

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2009.05.18**

(30) Prioridade(s): **2008.05.19 ES 200801560**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.03.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.09.05**
223/2012

(73) Titular(es):

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS**

C/ SERRANO 117 28006 MADRID ES

UNIVERSIDAD DE BARCELONA ES

INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES

AUGUST PI I SUNYER ES

(72) Inventor(es):

CARMEN PERALTA UROZ ES

JOAN LLÓ-CATAFAU ES

ISMAIL BEN MOSBAH ES

RAMÓN BARTRONS BACH ES

(74) Mandatário:

ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA

**AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA
PT**

(54) Epígrafe: **SOLUÇÃO AQUOSA PARA A CONSERVAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS**

(57) Resumo:

FORNECE-SE UMA SOLUÇÃO AQUOSA MELHORADA PARA A CONSERVAÇÃO DE TECIDOS E DE ÓRGÃOS, COMPREENDENDO CARVEDILOL, TACROLIMUS E TRIMETAZIDINA. OBSERVA-SE UM EFEITO SINÉRGICO NO CASO DESTA SOLUÇÃO DE CONSERVAÇÃO, QUE É PARTICULARMENTE EFICAZ EM ÓRGÃOS MARGINAIS, COMO OS FÍGADOS ESTEATÓTICOS.

RESUMO

"SOLUÇÃO AQUOSA PARA A CONSERVAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS"

Fornece-se uma solução aquosa melhorada para a conservação de tecidos e de órgãos, compreendendo carvedilol, tacrolimus e trimetazidina. Observa-se um efeito sinérgico no caso desta solução de conservação, que é particularmente eficaz em órgãos marginais, como os fígados esteatóticos.

DESCRIÇÃO

"SOLUÇÃO AQUOSA PARA A CONSERVAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS"

A presente invenção é relativa a uma solução aquosa para a conservação de tecidos e órgãos, à utilização da mesma, em particular na conservação de órgãos marginais, e a um método para a conservação de tecidos e órgãos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O transplante de órgãos é o tratamento de primeira escolha no caso dos doentes que padecem de doenças crónicas em fase terminal. Apesar dos avanços na melhoria das técnicas de transplante, a lesão do enxerto que ocorre durante o período isquémico e a subsequente reperfusão constituem ainda um problema por resolver na prática clínica.

Após a remoção de um dador e antes do transplante de enxerto num receptor, os órgão(s) e tecidos são sujeitos a um período inerente de isquémia. Por isso, as soluções líquidas empregues para conservar os órgãos e tecidos têm de cumprir alguns requisitos: remoção de sangue do dador, rápido arrefecimento do órgão, e garantir uma prevenção e uma proteção eficazes contra as lesões causadas por isquémia.

A conservação hipotérmica estática é um método eficaz de conservação de órgãos durante períodos curtos de isquémia. No entanto, os períodos de isquémia prolongados estão associados ao não funcionamento do enxerto primário no transplante hepático e à disfunção do enxerto no transplante renal. Além da necessidade de aumentar o período de isquémia, o conjunto limitado de dadores e o

subsequente aumento da lista de espera para o transplante de órgãos levaram a aceitar órgãos marginais, os quais têm baixa tolerância às lesões causadas pela ocorrência de isquemia. No caso do transplante hepático, a utilização de órgãos marginais, como os enxertos esteatóticos, está associada a um maior risco de não funcionamento primário ou de disfunção do enxerto após transplante, em comparação com os não esteatóticos. Além disso, alguns fígados esteatóticos não são considerados apropriados para transplante, exacerbando a escassez de órgãos para transplante. Sabe-se bem que a maioria das lesões mostradas por um órgão marginal durante o transplante estão relacionadas com o período de conservação hipotérmica. Estas observações indicam ser necessário otimizar a conservação de órgãos. Por isso, o principal objetivo da conservação de órgãos é tentar prolongar a tolerância dos órgãos à isquemia.

Existem dados que indicam que a composição das soluções de conservação é um fator crítico na qualidade dos órgãos sujeitos a períodos de isquemia prolongados. A solução de conservação da University of Wisconsin (UW) é considerada a solução padrão para a conservação do fígado, dado ter mostrado ser eficaz na redução dos danos causados pela isquemia fria e ter maiores prazos-limites de armazenamento. Esta solução de conservação contém diferentes componentes destinados a aumentar a conservação dos órgãos, inclusive o hidroxietilamido coloidal para impedir o edema celular, adenosina como fonte de ATP na reperfusão, alopurinol e glutatona com efeitos antioxidantes, e agentes de impermeabilização de membrana, como o ácido lactobiônico e a rafinose. No entanto, esta solução de conservação, UW, está limitada em termos de eficácia, dado se ter observado lesões irreversíveis nos

órgãos transplantados quando os períodos isquêmicos frios são prolongados (16 h-24 h).

O tacrolimus (TCR) é um composto macrólido com uma ação imunossupressora eficaz, uma ação antimicrobiana e outras ações farmacológicas, e é importante na prevenção de reações de rejeição aquando do transplante de órgãos e tecidos, bem como no caso de distúrbios autoimunes e de distúrbios infecciosos. Sabe-se que adicioná-lo às soluções de conservação pode conferir uma proteção contra a lesão por reperfusão. Uma solução de conservação UW contendo o tacrolimus foi descrita na literatura (K. G. Rajesh et al., "Mitochondrial Permeability transition-pore inhibition enhances functional recovery after long-time hypothermic heart preservation", *Transplantation*, 2003, vol. 76 (9), pág. 1314-20). Foi testada a sua ação na conservação do coração. Em todo o caso, concluiu-se que o tacrolimus não foi capaz de produzir qualquer efeito na conservação.

O carvedilol (CVD) é um bloqueador β -adrenérgico não seletivo lipofílico com efeitos vasodilatadores que são primeiramente produzidos através do bloqueio do recetor $\alpha 1$ seletivo e com um forte efeito antioxidante. A capacidade de o carvedilol inibir a peroxidação lipídica é muito superior à de outros bloqueadores β -adrenérgicos testados, o que poderá explicar os seus efeitos protetores superiores nos modelos de isquémia/reperfusão. Embora a adição de antioxidantes, como o carvedilol, às soluções de conservação tenha sido sugerida na literatura (ver B. Yard et al., "Prevention of cold-preservation injury of cultured endothelial cells by catecholamines and related compounds", *American Journal of transplantation*, 2004, vol. 4, pág. 22-30), nunca foi revelada uma solução de conservação específica contendo carvedilol.

Um trabalho recente indica que a adição de trimetazidina (TMZ) à solução de conservação UW melhorou a capacidade de esta solução de conservação padrão proteger tanto os fígados não esteatóticos como, em especial, os fígados esteatóticos sujeitos a períodos de isquemia prolongados (ver I. Ben Mosbah et al. "Trimetazidine: Is it a promising drug for use in steatotic grafts?", *World J Gastroenterol*, 2006, vol. 12(6), pág. 908-914).

Em todo o caso, algumas das propriedades da solução UW, como é o caso de uma elevada concentração de potássio (necessária para injetar o órgão antes da reperusão do enxerto no receptor) e a presença de hidroxietilamido (HES) como suporte oncótico (que poderá ser responsável pela agregação dos glóbulos vermelhos), não favorecem a conservação dos órgãos. Estudos recentes demonstraram que ambos os enxertos hepáticos (enxertos esteatóticos e não esteatóticos) ficam melhor conservados numa solução de conservação UW modificada (denominada IGL-1), caracterizada pela inversão das concentrações de K^+ e de Na^+ e pela substituição de HES por polietilenoglicol (PEG) na solução UW original (ver I. Ben Mosbah et al., "Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution", *Liver Transpl*, 2006, vol. 12 (8), pág. 1215-23). Por outro lado, apesar das melhorias proporcionadas pela solução IGL-1, os efeitos nocivos da isquemia-reperusão (I/R) ainda ficam por resolver.

É ainda necessário encontrar soluções de conservação, que permitam prolongar a tolerância dos órgãos à isquemia e minimizar o risco inerente de órgãos marginais sujeitos a transplante.

