sangre de un vaso sanguíneo dañado. El término “herida” como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier herida abierta que presenta flujo o pérdida sanguínea, independientemente de la fase o profundidad de la herida.

Los ejemplos de heridas que se pueden tratar según la presente invención son, por ejemplo, heridas abiertas que presentan pérdida o flujo sanguíneo. Las heridas abiertas que se pueden tratar mediante el uso de la invención incluyen, sin limitación, quemaduras causadas por frío o calor, incisiones, úlceras, llagas, laceraciones, abrasiones, acné, mordeduras, perforaciones o heridas balísticas.

También se pueden tratar heridas asépticas, heridas contusas, heridas incisivas, heridas laceradas, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas punzantes, heridas sépticas, heridas subcutáneas, etc. según la presente invención. Los ejemplos de llagas son úlceras de decúbito, aftas, úlceras cromo, calenturas, úlceras de presión, etc. Los ejemplos de úlceras son, por ejemplo, úlcera péptica, úlcera duodenal, úlcera gástrica, úlcera gotosa, úlcera diabética, úlcera isquémica hipertensiva, úlcera por estasis, ulcus cruris (úlcera venosa), úlcera sublingual, úlcera submucosa, úlcera sintomática, úlcera trófica, úlcera tropical y úlcera venérea, por ejemplo, causada por gonorrea (incluyendo uretritis, endocervicitis y proctitis). Las afecciones relacionadas a heridas o llagas que se pueden tratar con éxito según la invención son quemaduras, carbunco, tétanos, gangrena gaseosa, escarlatina, erisipelas, sicosis de la barba, foliculitis, impétigo contagioso o impétigo bulloso, etc. Con frecuencia hay un solapamiento entre el uso de los términos “herida” y “úlcera” y “herida” y “llaga” y, además, los términos con frecuencia se usan aleatoriamente. Por tanto, como se ha mencionado previamente, en el presente contexto el término “herida” incluye los términos “úlcera”, “lesión”, “llaga” e “infarto” y los términos se usan indistintamente a menos que se indique otra cosa.

Los tipos de heridas que se van a tratar según la invención también incluyen i) heridas generales, tal como, por ejemplo, heridas quirúrgicas, traumáticas, infecciosas, isquémicas, térmicas, químicas y bullosas; ii) heridas específicas de la cavidad oral, tal como, por ejemplo, heridas después de extracciones, heridas endodónticas especialmente en relación al tratamiento de quistes y abscesos, úlceras y lesiones bacterianas, víricas o

autoinmunitarias, heridas mecánicas, químicas, térmicas, infecciosas y liquenoides; úlceras herpéticas, estomatitis aftosa, gingivitis ulcerosa necrotizante aguda y síndrome de la boca ardiente son ejemplos específicos; y iii) heridas en la piel, tal como, por ejemplo, neoplasias, quemaduras (por ejemplo, quemaduras químicas o térmicas), lesiones (bacterianas, víricas, autoinmunitarias), mordeduras e incisiones quirúrgicas. Otra manera de clasificar las heridas es como i) pérdida pequeña de tejido debido a incisiones quirúrgicas, abrasiones menores y mordeduras menores, o como ii) pérdida significativa de tejido. Este último grupo incluye úlceras isquémicas, llagas de presión, fístulas, laceraciones, mordeduras graves, quemaduras térmicas y heridas en sitio donante (en tejidos blandos y duros) e infartos.

En una forma de realización preferida del uso de la invención el fomento de hemostasia es en el tratamiento de una herida sangrante en donde la herida se selecciona del grupo consistente en: herida aséptica, herida contusa, herida incisa, herida lacerada, herida abierta, herida penetrante, herida perforante, herida punzante, herida séptica, herida subcutánea, fístula y mordedura.

En otra forma de realización preferida del uso de la invención el fomento de hemostasia es en el tratamiento de una herida sangrante en donde la herida sangrante es una hemorragia. El término “hemorragia” como se usa en el presente documento se refiere a una liberación de sangre de moderada a pesada en o desde un cuerpo. El término hemorragia en el contexto de la presente invención se debe interpretar en sentido amplio para incluir hemorragia arterial, venosa y capilar, así como para incluir hemorragia primaria y secundaria y hemorragia interna y externa. La hemorragia se puede clasificar en cuatro clases dependiendo de la cantidad de pérdida de sangre del volumen total de sangre del cuerpo. La hemorragia de clase I implica hasta el 10-15% de pérdida de volumen de sangre; la clase II implica el 15-30% de pérdida de volumen de sangre; la hemorragia de clase III implica el 30-40% de pérdida de volumen de sangre; y la clase IV implica más del 40% de pérdida de volumen de sangre. La hemorragia puede estar causada por cualquiera de los tipos de heridas previamente descritos. Hay frecuentemente un solapamiento entre el uso de los términos “sangrado” y “hemorragia” y, además, los términos con frecuencia se usan aleatoriamente. Por tanto, como se ha mencionado previamente, en el presente contexto el término “sangrado” incluye los términos “hemorragia” y los términos se usan indistintamente a menos que se indique otra cosa. Los ejemplos de hemorragia que se puede tratar en el contexto de la invención son, sin limitación, epistaxis o hemorragia nasal, erupción dental, hemorragia posoperatoria, hemorragia oral, hemorragia gingival o hemorragia quirúrgica. En una forma de realización preferida del uso de la invención el fomento de hemostasia es en el tratamiento de hemorragia en donde la hemorragia se selecciona de un grupo consistente en: hemorragia nasal, erupción dental, hemorragia posoperatoria, hemorragia oral, hemorragia gingival o hemorragia quirúrgica, preferiblemente hemorragia nasal.

En el contexto de la presente invención cualquier animal que presenta pérdida de sangre puede tratarse por el SLS de la invención. Por tanto, en otra forma de realización preferida del uso de la invención, la herida sangrante es de un sujeto, preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, sin limitación, humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de zoo, animales deportivos, mascotas tal como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas; primates tal como simios, monos, orangutanes, y chimpancés; cánidos tal como perros y lobos; félidos tal como gatos, leones, y tigres; équidos tal como caballos, burros y cebras; animales de producción tal como vacas, cerdos y ovejas; ungulados tal como ciervos y jirafas; y roedores tal como ratones, ratas, hámsteres y cobayas. En una forma de realización preferida del uso de la invención el sujeto es un humano de cualquier edad, género o raza.

Productos

El SLS previamente definido en la presente descripción encuentra aplicación en la elaboración de productos que pueden usarse para fomentar hemostasia en un sujeto. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un producto hemostático, de aquí en adelante el producto de la invención que comprende un SLS de la invención y un soporte en donde el SLS está inmovilizado en un soporte.

El experto en el campo conocerá el soporte indicado que puede usarse con el SLS de la invención y el mejor procedimiento para aplicar el SLS a dicho soporte. Los ejemplos de soportes son, sin limitación, gasa, tejido, tejido plástico, tira, cordón, película, yeso, apósito o vendaje quirúrgico. En una forma de realización preferida del uso de la invención el soporte se selecciona de un grupo consistente en: gasa, tejido, tejido plástico, tira, cordón, película, yeso, apósito o vendaje quirúrgico.

El término “gasa” como se usa en el presente documento se refiere a un material holgadamente tejido muy fino, ligero, habitualmente de seda o algodón, y también se pretende que incluya otro material de textura abierta similar tal como gasa de alambre. El término “gasa” como se usa en el presente documento también incluye gasas de zinc (gasas con zinc impregnado).

El término “tejido” como se usa en el presente documento se refiere a apósitos de heridas bioactivos que se producen de biomateriales de fuentes naturales o artificiales. Los ejemplos de tales tejidos son, sin limitación, colágeno, ácido hialurónico, quitosano, alginato y elastina.

El término “tejido plástico” como se usa en el presente documento se refiere a apósitos de heridas basados en polímeros sintéticos. Estos se clasifican como productos pasivos, interactivos y bioactivos. Los productos pasivos son no oclusivos, tal como gasa y apósitos de tul, usados para cubrir la herida para restablecer su función por debajo. Los apósitos interactivos son semioclusivos u oclusivos, disponibles en las formas de películas, espuma, hidrogel e hidrocoloides. Estos apósitos actúan como una barrera contra la penetración de bacterias al entorno de la herida.

En otra forma de realización preferida del producto de la invención al menos parte del soporte no contiene el SLS inmovilizado. Dicha parte que no contiene el SLS puede requerirse para adherir a una parte de cuerpo de un sujeto o a un objeto, o para colocar otros agentes requeridos para la función del producto. Por tanto, la determinación de la parte que no contiene SLS la determina el experto en el campo dependiendo del fin del producto requerido, en donde dicha parte puede ser tan baja como el 0,1% o tan alta como el 99,9% del área total del producto, y puede tener cualquier forma que se desee.

En otra forma de realización preferida del producto de la invención al menos parte de la región que no contiene el SPS inmovilizado comprende un compuesto adhesivo que permite la adhesión del producto hemostático a la piel.

El término “compuesto adhesivo” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia que sea capaz de mantener materiales juntos de una manera funcional por unión de superficies que resiste la separación. En la presente invención, dicha sustancia mantiene juntos el producto de la invención y la piel de un sujeto. Dicho compuesto adhesivo incluye monómeros, oligómeros, polímeros, y combinaciones de los mismos que pueden usarse para unir al menos dos superficies temporal o permanentemente, y/o pueden usarse para unir a una superficie. El término adhesivo también puede incluir monómeros, oligómeros, polímeros, y combinaciones de los mismos en forma de solución, hidrogel, suspensión y/o emulsión, que tras secado, curado o polimerización, puede formar un adhesivo. El adhesivo según la presente divulgación puede ser pegajoso al tacto tal como adhesivo sensible a presión. Los adhesivos descritos en el presente documento también incluyen adhesivos en gel. Los ejemplos de compuestos adhesivos que pueden usarse en el contexto de la presente invención son, sin ninguna limitación, cianoacrilato de 2-octilo, cianoacrilato de n-butilo, 2-cianoacrilato de etilo o cualquier combinación de los mismos.

La invención se describirá mediante los siguientes ejemplos que deben considerarse como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y Métodos

Ejemplo 1.0 – Materiales usados para la preparación de SLS

SPI, PROFAM 974, fue suministrado por ADM Protein Specialites Division (Países Bajos). El contenido de azufre en SPI se determinó usando un analizador elemental Euro EA. Además, la composición de aminoácidos del SPI se determinó con un sistema fisiológico analizador de aminoácidos Biochrom 30+. CH se extrajo de plumas de calamar recientes (Loligo sp.), amablemente suministradas por un mercado de pescado local. Primero, las plumas de calamar se lavaron con agua. Después, se trataron con NaOH (1 M) en una relación de 1:20 (p/v) a temperatura ambiente y con agitación continua durante 24 h con el fin de evitar la desacetilación de la CH nativa. Después de este proceso, las muestras se filtraron y la fracción sólida (CH) se lavó con agua destilada hasta pH neutro. Por último, CH se liofilizó y molió para obtener el polvo. Determinado por un análisis elemental la cantidad de C y N presente en CH fue, respectivamente, el 42,1% y el 6,2%. Además, el grado medio de acetilación fue el 95,9%. Respecto al glicerol (pureza del 99,01%), fue proporcionado por Panreac (España) y empleado como plastificante.

Ejemplo 1.1: Caracterización por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se obtuvieron micrografías de MEB usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) Hitachi S-4800 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japón) a un voltaje acelerado de haz de 5 kV. Los materiales se cortaron en discos de 8 mm de diámetro, montaron en una estructura metálica con cinta adhesiva y recubrieron con oro al vacío (JFC-1100) en una atmosfera de argón antes del ensayo.

Los tamaños de poro se determinaron midiendo diámetros de poros de micrografías MEB usando el software Image J. Se midieron entre 75 y 250 poros para cada material, que se seleccionaron aleatoriamente de diferentes muestras (n = 3 muestras por grupo), y calculó el tamaño de poro medio para cada material.

Para evaluar la porosidad de las muestras (15-20 mg, n = 3 muestras por grupo), se realizó un método de desplazamiento líquido usando etanol al 98% como el medio líquido, debido a su capacidad para penetrar a través de andamiajes sin inducir hinchamiento o reducción de matriz (G. Yang et al., 2018, Scientific Reports, 8(1), 1-13). Las muestras se sumergieron en un volumen conocido (V1) de etanol y desgasificaron durante 5 min con una bomba de vacío. El volumen total de etanol y muestra impregnada en etanol se registró como V2. Por último, las muestras impregnadas en etanol se retiraron y el volumen residual de etanol se registró como V3. La porosidad (ε) de cada muestra se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\varepsilon\ (\%) = \frac{V1 - V3}{V2 - V3} x100$$

Ejemplo 1.2: Capacidad de hinchamiento y proporción de retención de líquido a presión (LRRP)

La capacidad de hinchamiento de los materiales (15-20 mg, n = 4 muestras por grupo) se calculó sumergiendo muestras prepesadas (W_0) de cada material en 5 ml de PBS y pesándolas otra vez (W_t) en diferentes puntos de tiempo -5 s, 15 s, 30 s, 1 min, 5 min y 15 min- para obtener las curvas de hinchamiento de cada material. El hinchamiento en cada punto de tiempo se calculó usando la siguiente ecuación:

$$Hinchamiento\ (\%) = \frac{Wt - W0}{W0} x100$$

La proporción de retención de líquido a presión (LRRP) se calculó con el fin de evaluar la capacidad de cada material de retener el líquido preabsorbido cuando se aplica una cierta presión. Se sumergieron muestras de cada material (20-25 mg, n = 6 muestras por grupo) en PBS para absorber tanto líquido como fuera posible, y después se pesaron (W_0). A continuación, se colocaron pesos conocidos -10 g, 15 g, 30 g y 40 g- en serie sobre el material húmedo, recogiendo cuidadosamente el líquido liberado y pesando la muestra de nuevo. Este procedimiento se repitió para cada peso (WX). Después, la LRRP se obtuvo usando la siguiente ecuación:

$$LRRP\ (\%) = \frac{Wx}{W0} x100$$

Ejemplo 1.3: Degradación hidrolítica

La degradación hidrolítica se estudió sumergiendo muestras prepesadas (20-25 mg, n = 4 muestras por grupo) de cada material en 2 ml de PBS, y cultivándolas a 37ºC durante diferentes periodos de tiempo -2, 5, 9 y 14 días-. Las muestras se retiraron del PBS, liofilizaron y pesaron con el fin de determinar el peso restante (%).

