

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
15 de agosto de 2019 (15.08.2019)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2019/153099 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 31/20 (2006.01) A61K 9/0019 (2006.01)
A61K 31/385 (2006.01) A61P 41/00 (2006.01)

KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CL2018/050009

(22) Fecha de presentación internacional:

12 de febrero de 2018 (12.02.2018)

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con reivindicaciones modificadas (Art. 19(1))
- en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitante: **GADOR LIMITADA** [CL/CL]; Antonio Bellet 444 piso 8 of.801, Providencia, Santiago, Chile., Santiago (CL).

(72) Inventores: **INCARDONA, Claudio Alejandro**; Darwin 429, Buenos Aires, C1414CUI (AR). **CHULUYAN, Héctor Eduardo**; Paraguay 2155, 17° piso, Buenos Aires, C1121ABG (AR).

(74) Mandatario: **FERNANDEZ TELLERIA, Fernando**; Avenida Providencia 1208, Oficina 308, Santiago (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG,

(54) **Title:** COMPOUND AND PROCEDURE FOR OPTIMISING THE TRANSPLANT OF VASCULARISED SOLID ORGANS AND REDUCING THE DYSFUNCTION OF SAME

(54) **Título:** COMPUESTO Y PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR EL TRASPLANTE DE LOS ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y REDUCIR LA DISFUNCIÓN DE LOS MISMOS

(57) **Abstract:** The invention relates to a compound and procedure for optimising the transplant of vascularised solid organs and reducing the dysfunction of same, which comprises 400 to 1000 mg of alpha lipoic acid (ALA), preferably 600 mg of ALA, and the administration of ALA for the usual treatment of immunosuppression, for perfusion of the graft prior to the transplant and to the recipient during the first two days following the transplant in order to reduce the functional recovery time of the graft and to improve the short-term clinical parameters for patients undergoing kidney-pancreas, kidney and liver transplants.

(57) **Resumen:** Un compuesto y procedimiento para optimizar el trasplante de los órganos sólidos vascularizados y reducir la disfunción de los mismos, en donde comprende 400 a 1000 mg de ácido alfa lipoico (ALA), preferentemente 600 mg de ALA y la administración de ALA, al tratamiento habitual de inmunosupresión, la perfusión del injerto previo al trasplante y al receptor en los dos primeros días posteriores al trasplante para reducir el tiempo de recuperación funcional del injerto y mejorar los parámetros clínicos de los pacientes a corto plazo de pacientes sometidos a trasplantes renopancreáticos, renales y hepáticos.



WO 2019/153099 A1

**COMPUESTO Y PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR EL
TRASPLANTE DE LOS ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y
REDUCIR LA DISFUNCIÓN DE LOS MISMOS**

MEMORIA DESCRIPTIVA

1) CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un “COMPUESTO Y PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR EL TRASPLANTE DE LOS ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y REDUCIR LA DISFUNCIÓN DE LOS MISMOS”, especialmente en las etapas de ablación, trasplante y post-trasplante con el fin de optimizar el tiempo de recuperación funcional del injerto y los parámetros clínicos de los pacientes a corto plazo sometidos preferentemente a trasplantes renopancreáticos, renales y hepáticos.

2) ESTADO DE LA TECNICA Y EXPOSICIÓN DE PROBLEMAS A SOLUCIONAR

Es conocido en el arte previo que el daño irreversible de órganos es uno de los principales desafíos de la salud. Una manera de mitigar este problema es a través de la realización de trasplantes de órganos. Si bien el trasplante ha alcanzado un grado de éxito considerable, varios factores limitan significativamente su efectividad. En este contexto las reacciones inflamatorias en el injerto tienen una influencia fundamental en el funcionamiento del órgano a corto y a largo plazo. Una de las principales razones de la reacción inflamatoria inicial, es el daño generado por la isquemia y la reperfusión del órgano, condicionando así el tiempo de recuperación de la función del órgano

post-trasplante. En el caso del trasplante renal, la entidad clínica denominada función retrasada del injerto (DFI), es una situación clínica frecuente donde el órgano tarda en recuperar la función luego del trasplante. En otros tipos de trasplante, como el hepático, también se describen eventos adversos en la etapa inmediata post-trasplante. En este caso, se puede presentar un síndrome denominado "síndrome por reperfusión" (SPR), que se manifiesta como una descompensación del receptor del trasplante. Datos bibliográficos indican que tanto especies reactivas del oxígeno como mediadores de la respuesta inmune participarían en estos eventos adversos iniciales. Por lo tanto, estrategias terapéuticas que tiendan a limitar la acción de radicales libres así como inmunomoduladores, podrían ejercer efectos beneficiosos en el trasplante.

Una vez realizada la cirugía, se espera que el funcionamiento del órgano sea inmediato. Sin embargo, en la mayoría de los distintos tipos de trasplantes de órganos sólidos vascularizados está descrito la posible ocurrencia de un fenómeno en el cual el injerto no funciona inmediatamente debido a la injuria de todo el proceso que implica la ablación y el trasplante. Este fenómeno llamado disfunción temprana del injerto es definido de forma diferente según el órgano trasplantado, e incluso, para un mismo tipo de trasplante, entre distintos centros y en la literatura.

Actualmente la única conducta terapéutica que reduce los eventos adversos tempranos del trasplante es la utilización de máquinas de perfusión y líquidos de perfusión de calidad como el de Wisconsin y el HTK. Además, también se administran diferentes combinaciones de inmunosupresores que varían según el tipo de paciente y el centro donde se realice el trasplante. Esta primera inmunosupresión se la llama terapia de inducción.

La recuperación funcional inmediata del injerto, en general se logra con donantes vivos ideales y tiempos de isquemia fría y caliente reducidos. Sin

embargo, estos tipos de trasplantes ideales, en la práctica no se pueden realizar de rutina por la escasez de donantes. Además, se debe tener presente que, con el afán de aumentar la oferta de órganos, se han instalado programas de donación de órganos de los llamados donantes con criterio extendido. Estos donantes distan de ser ideales y presentan mayores porcentajes en la aparición de la llamada disfunción temprana del injerto. Hoy en día, no existen métodos que logren reducir la disfunción temprana del injerto cuando el receptor de un trasplante recibe un órgano de un donante con criterio extendido.

Otro problema en las primeras horas post-trasplante podría ser la aparición de rechazos. Sin embargo, el problema de los rechazos se ha podido solucionar parcialmente con los estudios de cross match, la tipificación de HLA y el uso de tratamientos inmunosupresores.

Existen dos tipos de tratamiento inmunosupresor que tratan de evitar el rechazo: el tratamiento de inducción y el de mantenimiento. El tratamiento inmunosupresor de inducción trata de evitar el fenómeno de rechazo del injerto, y que de hecho lo consigue. Sin embargo, este tratamiento no es efectivo para lograr una rápida recuperación funcional del injerto. No hay en la actualidad ninguna estrategia terapéutica basada en la administración de alguna droga o fármaco que logre recuperar la función temprana del injerto. Como se mencionó más arriba, las estrategias se basan en la utilización de máquinas de perfusión continua, pero éstas no están implementadas en todos los centros de trasplante y resultan muy caras por los insumos que deben ser reemplazados luego de cada operativo.

Los métodos que se utilizan hoy en día para recuperar la función temprana del injerto se basan en mejorar las técnicas de preservación y reducir los tiempos de isquemia. Este último aspecto, no siempre es posible por lo que implica todo el proceso de procuración de órganos. En Argentina el método de preservación utilizado para minimizar el daño al momento del traslado y

conservación del órgano, es la preservación hipotérmica estática cuyo fundamento es la supresión del metabolismo celular mediante la hipotermia a 4°C. Sin embargo, la hipotermia por sí sola no es suficiente para una adecuada preservación, por lo que es necesario irrigar el órgano con soluciones especiales antes, durante y después del almacenamiento.

Cada componente de las soluciones de preservación fue elegido con una finalidad. En primer lugar, es necesario evitar la edematización celular dada por la inactividad de la bomba de Na/K-ATPasa. Esto se logra utilizando líquidos de preservación que tengan una baja concentración de sodio y alta de potasio. También se utilizan soluciones iónicas con composición extracelular. Asimismo, los líquidos de preservación contienen sustancias impermeables para la célula a base de azúcares simples, lactobionato y trisacáridos para mantener una osmolalidad similar al plasma (310 mOsm/kg). Además, la isquemia genera acidosis tisular, por esta razón es necesario que las soluciones de preservación tengan sustancias tampón que mantengan el pH lo más próximo al pH fisiológico. También es preciso que contengan sustancias que aumenten la presión oncótica intravascular para evitar el edema intersticial y el colapso capilar, para lo que se utilizan derivados del almidón hidroxietílico. Los radicales libres liberados durante la isquemia fría y la reperfusión producen oxidación de las estructuras celulares y lesión celular. En esta situación, la defensa natural contra radicales libres se ve superada por lo que es necesario la adición de sustancias *scavenger* exógenas, como el glutatión. Existen diversas soluciones de preservación, por ejemplo la solución de la Universidad de Wisconsin (UW), EuroCollins (EC) y HTK (Histidina-Triptofano-Cetoglutaratato) (**Tabla 1**).

De todas ellas, la solución más aceptada es la UW a pesar de ser la más cara. Esta solución suele ser utilizada en trasplante renal, hepático y pancreático.

La preocupación de los trasplantólogos por mejorar la calidad de los órganos donados ha impulsado en los últimos años el desarrollo de métodos de preservación mejores que el simple almacenamiento en frío[1,2]. Actualmente, en algunos países, se utiliza un método de enfriamiento llamado máquina de perfusión hipotérmica (MPH). Esta permite una preservación en frío más prolongada y efectiva debido al aporte continuo de oxígeno, sustratos para la síntesis de ATP y otros metabolitos, y facilita el lavado de los desechos del metabolismo celular. Diversos estudios en trasplante renal, han demostrado que la MPH conlleva a una mejor función inicial y a largo plazo del injerto en comparación con la conservación estática en órganos de donantes con muerte encefálica. Con esta máquina se ha observado que la disfunción temprana del injerto puede disminuir hasta llegar a afectar solo a un 10% de los pacientes trasplantados. En relación con los tratamientos farmacológicos, hay numerosos estudios experimentales centrados tanto en inhibir los efectos nocivos de la isquemia como la respuesta inflamatoria asociada a la reperfusión.

Con esta finalidad se han administrado fármacos como la cloroquina o la clorpromazina, para prevenir las disfunciones mitocondriales y la degradación de fosfolípidos durante la isquemia. A su vez, se investigó bloquear la activación de neutrófilos y la infiltración con anticuerpos monoclonales específicos, así como también, se buscó disminuir la apoptosis bloqueando el calcio con un antagonista. Pero sin lugar a dudas, y en base al conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología del daño por isquemia reperfusión, uno de los principales blancos de acción debería ser la producción de radicales oxidrilos. Al respecto, se describió el uso de tocoferol para minimizar los efectos de las especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, el antioxidante más utilizado en experimentación y modelos clínicos es la N-acetilcisteína (NAC). El uso de NAC en modelos animales de IRI ha demostrado resultados alentadores. En uno de los casos de IRI hepática se mostró una reducción significativa del daño oxidativo, aumento de glutatión, disminución de peroxidación lipídica, de alanina aminotransferasa y apoptosis celular. Por otra

parte, en un modelo de IRI renal, el pretratamiento con α -tocoferol y erdoesteína redujo la peroxidación lipídica de membranas celulares renales. A su vez se observó un aumento de la supervivencia de ratas isquémicas tratadas con α -tocoferol. Sin embargo, no siempre lo que se observa en modelos animales resulta eficiente en el ser humano.

	HTK	EC	UW	
Sodio	15	10	30	Electrolito
Potasio	10	115	120	Electrolito
Magnesio	4	–	5	Electrolito
Cloro	50	15	–	Electrolito
Bicarbonato	–	10	–	Tampón
Fosfato	–	50	25	Tampón
Sulfato	–	–	5	Tampón
Histidina	100	–	–	Tampón, impermeante
Glucosa	–	195	–	Impermeante
Manitol	30	–	–	Impermeante
Rafinosa	–	–	30	Impermeante
Lactobionato	–	–	100	Impermeante
Adenosina	–	–	5	Precursor energético
Ketoglutarato	1	–	–	Precursor energético
Glutación	–	–	3	Scavenger*
Alopurinol	–	–	1	Inhibidor, scavenger*
HES	–	–	50 g/l	Sustancia coloidal
Triptófano	2	–	–	Fármaco**
Dexametasona	–	–	8	Fármaco**
Insulina	–	–	100 U/l	Fármaco**
Osmolalidad (mOsm/l)	310	355	320	

*Scavenger de radicales libres de oxígeno.

**Fármaco: fármacos con otros mecanismos de acción.

EC: EuroCollins; HTK: solución de Bretschneider o Custodiol; UW: solución de Belzer o de la Universidad de Wisconsin.

Tabla 1: Composición electrolítica (en mmol/l) de las principales soluciones de preservación.

La preservación de órganos sólidos vascularizados comienza en muchos casos previo a la ablación. Una vez realizada, y con el fin de eliminar elementos formes para minimizar la posibilidad de coagulación, la sangre es reemplazada por una solución diseñada específicamente para optimizar la tolerancia del órgano a la hipotermia y a la falta de oxígeno. Dado al conocimiento adquirido sobre el daño por isquemia reperusión.

Existen muchas drogas anti-oxidantes disponibles para ser probados en diferentes modelos de daño por isquemia reperusión. Uno de los anti-oxidantes más efectivos y que se usa en la clínica diaria, es el ácido tioctico o alfa lipoico (ALA). El ALA es un compuesto de origen natural creado en la mitocondria a partir del ácido octanoico como precursor. Es un poderoso antioxidante natural que tiene actividad tanto en medio acuoso como lipídico.