RESUMO DA INVENÇÃO

Embora as soluções de conservação contendo tacrolimus, carvedilol ou trimetazidina sejam conhecidas ou tenham sido sugeridas no estado da técnica, nunca foi sugerida uma solução aquosa para a conservação de tecidos e órgãos compreendendo uma combinação destes três ingredientes ativos farmacêuticos. Os inventores descobriram de forma surpreendente que uma solução de conservação contendo uma combinação de tacrolimus, carvedilol e trimetazidina melhora de forma sinérgica a capacidade de conservação de tecidos e órgãos sujeitos a um período isquêmico prolongado. Em particular, este efeito sinérgico é especialmente evidente em órgãos marginais, como os fígados esteatóticos, o que torna a solução particularmente vantajosa, uma vez que melhorará as condições iniciais dos órgãos marginais disponíveis para transplante mas com resultados pós-cirúrgicos deficientes, e poderá também aumentar a utilização de órgãos que hoje em dia são descartados em termos de transplante, e assim aumentar a quantidade de órgãos disponíveis para transplante.

Por conseguinte, um aspeto da presente invenção tem a ver com uma solução de conservação aquosa para a conservação de tecidos e órgãos, compreendendo uma quantidade eficaz de carvedilol, uma quantidade eficaz de tacrolimus, e uma quantidade eficaz de trimetazidina.

A solução de conservação aquosa da presente invenção permite conservar os tecidos ou órgãos durante um período de tempo superior ao conseguido com outras soluções de conservação conhecidas. Outra vantagem da solução de conservação da invenção é de permitir aumentar o período de tempo em que um tecido ou órgão funciona em condições e em que pode ser aproveitado para transplante, em comparação

com o período de tempo conseguido com outras soluções de conservação.

Um segundo aspeto da presente invenção refere-se à utilização da solução aquosa da presente invenção na conservação de tecidos ou órgãos. A solução pode ser aplicada a tecidos ou órgãos de mamíferos, inclusive humanos. Os exemplos dos referidos tecidos são veias e artérias.

Também constitui parte da presente invenção um método para a conservação de tecidos e órgãos, compreendendo manter os referidos tecidos ou órgãos na solução aquosa da presente invenção a uma temperatura compreendida entre 2-10°C. Ao introduzir um tecido ou um órgão na solução de conservação aquosa da presente invenção, previne-se lesões por reperfusão associadas ao implante de tecidos ou órgãos e a rejeição de transplantes.

Como empregue no presente documento, a expressão "uma concentração eficaz de" um ingrediente ativo é a quantidade do ingrediente ativo que pode ser empregue na conservação de tecidos ou órgãos.

Qualquer valor de um intervalo de valores fornecido no presente documento poderá ser aumentado ou alterado sem perder os efeitos pretendidos, como será evidente a um especialista. Por conseguinte, os intervalos de valores fornecidos, tais como as concentrações, e semelhantes, deverão ser considerados aproximados, se nada for especificamente expresso em contrário.

Ao longo da descrição e das reivindicações, a palavra "compreende" e as variações dessa palavra não se destinam a

excluir outras características, aditivos, componentes ou etapas técnicos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As Figuras (1-10) ilustram o efeito da adição do tacrolimus (TCR), do carvedilol (CVD) e da trimetazidina (TMZ) a algumas soluções de conservação, e os efeitos da solução de conservação do Exemplo 1 (P1), onde fígados esteatóticos (S) e não esteatóticos (NS) foram sujeitos a um longo período isquêmico. Nas Figuras, %P significa percentagem de proteção.

A FIG. 1 ilustra a percentagem de proteção comparativamente à solução de conservação UW, ao avaliar os valores de ALT no fim do período isquêmico (0 min).

A FIG. 2 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação UW, ao avaliar os valores de ALT no fim da reperfusão (120 min).

A FIG. 3 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação UW, ao avaliar a produção de biliar no fim da reperfusão (120 min).

A FIG. 4 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação UW, ao avaliar-se a % de eliminação hepática BSP na biliar durante a reperfusão.

A FIG. 5 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação UW, ao avaliar os níveis de ATP no fim da reperfusão (120 min).

A FIG. 6 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação IGL-1, ao avaliar os valores de ALT no fim do período isquémico (0 min).

A FIG. 7 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação IGL-1, ao avaliar os valores de ALT no fim da reperfusão (120 min).

A FIG. 8 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação IGL-1, ao avaliar a produção de bÍlis no fim da reperfusão (120 min).

A FIG. 9 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação IGL-1, ao avaliar a % de eliminação hepática BSP na bÍlis durante a reperfusão.

A FIG. 10 ilustra a percentagem de proteção em comparação com a solução de conservação IGL-1, ao avaliar os nÍveis de ATP no fim da reperfusão (120 min).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

É possível aplicar a solução aquosa da presente invenção a tecidos ou órgãos aquando da sua remoção do dador, e durante o seu armazenamento, o transporte e a eventual implantação num doente. Pode ser empregue para períodos isquémicos curtos e fundamentalmente para períodos isquémicos prolongados.

Numa execução preferida da solução aquosa da presente invenção, a concentração de carvedilol é de 5 a 10 microM, a concentração de tacrolimus é de 5 a 10 microM, e a concentração de trimetazidina é de 0,01 microM a 10 microM.

De modo a prevenir a formação de edema celular e tecidual, a solução aquosa da presente invenção compreende polietilenoglicol (PEG) com um peso molecular superior a 15.000, que permite garantir a pressão oncótica. Preferencialmente, o PEG empregue é um PEG com um peso molecular de 35.000. Com maior preferência, o PEG é um PEG não linear purificado, ou seja, um PEG sintetizado a partir de moléculas de PEG com um baixo peso molecular.

Em conformidade com isso, noutra execução preferida, a solução aquosa da presente invenção tem um valor de pH de 6,5 a 8 e uma osmolaridade de 290 a 320 milimoles/kg, e compreende ainda PEG com um peso molecular superior a 15.000 numa concentração de 0,01 a 5 mM, rafinose numa concentração de 20 a 40 mM, MgSO_4 numa concentração de 1 a 10 mM, H_2PO_4^- numa concentração de 10 a 40 mM, iões de potássio numa concentração de 30 a 50 mM, iões de sódio numa concentração de 110 a 160 mM, e ácido lactobiónico numa concentração de 70 a 140 mM.

Ainda noutra execução preferida, a solução aquosa da presente invenção tem um valor de pH de 7,4, uma osmolaridade de 320 milimoles/kg, e a concentração de PEG com um peso molecular superior a 15.000 é 0,03 mM, a concentração de rafinose é 30 mM, a concentração de MgSO_4 é 5 mM, a concentração de H_2PO_4^- é 25 mM, a concentração de iões de potássio é 40 mM, a concentração de iões de sódio é 120 mM, a concentração de ácido lactobiónico é 100 mM, a concentração de tacrolimus é 5 microM, a concentração de carvedilol é 10 microM, e a concentração de trimetazidina é 1 microM. Preferencialmente, o PEG tem um peso molecular de cerca de 35000.

É do conhecimento geral que a causa principal de os órgãos serem considerados inviáveis para transplante é a estenose.

As execuções acima preferidas da solução de conservação da invenção permitem aumentar a tolerância dos fígados esteatóticos à lesão por isquémia-reperfusão associada ao transplante hepático. Este facto permite melhorar a função pós-transplante do enxerto esteatótico, e aumentar a disponibilidade de órgãos apropriados para transplante.

Uma solução aquosa particularmente preferida da presente invenção consiste nos seguintes componentes:

- polietilenoglicol com um peso molecular de cerca de 35000 numa concentração de 0,03 mM,
- rafinose numa concentração de 30 mM,
- MgSO_4 numa concentração de 5 mM,
- H_2PO_4^- numa concentração de 25 mM,
- iões de potássio numa concentração de 40 mM,
- iões de sódio numa concentração de 120 mM,
- ácido lactobiónico numa concentração de 100 mM.
- tacrolimus numa concentração de 5 microM,
- carvedilol numa concentração de 10 microM, e
- trimetazidina numa concentração de 1 microM,

e tem um pH de 7,4 e uma osmolaridade de 320 milimoles/kg.

Com maior preferência, esta solução de conservação compreende ainda dexametasona numa concentração de 16 g/L, e penicilina numa concentração de 200.000 U/L.

Estas duas execuções preferidas da solução de conservação da invenção não contêm determinados fármacos, tais como GSH, HES, insulina, alopurinol e adenosina, que se encontram incluídos noutras soluções de conservação já conhecidas (tais como soluções de conservação UW e/ou IGL-1) e que se verificou serem ineficazes ou mesmo ter efeitos deletérios no órgão conservado. Observou-se uma sinergia particularmente relevante no caso destas soluções de conservação preferidas, dado conferirem proteção tanto a fígados esteatóticos como não esteatóticos, em comparação com os resultados obtidos no caso de outras soluções de conservação.