Ejemplo 1.4: Caracterización mecánica

Las propiedades mecánicas de los materiales secos se ensayaron por prueba de compresión y prueba de compresión cíclica (35-45 mg, n = 5 muestras por grupo), usando un analizador mecánico -Instron 5969 equipado con una célula de carga 100 N- a una velocidad de compresión de 0,5 mm s^{-1} hasta el 70% de deformación. Como MRC se comercializa en forma liofilizada, se expandió antes de la prueba, mojándola y secándola completamente. Se calcularon varios parámetros, incluyendo la tensión relativa, módulo de Young y coeficiente de amortiguación con el fin de comparar las propiedades mecánicas de los materiales. Además, se realizó una prueba de fuerza de expansión, hidratando muestras de materiales secos (35-45 mg, n = 5 muestras por grupo) y registrando la tensión ascendente mostrada por la expansión del material durante la absorción de agua.

Ejemplo 1.5: Estudios citotóxicos

Se evaluó la citotoxicidad de los materiales según las directrices ISO 10993-5:2009 para evaluación biológica de dispositivos médicos. Los ensayos se realizaron tanto por contacto directo con las células -citotoxicidad directa- como exponiendo las células a medio acondicionado de cada material -citotoxicidad indirecta-. En ambos ensayos se midió la viabilidad de fibroblastos L-929 (ATCC® 30-2003™) empleando reactivo CCK-8 (Sigma-Aldrich, España). Después de incubar las células con solución de CCK-8 en medio (1:11) durante 4 h, la absorbancia se leyó con un lector de placas (serie Infinite® 200 PRO, Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza) a 450 nm, usando 650 nm como la longitud de onda de referencia. Se usaron células sin exposición a material como un grupo control (viabilidad del 100%).

En el ensayo de citotoxicidad directa, se sembraron 35.000 células por pocillo en 500 µl/pocillo de medio completo EMEM en una placa de 24 pocillos. A continuación, las células se incubaron durante 24 horas a 37ºC. Después de ello, el medio se retiró, se añadió 1 ml de medio reciente y cada material (10-15 mg, n = 4 muestras por grupo) se hidrató y colocó en un pocillo transwell para ponerlo en contacto directo con el fondo del pocillo. Después de 48 horas de incubación, los materiales se retiraron, y el medio se sustituyó con 300 µl por pocillo de CCK-8.

En el ensayo de citotoxicidad indirecta, se expusieron fibroblastos L-929 a medio acondicionado de cada material (n = 5 muestras por grupo), obtenido incubando 100 mg de cada material con 500 µl de EMEM a 37ºC durante 24 horas. En primer lugar, se sembraron 5000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con 100 µl por pocillo de medio e incubaron durante 24 h a 37ºC. Después, el medio se sustituyó con 100 µl por pocillo del medio acondicionado recogido, y la placa se incubó inmediatamente a 37ºC durante 24 h. Por último, el medio acondicionado se retiró, y se añadieron 110 µl por pocillo de CCK-8.

Ejemplo 1.6: Hinchamiento con sangre y degradación en sangre

Se ensayó la capacidad de hinchamiento con sangre máxima sumergiendo muestras prepesadas (W0) (15-20 mg, n = 5 muestras por grupo) de los materiales en 500 µl de sangre. Después de 2 minutos, para permitir la absorción completa de sangre, las muestras se pesaron otra vez (Wf). La máxima capacidad de hinchamiento (%) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$Hinchamiento\ (\%) = \frac{Wf}{W0} x100$$

Para evaluar la degradación de los materiales en sangre, muestras prepesadas (W0) (15-25 mg, n = 4 muestras por grupo) de cada material se colocaron en placas de 24 pocillos, usando una placa para cada punto de tiempo ensayado -2, 4 y 7 días-. Se añadió sangre a cada muestra en una cantidad de un 120% de su máxima capacidad de hinchamiento con sangre, y las placas se incubaron a 37ºC. En cada punto de tiempo, las muestras se lavaron con PBS, liofilizaron y pesaron (Wf). La degradación en sangre se expresó como el peso restante de las muestras incubadas y liofilizadas con respecto a su peso inicial, según la siguiente ecuación:

$$Peso\ restante\ (\%) = \frac{Wf}{W0} x100$$

Ejemplo 1.7: Coagulación de sangre completa *in vitro*: cuantificación de hemoglobina

El contenido de hemoglobina de las muestras se cuantificó usando un kit de ensayo de hemoglobina (Sigma-Aldrich, EE UU), midiendo la absorbancia de las muestras (Is) con un lector de placas (serie Infinite® 200 PRO, Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza) a 400 nm.

Para la prueba de coagulación de sangre completa, se recogió sangre completa citratada -sangre completa a citrato de sodio al 3,8% 9:1- de un donante humano sano. Primero, se añadieron 0,2 ml de la sangre completa citratada a muestras precalentadas (30 min a 37ºC) de los materiales dispuestos en una placa de 24 pocillos (25-35 mg, n = 5 muestras por grupo). Después de esto, se añadieron 20 µl de $CaCl_2$ (0,2 M) para empezar la coagulación. La placa con los materiales se incubó con agitación a 30 rpm durante 10 min a 37ºC. Después de ello, se añadieron 2 ml de agua desionizada en cada pocillo para hemolizar los glóbulos rojos que no estaban en el coágulo formado en el material. El agua desionizada que contenía los glóbulos rojos no adheridos y hemolizados se recogió y su contenido de hemoglobina se cuantificó. Se añadieron 5 µl de $CaCl_2$ (0,2 M) y 50 µl de sangre completa citratada a 750 µl de agua desionizada, y la absorbancia de esta solución se usó como el valor de referencia (Ir). La absorbancia de un pocillo vacío también se midió (Io). El índice de coagulación sanguínea (BCI) de cada muestra se calculó usando la siguiente ecuación:

$$BCI\ (\%) = \frac{(Is - Io)}{(Ir - Io)} x100$$

Con el fin de evaluar visualmente la capacidad de coagulación de cada material, se dispusieron 150 mg de cada material en tubos Eppendorf, añadiendo posteriormente 500 µl de sangre completa citratada y 500 µl de $CaCl_2$ (10 mM). Después de incubar los tubos Eppendorf durante 1 min a 37ºC, se dieron la vuelta y agitaron suavemente para observar los coágulos formados.

Ejemplo 1.8: Ensayo de hemólisis *in vitro*

Para la evaluación de hemocompatibilidad *in vitro*, se recogió sangre completa citratada -sangre completa a citrato de sodio al 3,8% 9:1- de un donante sano y diluyó 1:5 en solución salina normal. Se dispusieron muestras de cada material (10-15 mg, n = 6 muestras por grupo) en una placa de 24 pocillos. Se añadió sangre completa diluida a cada muestra en una cantidad del 80% de la capacidad de hinchamiento de cada material. La placa se incubó durante 1 h a 37ºC. Las muestras se movieron a tubos de centrífuga cónicos y centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm. El sobrenadante de cada muestra se recogió y su contenido de hemoglobina se cuantificó como se describe en la sección del ejemplo 1.7. Se añadieron 150 µl de sangre completa a agua desionizada y a solución salina normal, con el fin de usar estas soluciones como controles positivo (Ir) y negativo (Io), respectivamente. La tasa de hemólisis se calculó usando la siguiente ecuación:

$$Hemolisis\ (\%) = \frac{(Is - Io)}{Ir - Io)}\ x\ 100$$

Ejemplo 1.9: Adhesión de glóbulos rojos *in vitro*

Para evaluar la adhesión de glóbulos rojos (RBC) al material, se recogió sangre completa citratada -sangre completa a citrato de sodio al 3,8% 9:1- de un donante sano. Se cortaron muestras de cada material (15-20 mg, n = 6 muestras

por grupo) y cada muestra se colocó en una placa Petri. Se añadió sangre completa citratada a cada muestra en una cantidad del 80% de la capacidad de hinchamiento de cada material, y se incubaron durante 5 min a 37ºC. A continuación, se añadieron 5-10 ml de agua desionizada suavemente por el borde de la placa hasta que el agua tocó la muestra y la sangre empezó a fluir. Se añadió más agua desionizada hasta un volumen total de 50 ml para cada muestra. Cada material se movió cuidadosamente a una placa Petri limpia, y el líquido en cada placa Petri vieja, -que contiene los glóbulos rojos que no se pudieron adherir a la muestra- se recogió. El contenido de hemoglobina de esta solución se cuantificó como se describe en el ejemplo 1.7. Esta medida representa la *hemoglobina fuera* del material, es decir, los glóbulos rojos que no pudieron adherirse al material.

Después de ello, se midió la *hemoglobina dentro* de los materiales, que representa la cantidad de glóbulos rojos adheridos a cada muestra. Se añadieron 10 ml de agua desionizada directamente sobre el material -de modo que los glóbulos rojos previamente adheridos pudieran liberarse- y el contenido de hemoglobina de la solución resultante se cuantificó como se describe en el ejemplo 1.7.

Tanto para la *hemoglobina fuera* como *dentro* del material, se preparó un control positivo mezclando 200 µl de sangre y 50 ml de agua desionizada. La concentración de hemoglobina (mg dl^{-1}) de cada muestra se calculó usando la siguiente ecuación proporcionada por kit de ensayo de hemoglobina, y los resultados de cada muestra se normalizaron frente al volumen de sangre añadido al grupo control:

$$[Hemoglobina] = \frac{(Is - Io)}{(Ir - Io)} x100 \frac{mg}{dl}\ x\ df$$

donde *Is* es la absorbancia de la solución ensayada; *Io* es la absorbancia del blanco (agua); *Ir* es la absorbancia del calibrador proporcionado en el kit de ensayo de hemoglobina; *100 mg/dl* es la concentración del calibrador diluido; *df* es el factor de dilución, que se calculó para cada muestra dependiendo del volumen de sangre y agua desionizada añadido.

También se añadió sangre completa citratada a muestras de cada material (n = 3 muestras por grupo) y la adhesión de glóbulos rojos se evaluó visualmente usando micrografías de MEB, obtenidas como se describe en el ejemplo 1.1.

Ejemplo 1.10: Adhesión de plaquetas *in vitro*

La adhesión de plaquetas a los materiales se estudió mediante un kit de ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) (Sigma-Aldrich, EE UU), que permite cuantificar la adhesión de plaquetas midiendo la LDH liberada por plaquetas cuando se lisan, según un método descrito (No et al., 2002, International Journal of Food Microbiology, 74(1-2), 65-72). Brevemente, se recogió sangre completa citratada -sangre completa a citrato de sodio al 3,8% 9:1- de un donante sano y centrifugó a 480 g durante 10 min a 4ºC con 4 a/d, con el fin de obtener plasma rico en plaquetas (PRP). El suero encima de capa leucocítica se recogió de las muestras de sangre centrifugadas y mantuvo en tubos citratados. Se dispusieron muestras de cada material (10-15 mg, n = 5 muestras por grupo) en una placa de 24 pocillos y se añadió PRP a cada muestra en una cantidad del 80% de la capacidad de hinchamiento de cada material, y se incubaron durante 30 min a 37ºC. Se añadió solución salina normal a cada pocillo suavemente hasta que las muestras se sumergieron, de modo que las plaquetas no adheridas pudieran retirarse del material, y todas las muestras se movieron a una nueva placa de 24 pocillos. Se añadió 1 ml de Triton X-100 al 1%-PBS directamente sobre el material, con el fin de lisar las plaquetas que se habían adherido al material. Después de incubación durante 1 h a 37ºC, cada solución de Triton y plaquetas lisadas se recogió y el contenido de LDH se midió según el protocolo proporcionado por el fabricante (Sigma-Aldrich, EE UU) del kit LDH. Para preparar los controles negativo (Io) y positivo (Ir), se añadieron 200 µl de PRP a 1 ml de PBS y Triton X-100 al 1%, respectivamente. Las absorbancias de las plaquetas lisadas de cada muestra (Is) se midieron con un lector de placas (serie Infinite® 200 PRO, Tecan Trading AG, Männedorf, Suiza) a 400 nm, y normalizaron frente al volumen de PRP añadido a los controles. La liberación de LDH (%) relativa al control positivo se calculo usando la siguiente ecuación:

$$Liberación\ de\ LDH\ (\%) = \frac{(Is - Io)}{(Ir - Io)} x100$$

También se añadió PRP a muestras de cada material (n = 3 muestras por grupo) y la adhesión de plaquetas se evaluó visualmente usando micrografías de MEB, obtenidas como se describe en el ejemplo 1.1.