Actúa tanto a nivel intra como extracelular y tiene dos formas isoméricas. Debido a estas propiedades tiene un amplio potencial de acción farmacológica. Su papel biológico principal es como cofactor en las enzimas mitocondriales tales como α -cetoglutarato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa. ALA también parece estar involucrado en la producción de acetyl-CoA, a través de la descarboxilación oxidativa de piruvato. *In vivo*, ALA puede ser reducido en ácido dihidrolipoico (ADHL) el cual posee una mayor acción antioxidante. Ambos, ALA y ADHL, tienen capacidad quelante de metales (Fe^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+}) y neutralizadora de especies reactivas del oxígeno pero sólo el ADHL es capaz de regenerar antioxidantes endógenos (glutatiión y vitamina E, C) y reparar el daño tisular generado por las especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, no todos los efectos del ALA se deben a su actividad anti-oxidante. Por ejemplo, se pudo observar que varios de los efectos antiinflamatorios del ALA han sido

mediados por su capacidad de inhibir NF- κ B. Es decir que ALA, no sólo es un anti-oxidante sino también una sustancia con actividad antiinflamatoria.

La utilización de ALA resultó ser protectora en varios modelos experimentales, tales como daño por isquemia reperfusión hepático y renal y pancreatitis aguda. En este último estudio, la administración intraperitoneal de 100 mg/kg de ALA en animales que sufrieron 45 min de isquemia renal por la oclusión del pedículo renal fue capaz de revertir efectos deletéreos de la isquemia, tales como el aumento de la creatinina sérica, IL-1 β , IL-6 y TNF- α , entre otros. En ratas, también se determinó que la administración intraperitoneal de ALA previno la desregulación de aquaporinas y transportadores de sodio, que se observa en la reperfusión renal y atenuó el incremento de la expresión de endotelina-1, que conduce a la disfunción renal. En estos estudios, la administración de dosis alta de ALA (100 mg/kg) se realizó antes de la isquemia e inmediatamente antes del período de reperfusión.

También se han observado efectos beneficiosos en el uso de ALA en humanos. Varios estudios han documentado un efecto terapéutico positivo, en particular en enfermedades como diabetes, arteriosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, y en SIDA, entre otras. Los suplementos de ALA son relativamente seguros en las dosis consumidas en humanos. Las dosis de 600mg/día y 1800mg/día no tuvieron efectos secundarios durante un período de 1-6 meses. Luego de la ingesta oral, es excretado ampliamente por el riñón y se metaboliza en hígado con un elevado efecto de primer paso hepático. En un ensayo clínico, se observó que el ALA disminuye el IRI hepático después de la oclusión y resección hepática. Sin embargo, el efecto terapéutico más significativo de ALA en humanos es en las complicaciones inducidas por la diabetes, incluyendo la polineuropatía y la formación de cataratas. De hecho, tanto la administración intravenosa de ALA como la oral están aprobadas para el tratamiento de polineuropatía diabética en varios países, incluso Argentina.

En el caso de trasplante renal, la disfunción temprana del injerto se denomina “delay graft function” o DGF (retraso de la función del injerto). El término DGF se lo utiliza para indicar que el paciente requiere sesiones de diálisis dentro de la primera semana post-trasplante.

El DGF es descrito como una discrepancia entre la capacidad funcional del injerto y de las necesidades fisiológicas del receptor, siendo una forma de insuficiencia renal aguda que resulta en oliguria post-trasplante. Alrededor del 30-50% de los trasplantados renales sufren DGF. Sin embargo, en nuestro país la cifra de pacientes con DGF asciende al 60-70%. Con respecto a la relación entre DGF y la sobrevida del injerto, se sabe que la vida media de un riñón con DGF es de 8,6 años en comparación con la vida media de 14,1 años de un riñón sin DGF. La utilización de AAL permitiría reducir la incidencia de DGF.

En el caso del trasplante hepático el síndrome post-reperfusión (SPR) es una causa conocida de disfunción primaria del injerto. Aunque muchos de los órganos que sufren disfunción pueden recuperarse, aproximadamente el 5% no logran abastecer las necesidades del receptor y sólo el retrasplante urgente puede salvar al paciente. La disfunción primaria del injerto (DPI), suele dividirse en dos manifestaciones; la disfunción temprana del injerto (DTI) y la no-función primaria (NFP). Ambas describen diferentes grados de impedimento funcional comenzando en el período intraoperatorio. Sin embargo, las definiciones no son claras en la literatura. La DTI se refiere a un mal funcionamiento del injerto dentro de la primer semana post-trasplante mediante el análisis de resultados alterados de laboratorio, entre ellos de alanino aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, tiempo de protrombina, lactato y amonio sérico, entre otros[3-9]. Mientras que la NFP tiene una implicancia más severa que se asocia con un deterioro catastrófico clínico y de laboratorio. Se caracteriza por necrosis hepática, aumento de transaminasas séricas, coagulopatía, aumento de niveles de lactato, inestabilidad hemodinámica,

hipoglucemia, falla respiratoria y renal. A diferencia de DTI que es una condición con potencial recuperación, la NFP puede llevar a la falla del injerto, emergencia de retrasplante o muerte del receptor. En este tipo de trasplante es necesario destacar que la preservación hepática es más crítica que la renal ya que, al no disponerse de una máquina sustitutiva del órgano, es fundamental que las funciones del injerto retornen inmediatamente después del trasplante.

Para ambos órganos (riñón e hígado) no existen terapias que eviten la disfunción temprana del injerto, excepto el hecho de tener donantes ideales, los cuales en la práctica se da en pocos casos.

3) SOLUCION APORTADA

En la mayoría de los trasplantes de órganos sólidos vascularizados se produce un retardo en la recuperación funcional del injerto. Este proceso ha sido asociado a la injuria presente en las etapas de ablación y trasplante de órganos. Se ha tratado de reducir la aparición de este fenómeno utilizando mejores medios y sistemas de preservación de órganos. Sin embargo, a pesar de la utilización de estos medios las incidencias de disfunción temprana es muy alta y repercute a largo plazo en la sobrevida del órgano.

Los inventores aportan un producto suplementario que contiene una sustancia activa de ácido alfa lipoico ó tióctico (ALA) ($C_8H_{14}O_2S_2$) al donante y/o la perfusión de los órganos a trasplantar con ALA junto con la administración de ALA en los dos primeros días post-trasplante permite reducir la disfunción temprana del injerto.

En estos casos, nuestra invención no implica modificar las terapias y procedimientos habituales en el trasplante de órganos sólidos, sino la de incorporar un producto suplementario a los mismos ALA para mejorar

parámetros clínicos a corto y largo plazo. La incorporación de ALA, ya sea en el donante y/o en el órgano a trasplantar y al receptor del trasplante en los primeros dos días post-trasplante mejora la función temprana del injerto, avalado por los cambios que se observan en los mediadores inflamatorios a nivel local como sistémico. El procedimiento de administración de ALA se realiza de la siguiente manera, cuyas etapas son:

- a) Administrar al donante, particularmente en el quirófano previo al procedimiento quirúrgico del trasplante, una sustancia activa de ácido alfa lipoico (ALA) comprendido en cantidades entre 400 a 1000 mg, preferentemente 600 mg diluido en 100 ml solución fisiológica que se pasan durante 30 minutos, junto con la infusión de 1 ampolla de vitamina B (Bagó B1 B6 B12 o Becozym) endovenosa;
- b) Introducir lenta y continuada al órgano a trasplantar una solución de la Universidad de Wisconsin(UW), HTK (solución de Bretschneider o Custodiol) o Eurocollins (EC) conteniendo una sustancia activa de ácido alfa lipoico (ALA) comprendido en cantidades entre 400 a 1000 mg, preferentemente 600 mg diluidos en 500 ml de solución fisiológico entre 30-60 minutos previo al trasplante; y
- c) Incorporar al receptor, una sustancia activa de ácido alfa lipoico (ALA) comprendido en cantidades entre 400 a 1000 mg, preferentemente 600 mg diluido en 100 ml solución fisiológica, durante el acto quirúrgico, previo al implante y una hora después de la cirugía y en los dos días posteriores como medio de nivelación de los parámetros bioquímicos.

También otra opción que tienen los inventores es en la situación en que aquellos donantes que tengan dificultad en perfundir la sustancia activa de ácido tioctico o alfa lipoico ALA, se procede como variante en introducir lenta y continuamente esta sustancia únicamente al órgano y/o al receptor

4) BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- La figura 1, muestra a los pacientes con trasplante hepático de los grupos Rama Control y Rama Tratada con ALA que sufrieron o no síndrome post-reperusión (SPR).
- La figura 2, muestra la expresión relativa en biopsias de pacientes trasplantados hepáticos que recibe un órgano perfundido con ALA y cuyo receptor ha recibido ALA.
- La figura 3, muestra los niveles plasmáticos de SLPI y PAP en pacientes trasplantados hepáticos. Los pacientes trasplantados hepáticos reciben órganos perfundidos (Grupo RT) o no con ALA (Grupo RC).
- La figura 4, muestra que los pacientes con trasplante reopancreático simultáneo que recibe un órgano perfundido con ALA y cuyo receptor haya recibido ALA presenta menor disfunción temprana del injerto, mayor sobrevida del injerto y del paciente comparado con los pacientes no tratados.
- La figura 5, muestra la expresión relativa de mediadores inflamatorios en biopsias renales y pancreáticas de pacientes trasplantados reopancreáticos tratados con ALA.
- La figura 6, se muestran los niveles plasmáticos de citoquinas en pacientes trasplantados reopancreáticos medidos en muestras obtenidas en el pre-trasplante (Pre-Tx) y 12 h post-trasplante.
- La figura 7 se muestran los niveles plasmáticos de PAP (proteína indicadora de pancreatitis) y SLPI en pacientes trasplantados reopancreáticos en el pre-trasplante, inmediatamente luego al acto

quirúrgico (tiempo 0 h post-Tx) y 12 horas posterior al trasplante en el grupo C, R y DR.

- La figura 8, se muestran los niveles plasmáticos de amilasa, lipasa, glucosa, creatinina y urea.
- La figura 9, se muestran los % de DGF, los requerimientos de diálisis y el tiempo de internación de los pacientes que reciben riñones perfundidos con ALA y son tratados con ALA durante los primeros días post-trasplante.

5) DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Con respecto a la fig.1, dicho síndrome se evalúa dentro del quirófano como hipotensión persistente (TA > 30% los valores de la fase anhepática), asistolia o arritmias que desencadenen inestabilidad hemodinámica, con necesidad de infusión continua de vasopresores. Aparición de fibrinólisis prolongada (más de 30 minutos) o recurrente (reaparición de fibrinólisis 30 minutos después de que haya sido resuelta). Se grafica el total de pacientes y según el tipo de donante. Se puede ver que los pacientes tratados con ALA presentan menos SPR que los pacientes no tratado. Este fenómeno es mucho más evidente cuando se diferencian los grupos según el tipo de donante, observándose una clara diferencia en los pacientes que reciben órganos de donantes con criterio extendidos perfundidos con ALA vs los controles (Chi square test $p = 0.032$).

Con respecto a la fig.2, se realizó qPCR de biopsias de pacientes trasplantados hepáticos del grupo RC (control) y RT (tratado). En el gráfico se muestra la expresión relativa de ARNm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en las biopsias del grupo de pacientes RT vs las biopsias del grupo RC. Los datos se representan como la media \pm SD* $p < 0,05$. Prueba de Mann-Whitney. Se observa que los niveles de los transcritos de Birc2, Sestrin2, Ikb α , HIF-1 α , GATA3, CCR1, IL-6 e IL-8 fueron

similares en ambos grupos de pacientes. También se observaron niveles mayores de SLPI en las biopsias de los pacientes tratados, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, los niveles de transcripto de PHD1 y 2 y REG3a/PAP fueron significativamente menores en el grupo tratado (RT) comparado con los del grupo RC, indicando que la perfusión del órgano con ALA, protege al mismo de la hipoxia sufrida durante el procedimiento quirúrgico.

Con respecto a la fig.3, se obtiene plasma previo al trasplante, durante la reperfusión y en los días 1, 2, 3 y 7 días post-trasplante y se realiza un ELISA sándwich. En los gráficos se muestra que los niveles plasmáticos de PAP en el grupo RC fueron mayores con respecto a los encontrados en el grupo RT, en la reperfusión y en el día 1 post-trasplante, siendo estadísticamente significativo únicamente en el 1er día post-trasplante. Además, los niveles plasmáticos de SLPI (considerada un alarmina con funciones anti-inflamatorias) en los pacientes del grupo RC se elevan a partir del momento del despinzamiento vascular y se mantienen elevados durante los dos primeros días post-trasplante. Este perfil, también se observa para el grupo de pacientes RT, pero el aumento es de mucha menor magnitud; de tal manera que al comparar los niveles plasmáticos de SLPI en el día 2 post-trasplante del grupo RT vs los del grupo RC, se observan valores significativamente menores. Estos resultados indican que los pacientes tratados con ALA presentan perfiles inflamatorios menores y mucho más estables comparados con los pacientes no tratados.

Este perfil, también se observa para el grupo de pacientes RT, pero el aumento es de mucha menor magnitud; de tal manera que al comparar los niveles plasmáticos de SLPI en el día 2 post-trasplante del grupo RT vs los del grupo RC, se observan valores significativamente menores. Estos resultados indican que los pacientes tratados con ALA presentan perfiles inflamatorios menores y mucho más estables comparados con los pacientes no tratados.

Con respecto a la fig.4, se muestran los resultados clínicos, a corto plazo, obtenidos con los pacientes con trasplante reopancreático simultáneo que recibe un órgano perfundido con ALA y cuyo receptor haya recibido ALA. En el mismo gráfico se puede ver que los pacientes tratados con ALA presentan un menor porcentaje de disfunción renal y pancreatitis, un mayor porcentaje de sobrevida del injerto y de los pacientes evaluados a 3 meses post-trasplante comparado con los pacientes no tratados.