Como acima referido, um aspeto adicional da presente invenção é relativo à utilização da solução aquosa como descrito e reivindicado no presente documento, para a conservação de tecidos ou órgãos. Numa execução preferida, o órgão é um órgão abdominal, como fígado, rim e pâncreas. Preferencialmente, o órgão abdominal é um órgão marginal, e com maior preferência é um fígado esteatótico.

A solução de conservação da presente invenção aplica-se à conservação hipotérmica estática e é empregue a uma temperatura entre 2 e 10°C, preferencialmente entre 3 e 5°C e, com maior preferência, nos 4°C.

Além disso, a presente invenção compreende todas as combinações possíveis dos grupos particulares e preferidos anteriormente descritos.

Os exemplos e as figuras que se seguem destinam-se a ser ilustrativos.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Preparação de uma solução de conservação aquosa

Uma solução aquosa, cuja composição é mostrada na Tabela 1, foi preparada de acordo com o processo abaixo revelado.

Tabela 1:

	Concentração (mM)
Ácido lactobiônico	100
H_2PO_4^-	25
MgSO_4	5
Rafinose	30
PEG 35000	0,03
Iões de potássio	40
Iões de sódio	120
Tacrolimus	$5 \cdot 10^{-3}$
Carvedilol	$10 \cdot 10^{-3}$
Trimetazidina	$1 \cdot 10^{-3}$

Etapa 1:

A uma solução contendo 1 g de polietilenoglicol dialisado (PEG 35.000), adicionou-se 4,11 mg de tacrolimus (TCR) e agitou-se para formar uma primeira solução.

Etapa 2:

Adicionou-se 35,83 g de ácido lactobiônico num recipiente de um litro contendo 800 mL de água (destilada e

desionizada) à temperatura ambiente e agitou-se até à sua dissolução. Depois, adicionou-se 0,60 g de MgSO_4 , 22,5 mL de NaOH 5 N, 6 mL de KOH 5 N, 3,4 g de KH_2PO_4 , e 17,83 g de rafinose, para formar uma segunda solução. Subsequentemente, adicionou-se 1 mL de uma solução contendo TMZ a partir de uma solução-mãe (solução-mãe: 2,66 mg de TMZ dissolvidos em 10 mL de água) e 10 mL de CVD a partir de uma solução-mãe (solução-mãe: 6,5 mg de carvedilol em 8 mL de ácido tartárico e 8 mL de água) a esta segunda solução.

A solução preparada na Etapa 1 foi misturada com a solução preparada na Etapa 2, e adicionou-se em seguida NaOH 5 N, em função do necessário para ajustar o valor de pH para $7,4 \pm 0,1$.

Por fim, adicionou-se água ao recipiente para levar o volume para 1 litro, e em seguida filtrou-se a solução e esterilizou-se a mesma. Obteve-se uma solução tendo uma osmolaridade de 320 ± 10 mOsm/L. Antes da utilização, adicionou-se dexametasona (16 g/L) e penicilina (200.000 U/L).

EXEMPLO 2

Neste exemplo, foi feita a comparação entre o efeito da solução aquosa da presente invenção no fígado e o efeito obtido ao utilizar as soluções de conservação UW e IGL-1.

Avaliou-se a lesão e a função hepáticas através da medição das transaminases, da produção de biliar, da eliminação hepática (%BSP) e do teor de ATP.

De modo a realizar o estudo, utilizou-se ratas Zucker homozigóticas (obesas, Ob) e heterozigóticas (magras, Ln),

com 16-18 semanas de idade, compradas à Iffa-Credo (L'Abresle, França). Um fígado perfusado isolado foi empregue para avaliar a lesão e a função hepáticas, sem a influência de outros órgãos, constituintes plasmáticos e efeitos neuronais/hormonais. A arquitetura hepática, a microcirculação e a produção de bÍlis são conservadas neste modelo experimental. Este modelo experimental empregue foi considerado na literatura apropriado para testar a eficácia de diferentes soluções de conservação para transplante. Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia de inalação de isoflurano. O estudo respeitou as normas da União Europeia (Diretiva 86/609/CEE) para experiências animais.

Aquisição de fÍgados e grupos experimentais

Realizou-se a técnica cirúrgica como descrito em estudos anteriores (I. Ben Mosbah, et al. "Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution", *Liver Transpl* 2006, vol. 12 (8), pág. 1215-23, e I. Ben Mosbah et al. "Addition of adenosine monophosphate-activated protein kinase activators to University of Wisconsin solution: a way of protecting rat steatotic livers", *Liver Transpl.*, 2007, vol. 13(3), pág. 410-25). Após a canulação do ducto biliar comum, isolou-se a veia porta e ligou-se os ramos esplénico e pilórico. Todos os animais foram distribuídos de forma aleatória pelos grupos experimentais seguintes, como abaixo descrito.

Soluções de conservação e grupos experimentais

A composição das soluções de conservação UW, IGL-1 e P1 é mostrada na Tabela 2, sendo P1 uma solução de conservação de acordo com a presente invenção.

Tabela 2:

Componentes	Propriedades	UW	IGL-1	P1
Na ⁺ (mmol)	Catão	30	100	120
K ⁺ (mmol)	Catão	100	30	40
Mg ²⁺ (mmol)	Catão	5	5	5
Sulfato (mmol)	Tampão	5	5	5
Fosfato (mmol)	Tampão	25	25	25
Ácido lactobiónico (mmol)	Tampão	100	100	100
Rafinose (mmol)	Açúcar	30	30	30
HES (g/L)	Coloide	50	–	–
PEG (g/L)	Coloide	–	1	1
Adenosina (mmol)	Fonte de energia	5	5	–
Alopurinol (mmol)	Antioxidante	1	1	–
GSH (mmol)	Antioxidante	3	3	–
Trimetazidina (µmol)	Protetor mitocôndrico	–	–	1
Carvedilol (µmol)	Antioxidante	–	–	10
Tacrolimus (µmol)	Anti-inflamatório	–	–	5
Insulina (U/L)	Protetor mitocôndrico	40	40	–
Dexametasona (g/L)	Protetor de membrana	16	16	16
Penicilina (U/L)	Antibiótico	200.000	200.000	200.000
HES = hidroxietilamido; GSH = glutathione				

A Estudo I: Solução P1 vs. UW

1) UW: Fígados de 16 ratas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução UW.

2) UW+CVD: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução UW contendo 10 μ M de carvedilol.

3) UW+TMZ: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução UW contendo 1 μ M de trimetazidina.

4) UW+TCR: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução UW contendo 5 μ M de tacrolimus.

5) UW+CVD+TMZ+TCR: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução UW contendo 10 μ M de carvedilol, 1 μ M de trimetazidina e 5 μ M de tacrolimus.

Os resultados obtidos nos grupos 1-5 foram comparados com os obtidos quando os fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução de conservação P1.

B) Estudo II: P1 vs. IGL-1

1) IGL: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução IGL-1.

2) IGL+CVD: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução IGL-1 contendo 10 μ M de carvedilol.

3) IGL+TMZ: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução IGL-1 contendo 1 μ M de trimetazidina.

4) IGL+TCR: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução IGL-1 contendo 5 μ M de tacrolimus.

5) IGL+CVD+TMZ+TCR: Fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução IGL-1 contendo 10 μ M de carvedilol, 1 μ M de trimetazidina e 5 μ M de tacrolimus.

Os resultados obtidos nos grupos 1 a 5 foram comparados com os obtidos quando os fígados de 16 ratazanas Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram conservados durante 24 h nos 4°C em solução de conservação P1.

Procedimento

Após 24 h de conservação a frio do enxerto, mediu-se os níveis de alanina aminotransferase (ALT) cumulativa após isquemia prolongada. Além disso, após 24 h de conservação a frio do enxerto, e de modo a imitar o período isquêmico quente sofrido pelo enxerto durante o implante cirúrgico no receptor, os fígados foram expostos a 22°C durante 30 min. Os fígados foram depois ligados através da veia porta a um sistema de perfusão recirculante e foram sujeitos a perfusão durante 120 min nos 37°C. Durante os primeiros 15 min de perfusão, aumentou-se progressivamente o fluxo de modo a estabilizar a pressão da veia porta em 12 mm Hg (Pression Monitor BP-1, Instruments, Inc, Sarasota, FL, EUA). Controlou-se o fluxo utilizando uma bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, França). O líquido de perfusão consistia num meio de cultura celular (William's médium E, Bio Whittaker, Espanha) com a solução de Krebs-Heinseleit-albumina. O líquido de perfusão foi oxigenado com uma mistura gasosa de O₂ a 95% e CO₂ a 5%, e manteve-se a temperatura do líquido de perfusão nos 37°C. No fim da

reperfusão normotérmica (120 min), recolheu-se alíquotas do líquido de perfusão para avaliar a ALT. Também se avaliou a produção de bÍlis e a eliminação hepática (%BSP) em amostras de bÍlis e o teor de ATP nas amostras hepáticas.