Ejemplo 1.11: Eficacia hemostática *in vivo*

Para evaluar la eficacia hemostática *in vivo*, se usó un modelo de amputación de cola de rata. Este experimento se realizó según los protocolos aprobados por el Comité de Ética Institucional para Experimentación Animal de la Universidad del País Vasco. Se anestesiaron ratas Wistar -con pesos entre 250-300 g (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Francia)- con isoflurano (Isoflo®, Esteve, España), y se cortaron 2,5 cm del extremo de su cola usando un bisturí. La cola se colocó en aire durante 10 s para asegurar pérdida de sangre normal, y la herida se cubrió con el correspondiente material prepesado (250-300 mg, n = 6 ratones por grupo), sujetándolo con una gasa prepesada (900-

950 mg). La herida se descubrió cada minuto para comprobar si seguía sangrando. Por esta razón, el tiempo de sangrado (min) se evaluó asignando una puntuación a cada periodo en que cesó el sangrado, como sigue: 0-3 min: 1; 3-6 min: 2; 6-9 min:3; >9 min: 4. Por tanto, una menor puntuación de tiempo de sangrado representa un efecto hemostático más rápido. Las muestras impregnadas en sangre se pesaron otra vez para calcular la pérdida de sangre total (g).

Ejemplo 1.12: Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar. Cuando estaban distribuidos normalmente, los resultados se analizaron mediante una prueba ANOVA unívoca. Se aplicó análisis de Bonferroni o Tamhane post-hoc basado en la prueba de Levene para la homogeneidad de varianzas. A la inversa, los datos no normalmente distribuidos se analizaron por análisis no paramétrico de Mann-Whitney. El tamaño de muestra de cada experimento se indica en la sección de materiales y métodos correspondiente. Se consideró $p < 0,05$ estadísticamente significativo. Además, todas las computaciones estadísticas se realizaron usando SPSS 25.0 (SPSS®, Inc., Chicago, IL, EE UU).

Ejemplo 2. Resultados

Ejemplo 2.0: Preparación del SLS de la invención

El SLS de la invención se preparó basado en una estrategia verde usando subproductos revalorizados de la industria alimentaria (Las Heras *et al.,* 2020, Green Chem., 22, 3445-3460).

Ejemplo 2.1: Tamaño de poro y porosidad

La estructura de poro de los biomateriales destinados a ser usados como agentes de cicatrización -ya sea para tratar hemorragias u otros tipos de heridas- es de gran importancia. En este experimento, la gasa era el material con el tamaño de poro mayor -479 ± 252 µm-, mientras MRC y SP-CH mostraron una distribución de tamaño de poro muy similar, 144 ± 63 y 141 ± 124 µm, respectivamente (Figura 1A). MRC y SP-CH no mostraron diferencia significativa en el tamaño de poro medio ($p > 0,05$), mientras ambos mostraron diferencias significativas con respecto a gasa ($p < 0,001$).

En este contexto, MRC y SP-CH mostraron porosidad similar (Figura 1B), 92,97 ± 4,39% y 86,95 ± 1,58%, respectivamente. Mientras, la gasa mostró porosidad significativamente mayor que SP-CH, 96,68 ± 0,12%. Por otra parte, las micrografías de MEB (Figura 1C) muestran claramente que las estructuras internas de los tres materiales se diferencian. La gasa muestra miles de fibras entrelazadas formando una malla, pero el espacio entre las fibras no presenta poros bien definidos, que se requieren para buena retención de líquido. Por su parte, MRC y SP-CH muestran una microestructura interna de poros interconectados bien definidos, que en el caso de MRC son más circulares y en el caso de SP-CH presentan una estructura más amorfa. Junto con un tamaño de poro y porosidad similares esto hace MRC y SP-CH muy similares respecto a su microarquitectura interna, que se diferencia completamente de la de la gasa.

Ejemplo 2.2: Capacidad de hinchamiento y proporción de retención de líquido a presión (LRRP)

La capacidad de los biomateriales para absorber fluidos es importante ya que determinará sus capacidades para absorber la sangre presente en hemorragias. Se ensayaron los perfiles de hinchamiento con agua de los tres materiales midiendo el hinchamiento en diferentes puntos de tiempo (Figura 1D). Los tres materiales mostraron capacidad de absorción de agua similar, variando la máxima capacidad de hinchamiento entre 1.334 ± 34,2% (MRC) y 1.442 ± 266.91% (SP-CH) de su peso inicial después de 15 minutos. Durante ese periodo de tiempo, la gasa absorbió 1412 ± 181,6% de su peso inicial. Incluso si la máxima capacidad de absorción era similar para los tres materiales, el perfil de hinchamiento resultó ser bastante diferente. Mientras SP-CH y gasa alcanzaron un 1.383 ± 167,78% y 1.324 ± 302,31% de su peso inicial en solo 5 segundos, respectivamente, MRC pudo solo hincharse un 178 ± 21,36% de su peso inicial durante el mismo tiempo. Esto muestra que incluso si todos ellos mostraron capacidad de absorción máxima similar, MRC mostró hinchamiento retrasado, solo igualando a SP-CH y gasa después de 60 segundos. La propiedad de absorción de agua parece ser especialmente importante en el tratamiento de epistaxis ya que la principal manera en que los tapones nasales paran el sangrado es ejerciendo presión sobre los vasos sanguíneos dañados de la mucosa nasal para fomentar hemostasia. Después de insertarse en la fosa nasal, el tapón nasal absorbe fluidos de la herida y se expande, manteniendo presión sobre el sitio de la herida. Esta presión debe ser suficientemente alta para controlar el sangrado, pero no tan alta que dañe la cavidad nasal. Las complicaciones asociadas con presión excesiva incluyen movimiento del tapón desde su posición inicial, respiración obstruida y sentido del olfato reducido, e incluso necrosis de mucosa y cartílago.

No obstante, cuando el tapón pone presión en las paredes de la fosa nasal, las paredes de la fosa nasal también ponen presión en el tapón, desorbiendo de esta manera parte de los fluidos previamente absorbidos. Por esta razón, evaluamos la capacidad de los materiales para retener el líquido absorbido bajo presión. En este experimento (Figura 1E) tanto MRC como SP-CH mostraron capacidad de retención de agua significativamente mayor ($p < 0,001$) comparados con gasa, independientemente de la presión aplicada. Además, MRC mostró retención significativamente

mejor a bajas presiones comparado con SP-CH, aunque ambos materiales llegaron a valores de retención similares ($p > 0,05$) para agua preabsorbida cuando se aplicó el peso máximo -40 g- manteniendo MRC el 49,58 ± 4,37% y SP-CH el 45,83 ± 5,54% de su máxima capacidad de hinchamiento, mientras la gasa mantuvo solo el 34,44 ± 2,35%. Por tanto, incluso si los tres materiales mostraron capacidad de hinchamiento con agua similar, la gasa no es capaz de retener eficazmente el agua absorbida cuando se aplica una presión, y por tanto pierde su capacidad de ejercer presión al sitio de sangrado, probablemente debido a su microestructura interna.

Ejemplo 2.3: Degradación hidrolítica

La degradabilidad es una propiedad de popularidad creciente entre biomateriales para tapones nasales, ya que reduce tanto el malestar del paciente como sangrado recurrente tras la retirada, entre otras ventajas. En esta línea, tanto gasa como MRC no mostraron degradación durante los 14 días de experimento (Figura 1F), mientras SP-CH se degradó el 25,96 ± 3,22% de su peso inicial después de 48 h. Después de esa medida, SP-CH no mostró más degradación en los días siguientes ($p > 0,05$). Estos resultados claramente muestran que tanto gasa como MRC son tapones nasales totalmente no absorbibles, mientras SP-CH puede perder aproximadamente un 25% de su peso inicial después de 48 horas a través de degradación hidrolítica. Esto puede ser probablemente suficiente para aliviar el malestar del paciente y el daño asociado con la retirada del tapón, y evitar episodios de sangrado recurrente, que supondría una gran ventaja tanto para el paciente como el médico (Wormald et al., 2006, American Journal of Rhinology, 20(1), 7-10).

Ejemplo 2.3: Caracterización mecánica

Para el manejo y uso clínico apropiado los tapones nasales deben presentar buenas propiedades mecánicas y resistencia a la deformación, aliviando así las preocupaciones del paciente sobre malestar durante el tratamiento y proporcionando estabilidad mecánica.

Se llevó a cabo una prueba de tensión-deformación de compresión cíclica con 10 ciclos (Figura 2A) para caracterizar las propiedades mecánicas de los materiales (Figura 2B-D). Estas curvas muestran una región meseta inicial, seguida por una región hiperelástica a mayores deformaciones, que es más notable para la gasa y SP-CH que para MRC. Para los tres materiales la relación entre tensión y deformación es no lineal, mostrando viscoelasticidad no lineal, similar a muchos tejidos corporales y componentes de la matriz extracelular. Esta viscoelasticidad pudo confirmarse por las curvas de carga y descarga de cada ciclo que toman diferentes caminos, que se produce debido a la disipación de energía durante la deformación del material (Z. Wang et al., 2016, *Viscoelastic and Viscoplastic Materials,* 2, 64), produciendo un bucle de histéresis entre las curvas de carga y descarga. El área bajo la curva de carga representa la energía aportada total del ciclo y el área bajo la curva de descarga representa la energía de deformación elástica, mientras el área entre las dos curvas representa la energía disipada durante el ciclo de compresión (D. Yang et al., 2020, *Alexandria Engineering Journal,* 59(5), 3587-3597). Además de esto, la gasa mostró la mayor tensión a una deformación del 70%, tanto para el ciclo 1 como para el ciclo 10, mientras MRC mostró la menor, lo que significa que la gasa era el material más difícil de deformar hasta una deformación del 70%, y MRC el más fácil, que podría deberse a la microestructura interna de cada uno. SP-CH requirió una tensión intermedia para deformarse hasta un 70% de deformación.

No obstante, la prueba de compresión cíclica reveló que la tensión necesaria para deformar los materiales disminuyó sustancialmente ciclo tras ciclo (Figura 2E), perdiendo su máxima capacidad de resistir deformación. Este fenómeno, que se define como ablandamiento cíclico (Jürgens *et al.,* 2019, Metals, 9(1)), es probablemente una consecuencia de deformaciones irreversibles de la microestructura interna causadas por la compresión (L. Zhu et al., 2017, RSC Advances, 7(69), 43755-43763). Los resultados de la tensión máxima relativa (%) (Figura E) muestran que la gasa pudo solo mantener un 80,2 ± 2,04% de su tensión máxima después de 10 ciclos, comparada a la tensión máxima del ciclo 1. Esto es significativamente menor ($p<0,01$) que MRC y SP-CH, que mostraron una tensión relativa del 87,34 ± 5,24% y 88,63 ± 1,63% después de 10 ciclos, respectivamente.

El módulo de Young define la capacidad de un material de soportar cambios en longitud cuando se somete a cargas compresivas, y es útil para medir la rigidez de un material (L. Wang et al., 2003, *Journal of Applied Oral Science, 11(3),* 162-167): cuanto mayor es el módulo de Young, mayor la rigidez del material. Puesto que los materiales presentan un comportamiento no lineal, el módulo de Young no es constante, sino que cambia dependiendo de la posición en la curva de tensión-deformación, y se define por la pendiente de la tangente a la curva. Por tanto, calculamos el módulo de Young para las tres deformaciones del primer ciclo de cada biomaterial (Figura 2F). Inicialmente, las tres muestras presentaban un módulo de Young alto, que rápidamente disminuyó cuando la deformación empezó a aumentar. Según aumentó la deformación, el módulo de Young de gasa y SP-CH empezó a aumentar otra vez a deformaciones coincidentes con esas en que la región hiperelástica de cada material empieza -aproximadamente el 25% de deformación para gasa y 50% de deformación para SP-CH-. Esto podría indicar que al 25% de deformación, todas las capas de algodón que forman la gasa están muy compactas, y por consiguiente la rigidez de la muestra aumenta fuertemente. Mientras tanto, la microestructura interna de SP-CH no se compactaría por completo hasta una deformación del 50%. MRC no mostró aumento significativo de su módulo de Young a mayores deformaciones, indicando que su rigidez permaneció baja a lo largo de todo el proceso de compresión. Resumiendo, mientras la gasa se vuelve rígida a bajas deformaciones, tanto MRC como SP-CH permanecen flexibles hasta que se alcanza una deformación del 50%.

Puesto que un tapón nasal está inevitablemente sometido a compresión mecánica cuando se inserta en la fosa nasal, evaluamos el coeficiente de amortiguación de los tres materiales para el ciclo 1 y 10, calculándolo como la proporción de la disipación de energía -área del bucle de histéresis- y la energía aportada total -área bajo la curva de carga- para el ciclo dado (Orban, 2011, en *Journal of Physics: Conference Series* [Vol. 268, número 1], IOP Publishing). Para el primer ciclo, SP-CH presentó un coeficiente de amortiguación de 0,72 ± 0,02, que era significativamente mayor ($p < 0,001$) que los obtenidos para gasa y MRC, 0,59 ± 0,05 y 0,29 ± 0,01, respectivamente. Comparando el coeficiente del primer ciclo al del ciclo 10, todos los materiales perdieron significativamente ($p<0,001$) capacidad de amortiguación, probablemente debido a alteraciones irreversibles en su microestructura interna causadas por la compresión cíclica. Incluso así, SP-CH presentó un coeficiente de amortiguación de 0,57 ± 0,03 en el ciclo 10, que es todavía significativamente mayor ($p < 0,001$) que los calculados para gasa y MRC, 0,38 ± 0,03 y 0,21 ± 0,01, respectivamente. Estos resultados indican que nuestro material tiene una capacidad aumentada para amortiguar las ondas de impacto y fuerzas mecánicas que pueden producirse con el tapón colocado en la cavidad nasal.