Con respecto a la fig.5, se puede observar que en las biopsias renales de los pacientes del grupo DR (tratamiento de AAL en donantes y receptores) mostraron niveles menores de C3 y TNF- α y niveles mayores de TGF- β comparadas con las del grupo control. Por otra parte, la expresión de HMOX-1 no mostro diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,669$). Al analizar la expresión en páncreas, se pudo observar una alta expresión tanto de C3 ($p= 0,0018$) como de HMOX-1 ($p<0,0001$). A diferencia de lo observado en el tejido renal, donde se veían diferencias significativas en la expresión relativa de TNF- α y TGF- β entre ambos grupos de pacientes, en las biopsias pancreáticas no se observaron diferencias significativas en ninguno de los mediadores mencionados. Estos resultados indican que tanto en riñón como en páncreas se muestran órganos con un perfil predominantemente anti-inflamatorio. Se muestran el cambio de expresión ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) en las biopsias del grupo de pacientes DR vs las biopsias controles. Los datos se representan como la media \pm SD* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Con respecto a la fig.6, los pacientes del grupo DR, fueron tratados con ALA y recibieron un órgano proveniente de un donante cadavérico perfundido con ALA; en tanto los pacientes del grupo R, fueron tratados con ALA 1 hora previa al trasplante. Se representan los datos como la media \pm SD. * $p<0,05$. ANOVA *pos hoc* Dunnett para comparaciones múltiples. Se puede observar que luego de la cirugía, los pacientes que no fueron tratados con ALA (grupo control)

presentaban niveles plasmáticos significativamente mayores de IL-8 ($p < 0,05$), IL-6 ($p < 0,001$) e IL-10 ($p < 0,0001$) con respecto a los valores presentes en la muestra pre-trasplante. En cambio, 12 horas posteriores a la cirugía, el grupo de pacientes tratados con ALA y que recibieron un órgano proveniente de un donante perfundido con ALA (grupo DR), presentaron niveles plasmáticos de IL-8 e IL-6 similares a los detectados en el pre-trasplante y, además, significativamente menores que los niveles detectados en el grupo control. Este efecto del ALA, sobre los niveles de IL-8, no se pudo observar en los pacientes del grupo R. En este mismo grupo de pacientes, los niveles de IL-10 e IL-6 mostraron una tendencia a ser menores a los del grupo control, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Con respecto a las citoquinas IL-12p70 y TNF- α , sus niveles plasmáticos estuvieron por debajo del umbral de detección del ensayo utilizado. Estos resultados confirman que los pacientes tratados con ALA tienen un perfil anti-inflamatorio comparado con el grupo de pacientes que no recibieron ALA.

Con respecto a la fig. 7, los datos se representan como la media \pm SD en (A) y (B). * $p < 0,05$. Prueba de t no pareada en comparación con el tiempo 0 h post-trasplante. En todos los grupos, el nivel plasmático de PAP medido al final de la cirugía (tiempo 0 h post-trasplante) se encontró aumentado en relación a los niveles encontrados en el pre-trasplante. Sin embargo, a las 12 horas del trasplante, los niveles séricos de PAP fueron significativamente menores, comparados con los niveles de las 0 horas, únicamente para los pacientes del grupo DR ($p = 0,039$; Figura 15A), lo cual sugiere un menor grado de agresión en los pacientes tratados con ALA y que recibieron un órgano proveniente de un donante cadavérico perfundido con dicha droga. Otra de las proteínas analizadas en el plasma de los pacientes trasplantados fue la alarmina SLPI. En la Figura se puede observar un patrón de expresión similar al de PAP; es decir, únicamente los pacientes del grupo DR presentaron niveles de SLPI significativamente menores, a las 12 horas de la cirugía, comparado con los niveles hallados a las 0 horas, sugiriendo que ambas proteínas, al ser proteínas

de fase aguda, estarían indicando que el tratamiento con ALA genera un ambiente con menor grado de daño del organismo durante el trasplante.

Con respecto a la fig.8, se muestra (A) niveles del primer día post-trasplante. (B) área bajo la curva de los primeros 5 días post-trasplante y del día 6 al 14. Los datos están representados como la media \pm SD. * $p < 0,05$. Prueba de Kruskal-Wallis con test post hoc Dunn. Se observa que el grupo DR tiene niveles significativamente más bajos de amilasa y lipasa que el grupo control, mientras que el grupo receptor sólo mostró niveles ligeramente inferiores de lipasa comparados con los del grupo control. Con este análisis, también se observó que los pacientes del grupo DR mostraban una leve tendencia a tener los niveles de glucosa, creatinina y urea en plasma, menores que el grupo control. Sin embargo, cuando se realizó el mismo análisis, pero utilizando los valores de los parámetros clínicos obtenidos de las muestras de los días 6 a 14 post-trasplante, no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Estos resultados demuestran que el uso de ALA mejora los parámetros clínicos tempranos de función de los órganos trasplantados. Con estos resultados podemos determinar que el uso del ALA no afectó la función de los injertos, así como tampoco demostró ser un riesgo para la sobrevida del injerto y el paciente. Muy por el contrario, algunos parámetros bioquímicos y génicos indicaron que la administración de ALA podría tener algún efecto beneficioso para el injerto y para el paciente, al menos, a corto plazo.

Con respecto a la fig.9, muestra que los pacientes trasplantados renales que reciben un órgano perfundido con ALA tienen una tendencia a presentar menos porcentaje de DGF (retardo en la función del injerto), pero claramente mostraron requisitos de diálisis más bajos durante las primeras dos semanas después del trasplante y fueron dados de alta del hospital más rápidamente durante el período de hospitalización de los pacientes. Estos datos muestran

los beneficios de la administración de ALA en el período post-trasplante temprano.

6) EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Para el desarrollo de esta invención, se utilizaron tres tipos diferentes de trasplante: i) trasplante simultáneo renopancreático; ii) trasplante hepático; y iii) trasplante renal. En cada uno de ellos, existen similitudes y diferencias particulares que se tuvieron que tener en cuenta dada las diferencias en los procedimientos quirúrgicos de cada órgano. En esta sección se describirá inicialmente la metodología utilizada para cada uno de los protocolos, luego pasaremos a describir los resultados y finalmente se discutirán en conjunto las conclusiones.

✓ **Trasplante simultáneo renopancreático:**

El estudio incluyó 26 pacientes con trasplante simultáneo de riñón-páncreas (SRP). Los pacientes reclutados en dicho estudio fueron 11 varones y 15 mujeres, en un rango de edad 21-57 años. Dado que ambas formas de ALA, intravenosa y oral son aprobadas para mitigar la polineuropatía sensitivomotora diabética en Argentina, todos los pacientes reclutados para el estudio presentaban dicha afección.

Los pacientes incluidos fueron personas entre 18 a 65 años de edad, receptores de trasplante SRP. Todos los pacientes recibieron como terapia de inducción Timoglobulina (1,5 mg / kg durante cinco días) y Solumedrol; y como terapia de mantenimiento una triple inmunosupresión (tacrolimus con niveles de 10-12 ng/ml, prednisona 4 mg/día y micofenolato sódico 1,440 mg/día). Los pacientes fueron aleatoriamente divididos en tres grupos: 1) Control: pacientes que no recibieron tratamiento con ALA; 2) R-ALA: pacientes a los que se les administró una dosis de ALA (600 mg) inmediatamente antes del procedimiento quirúrgico; y 3) DR- ALA: pacientes que además de recibir una dosis de ALA (600 mg) inmediatamente antes del procedimiento quirúrgico, tal como el grupo

anterior, también recibieron órganos provenientes de donantes cadavéricos a los que se les administró ALA (600 mg) en el momento de la procuración. El objetivo de la administración de ALA fue reducir el efecto desfavorable de las EROs que se producen en todo el proceso conocido como IRI, que comienza en el donante y continúa en el receptor. Este diseño experimental de comparar el grupo DR-ALA con el grupo R-ALA tuvo como objeto desentrañar el impacto de EROs que se producen durante las diferentes etapas del proceso de IRI.

El tratamiento del donante cadavérico, llamado preconditionamiento, se realizó justo antes del procedimiento de procuración, por goteo intravenoso (20 min) de 600 mg de ALA diluidos en 250 ml de solución salina al comienzo del proceso de ablación, que tiene una duración total de aproximadamente 90-120 minutos. La elección de la dosis administrada a los donantes se basó en los trabajos de Dunschede *et al* y Muller *et al*, con humanos y roedores, respectivamente[10,11]. Además, esta dosis es la dosis aprobada por nuestras autoridades de regulación locales para tratar la neuropatía diabética. La administración de dicho antioxidante se considera parte del proceso normal de extracción de órganos, y por lo tanto, no fue necesario un consentimiento informado más allá del asociado con la donación de órganos. Los órganos fueron almacenados en frío hasta el trasplante.

Las muestras de sangre para la obtención de plasma y la medición de los mediadores se adquieren al principio de la cirugía, luego del desbloqueo sanguíneo, 12 h después de la cirugía y cada uno o dos días después del trasplante durante al menos 14 días o hasta el alta del paciente. Estas muestras sirvieron, no sólo para la medición de los mediadores inflamatorios, sino también como parte de la determinación rutinaria de analitos para evaluar la función renal y pancreática. Además, biopsias de riñón y páncreas fueron tomadas al final de la cirugía para realizar un estudio de RT-qPCR. Los niveles plasmáticos de IL-8, IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70 se midieron en la

muestra previa a la cirugía y a las 12 h después del trasplante usando el kit "BD™ Cytometric Bead Array" (BD Biosciences, San Jose, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto las muestras como la curva estándar fueron incubadas con estos reactivos y luego se pasaron por un citómetro de flujo FACSCalibur para su detección. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software FCAP Array. Los niveles de SLPI plasmáticos se determinaron utilizando un ELISA sándwich. Para esto se adhirió un anticuerpo monoclonal de ratón anti-SLPI humano (1µg/ml, R&D) a la superficie de placas de 96 pocillos (de alta unión a péptidos) por 18h a 4°C. Luego se bloqueó la placa durante 1h a 37°C con 0,5% seroalbumina bovina (Sigma) y 1% leche baja en grasa en PBS 1X (solución de bloqueo). Posteriormente los pocillos se lavaron con PBS/Tween 20 0,1% y se incorporaron las muestras de plasma y el estándar; estas se conservaron por 1h a 37°C. Una vez cumplido el tiempo de incubación se agregó el segundo anticuerpo policlonal de conejo anti-SLPI humano en solución de bloqueo (1/1000), dejándose 1,5 h a 37°C. Luego, los pocillos se lavaron con PBS/Tween 20 0,1%. Por último, se incubó durante 1 h con el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1/1500, Chemicon) en solución de bloqueo. Se reveló con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Invitrogen), la reacción fue detenida con ácido sulfúrico 1N y la absorbancia leída a 450nm con resta de 630 nm en lector de placas de ELISA (Rayto, China). Reg3/PAP se determinó por ELISA sándwich siguiendo las instrucciones del fabricante (Páncreas PAP, Dynabio, Francia). El kit consta de una placa de 96 pocillos con el anticuerpo de detección anti-Reg3a ya adherido. Sembradas las muestras y la curva estándar, se dejó incubar durante 3 h a temperatura ambiente. Luego se realizaron lavados con PBS/Tween 20 0,1%. Una vez finalizada la incubación, se agregó el anticuerpo anti-Reg3a biotinilado por 30 min a temperatura ambiente. Luego se procedió a lavar y se agregó la avidina-peroxidasa, incubándose 15 min a temperatura ambiente.

Finalmente, se lavó y se agregó la solución de sustrato (TMB), la cual se dejó 10 min, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico. La absorbancia se leyó en

un lector de placas (Rayto, China) a 450 nm con resta de 630 nm. La concentración Reg3a / PAP se midió antes y a las 12 h post-trasplante y se expresó como nanogramos por mililitro (ng / ml). La determinación de transcritos de moléculas en biopsias de pacientes se realizó a través de ensayos de RT-qPCR. Las biopsias fueron mantenidas a -80°C en solución RNA *later* (Ambrion, US) hasta su procesamiento. Fueron procesadas 19 biopsias (11 controles y 8 del grupo DR). Inicialmente se llevó a cabo la purificación de ARNm utilizando el *Mini kit RNeasy* (QUIAGEN). Con las biopsias se realizó un homogenato en seco utilizando nitrógeno líquido. Este se resuspendió en buffer de lisis *RLT Plus* mediante la utilización de agujas de distinto calibre para su mejor degradación. Se realizó una centrifugación de 3 min a 10.000 rpm. Al sobrenadante se lo pasó por una columna *gDNA eliminator* (30 seg a 10.000 rpm). Al eluido se le agregó etanol 70% y se transfirieron 0,7 ml a la columna *RNeasy*. Luego de la centrifugación (15 seg a 10.000 rpm), se descartó el eluido y se lavó la columna con buffer *RW1*. A la columna se le agregó buffer *RPE*, y se lavó dos veces (15 seg y 2 min a 10000 rpm). Se realizó una centrifugación en seco para eliminar todo el buffer posible. Por último, a la columna se le agregó 50 μ l de agua libre de ARN, se centrifugó 1 min a 10.000 rpm y se recuperó el eluido. Se realizó una cuantificación utilizando un equipo Nanodrop, determinándose la pureza analizando la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm. Luego se obtuvo ADNc, mediante la utilización de un kit "RT2 *First Strand*" (QUIAGEN). Para esto se centrifugó 15 seg los 50 μ l obtenidos de ARN.

Se preparó la mezcla de *gDNA elimination* para cada muestra a la que se le agregó 700ng de ARN llegando a un volumen final de 10 μ l. Se centrifugó e incubó a 42°C por 5 min, inmediatamente se pasó a hielo y se dejó 1 min. Se preparó el *RT Cocktail* (según protocolo). A la mezcla de *gDNA elimination* se le agregó 10 μ l del *RT Cocktail*, se incubó durante 15 min a 42°C, y se detuvo la reacción calentando a 95°C por 5 min. Por último, se agregaron 91 μ l de agua destilada.

Para la cuantificación de los niveles de transcritos, el kit utilizado fue el de *SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal* (Invitrogen). Se preparó una Master mix para cada gen, con SYBR Green, ROX *reference*, cebador 5', cebador 3' y agua ultra pura. A 22,5 μ l de cada master mix se le agregó 2,5 μ l de cada muestra. El instrumento utilizado para qPCR fue un *Corbett Research Rotor-Gene 6000* (QIAGEN, Valencia, CA). El programa de ciclado utilizado fue: 5min a 50°C; 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 20 segundos a 72°C. La especificidad de los cebadores se chequeó con gel de agarosa post-amplificación y por curva de fusión.

El análisis de datos se basó en el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ con la normalización de los datos en bruto en relación a los niveles de expresión del gen control, en este caso GAPDH. Los cebadores de cada gen fueron diseñados y evaluados por nuestro grupo de investigación.