Determinações bioquímicas

- Ensaio das transaminases. Avaliou-se as transaminases como um parâmetro da lesão hepática de acordo com as instruções fornecidas por kits comerciais da Boehringer Mannheim (Munique, Alemanha).
- Produção de bÍlis. Avaliou-se a produção de bÍlis como um parâmetro da função hepática. Recolheu-se a bÍlis através do ducto biliar e estimou-se a produção de bÍlis através da medição do volume de bÍlis obtido passados 120 min de perfusão e registado como µL/g de fÍgado.
- Eliminação hepática BSP. Como no caso da produção de bÍlis, a eliminação hepática de BSP é considerada outro parâmetro fiável da função hepática. Adicionou-se 10 mg de BSP (bromossulfoftaleína) ao líquido de perfusão trinta minutos após a perfusão inicial. Determinou-se a concentração de BSP nas amostras de bÍlis através da medição da absorvância nos 580 nm. A eliminação hepática de BSP foi expressa na forma de %BSP.
- ATP. Homogeneizou-se amostras hepáticas numa solução contendo ácido perclórico, e mediu-se os níveis de ATP através de cromatografia líquida de alta resolução.

Estudo estatístico

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados obtidos foram sujeitos a um estudo estatístico

através de uma análise do teste de variância, e determinou-se o nível de significância estatística através do teste de Student-Newman-Keuls. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativamente diferentes se $p < 0,05$.

Avaliou-se os níveis de ALT para prever a lesão hepática após o período de conservação do enxerto. Esta medida é uma ferramenta valiosa para prever os danos no órgão após a conservação no frio. Ao fim da isquemia fria, observou-se níveis mais elevados de transaminases nos fígados esteatóticos em comparação com os fígados não esteatóticos conservados em soluções UW ou IGL. Isto confirma a fraca tolerância dos fígados esteatóticos aos efeitos lesivos causados durante a isquemia fria.

Os valores de ALT (U/L) ao fim da isquemia fria no caso dos enxertos conservados em solução UW eram de $32,87 \pm 2,91$ e de $152,23 \pm 2,21$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respectivamente. Os valores de ALT (U/L) ao fim da isquemia fria no caso dos enxertos conservados em solução IGL eram de $21,44 \pm 0,62$ e $87,47 \pm 3,20$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respectivamente.

Observou-se níveis mais elevados de transaminases nos fígados esteatóticos ao fim da reperfusão do que os encontrados nos fígados não esteatóticos. Os valores de ALT (U/L) no fim da reperfusão no caso dos enxertos conservados em solução de conservação UW eram de $45,05 \pm 3,53$ e $159,11 \pm 3,01$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respectivamente. Os valores de ALT (U/L) no fim da reperfusão no caso dos enxertos conservados em solução de conservação IGL eram $35,62 \pm 2,32$ e $121,41 \pm 1,23$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respectivamente.

Avaliou-se a função hepática através da medição da produção de biliar e da eliminação hepática (%BSP). A produção de biliar e a %BSP eram mais baixas nos fígados esteatóticos conservados em soluções UW ou IGL do que no caso dos fígados não esteatóticos. Os valores da produção de biliar ($\mu\text{L/g/120 min}$) no fim da reperfusão no caso dos fígados conservados em soluções UW eram de $9,55 \pm 0,25$ e de $1,46 \pm 0,18$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respetivamente. Os valores da produção de biliar ($\mu\text{L/g/120 min}$) no fim da reperfusão no caso dos fígados conservados em solução IGL eram de $14,25 \pm 0,63$ e $3,44 \pm 0,38$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respetivamente. Os valores da % de BSP na biliar no fim da reperfusão no caso dos fígados conservados em soluções UW eram de $6,13 \pm 1,13$ e $4,70 \pm 0,65$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respetivamente. Os valores da % de BSP na biliar no fim da reperfusão no caso dos fígados conservados em solução IGL eram de $8,04 \pm 0,61$ e $7,34 \pm 0,58$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respetivamente.

Observou-se níveis de ATP mais baixos no fim da reperfusão no caso dos fígados esteatóticos conservados em soluções UW ou IGL-1 do que os registados no caso dos fígados não esteatóticos. Os valores de ATP ($\mu\text{M/g}$) no fim da reperfusão no caso dos fígados conservados em solução UW eram de $0,90 \pm 0,02$ e $0,61 \pm 0,03$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respetivamente. Os valores de ATP ($\mu\text{M/g}$) no fim da reperfusão no caso dos fígados conservados em solução IGL eram $1,19 \pm 0,09$ e $0,77 \pm 0,06$ no caso dos fígados não esteatóticos e dos fígados esteatóticos, respetivamente.

As Tabelas 3-6 abaixo mostram o efeito da adição de tacrolimus (TCR), carvedilol (CVD) e trimetazidina (TMZ) a soluções de conservação conhecidas, e o efeito da solução de conservação do Exemplo 1 (P1) ao sujeitar fígados esteatóticos e não esteatóticos a um período de isquemia prolongado. Os valores são expressos na forma de percentagem de proteção em comparação com soluções de conservação UW ou IGL-1 de parâmetros de lesão e de funcionalidade hepática: ALT ao fim de 24 h de isquemia (0 min), ALT ao fim de 120 min de reperfusão (120 min), produção de bÍlis, % de BSP, e teor de ATP ao fim da reperfusão (120 min).

Tabela 3: Fígados não esteatóticos (de ratas Zucker Ln) em solução de conservação UW

	UW+ CVD	UW+ TMZ	UW+ TCR	[UW+CVD]+ [UW+TMZ]+ [UW+TCR]	UW+ TCR+ CVD+ TMZ	P1
Alt (0 min)	7,51	10,10	17,16	34,77	74,90	82,10
Alt (120 min)	11,66	17,44	20,59	49,69	76,68	85,05
BÍlis	8,24	12,0	14,0	34,24	58,87	63,37
%BSP	9,38	10,69	13,76	33,83	50,80	63,76
ATP	8,65	5,28	16,66	30,59	54,8	66,37

Tabela 4: Fígados esteatóticos (de ratazanas Zucker Ob) em solução de conservação UW

	UW+ CVD	UW+ TMZ	UW+ TCR	[UW+CVD]+ [UW+TMZ]+ [UW+TCR]	UW+ TCR+ CVD+ TMZ	P1
Alt (0 min)	14,44	18,54	25,77	58,75	81,06	85,20
Alt (120 min)	11,0	10,12	19,55	40,67	71,33	78,53
Bílis	8,50	11,40	17,60	37,50	81,40	91,50
%BSP	11,45	10,70	13,30	35,45	56,0	67,50
ATP	7,26	6,53	16,22	30,01	55,20	75,0

Tabela 5: Fígados não esteatóticos (de ratazanas Zucker Ln) em solução de conservação IGL-1

	IGL+ CVD	IGL+ TMZ	IGL+ TCR	[IGL+CVD]+ [IGL+TMZ]+ [IGL+TCR]	IGL+ TCR+ CVD+ TMZ	P1
Alt (0 min)	9,42	7,98	19,17	36,57	63,71	72,57
Alt (120 min)	15,97	17,41	18,59	51,97	70,52	81,11
Bílis	9,26	4,50	14,52	28,28	43,70	49,0
%BSP	8,74	8,37	10,15	27,26	41,40	49,0
ATP	8,17	8,41	16,56	33,14	48,63	59,60

Tabela 6: Fígados esteatóticos (de ratazanas Zucker Ob) em solução de conservação IGL-1

	IGL+ CVD	IGL+ TMZ	IGL+ TCR	[IGL+CVD]+ [IGL+TMZ]+ [IGL+TCR]	IGL+ TCR+ CVD+ TMZ	P1
Alt (0 min)	9,89	13,94	19,24	43,07	61,75	74,27
Alt (120 min)	14,62	10,75	19,47	44,84	63,76	72,69
Bílis	9,30	6,0	15,0	30,30	59,0	72,10
%BSP	9,73	8,22	9,98	27,93	49,28	62,58
ATP	7,99	2,63	18,15	28,77	57,0	65,37

Em conformidade com os parâmetros de lesão e funcionalidade hepáticas, os nossos resultados indicam que a adição combinada de tacrolimus, carvedilol e trimetazidina a soluções de conservação UW ou IGL-1 (UW+TCR+CVD+TMZ ou IGL-1+TCR+CVD+TMZ) teve por resultado um maior grau de proteção no caso dos fígados esteatóticos e não esteatóticos, em comparação com os resultados obtidos quando se adicionou tacrolimus, carvedilol e trimetazidina em separado a uma solução de conservação UW (ou seja, [UW+TCR]+[UW+CVD]+[UW+TMZ]) ou IGL-1 (ou seja, [IGL+TCR]+[IGL+CVD]+[IGL+TMZ]). Além disso, a solução de conservação P1 conferiu um maior grau de proteção tanto no caso dos fígados esteatóticos como dos fígados não esteatóticos, em comparação com os resultados obtidos no caso de UW+TCR+CVD+TMZ e IGL-1 +TCR+CVD+TMZ.