Para evaluar la fuerza ascendente mostrada por los materiales cando absorben agua, realizamos una prueba de fuerza de expansión, como se ilustra en la figura 2H. Esta fuerza es representativa de la fuerza que estos materiales mostrarían frente a las paredes de la cavidad nasal cuando absorben fluidos en la fosa nasal, y por tanto esta propiedad parece ser de especial interés para un tapón nasal. La figura 2I muestra las curvas de fuerza de expansión relativa de los materiales a lo largo del tiempo, comparada a su fuerza inicial. Tanto gasa como MRC mostraron fuerza de expansión nula cuando absorben agua, incluso disminuyendo su fuerza inicial después de añadir agua a la muestra. Por el contrario, la curva de expansión relativa de SP-CH revela que cuando absorbe agua muestra una fuerza ascendente creciente, causada por su expansión. Esto se representa numéricamente en la figura 2J, en la que la fuerza de expansión máxima (%) mostrada durante el experimento se calcula con respecto a la fuerza de expansión inicial. Los resultados confirmaron que gasa y MRC no tienen capacidad para mostrar una fuerza ascendente cuando absorben agua, aumentando solo la fuerza de expansión inicial hasta un 106,64 ± 10,66% y 109,88 ± 16,97%, respectivamente. Por el contrario, SP-CH presentó una fuerza de expansión del 249,59 ± 24,3% con respecto al inicio del experimento, que supone una fuerza de expansión significativamente mayor ($p<0,001$) que para gasa y MRC. Por tanto, probablemente sería capaz de ejercer una mayor presión al sitio de sangrado cuando absorbe fluidos de la herida en la fosa nasal para fomentar hemostasia.

Ejemplo 2.4: Estudios de citotoxicidad

Realizamos ensayos de citotoxicidad directa e indirecta para confirmar la biocompatibilidad de los materiales. Llevamos a cabo estos ensayos según un protocolo adaptado de las directrices ISO 10993 5:2009 para evaluación biológica de dispositivos biomédicos. Tanto en ensayos de toxicidad directa (Figura 3A) como indirecta (Figura 3B) los tres materiales mostraron viabilidad celular superior al 70% y por tanto su biocompatibilidad pudo confirmarse. En ambos ensayos, no se encontraron diferencias significativas en biocompatibilidad entre MRC y SP-CH ($p > 0,05$), pero la gasa mostró biocompatibilidad significativamente mayor en comparación a SP-CH en el ensayo de citotoxicidad directa ($p < 0,05$). Al contrario, en el ensayo de citotoxicidad indirecta, SP-CH resultó ser significativamente más biocompatible que la gasa ($p < 0,05$).

También realizamos método de tinción vivo/muerto para demostrar visualmente que estos materiales permitían la viabilidad de células L-929 cultivadas en ellos (Figura 3C), con prácticamente todas las células vivas (color verde) en todas las muestras, y solo unas pocas células muertas -de color rojo- presentes en las imágenes de MRC. Estos estudios demostraron que el SLS de SP-CH es adecuado para uso biomédico sin producir ninguna citotoxicidad a las células presentes en la cavidad nasal y tejidos circundantes.

Ejemplo 2.5: Degradación de sangre

Para probar el perfil de degradación de los materiales en un fluido más biológicamente relevante, evaluamos su perfil de degradación de sangre (Figura 4A). Los resultados mostraron que SP-CH degrada en contacto con sangre, mientras gasa y MRC no, confirmado por las imágenes de los materiales después de incubación con sangre (Figura 4B). Después de 4 días de incubación en sangre, la gasa presentó un peso del 110,07 ± 1,89% con respecto a su peso inicial, mientras MRC presentó un peso restante del 102,93 ± 1,23%. Al contrario, SP-CH mantuvo un 79,3 ± 1,79% de su peso después de 4 días de incubación en sangre, que significa que pudo degradar un 20,7 ± 1,79% de su peso inicial durante ese periodo de tiempo. Esto probablemente facilitaría su retirada de la fosa nasal del paciente una vez el tapón nasal alcanza su fin.

De forma interesante, la gasa y MRC no solo no se degradaron, sino que su peso aumento ligeramente después de ser incubados con sangre, aunque las muestras se liofilizaron antes de pesar, para eliminar todos los fluidos presentes en las muestras. Esto podría ser debido a células sanguíneas y proteínas adheridas a estos materiales, que no podrían eliminarse por completo. Esto indica que estos materiales podrían haberse degradado a algún nivel, pero que la adherencia de estos componentes sanguíneos equilibraría esa degradación. Por tanto, el perfil de degradación de SP-CH también podría haberse subestimado por la adhesión de componentes sanguíneos como en el caso de gasa y MRC, que significaría que nuestro material tiene incluso mejores propiedades de degradación en sangre. El hecho de que SP-CH se degrade una quinta parte de su peso después de 4 días, confirma que este material puede usarse como

un tapón nasal parcialmente absorbible, con los beneficios que esto implica, aliviando de esta manera preocupaciones tal como dolor durante la retirada y trastorno de la cicatrización, o disminuyendo la incidencia de adhesiones nasales.

Ejemplo 2.6: Capacidad de hinchamiento en sangre

La capacidad de hinchamiento en sangre es esencial para biomateriales destinados a usarse en heridas hemorrágicas, y parece ser de mayor importancia que el perfil de hinchamiento en agua debido a la presencia de sangre en el sitio de aplicación. Por esta razón, evaluamos la máxima absorción de sangre de los tres materiales (Figura 4C). La gasa mostró una capacidad de hinchamiento en sangre del 1.091,13 ± 20% con respecto a su peso inicial. MRC absorbió significativamente más sangre que la gasa ($p < 0,05$), con una absorción de sangre media del 1.276,1 ± 40,08%. Por su parte, SP-CH mostró capacidad de hinchamiento en sangre significativamente mayor comparada tanto con gasa como MRC ($p < 0,05$), absorbiendo hasta el 1.442,87 ± 116,76% de sangre con respecto a su peso inicial. Esta capacidad de hinchamiento en sangre aumentada de SP-CH es ventajosa desde diferentes puntos de vista. Por una parte, mayores volúmenes de sangre absorbida producirían un efecto de taponamiento más fuerte a la lesión, que es necesario para parar la hemorragia. Por otra parte, cuanto mayor volumen de sangre absorbe el tapón mayor será la cantidad de glóbulos rojos y plaquetas concentrada en el biomaterial, fomentando la hemostasia y formación de trombo.

Ejemplo 2.7: Ensayo de hemólisis *in vitro*

Realizamos un ensayo de hemólisis con el fin de evaluar la hemocompatibilidad de los materiales, ya que se requiere que los biomateriales en contacto con sangre induzcan hemólisis mínima, que se define como la destrucción de glóbulos rojos debido a tensión cortante o cambios en presión osmótica (Weber et al., 2018, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 6 (Julio)). En este contexto, la gasa mostró una tasa de hemólisis del 3,27 ± 0,62%, mientras MRC mostró tasa de hemólisis significativamente disminuida en comparación con tanto gasa como SP-CH ($p < 0,05$), exactamente el 2,06 ± 0,7%. SP-CH produjo una tasa de hemólisis del 3,54 ± 0,81%, que no supone diferencia significativa en hemocompatibilidad con gasa ($p > 0,05$). Puesto que el 5% de hemólisis es el máximo permitido para biomateriales (J. Zhu et al., 2019, Chemistry of Materials, 31(12), 4436-4450), los tres biomateriales ensayados demostraron ser no hemolíticos, y la hemocompatibilidad de SP-CH se pudo confirmar.

Ejemplo 2.8: Coagulación de sangre *in vitro*

La capacidad para inducir la coagulación de sangre es de enorme importancia para biomateriales destinados a tratar heridas sangrantes tal como hemorragias nasales, y por tanto evaluamos la coagulación de sangre *in vitro* para los tres materiales. Para esto, calculamos el índice de coagulación sanguínea (BCI%) de los materiales (Figura 4E), indicando un menor índice de coagulación sanguínea una velocidad de coagulación sanguínea más rápida (Chen et al., 2020, *Biomaterials Science,* 8(13), 3760-3771). MRC mostró el mayor BCI, y por tanto la velocidad de coagulación sanguínea más lenta, con un índice de 82,7 ± 4,52%. La gasa y SP-CH mostraron BCI significativamente menor ($p < 0,001$) comparados a MRC, 37,7 ± 18,2% y 34,42 ± 5,91%, respectivamente. Con el fin de evaluar visualmente la capacidad de coagulación de sangre *in vitro* de las muestras, realizamos el método de inversión del tubo (Figura 4F). Este ensayo refuerza los resultados obtenidos en la figura 4E, confirmando la excelente capacidad de coagulación sanguínea de SP-CH, ya que la sangre añadida a los tubos permaneció en la parte superior formando un coágulo fuerte debido a la interacción con la esponja de SP-CH. Por su parte, la gasa y MRC no fueron capaces de formar coágulos que mantuvieran toda la sangre en la parte superior del tubo, cayendo la mayoría de la sangre añadida al fondo del Eppendorf, y confirmando así su efecto hemostático disminuido comparado con el de SP-CH

Ejemplo 2.9: Adhesión de glóbulos rojos *in vitro*

La adhesión de glóbulos rojos a la superficie del biomaterial de gran importancia para fomentar hemostasia por la formación de un tapón de sangre estable y fuerte. La medida de la hemoglobina fuera de los materiales (Figura 5A) representa la cantidad de glóbulos rojos que no pudieron adherirse al material y, por tanto, una menor concentración de hemoglobina fuera del material indica una mayor adhesión de glóbulos rojos. En esta línea, tanto gasa como MRC no mostraron diferencia significativa ($p > 0,05$) con respecto a un control en que no se produjo adhesión de glóbulos rojos, mostrando concentraciones de hemoglobina de 15.535 ± 1.977 mg/dl y 15.882 ± 2.231 mg/dl, respectivamente, mientras en el grupo control medimos una concentración de hemoglobina de 16.245 ± 2.365 mg/dl. SP-CH mostró concentración de hemoglobina significativamente disminuida ($p < 0,001$) comparada a los otros grupos, en concreto 10.346 ±1.905 mg/dl, indicando mayor adhesión de glóbulos rojos a la superficie del biomaterial. La figura 5B muestra el aspecto de los materiales a lo largo del experimento, y una mayor concentración de hemoglobina -y por consiguiente una mayor adhesión de glóbulos rojos a SP-CH- se puede confirmar visualmente.

Además de esto, evaluamos la concentración de hemoglobina en los materiales (Figura 5C), que se puede usar como un indicador de la cantidad de glóbulos rojos adheridos a la superficie de los biomateriales y, por tanto, en este ensayo, una mayor concentración de hemoglobina indica un nivel aumentado de adhesión de glóbulos rojos. Los resultados de este experimento confirmaron la excelente adhesión de glóbulos rojos a SP-CH comparado a gasa y MRC. Mientras nuestro biomaterial presentó una concentración de hemoglobina de 6.661 ± 571 mg/dl, estas concentraciones fueron 1.801 ± 133 mg/dl y 2.004 ± 451 mg/dl en el caso de la gasa y MRC, respectivamente. De nuevo, las concentraciones

de hemoglobina -y por consiguiente la adhesión de glóbulos rojos presentada gráficamente- se puede confirmar visualmente en las imágenes de los biomateriales durante el experimento (Figura 5D). La muestra de SP-CH parecía más oscura debido a una mayor adhesión de glóbulos rojos, y el líquido finalmente recogido y cuantificado presentaba un color más rojo debido a una elevada concentración de hemoglobina.

Por último, evaluamos la adhesión de glóbulos rojos mediante micrografías de MEB (Figura 5E) de muestras de cada biomaterial, que se habían incubado previamente con sangre. Incluso si MRC muestra una cantidad aceptable de glóbulos rojos adheridos, la superficie de SP-CH muestra concentraciones aumentadas de glóbulos rojos, que forman grandes agregados de células que se adhieren tanto entre sí como a la superficie de nuestro biomaterial. Por el contrario, la adhesión de glóbulos rojos a gasa es mínima comparada a los otros materiales.

Estos resultados aclaran el mecanismo hemostático hipotético de SP-CH, ya que tiene una gran capacidad para absorber sangre y unirse a glóbulos rojos, concentrándolos en su superficie. En este sentido, el papel de los glóbulos rojos en hemostasia gana interés, y estudios recientes indican que los glóbulos rojos migran al sitio de sangrado y empujan las plaquetas hacia el endotelio -marginación- de una manera dependiente del hematocrito y cizalla.

Ejemplo 2.10: Adhesión de plaquetas *in vitro*

Evaluamos la adhesión de plaquetas de los tres materiales usando un método indirecto (Figura 6A) que mide la cantidad de LDH liberada de una muestra, que es directamente proporcional a la cantidad de plaquetas en ella. Tanto gasa como MRC mostraron adhesión de plaquetas disminuida, con una liberación de LDH de solo un 23,46 ± 3,75% y 24,86 ± 3,61%, respectivamente, de la medida para un control positivo en que todas las plaquetas añadidas se lisaron. Por su parte, SP-CH presentó una liberación de LDH de un 47,81 ± 8,4% de la medida para el control positivo, que significa una adhesión de plaquetas significativamente mayor ($p < 0,001$) comparada tanto a gasa como MRC. Micrografías de MEB de los materiales cultivados con PRP (Figura 6B) confirmaron los resultados cuantitativos obtenidos en el ensayo de adhesión de plaquetas *in vitro*, mostrando que la adhesión de plaquetas a gasa y MRC es mínima, mientras SP-CH muestra mayores cantidades de plaquetas adheridas a su superficie, formando agregados de plaquetas, incluso con algunas de ellas activadas.