Los pacientes trasplantados fueron evaluados para determinar la función renal y pancreática, definiéndose a la disfunción renal como una disminución de la creatinina menor al 70% de la creatinina basal al séptimo día post-trasplante o la necesidad de hemodiálisis durante la primera semana. La pancreatitis clínica se definió como un estado clínico de distensión abdominal, dolor abdominal, hinchazón del injerto y la necesidad de descanso del páncreas con nutrición parenteral total. Este diagnóstico fue realizado de forma independiente de este estudio por los médicos que estaban a cargo del paciente y se registró en la base de datos del paciente. También se evaluó la supervivencia tanto del injerto como del paciente a los 3 meses post-trasplante para determinar el impacto de estos primeros eventos en la evolución del trasplante.

✓ **Trasplante Hepático:**

Se trata de un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para evaluar el uso del ácido α -lipoico en el daño por isquemia-reperfusión en trasplante hepático. Se reclutaron 23 pacientes. Los criterios de inclusión fueron, que los pacientes sean mayores de 18 años y que reciban un trasplante hepático independientemente de su etiología; en tanto que los criterios de exclusión, fueron pacientes menores de 18 años o con hígados reducidos (Donante vivo relacionado, Split). De los 23 pacientes enrolados doce eran del sexo masculino y once femenino. La edad media de los pacientes fue de $60,9 \pm 6,8$ años. La etiología de la cirrosis fue infección por hepatitis C asociado a hepatocarcinoma en 10 (44%) pacientes, alcohol en 5 (20%) y otras causas en 7 (30%) pacientes.

Con respecto a las características de los donantes: 11 de los 23 (48%) no eran donantes óptimos y presentaban criterios de “donantes con criterio expandido” [donante corazón parado, pacientes > 65 años, sodio sérico >155 mEq/L, macroesteatosis > 30%, prolongado período de isquemia fría (>16 horas), prolongada isquemia caliente (>90 minutos)].

La mediana del valor de MELD (que es un índice pronóstico utilizado para valorar la gravedad de la insuficiencia hepática) de la población fue de 24 puntos y no hubo diferencias entre los dos grupos

Los pacientes se dividieron en dos grupos: Control y Tratado. Del total de pacientes incluidos, 13 pertenecieron al grupo tratado (tratados con α -lipoico) y 10 al grupo control. La administración de la droga o placebo se realizó de la siguiente forma según el grupo:

- **Rama Tratada:** A los donantes, antes del inicio de la isquemia fría, se les administró una infusión de ALA (600 mg en 50 ml de NaCl durante 5 minutos) por la vena porta con el objetivo de administrarlo directamente

al injerto. Posteriormente, una vez realizado el trasplante y previo a la reperfusión, se administró la infusión de ALA en el receptor, por la vena porta. Luego, se procedió al despinzamiento y a la reperfusión.

- **Rama Control:** en lugar de ALA, tanto los donantes como receptores recibieron un mismo volumen de solución fisiológica que el grupo tratado.

Es propicio aclarar que todos los pacientes recibieron la misma terapia de inducción y mantenimiento. El tratamiento de inducción consistió en corticoides durante la cirugía y Basiliximab en la terapia intensiva, repitiéndose la dosis de Basiliximab a los 4 días. La terapia de mantenimiento consistió en: esteroides (meprednisona) en dosis decrecientes, Tacrolimus (Prograf) y Mofetil Micofenolato.

Una vez realizado el trasplante, se prestó especial atención al desarrollo de síndrome post-reperfusión severo, el cual se definió según los siguientes criterios:

Inestabilidad hemodinámica con hipotensión persistente (tensión arterial > 30% los valores de la fase anhepática), asistolia o arritmias que desencadenaron inestabilidad hemodinámica, necesidad de infusión continua de vasopresores. Aparición de fibrinólisis prolongada (más de 30 minutos) o recurrente (reaparición de fibrinólisis 30 minutos después de que haya sido resuelta). El ARN total se aisló a partir de 10 biopsias (5 controles y 5 del grupo tratado) utilizando el Mini kit RNeasy (QUIAGEN), descrito previamente. La cuantificación y pureza del mismo se determinaron mediante la utilización del equipo Nanodrop. La retrotranscripción del ADNc fue realizada a partir de 1 µg ARN total utilizando el kit "RT2 First strand" (QUIAGEN), descrito previamente.

La amplificación y detección de ADNc en la PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando el reactivo *GoTaq® qPCR Master Mix*, en un formato de 96 pocillos en un equipo *Stratagene Mx 3000P*. El programa de ciclado fue: 95°C por 2 min, 40 ciclos a 95°C de 15 segundos y a 60°C 45 segundos. Por último, un ciclo de 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 95 °C. Los cebadores utilizados fueron diseñados y chequeados por el grupo de investigación. La especificidad fue evaluada mediante curva de fusión y corrida en gel de agarosa del resultado de la amplificación post-qPCR. El análisis del resultado se llevó a cabo mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, utilizando como gen control el 28S. Se determinaron los niveles Reg3a/PAP y SLPI de la misma manera que se hizo para los trasplantes simultáneos renopancreáticos.

✓ **Trasplantes Renales**

En este protocolo ("Uso del ácido α -lipoico en trasplante renal") se reclutaron 22 pacientes. De los 22 pacientes reclutados, 8 pertenecieron al grupo control y 14 pacientes correspondieron al grupo tratado (tratamiento con ALA). En la rama activa (grupo tratado) la administración de ALA se realizó a través de una infusión de 12 ampollas de 50 mg de ALA (600 mg) diluido en 100 ml solución fisiológica que se pasaron durante 30 minutos, junto con la infusión de 1 ampolla de vitamina B (Bagó B1 B6 B12 o Becozym) endovenosa, en el quirófano previo al procedimiento quirúrgico del trasplante renal. Además, el riñón a trasplantar fue perfundido con una solución de Wisconsin conteniendo 600 mg de ALA (diluidos en 500 ml de solución fisiológico) entre 30-60 minutos previo al trasplante. Los pacientes del grupo control sólo recibieron 1 ampolla de vitamina B (Bagó B1 B6 B12 o Becozym) endovenosa previo al procedimiento quirúrgico del trasplante renal. Con respecto al tratamiento de inducción, los pacientes recibieron ATG + MMF + Corticoides.

✓ **Evidencias del efecto**

Como mencionamos previamente, los pacientes trasplantados pueden sufrir un retraso en el funcionamiento del órgano, siendo esta una de las complicaciones

más frecuentes en el post-trasplante. Teniendo en cuenta que esta falta de funcionalidad está directamente relacionada con el proceso de daño por isquemia reperfusión y siendo las especies reactivas del oxígeno uno de los principales factores involucrados en la producción del daño, evaluamos la administración del anti-oxidante ALA (ácido alfa-lipoico) como una manera de reducir el efecto deletéreo de los mismos sobre el órgano y en última instancia en el resultado a corto plazo del trasplante. Para esta parte del proyecto, se implementaron tres protocolos. En el primer protocolo exploratorio, se estudió el efecto del ALA en pacientes que fueron sometidos a trasplantes renopancreáticos. El 2do y 3er protocolo se evaluó el efecto de ALA en trasplantes hepáticos y renales, respectivamente.

✓ **Trasplantes renopancreáticos**

Para este estudio se consideraron tres grupos: i) grupo control (C): fueron aquellos pacientes (n = 11) que no recibieron ALA previo o durante el procedimiento quirúrgico; ii) grupo de receptores tratados (grupo R): fueron aquellos pacientes (n = 8) a los que se les administró ALA una hora previa a la cirugía (la administración se realizó en la misma sala de cirugía); iii) grupo de receptores y donantes tratados (grupo DR): en este caso, se administró ALA a los receptores de la misma manera que en el grupo anterior, pero además recibieron un órgano proveniente de un donante cadavérico que había sido perfundido con ALA, 30 minutos previo al acto de ablación (n=7). De todos estos grupos, se obtuvieron plasma en diferentes momentos del acto quirúrgico para hacer las determinaciones bioquímicas, así como también se obtuvieron biopsias del grupo control y del grupo DR inmediatamente posterior a la reperfusión. Para evitar la injuria de los riñones, consideramos innecesario realizar biopsias en el grupo R, ya que era poco probable que se produjeran cambios en los niveles de transcritos entre el grupo control y el grupo R, teniendo en cuenta que las biopsias se tomaron inmediatamente luego del despinzamiento arterial.

Se realizó RT-qPCR para determinar la expresión de ARNm de mediadores inflamatorios involucrados en el daño por isquemia-reperfusión en las biopsias renales y pancreáticas del grupo C y DR. Particularmente se analizó los niveles de transcripto de C3, TNF- α , TGF- β , HMOX-1. En la Figura 5 se puede observar que las biopsias renales de los pacientes del grupo DR mostraron niveles menores de C3 y TNF- α y niveles mayores de TGF- β comparadas con las del grupo control. Por otra parte, la expresión de HMOX-1 no mostro diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0,669$). Al analizar la expresión en páncreas, se pudo observar una alta expresión tanto de C3 ($p=0,0018$) como de HMOX-1 ($p<0,0001$). A diferencia de lo observado en el tejido renal, donde se veían diferencias significativas en la expresión relativa de TNF- α y TGF- β entre ambos grupos de pacientes, en las biopsias pancreáticas no se observaron diferencias significativas en ninguno de los mediadores mencionados (Figura 5).

A continuación, se midieron los niveles plasmáticos de las citoquinas IL-12p70, TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-10 en el pre-trasplante y 12 h post-trasplante. En la Figura 6 se observa que luego de la cirugía, los pacientes que no fueron tratados con ALA (grupo control) presentaban niveles plasmáticos significativamente mayores de IL-8 ($p<0,05$), IL-6 ($p<0,001$) e IL-10 ($p<0,0001$) con respecto a los valores presentes en la muestra pre-trasplante. En cambio, 12 horas posteriores a la cirugía, el grupo de pacientes tratados con ALA y que recibieron un órgano proveniente de un donante perfundido con ALA (grupo DR), presentaron niveles plasmáticos de IL-8 e IL-6 similares a los detectados en el pre-trasplante y, además, significativamente menores que los niveles detectados en el grupo control. Este efecto del ALA, sobre los niveles de IL-8, no se pudo observar en los pacientes del grupo R. En este mismo grupo de pacientes, los niveles de IL-10 e IL-6 mostraron una tendencia a ser menores a los del grupo control, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 6). Con respecto a las citoquinas IL-12p70 y TNF- α , sus

niveles plasmáticos estuvieron por debajo del umbral de detección del ensayo utilizado.

El acto quirúrgico representa un proceso traumático, provocando un aumento en las proteínas de fase aguda. Entre las proteínas de fase aguda, y para el caso de los trasplantes renopancreáticos, se destaca una proteína denominada Reg3/PAP, cuya expresión aumenta más de 200 veces durante la pancreatitis. Por esta razón, decidimos determinar los niveles plasmáticos de esta proteína secretoria en el plasma de los pacientes tratados con ALA. En todos los grupos, el nivel plasmático de PAP medido al final de la cirugía (tiempo 0 h post-trasplante) se encontró aumentado en relación a los niveles encontrados en el pre-trasplante (Figura 7A). Sin embargo, a las 12 horas del trasplante, los niveles plasmáticos de PAP fueron significativamente menores, comparados con los niveles de las 0 horas, únicamente para los pacientes del grupo DR ($p=0,039$; Figura 7A), lo cual sugiere un menor grado de agresión en los pacientes tratados con AAL y que recibieron un órgano proveniente de un donante cadavérico perfundido con dicha droga. Otra de las proteínas analizadas en el plasma de los pacientes trasplantados fue la alarmina SLPI. En la Figura 7B se puede observar un patrón de expresión similar al de PAP; es decir, únicamente los pacientes del grupo DR presentaron niveles de SLPI significativamente menores, a las 12 horas de la cirugía, comparado con los niveles hallados a las 0 horas (Figura 7B). Ambas proteínas, al ser proteínas de fase aguda, estarían indicando que la administración de ALA genera un menor grado de daño o insulto del organismo durante el trasplante. Estos resultados nos indican que la perfusión de ALA a los donantes, tiene un efecto beneficioso, ya que transforma un injerto con alto potencial inductor de mediadores inflamatorios en órganos con menor potencial pro-inflamatorio.

Para determinar la importancia clínica del perfil inflamatorio observado en los grupos de pacientes tratados con ALA, examinamos parámetros bioquímicos vinculados a la función de los injertos pancreáticos (amilasa, lipasa y glucosa) y

renales (creatinina y urea). El seguimiento se realizó en un período de tiempo de 14 días posterior a la cirugía. En la Figura 8, se muestra que el grupo DR tenía niveles significativamente más bajos de amilasa y lipasa que el grupo control, mientras que el grupo receptor sólo mostró niveles ligeramente inferiores de lipasa comparados con los del grupo control, lo que confirma la tendencia encontrada en los valores del primer día. Con este análisis, también se observó que los pacientes del grupo DR mostraban una leve tendencia a tener los niveles de glucosa, creatinina y urea en plasma, menores que el grupo control. Sin embargo, cuando se realizó el mismo análisis, pero utilizando los valores de los parámetros clínicos obtenidos de las muestras de los días 6 a 14 post-trasplante, no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

La modificación observada en los parámetros génicos y bioquímicos no necesariamente implica una repercusión favorable en la clínica. Es por eso, que el siguiente paso fue estudiar la presencia de retraso de la función del injerto. En estos casos, se decidió evaluar el DGF examinando la presencia de disfunción renal y pancreatitis definiendo a la disfunción renal como una disminución menor al 70% de la creatinina basal a los 7 días post-trasplante y a la pancreatitis como un estado clínico de distensión abdominal, dolor abdominal, hinchazón del injerto y necesidad de alimentación parenteral. Utilizando estos criterios se detectaron 3 pacientes con disfunción renal temprana en el grupo control. En cambio, sólo se detectó un paciente con disfunción renal dentro del grupo R y otro en el grupo DR. Cuando se evaluó la presencia de pancreatitis clínica, se diagnosticaron 3 casos de pancreatitis en el grupo de control, uno en el grupo DR y ninguno en el grupo R (Figura 4). Luego, se realizó un seguimiento clínico a tres meses para evaluar parámetros clínicos más estrictos como son la sobrevida de los injertos y de los pacientes. A pesar que el número de pacientes reclutados y el tiempo transcurrido fueron muy bajos, se pudo observar que hubo una menor tasa de sobrevida del injerto y de los pacientes del grupo control en comparación con los grupos tratados (Figura 4).