Em resumo, a partir dos resultados mostrados nas Tabelas 3-6, é possível afirmar que o efeito sinérgico é observado no caso das soluções da presente invenção, o que se torna

particularmente evidente no caso da solução de conservação P1. Este efeito sinérgico é particularmente melhorado no caso dos fígados esteatóticos.

REIVINDICAÇÕES

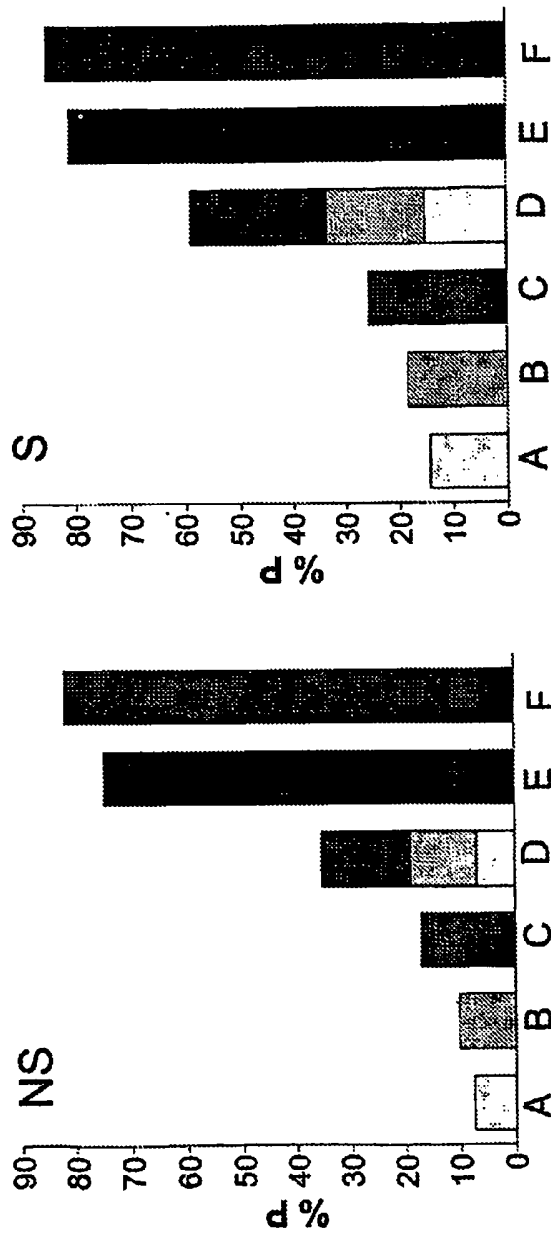
1. Solução aquosa para a conservação de tecidos e de órgãos, **caracterizada por** compreender uma quantidade eficaz de carvedilol, uma quantidade eficaz de tacrolimus e uma quantidade eficaz de trimetazidina.
2. Solução de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** ter uma concentração de carvedilol compreendida entre 5 e 10 microM, uma concentração de tacrolimus compreendida entre 5 e 10 microM, e uma concentração de trimetazidina compreendida entre 0,01 microM e 10 microM.
3. Solução de acordo com uma das reivindicações 1-2, **caracterizada por** compreender ainda polietilenoglicol com um peso molecular superior a 15.000.
4. Solução de acordo com uma das reivindicações 1-3, **caracterizada por** ter um pH de 6,5 a 8 e uma osmolaridade de 290 a 320 milimoles/kg, e ainda por compreender:
 - polietilenoglicol com um peso molecular superior a 15.000 numa concentração de 0,01 a 5 mM,
 - rafinose numa concentração de 20 a 40 mM,
 - MgSO_4 numa concentração de 1 a 10 mM,
 - H_2PO_4^- numa concentração de 10 a 40 mM,
 - iões de potássio numa concentração de 30 a 50 mM,
 - iões de sódio numa concentração de 110 a 160 mM,
 - e
 - ácido lactobiónico numa concentração de 70 a 140 mM.

5. Solução de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada por** o valor de pH ser 7,4, a osmolaridade ser 320 milimoles/kg, a concentração de polietilenoglicol ser 0,03 mM, a concentração de rafinose ser 30 mM, a concentração de MgSO_4 ser 5 mM, a concentração de H_2PO_4^- ser 25 mM, a concentração de iões de potássio ser 40 mM, a concentração de iões de sódio ser 120 mM, a concentração de ácido lactobiónico ser 100 mM, a concentração de tacrolimus ser 5 microM, a concentração de carvedilol ser 10 microM, e a concentração de trimetazidina ser 1 microM.
6. Solução de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada por** ser composta por:
- polietilenoglicol com um peso molecular de cerca de 35000 numa concentração de 0,03 mM,
 - rafinose numa concentração de 30 mM,
 - MgSO_4 numa concentração de 5 mM,
 - H_2PO_4^- numa concentração de 25 mM,
 - iões de potássio numa concentração de 40 mM,
 - iões de sódio numa concentração de 120 mM,
 - ácido lactobiónico numa concentração de 100 mM,
 - tacrolimus numa concentração de 5 microM,
 - carvedilol numa concentração de 10 microM, e
 - trimetazidina numa concentração de 1 microM.
7. Solução de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada por** compreender ainda dexametasona numa concentração de 16 g/L, e penicilina numa concentração de 200.000 U/L.

8. Solução de acordo com uma das reivindicações 6-7, **caracterizada por** não compreender nenhum de glutathione, hidroxietilamido, insulina, alopurinol e adenosina.
9. Utilização da solução como definido em qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizada por** ser usada com vista à conservação de um tecido ou órgão.
10. Utilização de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** o órgão ser um órgão abdominal.
11. Utilização de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada por** o órgão abdominal ser um órgão marginal.
12. Utilização de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada por** o órgão marginal ser um fígado esteatótico.
13. Método para a conservação de tecidos e órgãos, **caracterizado por** compreender manter os referidos tecidos ou órgãos na solução de conservação aquosa, como definido em qualquer uma das reivindicações 1-8, a uma temperatura compreendida entre 2-10°C.

Figuras

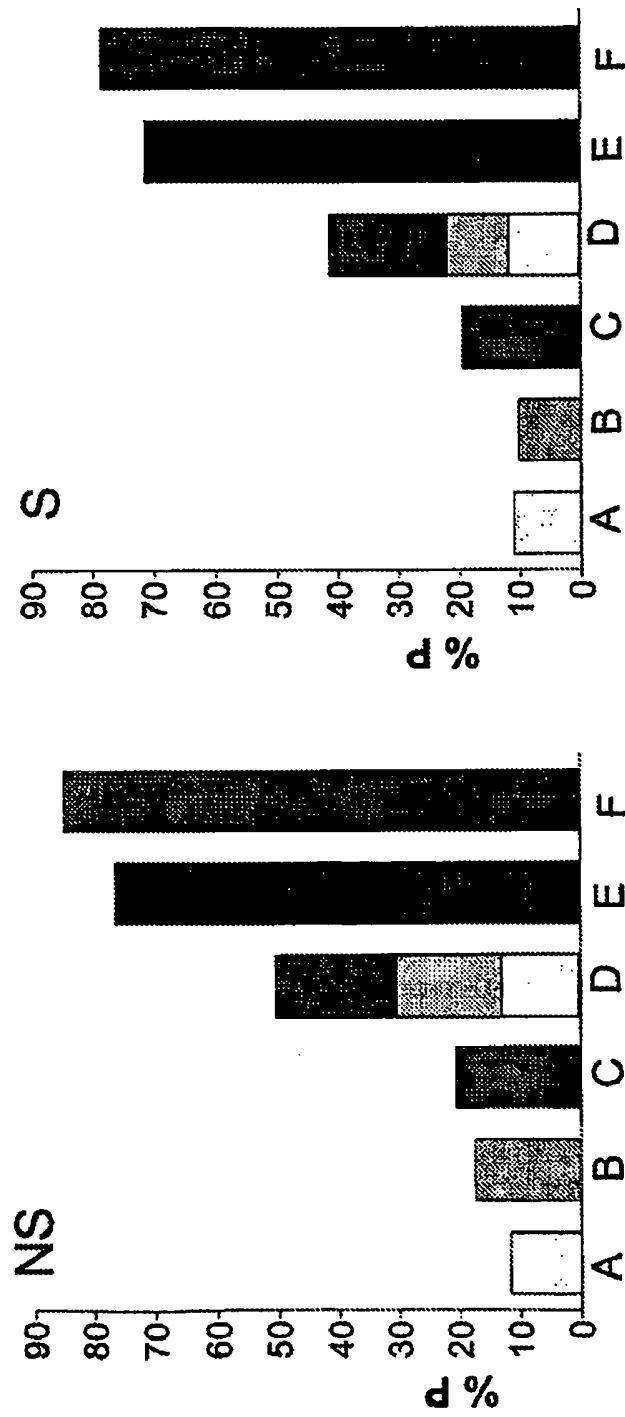
ALT(0 min)