Ejemplo 2.11: Eficacia hemostática *in vivo*

Se usó un modelo de amputación de cola de rata para evaluar las propiedades hemostáticas *in vivo* de los tres materiales. La gasa obtuvo una puntuación de tiempo de sangrado medio de 2,8 ± 0,84, que era similar a la de MRC, 2,5 ± 1,05. Mientras tanto, SP-CH obtuvo una puntuación de tiempo de sangrado significativamente menor ($p > 0,05$), 1,8 ± 0,45, que significa que podría fomentar hemostasia *in vivo* más rápido tanto que gasa como MRC (Figura 7A). Respecto a la pérdida de sangre, no se encontraron diferencias significativas entre grupos. La gasa presentó una pérdida de sangre media de 1,08 ± 1,01 g, MRC 1,17 ± 0,84 g y SP-CH 0,61 ± 0,35 (Figura 7B). Sin embargo, es digno de mención que tanto gasa como MRC mostraron una desviación aumentada entre replicados, mientras la pérdida de sangre en el grupo de SP-CH permaneció constante en todas las muestras ensayadas, garantizando una eficacia hemostática homogénea.

No obstante, los resultados del tiempo de sangrado apoyan los obtenidos en los experimentos *in vitro*, donde SP-CH mostró propiedades hemostáticas superiores comparado con gasa y MRC.

REIVINDICACIONES

1. Un andamiaje de tipo esponja que comprende aislado de proteína de soja (SPI), quitina (CH) y un plastificante para uso en fomentar hemostasia.

2. El andamiaje de tipo esponja para uso según la reivindicación 1, en donde el andamiaje tiene una porosidad de aproximadamente entre el 70% y el 80%, y un tamaño de poro de aproximadamente entre 0,5 mm y 1,5 mm.

3. El andamiaje de tipo esponja para uso según cualquier reivindicación previa, en donde el contenido de CH es de aproximadamente el 30% (p/p) con respecto al contenido de SPI seco.

4. El andamiaje para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la CH tiene un grado de acetilación de al menos el 75%.

5. El andamiaje para uso según la reivindicación 4, en donde la CH tiene un grado de acetilación de al menos el 97%.

6. El andamiaje para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la CH contiene β-quitina.

7. El andamiaje para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el SPI comprende Glu, Asp, Leu, Ser, Gly, Ala y Pro, en un porcentaje con respecto a los residuos de aminoácidos totales presentes en el SPI, de al menos el 6% cada uno.

8. El andamiaje para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el SPI tiene un contenido de azufre de aproximadamente menos del 2%, preferiblemente menos del 1%.

9. El andamiaje para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el plastificante es un poliol, preferiblemente glicerol.

10. El andamiaje para uso según la reivindicación 9, en donde el contenido de plastificante es de aproximadamente el 30% (p/p) con respecto al contenido de SPI.

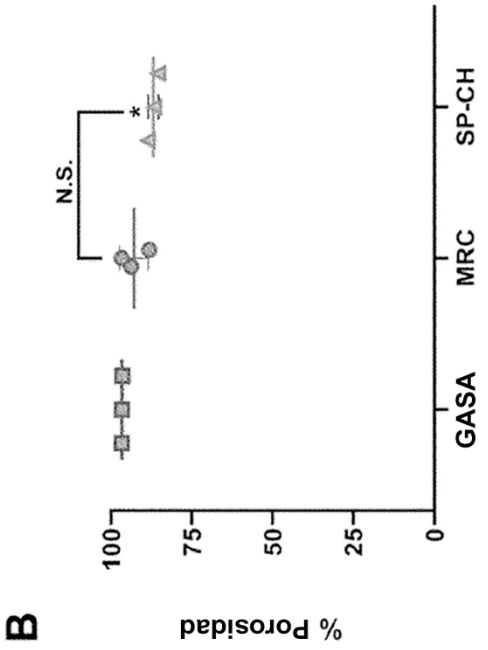
11. El andamiaje para uso según cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el fomento de hemostasia es en el tratamiento de una herida sangrante.

12. El andamiaje para uso según la reivindicación 11, en donde la herida sangrante es una hemorragia.

13. Un producto hemostático que comprende un andamiaje de tipo esponja como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un soporte en donde el andamiaje de tipo esponja está inmovilizado en un soporte.

14. El producto hemostático según la reivindicación 13, en donde el soporte es una gasa, un tejido, un tejido plástico, una tira o un cordón.

15. El producto hemostático según la reivindicación 13 o 14, en donde al menos parte del soporte no contiene el andamiaje de tipo esponja inmovilizado y al menos una región en la parte del soporte que no contiene el andamiaje de tipo esponja inmovilizado comprende un compuesto adhesivo que permite la adhesión del producto hemostático a la piel.


B
% Porosidad
100
75
50
25
0
N.S.
*
GASA
MRC
SP-CH

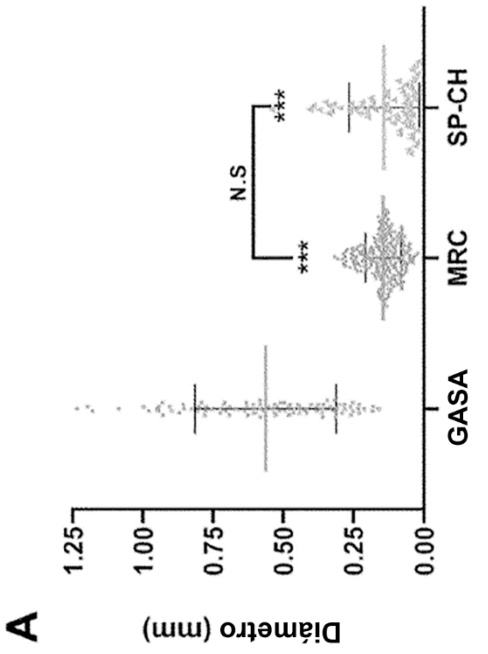

A
Diámetro (mm)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
N.S
***
***
GASA
MRC
SP-CH

Fig. 1

Fig. 1 (continuación)

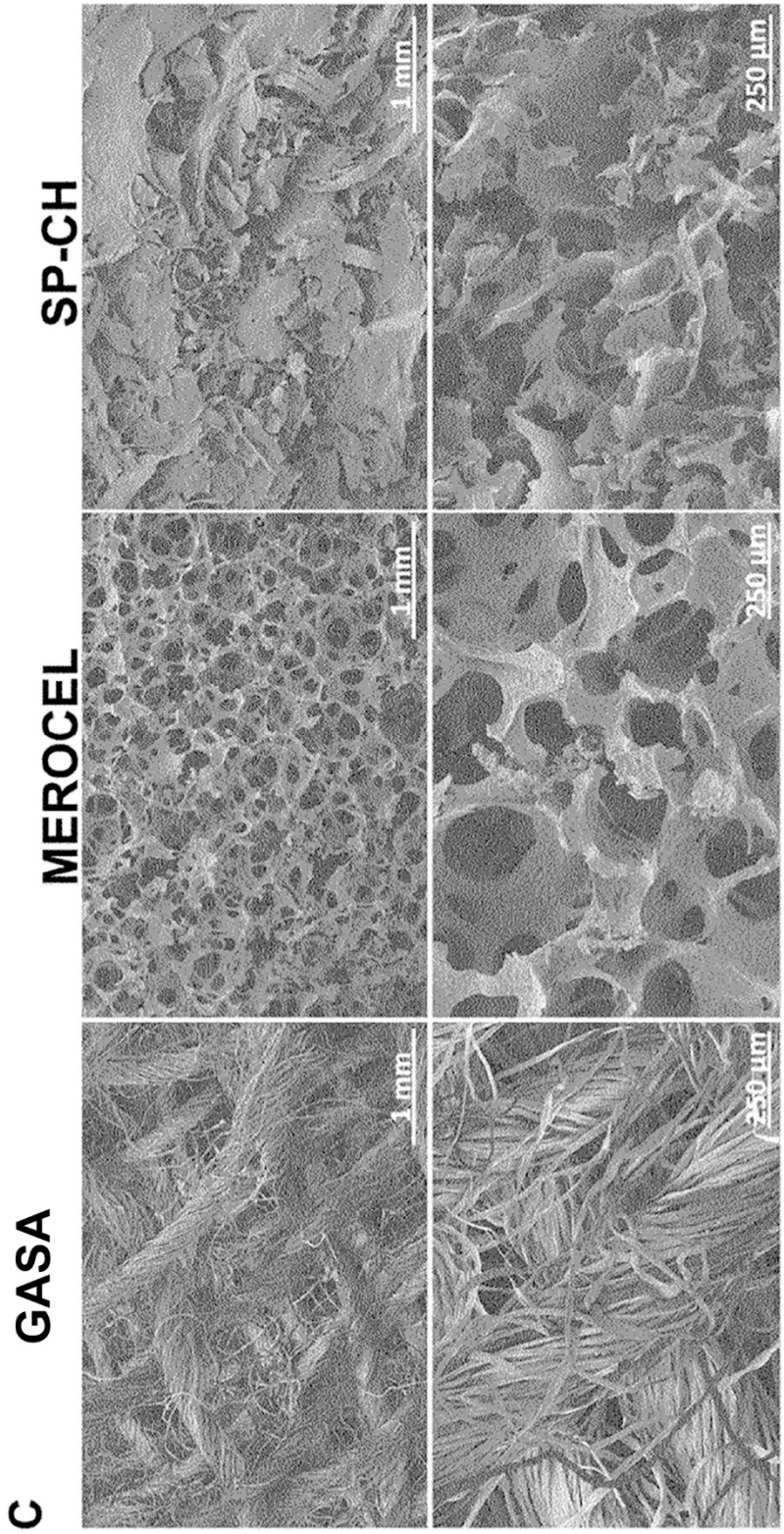
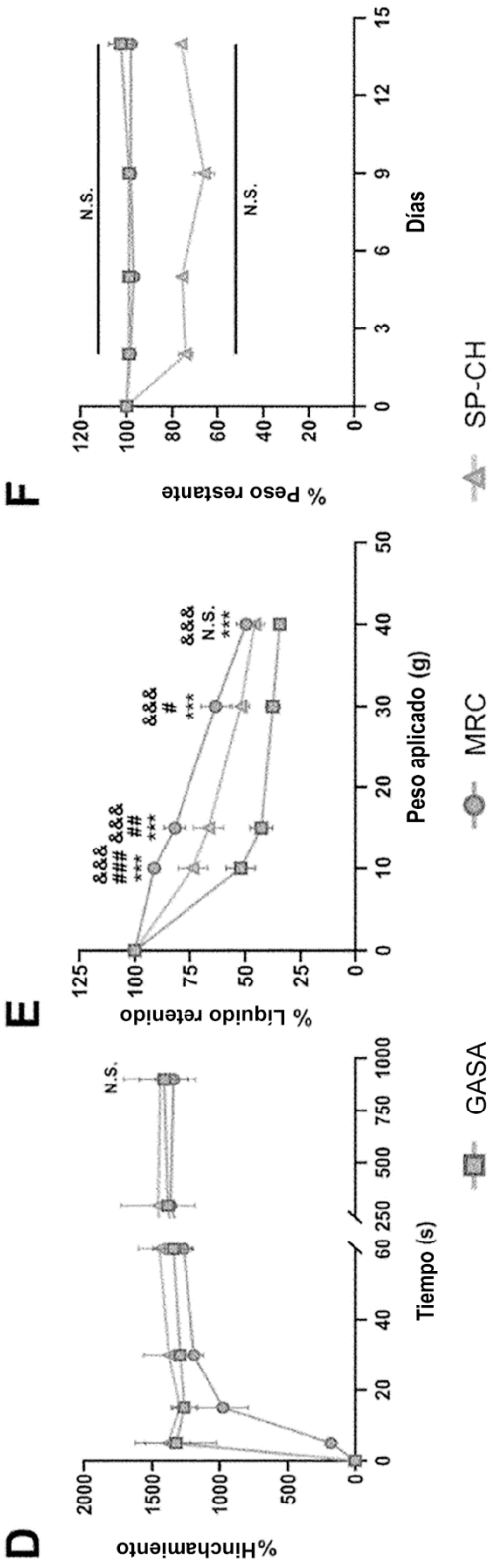


Fig. 1 (continuación)