Con estos resultados podemos determinar que el uso del ALA no afectó la función de los injertos, así como tampoco demostró ser un riesgo para la sobrevida del injerto y el paciente. Muy por el contrario, algunos parámetros bioquímicos y génicos indicaron que la administración de ALA tienen algún efecto beneficioso para el injerto y para el paciente, al menos, a corto plazo.

✓ **Trasplantes Hepáticos:**

La falta de efectos tóxicos en los pacientes trasplantados renopancreáticos tratados con ALA sumado a los resultados promisorios obtenidos, nos permitió especular sobre la posibilidad de utilizarlo en otros tipos de trasplantes, como es el trasplante hepático, en donde el IRI tiene un impacto importante en la evolución del paciente. En estos casos, a diferencia del protocolo renopancreático, los pacientes fueron divididos de manera aleatoria sólo en dos grupos, una rama control (RC) y una rama de pacientes que recibieron injertos que fueron perfundidos con ALA y que además recibieron una dosis de ALA por la vena porta inmediatamente previo al despinzamiento vascular (rama tratada, RT), evaluándose niveles de transcriptos, mediadores bioquímicos y signos clínicos.

El efecto del tratamiento en la expresión de marcadores vinculados al estrés oxidativo y la inflamación fue estudiado realizando RT-qPCR en biopsias hepáticas. Estas fueron procesadas para el análisis de los siguientes transcriptos: Birc2, Sestrin2, I κ B α , HIF-1 α , IL-8, IL-6, mTOR, Reg3a/PAP, PHD1, PHD2, GATA3, CCR1 y SLPI. En la Figura 2 se observa que los niveles de los transcriptos de Birc2, Sestrin2, I κ B α , HIF-1 α , GATA3, CCR1, IL-6 e IL-8 son similares entre el grupo RC y RT. Por otro lado, se observa que existe un aumento en SLPI, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, en las biopsias de los hígados provenientes de los pacientes del grupo RT comparado con los del grupo RC. Sin embargo, los niveles de transcripto de PHD1 y 2 y REG3a/PAP fueron significativamente menores en el grupo RT

comparado con los del grupo RC (Figura 2), indicando que la perfusión del órgano con ALA, protege al mismo de la hipoxia sufrida durante el procedimiento quirúrgico.

En base a la menor expresión génica de REG3a/PAP en los pacientes trasplantados hepáticos del grupo RT, decidimos analizar los niveles plasmáticos de PAP en ambos grupos. Como se puede observar en la Figura 3, al igual que en las biopsias, los niveles plasmáticos de PAP en el grupo RC fueron mayores con respecto a los encontrados en el grupo RT, en la reperfusión y en el día 1 post-trasplante, siendo estadísticamente significativo únicamente en el 1er día post-trasplante.

Como se mencionó anteriormente, en los pacientes trasplantados renopancreáticos, los niveles de PAP se correlacionaban de manera directa con los valores de SLPI. Por lo tanto, en este caso también se analizaron los niveles plasmáticos de SLPI. En la Figura 3 se puede observar que en los pacientes del grupo RC, los niveles plasmáticos de SLPI se elevan a partir del momento del despinzamiento vascular y se mantienen elevados durante los dos primeros días post-trasplante. Este perfil, también se observa para el grupo de pacientes RT, pero el aumento es de mucha menor magnitud; de tal manera que al comparar los niveles plasmáticos de SLPI en el día 2 post-trasplante del grupo RT vs los del grupo RC, se observan valores significativamente menores. De esta manera, la tendencia observada en las biopsias (mayor nivel de SLPI), no se evidencia a nivel plasmático; muy por el contrario, se repite lo ya observado en pacientes trasplantados renopancreáticos en quienes se ven menores niveles de SLPI en el grupo tratado comparado con el grupo control.

Los pacientes trasplantados del grupo control y tratado fueron evaluados clínicamente, prestando especial atención en la presencia del síndrome de post-reperfusión (SRP).

Como fue mencionado en la introducción, este síndrome es una amenaza latente relacionada con la incorporación del órgano recién injertado a la circulación del receptor. Dicho síndrome se manifiesta inmediatamente después del despinzamiento vascular y se acompaña de manifestaciones hemodinámicas, siendo la manifestación más prominente la caída brusca de la tensión arterial sistémica. También acontecen otras alteraciones químicas y físicas caracterizadas por hiperpotasemia, descenso del calcio sérico ionizado, hiperosmolaridad, acidemia metabólica e hipotermia.

El seguimiento post-trasplante mostró que 6 de los 23 pacientes (26%) presentaron SRP durante la cirugía. De los 6 pacientes que presentaron SRP sólo uno pertenecía al grupo tratado, en tanto que los 5 restantes pertenecían al grupo control (Figura 1). Uno de los pacientes del grupo control y que desarrolló SRP falleció durante la primera semana post-trasplante. La causa del óbito fue carcinomatosis peritoneal detectada durante la cirugía.

El efecto protector de la administración de ALA fue más evidentemente en los pacientes considerados con criterio extendido. En un seguimiento a más largo plazo (1er mes), se observó que 3 pacientes presentaron rechazo agudo, de los cuales 2 pertenecían al grupo RC y sólo uno al grupo RT. Todos estos pacientes habían presentado síndrome de reperfusión. Estos resultados indican, al igual que en los trasplantes renopancreáticos, que la perfusión con ALA de los órganos a ser injertados, presenta un efecto beneficioso para la sobrevivencia del injerto y del paciente. Asimismo, en este protocolo tampoco se detectaron efectos adversos atribuibles a la infusión de ALA.

✓ **Trasplantes Renales**

En vistas de los buenos resultados obtenidos con ALA en los pacientes trasplantados renopancreáticos y hepáticos y teniendo en cuenta que el DGF es uno de los mayores problemas en trasplantes renales, se decidió iniciar otro

protocolo clínico de uso de ALA en trasplante renal. Sin embargo, hubo que introducir variantes al protocolo de administración de ALA, dado que la administración del fármaco a los donantes cadavéricos resultaba dificultosa. Por lo tanto, para este protocolo se decidió administrar ALA al receptor (en el quirófano previo al procedimiento quirúrgico) y perfundir ALA al órgano una hora previa al trasplante.

En este estudio se reclutaron 22 pacientes, los cuales se dividieron en grupo control (n=8) y grupo tratado (n=14). De ambos grupos, se obtuvo plasma en diferentes momentos del acto quirúrgico para hacer las determinaciones bioquímicas, así como también se evaluó el estado clínico de los pacientes. En primer lugar, se realizó el análisis de los niveles de creatinina a lo largo de los días de internación de los pacientes y se obtuvo para cada uno de ellos, el área bajo la curva (AUC) de los niveles de creatinina (independientemente del tratamiento de inducción), pero no se pudo observar diferencia entre los tratados con ALA y los controles. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en los valores de MDRD entre los pacientes de la Rama Control y los de la Rama Activa. Todos los pacientes requirieron sesiones de diálisis durante la primera semana de internación, por lo tanto, se considera que todos los pacientes sufrieron DGF (Figura 9). Sin embargo, cuando se analizaron los requerimientos de diálisis por día de internación, se pudo observar que los pacientes de la Rama Activa requirieron menos días de diálisis comparado con los de la Rama Control ($p= 0,0024$) (Figura 9). Además, claramente se pudo observar que el tiempo de internación de los pacientes que habían recibido ALA, fue estadísticamente menor con respecto al grupo control.

Todos estos resultados sugieren que el ALA podría ser una nueva herramienta terapéutica para evitar o reducir las complicaciones tempranas del trasplante de órganos sólidos y que además podría tener repercusiones positivas a largo plazo.

FUNDAMENTACION DEL USO

La generación de ROS durante el trasplante, avalaron la posibilidad de utilizar un fármaco antioxidante como ALA con el objetivo de evitar o minimizar el retraso en la función del injerto. Sin embargo, la eficacia de las terapias antioxidantes ha sido cuestionada por una serie de estudios en los cuales no se observaban efectos beneficiosos. De hecho, en nuestro protocolo de trasplante renopcreático, el tratamiento del receptor con una única dosis de ALA en el momento de la cirugía (grupo R) no mejoró sustancialmente la mayoría de los parámetros inflamatorios o bioquímicos analizados dentro de las primeras semanas post-trasplante. A pesar de esto, sí se observó una tendencia a la mejoría en algunos parámetros clínicos (como pancreatitis y disfunción renal), incluso tratando sólo a los receptores del injerto. Esto nos hace pensar, que un mejor ajuste de las dosis de ALA y/o del momento de la administración podría mejorar el resultado del trasplante. De hecho, los estudios preclínicos con animales han demostrado mejores resultados con dosis altas de ALA (100 mg/kg) y han demostrado que dosis más bajas (10 mg/kg), como la utilizada en nuestro estudio, son menos efectivas[12].

Del conjunto de los resultados obtenidos con ALA, resultó muy llamativo lo observado en aquellos pacientes que además de recibir ALA en el momento de la cirugía, también recibían un órgano de un donante que había sido previamente tratado (grupo DR). Los resultados positivos, se obtuvieron en los parámetros inflamatorios y funcionales del injerto. De forma tal que la división en tres grupos experimentales, grupo control, grupo DR y grupo R permitió determinar principalmente la importancia del tratamiento al donante, indicando que en el donante cadavérico se está produciendo un fenómeno de activación inflamatoria que impacta de manera desfavorable en el injerto. De hecho, el análisis por RT-qPCR de mediadores en riñones y páncreas derivados de donantes tratados con AAL, demostró que éste favorecía la expresión diferencial de mediadores con un perfil antiinflamatorio o menos inflamatorio. Por ejemplo, en riñón se detectó baja expresión de C3 y alta de TGF- β y en

páncreas una notable expresión de HMOX-1. A su vez se determinó una elevada expresión de C3 en el páncreas en comparación con los órganos derivados de donantes no tratados. En este sentido, es interesante destacar que recientemente se propuso que la clasificación original de C3a se cambiara de un "mediador proinflamatorio" a un "modulador inflamatorio", basado en varias facetas antiinflamatorias encontradas para C3a *in vivo*[13].

Como se nombró previamente, uno de los factores analizados en las biopsias de los donantes tratados, fue HMOX-1. Diversos trabajos han descrito efectos benéficos de esta molécula antioxidante en varios modelos animales de IRI[14]. Llamativamente en el riñón, una alta expresión de HMOX-1 parece estar asociada con un mal pronóstico, cabe destacar que en el estudio de mediadores inflamatorios en pacientes con DGF describimos un aumento de la expresión de dicha molécula, en consonancia con la bibliografía[14,15]. A diferencia del riñón, en el páncreas, la regulación positiva de HMOX-1 puede prevenir la fibrosis al inhibir la proliferación de células estrelladas pancreáticas, de forma tal que el resultado obtenido en dicho órgano sería beneficioso[16]. El efecto global observado en las biopsias del grupo DR comparado con el grupo no tratado indica claramente un efecto beneficioso de AAL en el donante.

El preconditionamiento de los donantes para reducir IRI no es un nuevo concepto[17,18]. En un modelo animal, el tratamiento con esteroides o la administración del ligando soluble de P-selectina al donante con muerte encefálica, aumentó la supervivencia del receptor en comparación con el grupo no tratado[18]. Además, en humanos, el tratamiento con esteroides al donante cadavérico, redujo la expresión de citocinas proinflamatorias[19]. De hecho, en nuestro estudio, el grupo DR tenía una expresión reducida de IL-8 e IL-6, no así el grupo R. Por otra parte, la IL-10, considerada una citoquina antiinflamatoria, no mostró diferencias significativas en ningún grupo tratado. Es importante destacar que la eficacia de AAL en la disminución de los niveles de algunas citoquinas ya se describió durante la circulación extracorpórea[20]. Sin

embargo, creemos que al administrar AAL inmediatamente antes de la ablación, estamos protegiendo al órgano de las EROs producidas durante el proceso de ablación, en lugar de proteger frente a la tormenta de citocinas, que comúnmente comienza más temprano en el donante con muerte encefálica.

Otro de los marcadores analizados para evaluar la eficacia del tratamiento, fue la proteína asociada a pancreatitis (PAP). Esta proteína ha sido detectada en el jugo pancreático posterior al trasplante[21,22] y se describió como un buen marcador sérico para la lesión pancreática[23]. En pacientes que fueron tratados con ALA y a su vez recibieron injertos tratados, los niveles plasmáticos de PAP 12hs post-trasplante fueron menores, que el de los pacientes que recibieron injertos no tratados y fueron tratados con ALA en el momento de la cirugía. Por otro lado, se pudo observar el mismo patrón para la alarmina SLPI. De hecho, se observó una fuerte correlación directa entre PAP y SLPI. Todos estos resultados indican que el tratamiento con ALA afecta los niveles de mediadores inflamatorios plasmáticos, y dicho efecto fue más pronunciado cuando, tanto el donante como el receptor fueron tratados. Sin embargo, ambos grupos de pacientes tratados (R y DR) presentaron una tendencia hacia una disminución en la incidencia de disfunción renal temprana y pancreatitis.

La complejidad de los múltiples mecanismos patológicos que causan disfunción renal y pancreatitis podría explicar la falta de una asociación ideal entre todos los marcadores inflamatorios analizados y el resultado clínico en el grupo R. Esta diferencia en los resultados según el tratamiento, sugieren que, el preconditionamiento del donante con ALA desempeña un papel protector importante, pero insistimos que es probable que sea necesario el ajuste de la dosis para observar resultados más significativos. A su vez, la administración de ALA en los días post-trasplante también podrían ayudar a mejorar los resultados. En general, el ALA es un fármaco bien tolerado que puede tener efectos secundarios menores, en nuestro estudio dichos efectos no han sido detectados.

Estos resultados indican que el uso de un antioxidante puede reducir los marcadores inflamatorios y mejorar algunos parámetros clínicos en trasplante renopancreático humano. De hecho, este estudio preliminar sugiere que el acondicionamiento con ALA puede ser adecuado para disminuir los marcadores inflamatorios durante los primeros días post-trasplante, lo que disminuiría posteriormente la incidencia de disfunción renal temprana y pancreatitis de injerto.