A: UW+CVD
 B: UW+TMZ
 C: UW+TCR
 D: [UW+CVD]+[UW+TMZ]+ [UW+TCR]
 E: UW+CVD+TMZ+TCR
 F: P1

Fig.1

ALT(120 min)



- A: UW+CVD
 B: UW+TMZ
 C: UW+TCR
 D: [UW+CVD]+[UW+TMZ]+ [UW+TCR]
 E: UW+CVD+TMZ+TCR
 F: P1

Fig. 2

BÍLIS

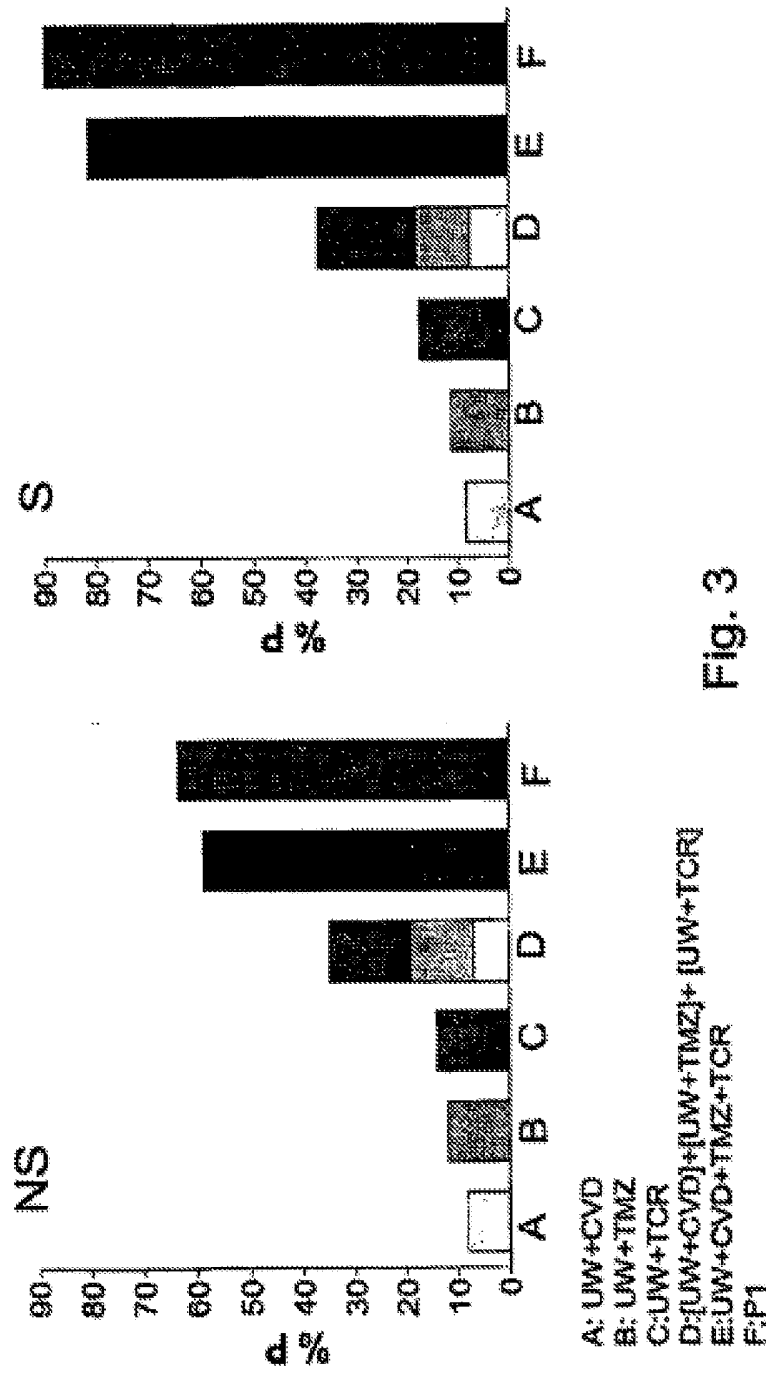


Fig. 3

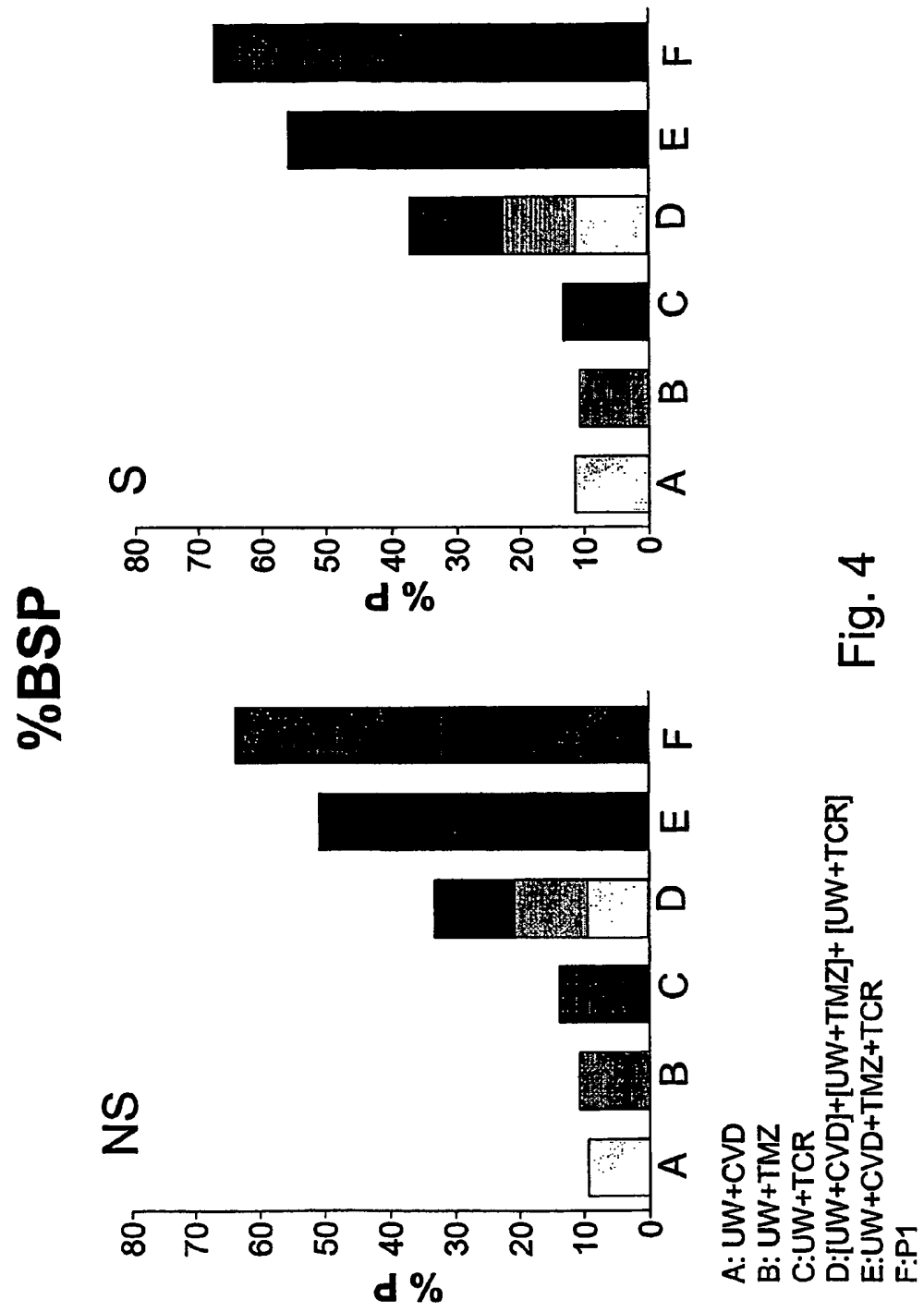


Fig. 4

ATP

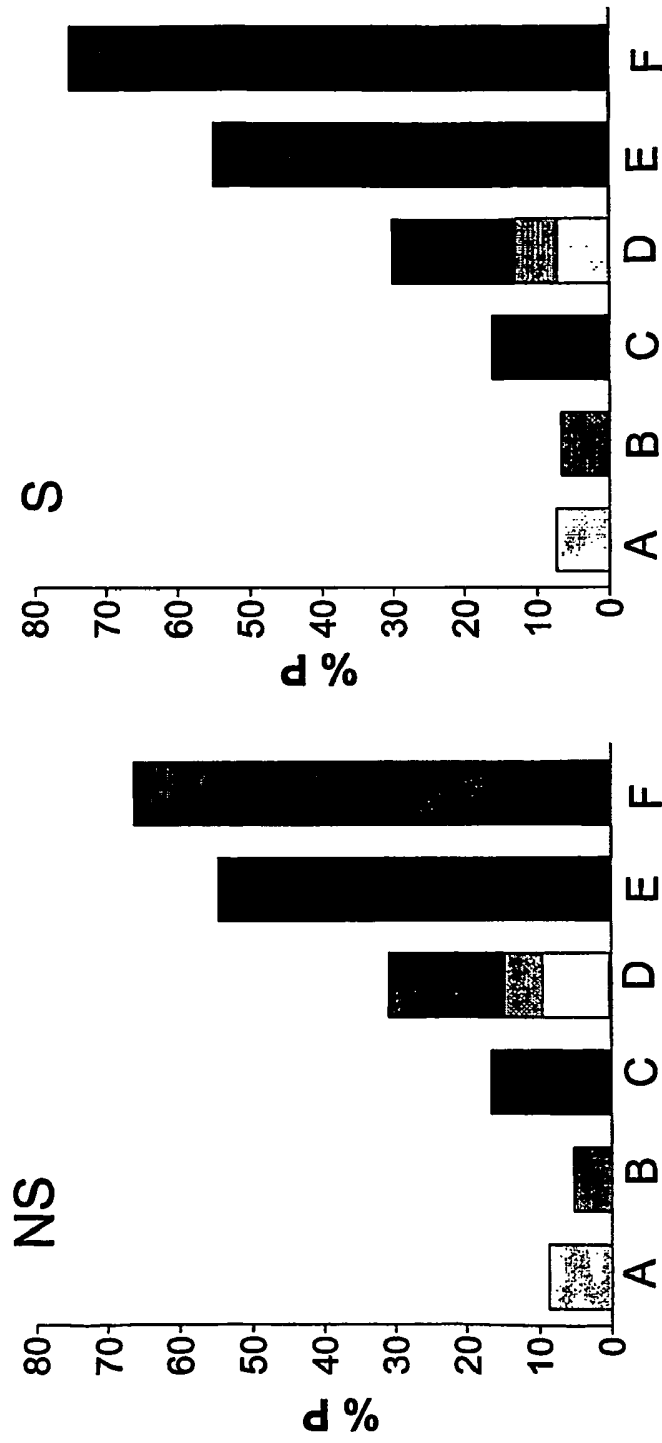
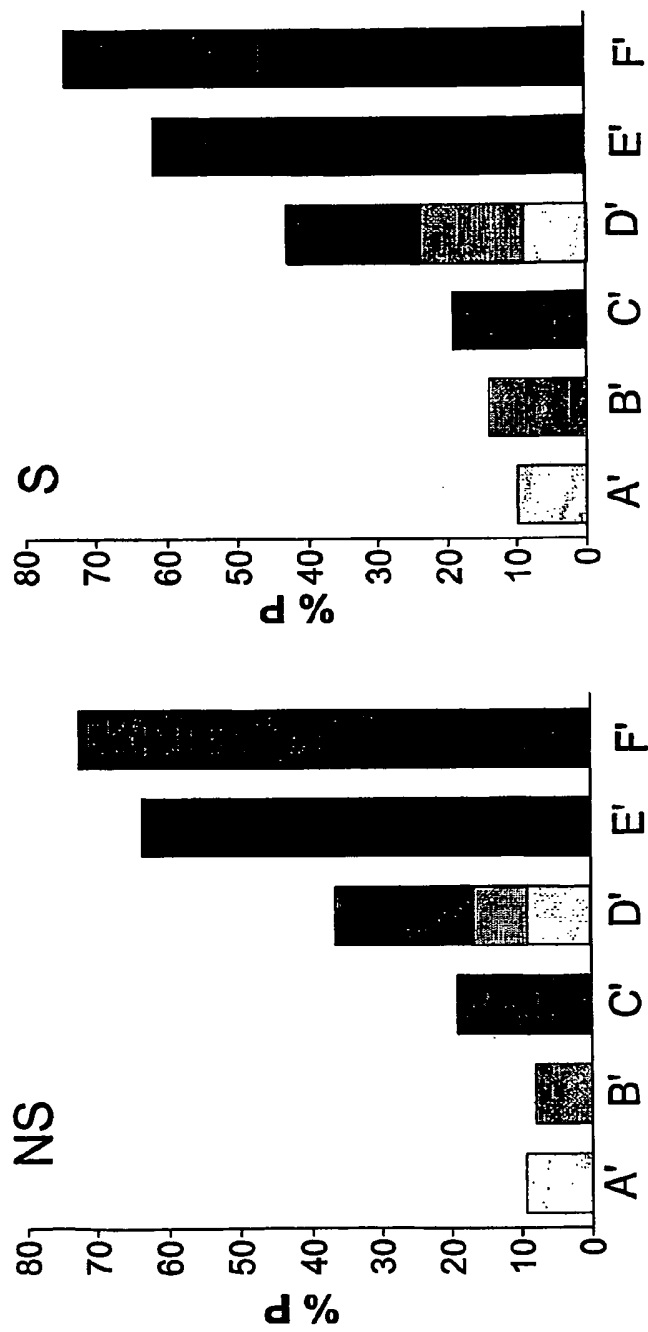


Fig. 5

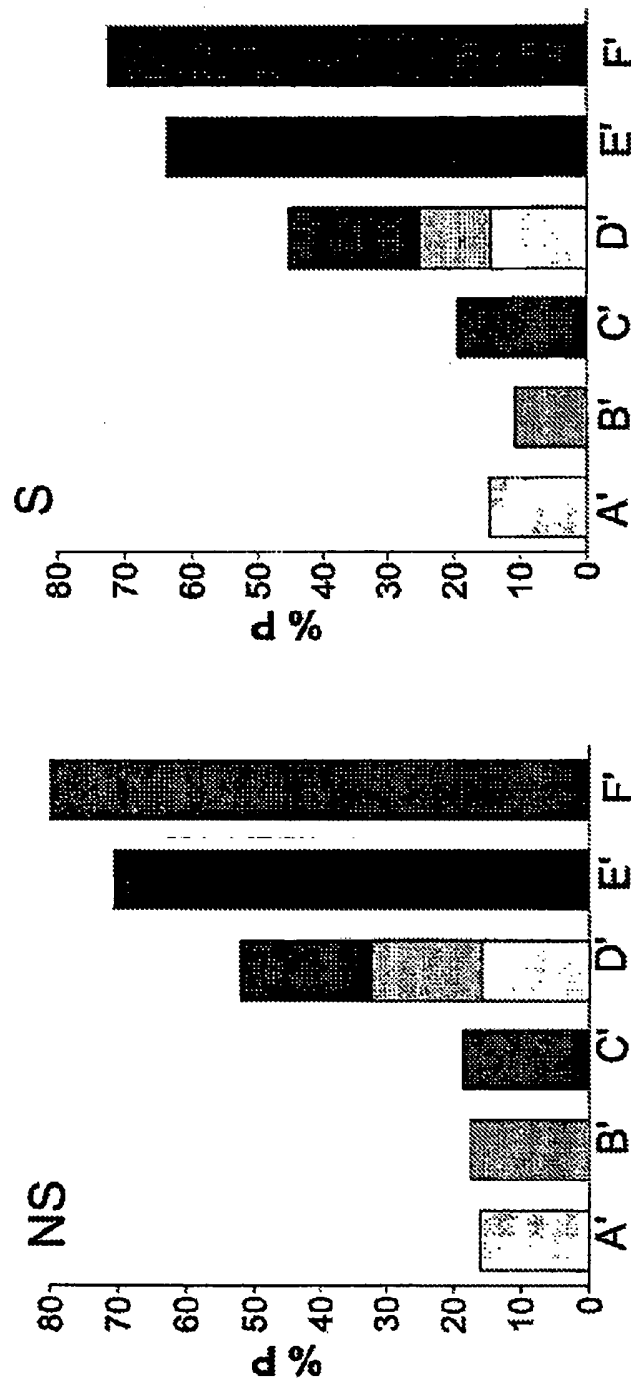
ALT(0 min)