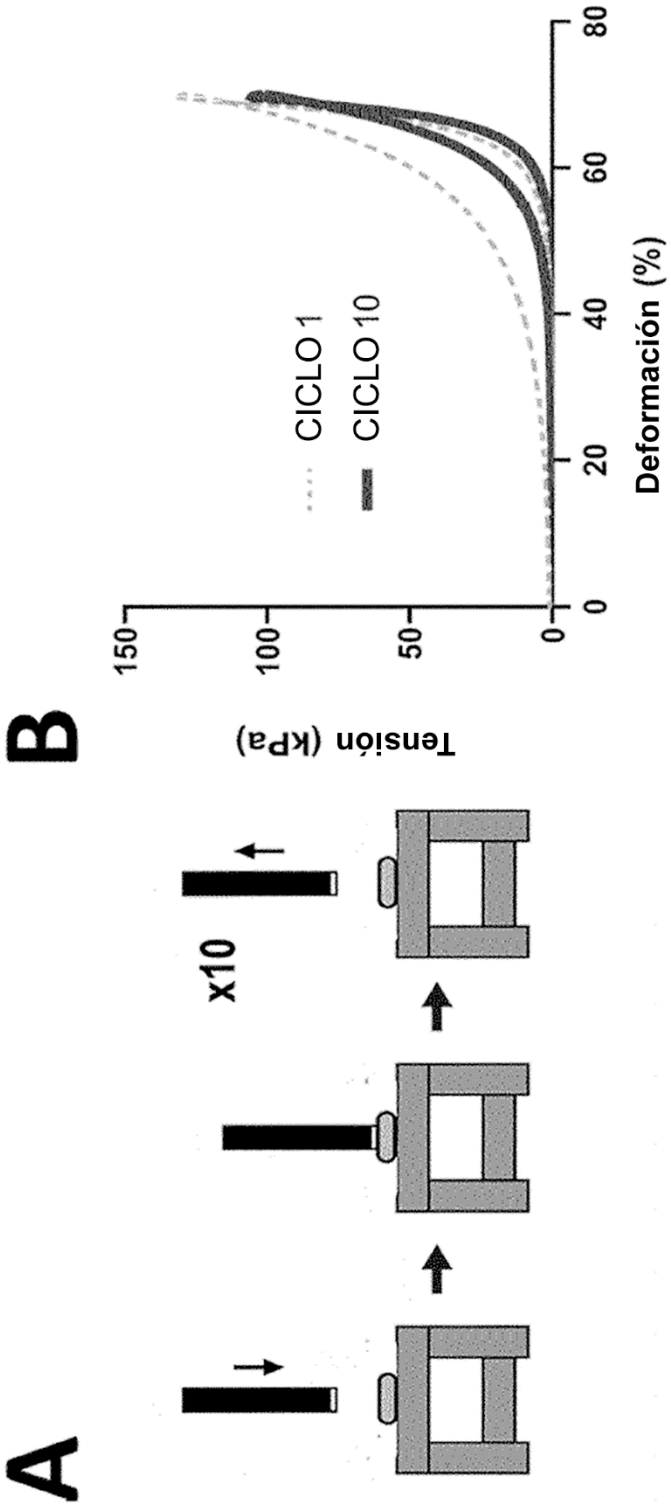

A
x10
B
Tensión (kPa)
150
100
50
0
0
20
40
60
80
Deformación (%)
CICLO 1
CICLO 10

Fig. 2

Fig. 2 (continuación)

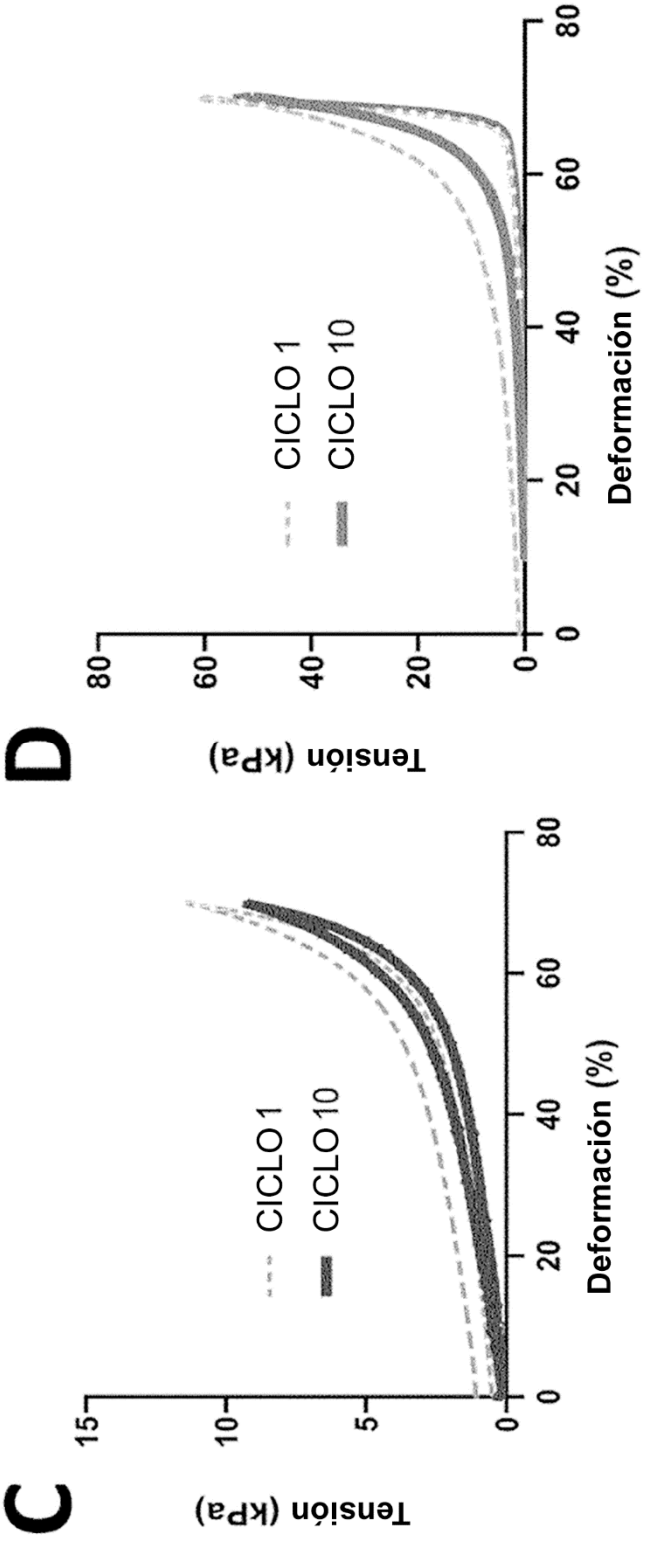


Fig. 2 (continuación)

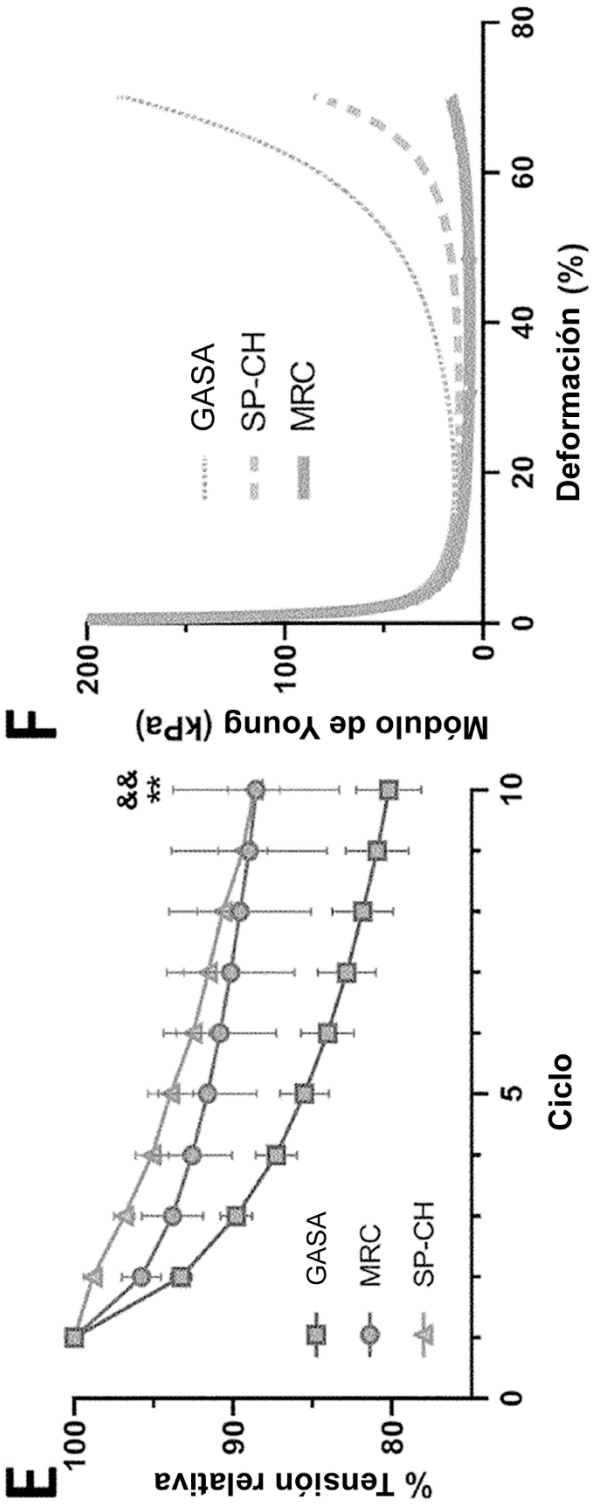
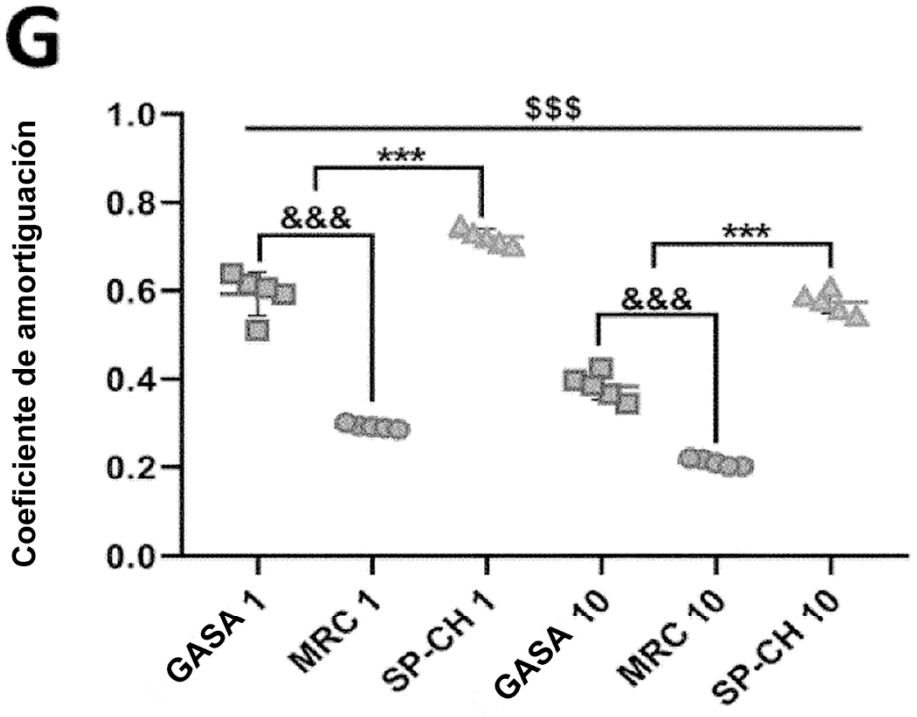
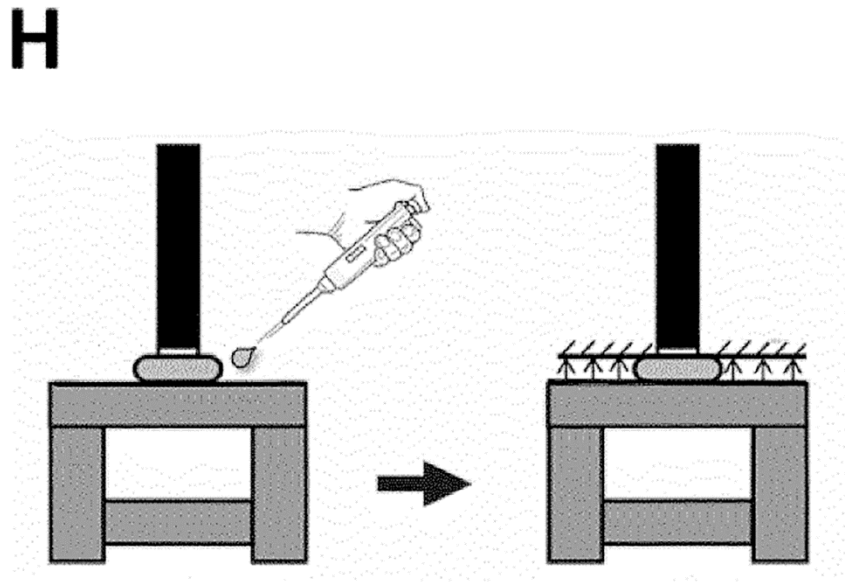


Fig. 2 (continuación)