En el trasplante hepático existe una alta morbimortalidad en el período post-trasplante inmediato, con complicaciones severas por IRI. En los protocolos de trasplante hepáticos, los pacientes se dividieron en un grupo control y un grupo tratado (donde el órgano recibía dos veces la administración de ALA, como en el grupo DR del protocolo renopancreático).

Los resultados obtenidos con la utilización de ALA en trasplante hepático, también evidenciaron resultados beneficiosos para los pacientes. Los estudios de los niveles de transcritos de mediadores en biopsias hepáticas, obtenidas luego de la reperfusión, indicaron cambios en la expresión de algunos genes, como por ejemplo disminución de PHD1 y PHD2. Llamativamente, estas enzimas se vinculan con la respuesta a hipoxia.

Estas enzimas modulan post-traduccionalmente la actividad de la subunidad HIF-1 α dado que son las encargadas de hidroxilarlo y de esta forma favorecer su degradación. Ya que la presencia de oxígeno es un requisito para dicha actividad, este proceso se suprime en hipoxia permitiendo que el HIF-1 α escape de la destrucción y permita la activación de la transcripción de genes blanco. Bernhardt W. *et al*, determinaron que el pretratamiento del órgano con un inhibidor de PHD2 mejoraba los resultados a corto y largo plazo después del trasplante alogénico en un modelo animal[24]. A su vez Schneider M. *et al*, observaron que tanto animales *knockout* para PHD1 como aquellos tratados con un shRNA para dicha enzima mostraban estar protegidos contra IRI

hepático[25]. De forma tal, que la disminución de los niveles de transcripto en las biopsias estaría indicando una protección frente a la hipoxia generada por la isquemia. Por otra parte, debemos destacar que los niveles de transcripto de SLPI en el grupo tratado mostraron una tendencia a ser mayores que en el grupo control. No está descrito en la bibliografía que el ALA induzca la expresión de SLPI. Sin embargo, Schneeberger *et al* analizaron la expresión endógena de SLPI en un modelo animal de trasplante cardíaco[26]. Estos investigadores determinaron que el SLPI aumenta en IRI y la falta de expresión del SLPI endógeno se vincula con un peor funcionamiento cardíaco postrasplante. La alta expresión de SLPI detectada, en nuestros estudios, a nivel local en los pacientes tratados con AAL indicaría una mayor protección tisular debido a su actividad antiinflamatoria y antiproteasa. Por el contrario, cuando se realizaron las mediciones de este mediador en plasma se observó que sus niveles eran menores en el grupo tratado en comparación con el grupo control; indicando que los pacientes tratados con ALA presentan un estado de menor inflamación sistémica, y por lo tanto menor nivel plasmático de la alarmina SLPI [27].

Otro de los transcriptos que mostró diferencia en sus niveles según el tratamiento fue Reg3a/PAP. En páncreas se sabe que aumenta su expresión frente a inflamación, sin embargo, sobre hígado no hay mucho descrito. Esta proteína en tejido hepático normal no suele ser detectada, pero en pacientes con cirrosis sus niveles séricos se encuentran elevados[27]. En este estudio, se determinó que las biopsias hepáticas de pacientes tratados con ALA tenían menores niveles de transcripto Reg3a/PAP comparado con los pacientes del grupo control. Por esta razón creemos que al ser una proteína que aumenta en inflamación, su expresión se induce en trasplante, y dicha disminución del transcripto entre el grupo tratado y control, estaría demostrando un menor nivel de inflamación en el tejido hepático de los pacientes trasplantados. Es interesante remarcar que estos resultados se reflejan también en los niveles plasmáticos. Los pacientes del grupo control mostraron un aumento en los

niveles de PAP al día 1 post-trasplante, a diferencia de los pacientes tratados con el antioxidante, que mantuvieron sus valores constantes.

Desde el punto de vista clínico, en el trasplante hepático se puede presentar una complicación temprana con graves implicancias denominado síndrome post-reperfusión (SPR). La incidencia de este síndrome varía en gran medida entre diferentes estudios, en los que va desde un 12%[28,29] a un 77%[30]. Esta variabilidad, podría resultar de la población estudiada, del manejo terapéutico, e incluso a la definición establecida para el SPR en cada centro. A pesar de esta variabilidad, es una complicación que aumenta la mortalidad perioperatoria para la cual no existe un tratamiento eficaz de prevención[31,32]. Por esta razón es importante destacar la gran diferencia de incidencia del SPR en nuestro estudio, entre el grupo tratado versus el grupo control. De esta manera, y al igual que en trasplante renopancreático, la administración de ALA parece tener un efecto beneficioso, al menos en el período post-trasplante inmediato.

Como fue mencionado previamente, el riñón también sufre consecuencias en el período post-trasplante inmediato que se caracteriza con el denominado DGF. Por lo tanto, era lógico comenzar con otro ensayo clínico en trasplante renal para observar el efecto de la administración de ALA. Sin embargo, para este protocolo no fue posible administrar ALA al donante, pero sí se pudo perfundir la droga al órgano a trasplantar en el quirófano, previo al trasplante. Los resultados preliminares hasta aquí obtenidos con ALA en trasplante renal, no pudieron demostrar un efecto benéfico sobre la aparición del DGF, pero se pudo advertir, que los pacientes de la Rama Control necesitaron más sesiones de diálisis, para mantener la homeostasis, en comparación con la Rama Activa. Lo cual es interesante, no sólo por el costo de la diálisis sino también por la calidad de vida de los pacientes.

Los resultados obtenidos del estudio, dan cuenta que la utilización de ALA reduce mediadores de la inflamación. Estos hallazgos, además, reforzaron los conocimientos que se tenían sobre las consecuencias deletéreas de las EROs, como uno de los principales mecanismos responsables de la lesión del injerto en el trasplante de órganos sólidos.

REIVINDICACIONES

1) UN COMPUESTO PARA OPTIMIZAR EL TRASPLANTE DE LOS ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y REDUCIR LA DISFUNCIÓN DE LOS MISMOS, especialmente en las etapas de ablación, trasplante y post-trasplante con el fin de optimizar el tiempo de recuperación funcional del injerto y los parámetros clínicos de los pacientes a corto plazo sometidos preferentemente a trasplantes renopancreáticos, renales y hepáticos **caracterizado porque** comprende una sustancia activa de ácido alfa lipoico (ALA).

2) COMPUESTO, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el ácido alfa lipoico (ALA) está comprendido en cantidades entre 400 a 1000 mg.

3) COMPUESTO, según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el ácido alfa lipoico (ALA) está comprendido preferentemente en cantidades entre 500 a 600 mg.

4) COMPUESTO, según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el ácido alfa lipoico (ALA) es de 600 mg.

5) PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR EL TRASPLANTE DE LOS ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y REDUCIR LA DISFUNCIÓN DE LOS MISMOS” utilizando el compuesto de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:

a) Administrar al donante previo o durante el procedimiento de ablación, particularmente en el quirófano previo al procedimiento quirúrgico del trasplante, una sustancia activa de ácido alfa lipoico (ALA) comprendido en

cantidades entre 400 a 1000 mg, preferentemente 600 mg diluido en 100 ml solución fisiológica que se pasan durante 30 minutos, junto con la infusión de 1 ampolla de vitamina B (Bagó B1 B6 B12 o Becozym) endovenosa;

b) Introducir lenta y continuada al órgano a trasplantar una solución de la Universidad de Wisconsin(UW), HTK (solución de Bretschneider o Custodiol) o Eurocollins (EC) conteniendo una sustancia activa de ácido alfa lipoico (ALA) comprendido en cantidades entre 400 a 1000 mg, preferentemente 600 mg diluidos en 500 ml de solución fisiológico entre 30-60 minutos previo al trasplante; y

c) Incorporar al receptor, una sustancia activa de ácido alfa lipoico (ALA) comprendido en cantidades entre 400 a 1000 mg, preferentemente 600 mg diluido en 100 ml solución fisiológica, durante el acto quirúrgico, previo al implante y una hora después de la cirugía y en los dos días posteriores como medio de nivelación de los parámetros bioquímicos.

6) PROCEDIMIENTO PARA OPTIMIZAR EL TRASPLANTE DE LOS ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y REDUCIR LA DISFUNCIÓN DE LOS MISMOS, según la reiv.5, **caracterizado porque** se introduce lenta y continuamente la sustancia activa de ácido alfa lipoico ALA, únicamente al órgano y/o al receptor, de acuerdo a las etapas b y/o c), preferentemente en aquellos donantes que tengan dificultad en perfundir dicha sustancia.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS
recibidas por la oficina Internacional el 12 de junio de 2019 (12.06.19)

1) Uso de ácido alfa lipoico (ALA) en el trasplante RENAL Y/O RENOPANCREATICO DE LOS ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y REDUCIR LA DISFUNCIÓN DE LOS MISMOS, especialmente en las etapas de ablación, trasplante y post-trasplante con el fin de optimizar el tiempo de recuperación funcional del injerto y los parámetros clínicos de los pacientes a corto plazo sometidos **caracterizado** porque comprende ALA está comprendido en cantidades entre 400 a 1000 mg.

2) Uso de ácido alfa lipoico (ALA) en el trasplante RENAL Y/O RENOPANCREATICO, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el ácido alfa lipoico (ALA) está comprendido preferentemente en cantidades entre 500 a 600 mg.

3) Uso de ácido alfa lipoico (ALA) en el trasplante RENAL Y/O RENOPANCREATICO, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el ácido alfa lipoico (ALA) es de 600 mg.

4) Uso de ácido alfa lipoico (ALA) en el trasplante RENAL Y/O RENOPANCREATICO, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque puede ser utilizado en trasplantes simultáneos renopancreáticos.

5) Uso de ácido alfa lipoico (ALA) en el trasplante RENAL Y/O RENOPANCREATICO, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque puede ser utilizado en trasplantes renales.

6) Uso de ácido alfa lipoico (ALA) en el trasplante RENAL Y/O RENOPANCREATICO, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque puede ser utilizado en trasplantes renopancreáticos.

7) Uso de ácido alfa lipoico (ALA) en el trasplante RENAL Y/O RENOPANCREATICO, según la reivindicación 2, **caracterizado** para ser administrado en el donante cadaverico del trasplante de órganos sólidos.

8) Uso de ácido alfa lipoico (ALA) en el trasplante RENAL Y/O RENOPANCREATICO, según la reivindicación 2, **caracterizado** para ser administrado en el receptor del trasplante de órganos sólidos.