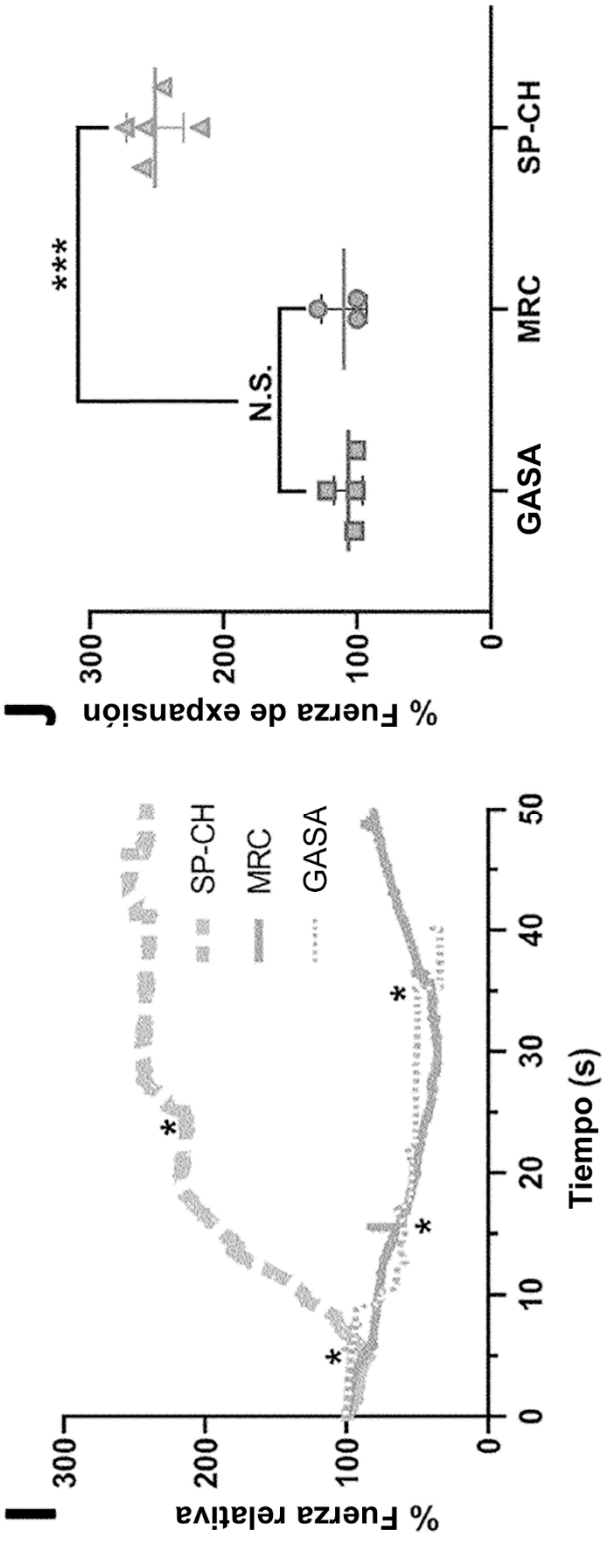


Fig. 2 (continuación)

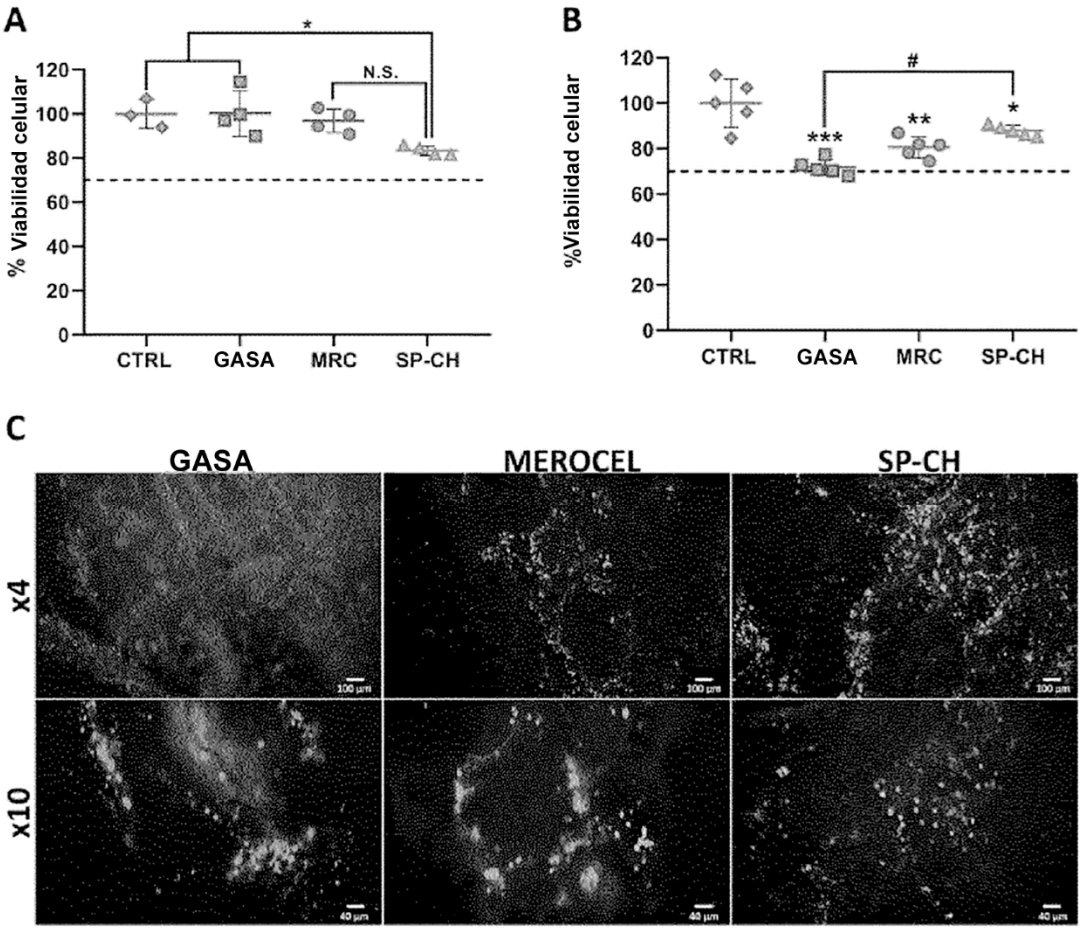

A
% Viabilidad celular
120
100
80
60
40
20
0
*
N.S.
CTRL
GASA
MRC
SP-CH
B
%Viabilidad celular
120
100
80
60
40
20
0
#
***
**
*
CTRL
GASA
MRC
SP-CH
C
GASA
MEROCEL
SP-CH
x4
x10
100 µm
40 µm

Fig. 3

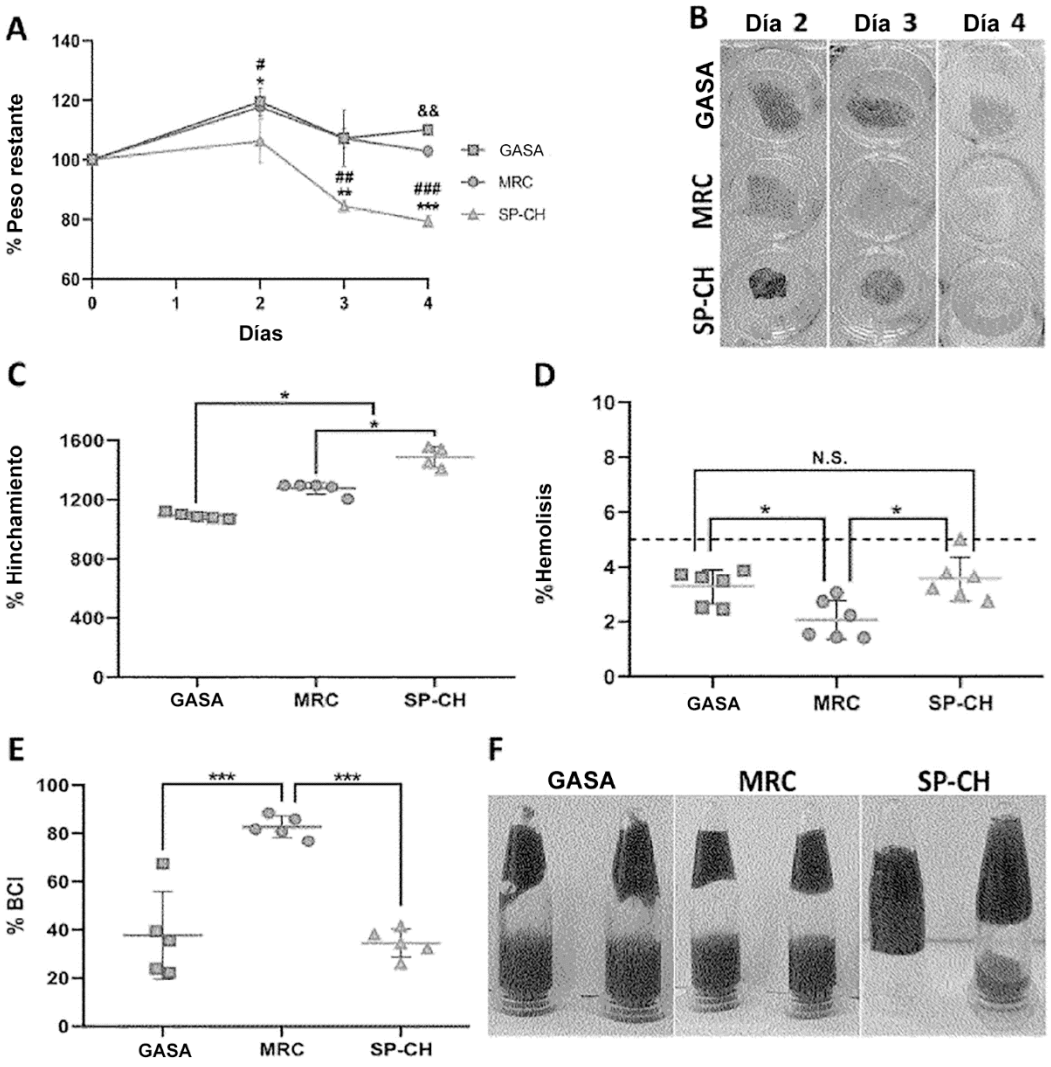

A
% Peso restante
Días
GASA
MRC
SP-CH
B
Día 2
Día 3
Día 4
GASA
MRC
SP-CH
C
% Hinchamiento
GASA
MRC
SP-CH
D
%Hemolisis
N.S.
GASA
MRC
SP-CH
E
% BCI
GASA
MRC
SP-CH
F
GASA
MRC
SP-CH

Fig. 4

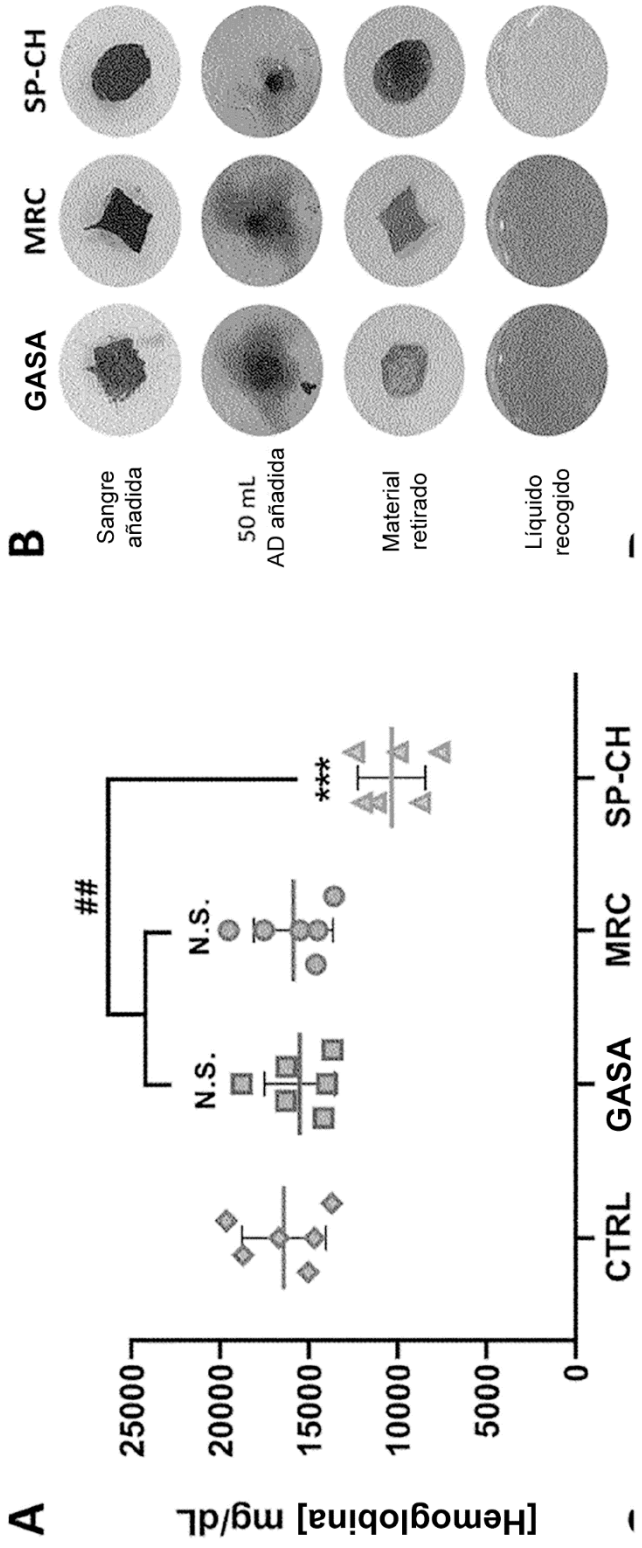

A
[Hemoglobina] mg/dL
25000
20000
15000
10000
5000
0
CTRL
GASA
MRC
SP-CH
N.S.
N.S.
##
***
B
GASA
MRC
SP-CH
Sangre añadida
50 mL AD añadida
Material retirado
Líquido recogido