FIGURA 1

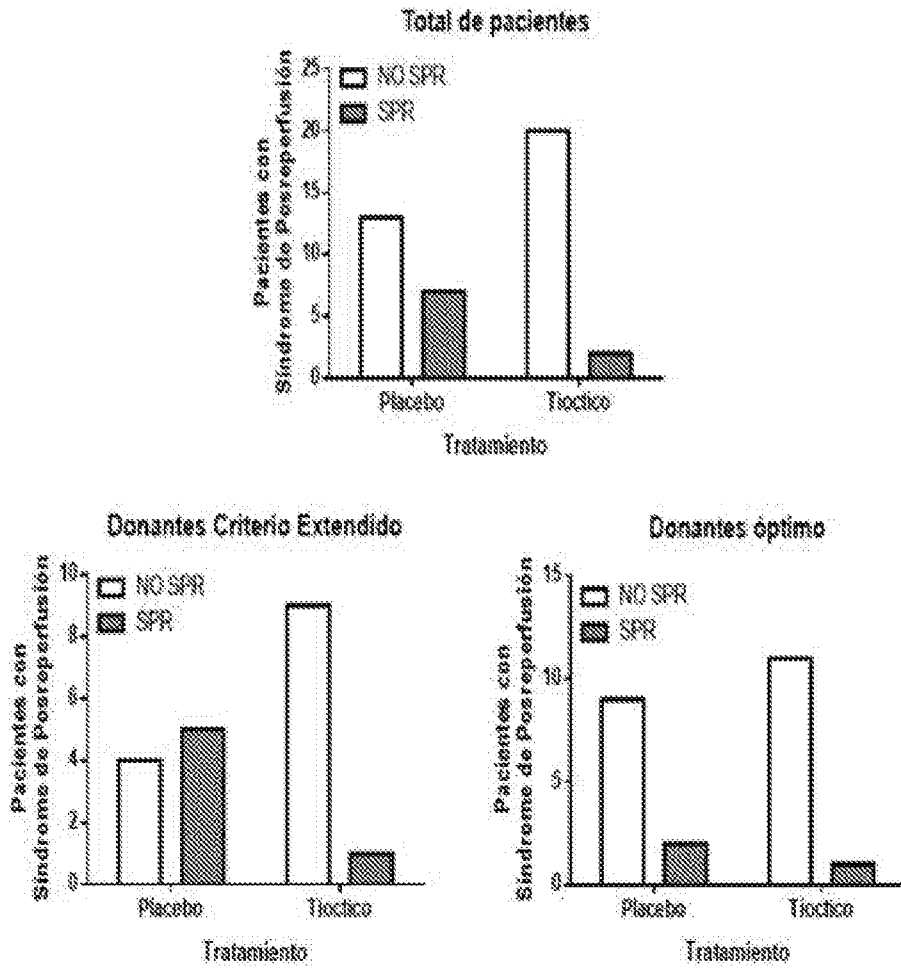


FIGURA 2

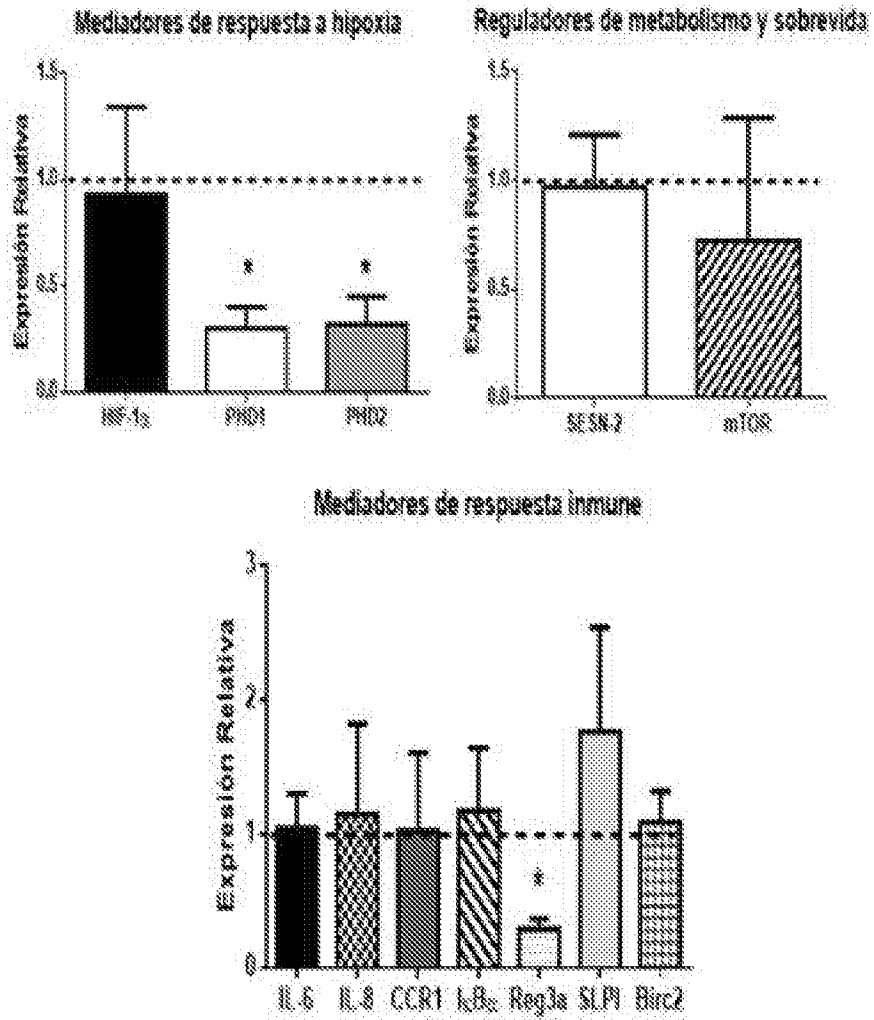


FIGURA 3

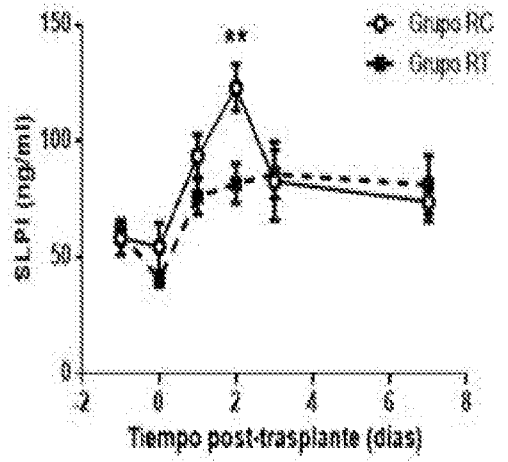
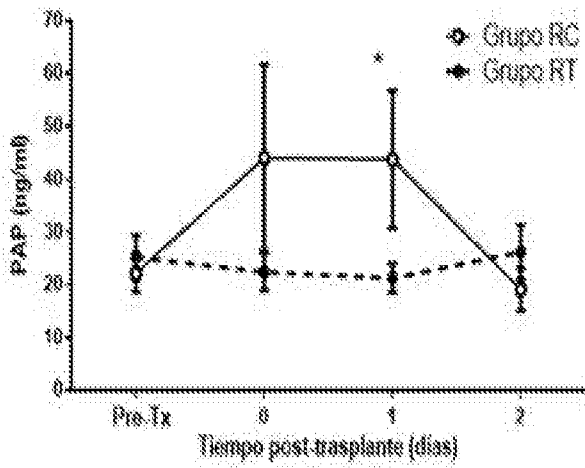


FIGURA 4

		CONTROL	DR	R
Disfunción del órgano (%)	Disfunción renal	27,3	14,3	12,5
	Pancreatitis	27,3	14,3	0
Tasa de sobrevida del injerto a 3 meses (%)	Riñón	91	100	100
	Páncreas	91	100	100
Tasa de supervivencia a los 3 meses (%)		91	100	100

FIGURA 5

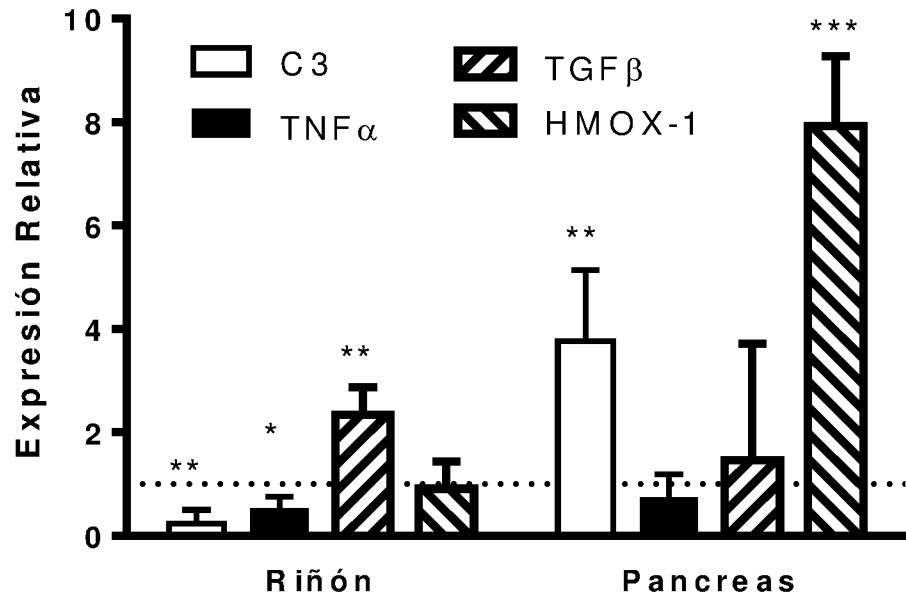


FIGURA 6

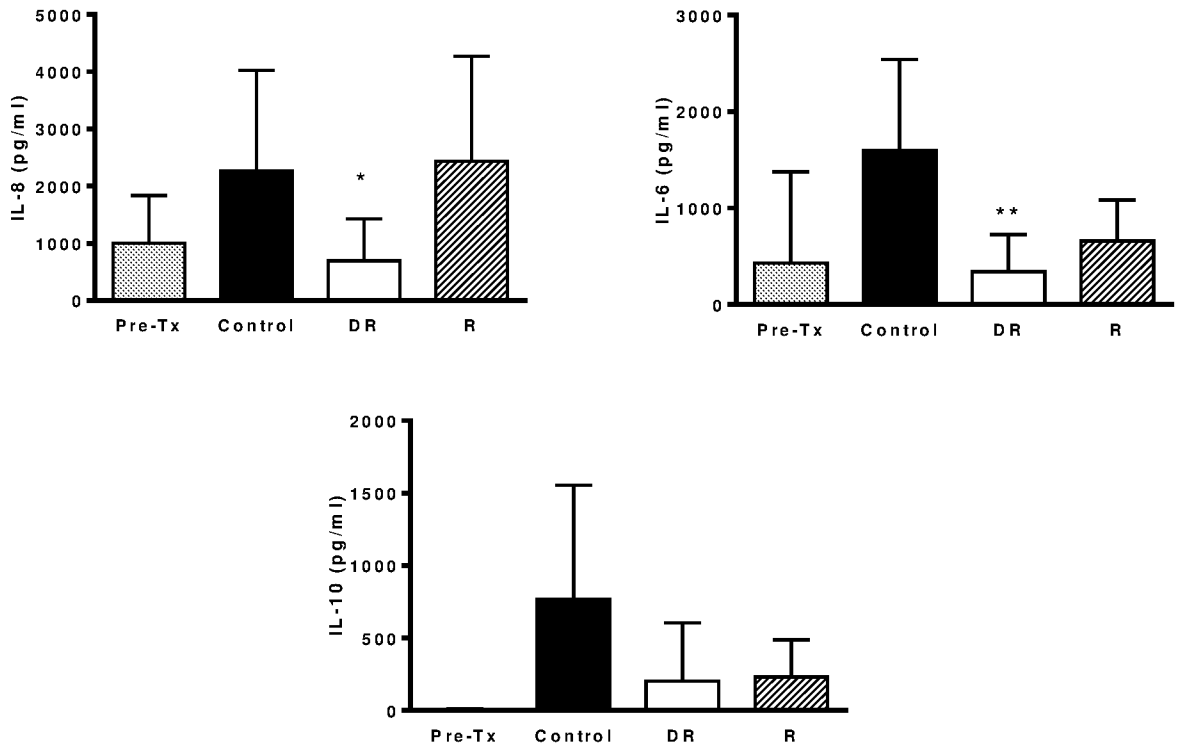


FIGURA 7

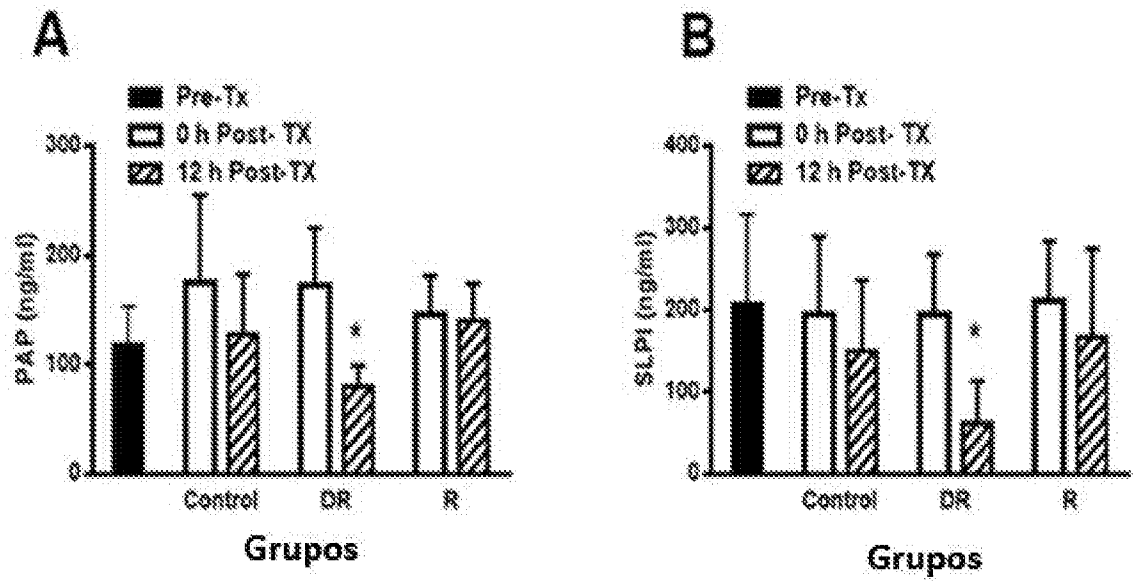


FIGURA 8

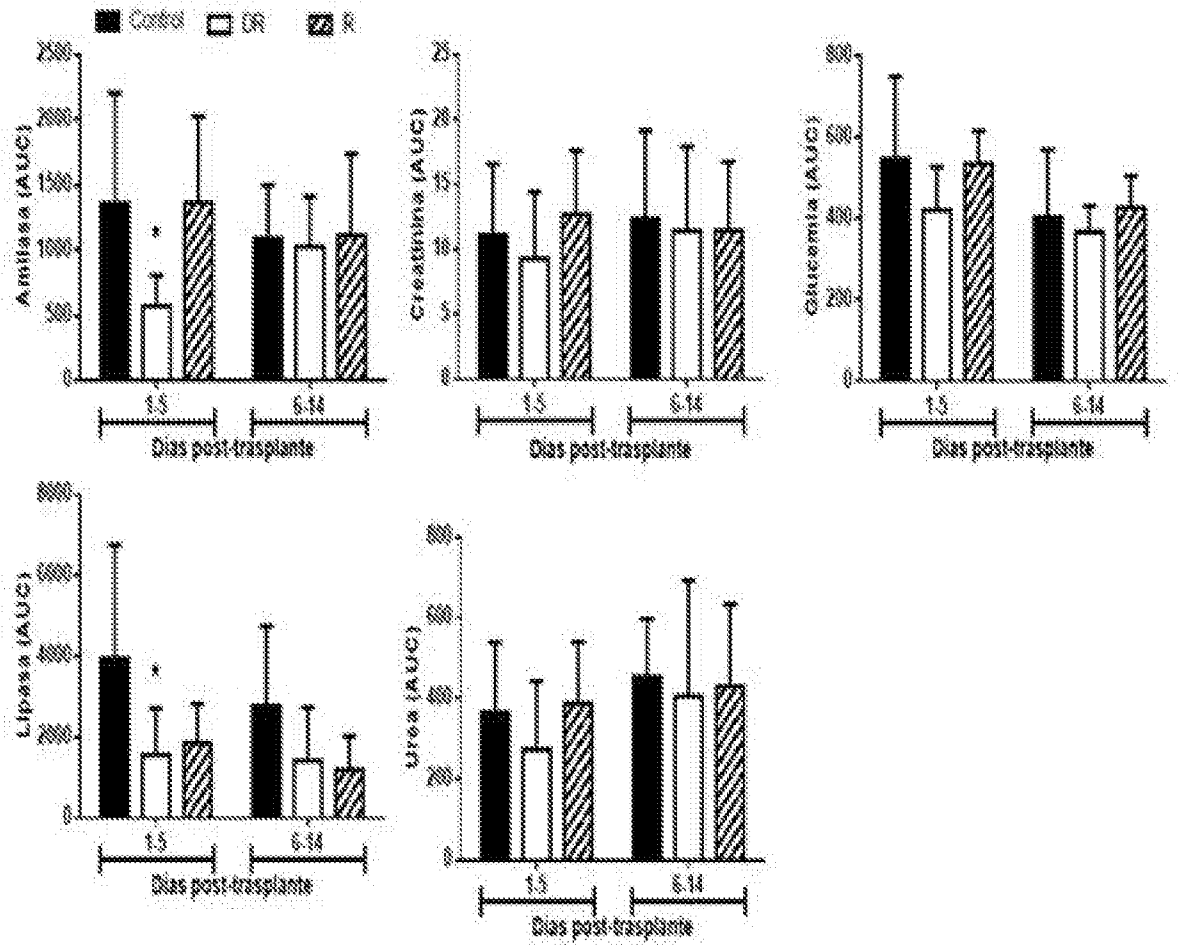
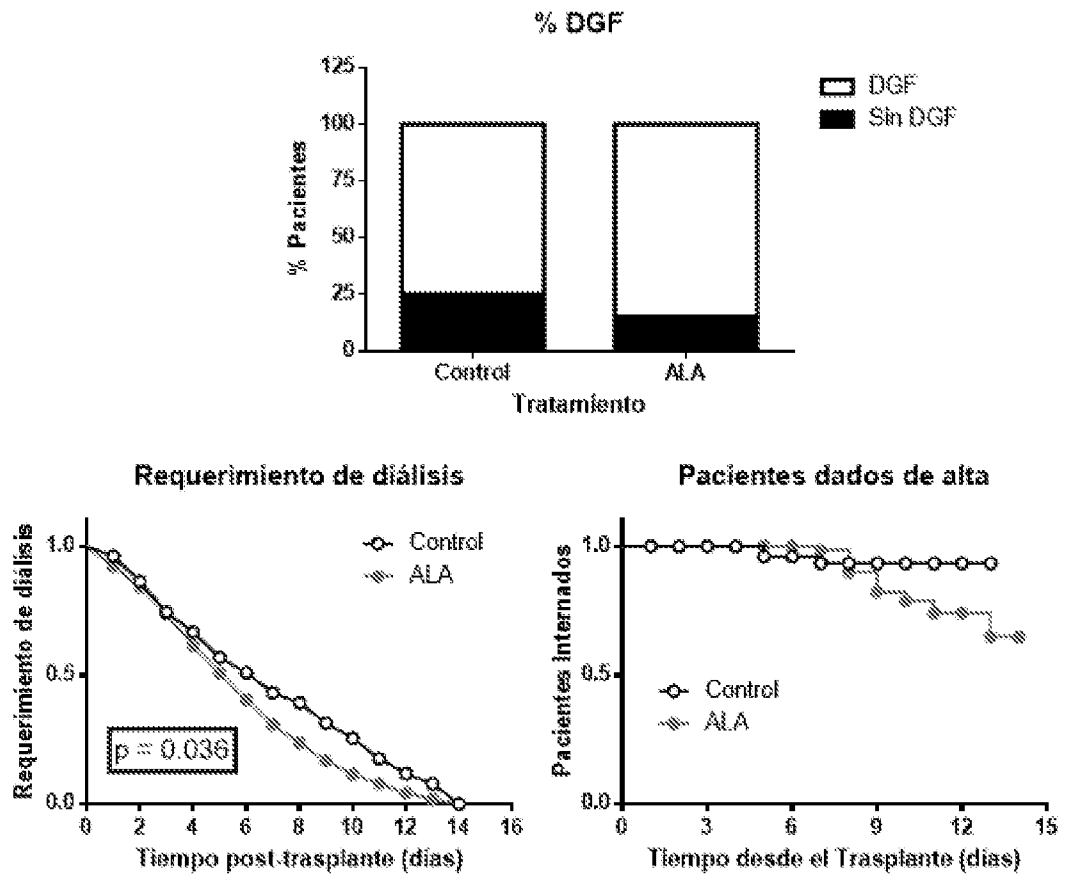