Fig. 5

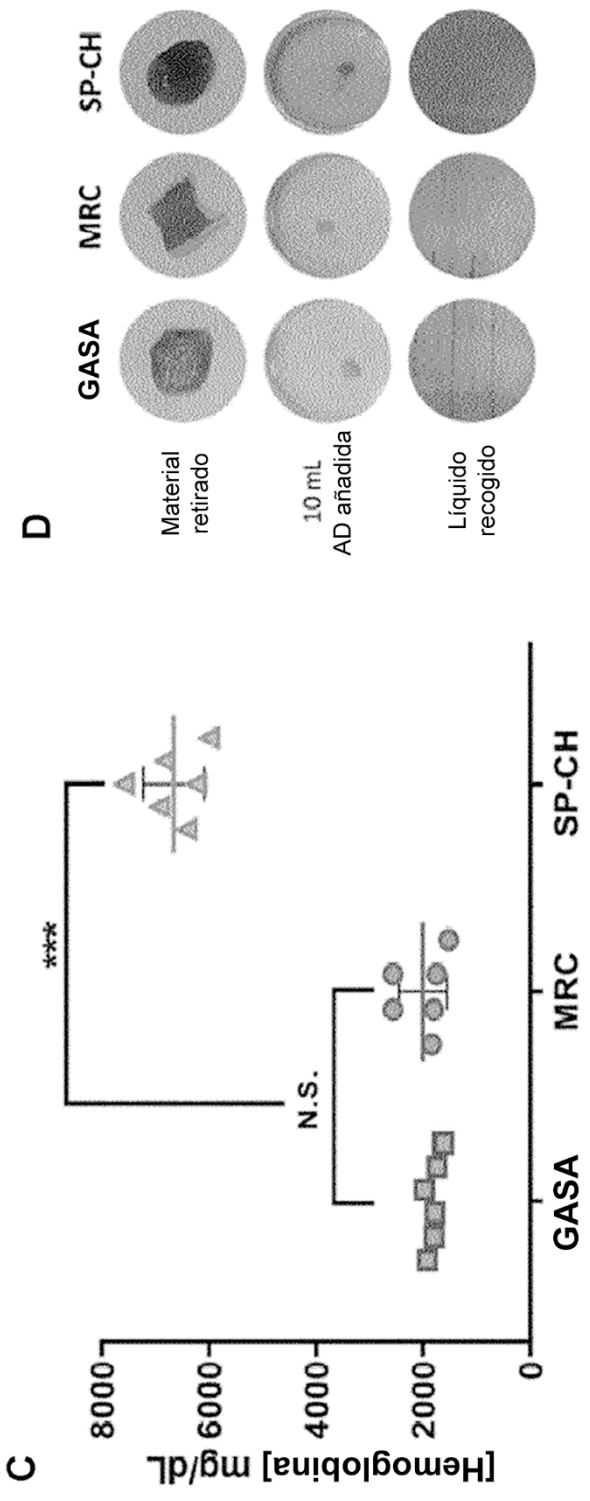


Fig. 5 (continuación)

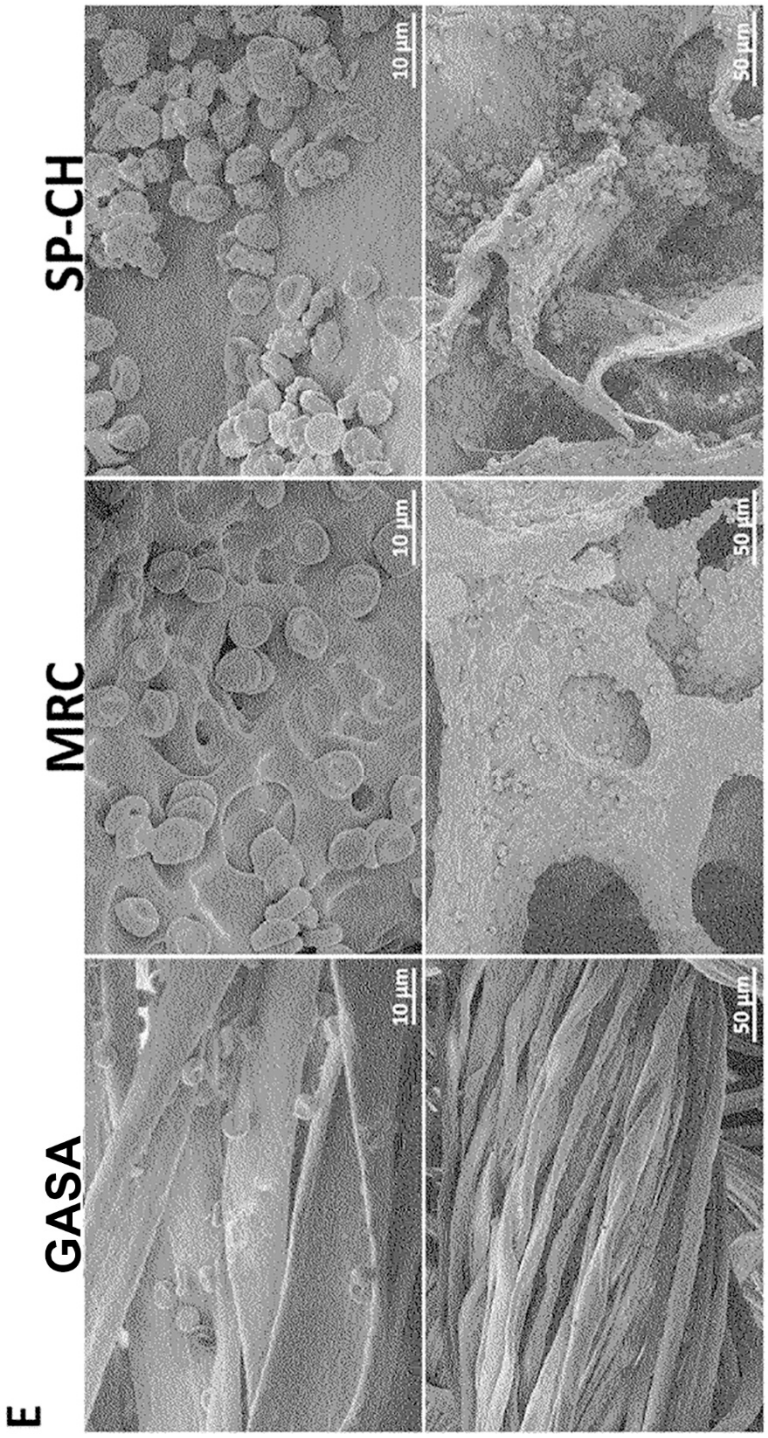


Fig. 5 (continuación)

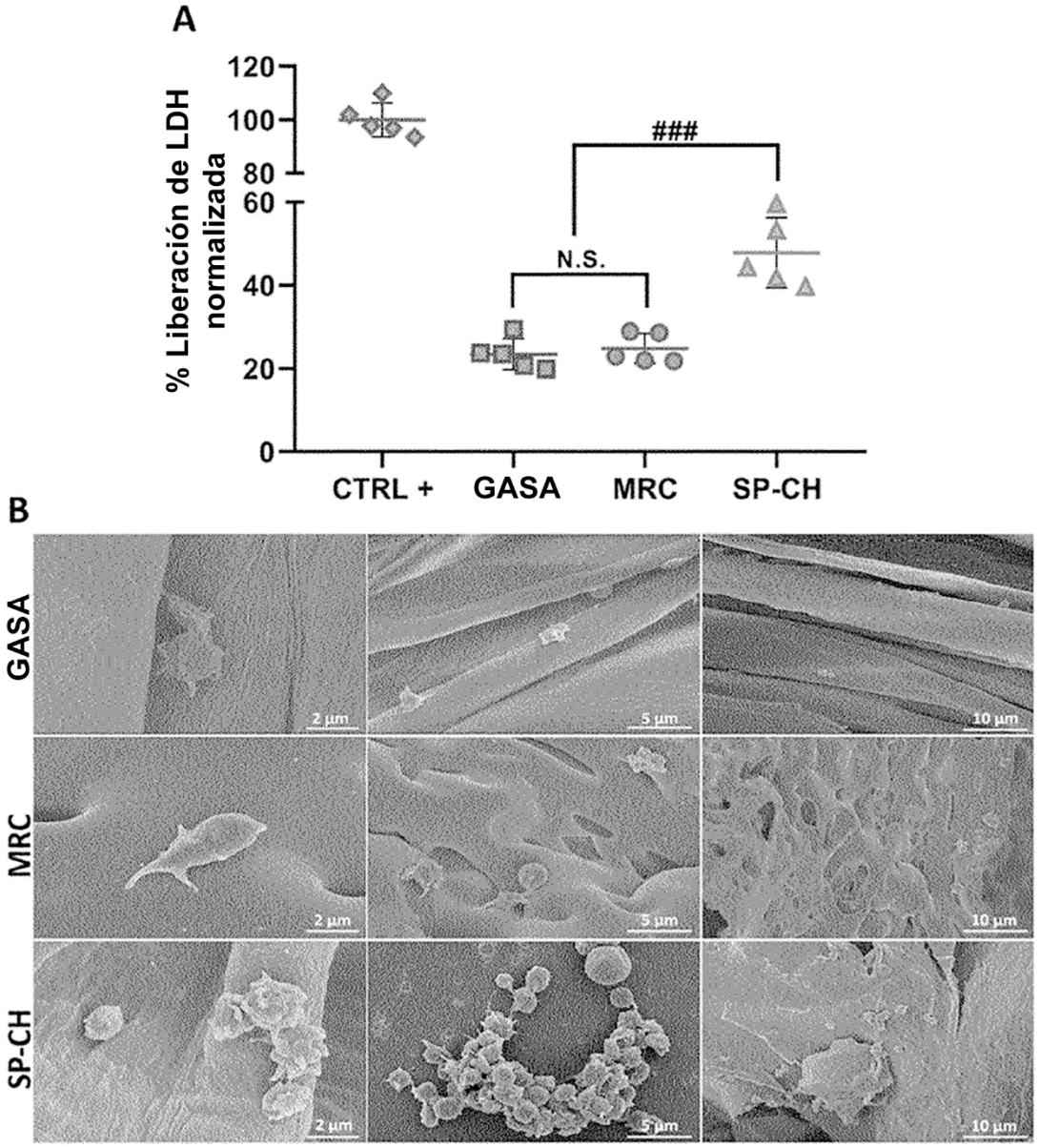

A
% Liberación de LDH normalizada
120
100
80
60
40
20
0
###
N.S.
CTRL +
GASA
MRC
SP-CH
B
GASA
MRC
SP-CH
2 µm
5 µm
10 µm

Fig. 6

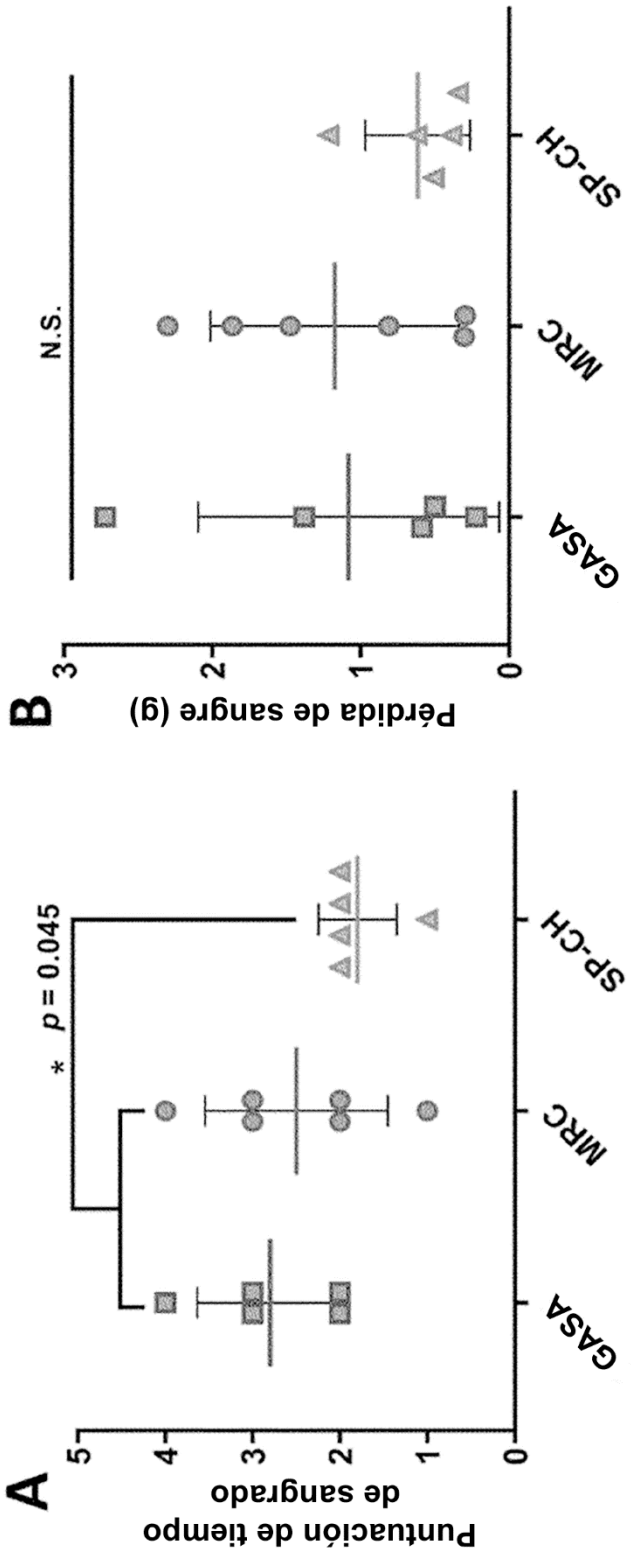

A
Puntuación de tiempo de sangrado
5
4
3
2
1
0
* p = 0.045
GASA
MRC
SP-CH
B
Pérdida de sangre (g)
3
2
1
0
N.S.
GASA
MRC
SP-CH

Fig. 7