FIGURA 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2018/050009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
CIP: A61K 31/20, 31/385, 9/0019; A61P41/00 (2018.01)
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
CIP: A61K 31/20, 31/385, 9/0019; A61P41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
INAPI, GOOGLE PATENTS, ESP@CENET, STN, BEIC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DÜNSCHEDE, F. et al. Reduction of ischemia reperfusion injury after liver resection and hepatic inflow occlusion by alpha-lipoic acid in humans. World Journal of Gastroenterology. Nov. 14, 2006;12(42):6812-6817 doi: 10.3748/wjg.v12.i42.6812 [The whole document]	1-4
X	DÜNSCHEDE F. et al. Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by alpha-lipoic acid. Shock. 2007; 27(6): 644-651 DOI: 10.1097/01.shk.0000248582.25647.ee [The whole document] [The whole document]	1-4
X	SEHIRLI Ö. et al. alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2008; 35: 249-255. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04810.x [The whole document]	1-4

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&” document member of the same patent family
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 08.06.2018	Date of mailing of the international search report 26.07.2018
Name and mailing address of the ISA/ INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago-Chile Facsimile No.	Authorized officer CARTIER-UGARTE, Denise Telephone No. 56-2-28870551

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050009

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DÜNSCHEDE F. Protective effects of ischemic preconditioning and application of lipoic acid prior to 90 min of hepatic ischemia in a rat model. World Journal of Gastroenterology. Jul. 21, 2007;13(27):3692-3698 doi: 10.3748/wjg.v13.i27.3692 [The whole document]	1-4
A	HE L. et al. Alpha lipoic acid protects heart against myocardial ischemia-reperfusion injury through a mechanism involving aldehyde dehydrogenase 2 activation. European Journal of Pharmacology 2012; 678: 32-38 doi:10.1016/j.ejphar.2011.12.042 [The whole document]	
A	EP0812590A3 (ASTA Medica Aktiengesellschaft) 09-06-1999 [Description]	
A	CA2446673 (SERUMWERK BERNBURG AG) 05-12-2002 [Description]	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050009

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **5 and 6**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
Estas cláusulas se refieren a una materia que esta Administración considera afectada por las Reglas PCT 39.1(iv) y 67.1(iv), concernientes a métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal, por cirugía o terapia, como también métodos de diagnóstico. En conclusión, ninguna opinión experta será establecida para novedad, nivel inventivo y aplicación industrial de dichas cláusulas {Art.17(2)(a)(b)}
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CL2018/050009

EP0812590 A3	09-06-1999	DE4035442 (A1)	16-05-1991
		DE59010810 (D1)	16-04-1998
		US5728735 (A)	17-03-1998
		US6271254 (B1)	07-08-2001
		EP0427247 (B1)	11-03-1998
		AT163849 (T)	15-03-1998
		CA2029596 (A1)	10-05-1991
		DK0427247 (T3)	28-09-1998
		ES2115589 (T3)	01-07-1998
		IE904034 (A1)	22-05-1991
		JPH03169813 (A)	23-07-1991
		PT95826 (A)	13-09-1991
		CA2446673	05-12-2002
AT288750 (T)	15-02-2005		
BR0209732 (A)	14-09-2004		
CN100435793A	22-09-2004		
DE10125883 (A1)	12-12-2002		
DK1392285 (T3)	13-06-2005		
EP1392285 (A1)	03-03-2004		
ES2237683 (T3)	01-08-2005		
HK1063606 (A1)	24-06-2005		
JP2004535410 (A)	25-11-2004		
MXPA03010833 (A)	22-11-2004		
PE00902003 (A1)	01-04-2003		
PT1392285 (E)	30-06-2005		
RU2003137772 (A)	27-05-2005		
US2004127550 (A1)	01-07-2004		
WO02096414 (A1)	05-12-2002		

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario 20-2018	PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN	ver Formulario PCT/ISA/220 y, en su caso, el punto 5 de esta hoja.
Solicitud internacional N° PCT/CL.2018/050009	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 12/02/2018 12/febrero/2018	Fecha prioridad (más antigua) (día/mes/año)
Solicitante GADOR LIMITADA		

El presente informe de búsqueda internacional, elaborado por esta Administración encargada de la búsqueda internacional, se transmite al solicitante, conforme al Artículo 18. Se remite una copia del mismo a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional comprende un total de 5 hojas.

Se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica citados en el informe.

1. Base del informe

a. En lo que se refiere al idioma, la búsqueda internacional se ha realizado sobre la base de:

- la solicitud en el idioma en el que se presentó
- una traducción de la solicitud al _____, que es el idioma de la traducción proporcionada a los fines de la búsqueda internacional (Reglas 12.3.a) y 23.1.b)

b. Este informe de búsqueda internacional se ha realizado teniendo en cuenta la rectificación de un error evidente autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91 (Regla 43.6bis. a)).

c. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional, véase Recuadro I.

2. Se estima que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (ver Recuadro II).

3. Falta unidad de invención (ver Recuadro III).

4. Con respecto al título,

- el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.
- el texto ha sido establecido por esta Administración con la siguiente redacción:

5. Con respecto al resumen,

- el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.
- el texto (reproducido en el Recuadro IV) ha sido establecido por esta Administración de conformidad con la Regla 38.2. El solicitante puede presentar observaciones a esta Administración en el plazo de un mes a contar desde la fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

6. Con respecto a los dibujos,

- a. la figura de los dibujos a publicar junto con el resumen es la Figura N° _____
 - propuesta por el solicitante.
 - propuesta por esta Administración, por no haber propuesto el solicitante ninguna figura.
 - propuesta por esta Administración, por caracterizar mejor, esta figura, la invención.
- b. no debe publicarse ninguna figura.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050009

<p>A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD</p> <p>CIP: A61K 31/20, 31/385, 9/0019; A61P41/00 (2018.01)</p> <p>De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.</p>														
<p>B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA</p> <p>Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguida de los símbolos de clasificación)</p> <p>CIP: A61K 31/20, 31/385, 9/0019; A61P41/00</p> <p>Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda</p> <p>Base de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) INAPI, GOOGLE PATENTS, ESP@CENET, STN, BEIC</p>														
<p>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Categoría*</th> <th>Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes</th> <th>Relevante para las reivindicaciones N°</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>DÜNSCHEDE, F. et al. Reduction of ischemia reperfusion injury after liver resection and hepatic inflow occlusion by alpha-lipoic acid in humans. World Journal of Gastroenterology. Nov. 14, 2006;12(42):6812-6817 doi: 10.3748/wjg.v12.i42.6812 [todo el documento]</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>DÜNSCHEDE F. et al. Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by alpha-lipoic acid. Shock. 2007; 27(6): 644-651 DOI: 10.1097/01.shk.0000248582.25647.ee [todo el documento]</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SEHIRLI Ö. et al. alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2008; 35: 249-255. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04810.x [todo el documento]</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°	X	DÜNSCHEDE, F. et al. Reduction of ischemia reperfusion injury after liver resection and hepatic inflow occlusion by alpha-lipoic acid in humans. World Journal of Gastroenterology. Nov. 14, 2006;12(42):6812-6817 doi: 10.3748/wjg.v12.i42.6812 [todo el documento]	1-4	X	DÜNSCHEDE F. et al. Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by alpha-lipoic acid. Shock. 2007; 27(6): 644-651 DOI: 10.1097/01.shk.0000248582.25647.ee [todo el documento]	1-4	X	SEHIRLI Ö. et al. alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2008; 35: 249-255. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04810.x [todo el documento]	1-4
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°												
X	DÜNSCHEDE, F. et al. Reduction of ischemia reperfusion injury after liver resection and hepatic inflow occlusion by alpha-lipoic acid in humans. World Journal of Gastroenterology. Nov. 14, 2006;12(42):6812-6817 doi: 10.3748/wjg.v12.i42.6812 [todo el documento]	1-4												
X	DÜNSCHEDE F. et al. Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by alpha-lipoic acid. Shock. 2007; 27(6): 644-651 DOI: 10.1097/01.shk.0000248582.25647.ee [todo el documento]	1-4												
X	SEHIRLI Ö. et al. alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2008; 35: 249-255. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04810.x [todo el documento]	1-4												
<p><input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recurso C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo</p>														
<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> <p>"T" documento anterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a uno o a otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"Z" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>														
<p>Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.</p> <p>08/06/2018 08/junio/2018</p>		<p>Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional</p> <p>26/07/2018 26/julio/2018</p>												
<p>Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional</p> <p>INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago-Chile</p> <p>N° de fax:</p>		<p>Funcionario autorizado</p> <p>CARTIER-UGARTE, Denise</p> <p>N° de teléfono 56-2-28870551</p>												

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050009

C (continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	DÜNSCHEDE F. Protective effects of ischemic preconditioning and application of lipoic acid prior to 90 min of hepatic ischemia in a rat model. World Journal of Gastroenterology. Jul. 21, 2007;13(27):3692-3698 doi: 10.3748/wjg.v13.i27.3692 [todo el documento]	1-4
A	HE L. et al. Alpha lipoic acid protects heart against myocardial ischemia-reperfusion injury through a mechanism involving aldehyde dehydrogenase 2 activation. European Journal of Pharmacology 2012; 678: 32-38 doi:10.1016/j.ejphar.2011.12.042 [todo el documento]	
A	EP0812590A3 (ASTA Medica Aktiengesellschaft) 09-06-1999 [descripción]	
A	CA2446673 (SERUMWERK BERNBURG AG) 05-12-2002 [descripción]	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050009

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2(a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N°s: 5 y 6 se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: Estas cláusulas se refieren a una materia que esta Administración considera afectada por las Reglas PCT 39.1(iv) y B7.1(iv), concernientes a métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal, por cirugía o terapia, como también métodos de diagnóstico. En conclusión, ninguna opinión experta será establecida para novedad, nivel inventivo y aplicación industrial de dichas cláusulas (Art.17(2)(a)(b))
2. Las reivindicaciones N°s: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. Las reivindicaciones N°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4 a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050009

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
EP0812590 A3	09-06-1999	DE4035442 (A1)	16-05-1991
		DE59010810 (D1)	16-04-1998
		US5728735 (A)	17-03-1998
		US6271254 (B1)	07-08-2001
		EP0427247 (B1)	11-03-1998
		AT163849 (T)	15-03-1998
		CA2029596 (A1)	10-05-1991
		DK0427247 (T3)	28-09-1998
		ES2115589 (T3)	01-07-1998
		IE904034 (A1)	22-05-1991
		JPH03169813 (A)	23-07-1991
		PT95826 (A)	13-09-1991
		CA2446673	05-12-2002
AT288750 (T)	15-02-2005		
BR0209732 (A)	14-09-2004		
CN100435793A	22-09-2004		
DE10125883 (A1)	12-12-2002		
DK1392285 (T3)	13-06-2005		
EP1392285 (A1)	03-03-2004		
ES2237683 (T3)	01-08-2005		
HK1063606 (A1)	24-06-2005		
JP2004535410 (A)	25-11-2004		
MXPA03010833 (A)	22-11-2004		
PE00902003 (A1)	01-04-2003		
PT1392285 (E)	30-06-2005		
RU2003137772 (A)	27-05-2005		
US2004127550 (A1)	01-07-2004		
WO02096414 (A1)	05-12-2002		