- A': IGL+CVD
- B': IGL+TMZ
- C': IGL+TCR
- D': [IGL+CVD]+[IGL+TMZ]+[IGL+TCR]
- E': IGL+TCR+CVD+TMZ
- F': P1

Fig. 6

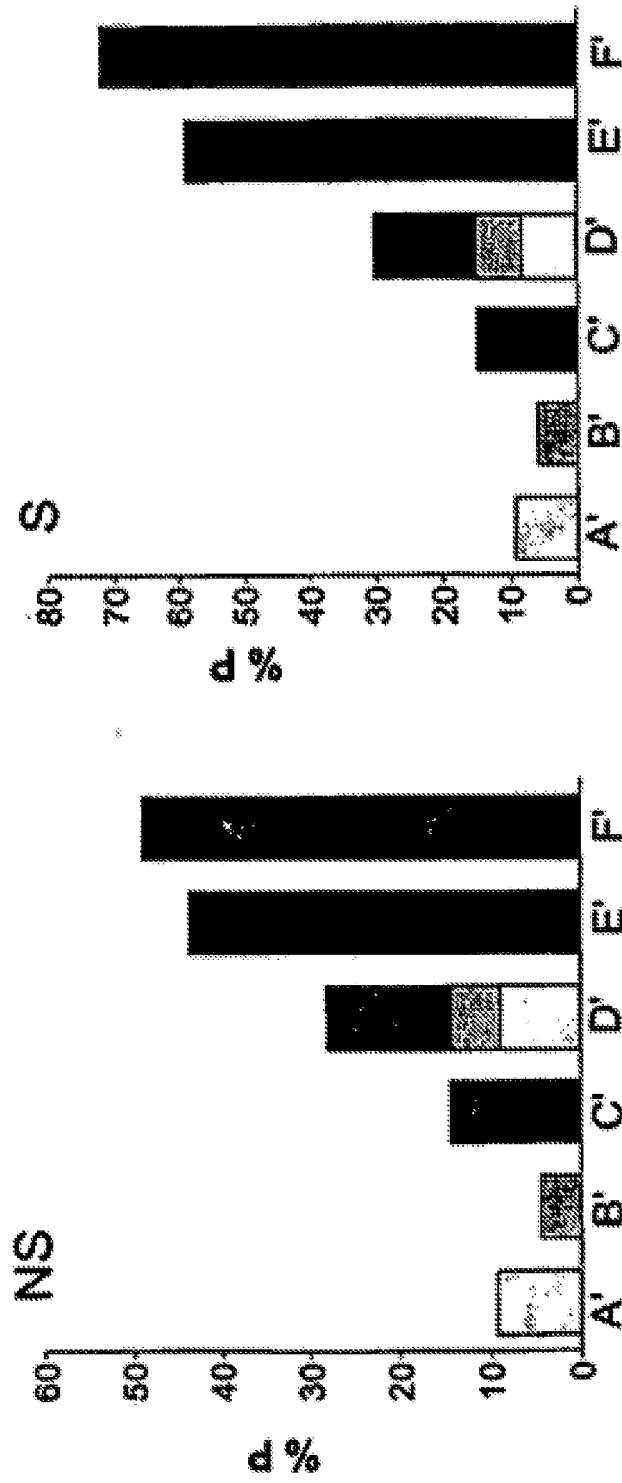
ALT(120 min)



A': IGL+CVD
B': IGL+TMZ
C': IGL+TCR
D': [IGL+CVD]+[IGL+TMZ]+[IGL+TCR]
E': IGL+TCR+CVD+TMZ
F': P1

Fig. 7

BÍLIS



A': IGL+CVD
 B': IGL+TMZ
 C': IGL+TCR
 D': [IGL+CVD]+[IGL+TMZ]+[IGL+TCR]
 E': IGL+TCR+CVD+TMZ
 F': P1

Fig. 8

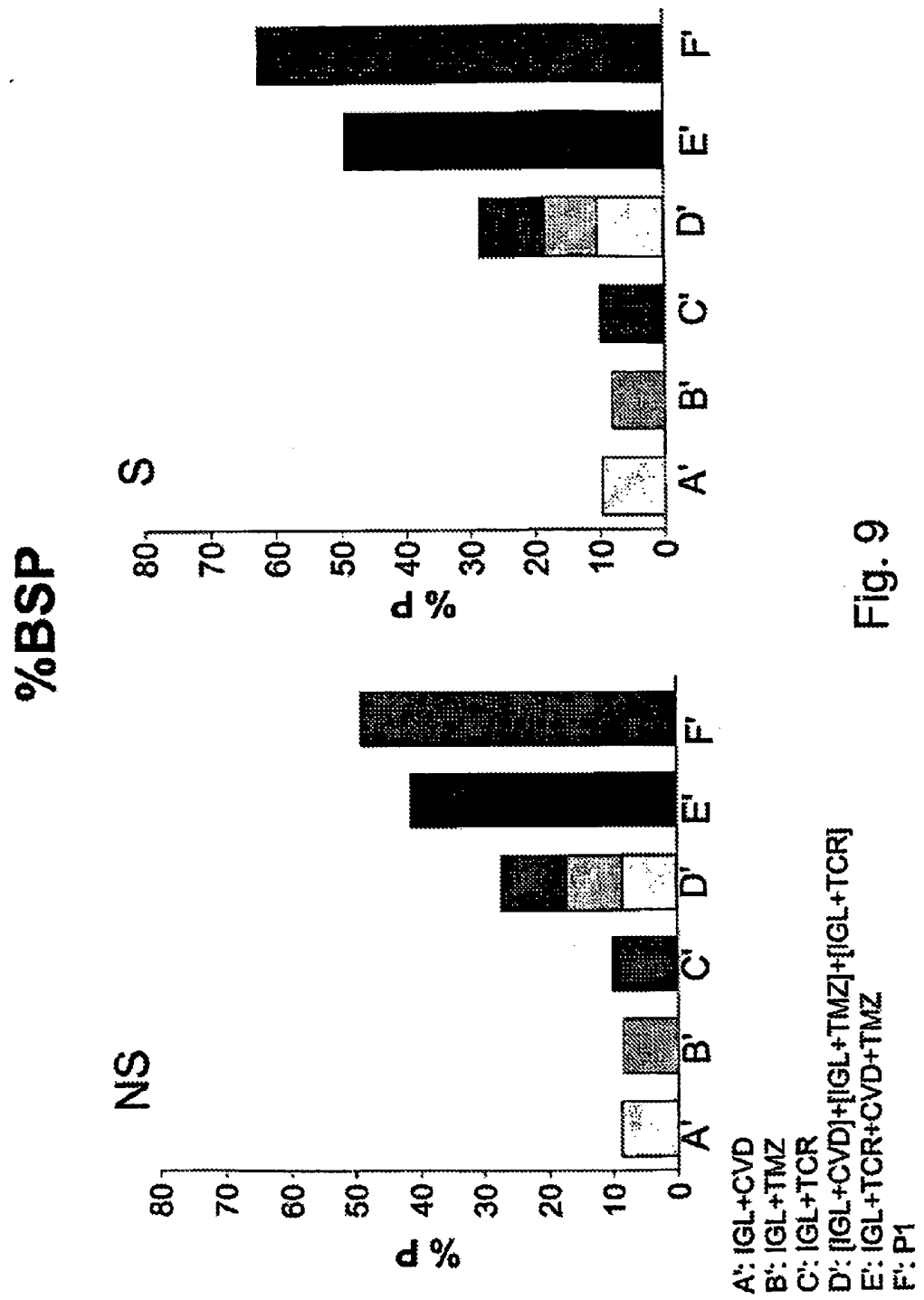


Fig. 9

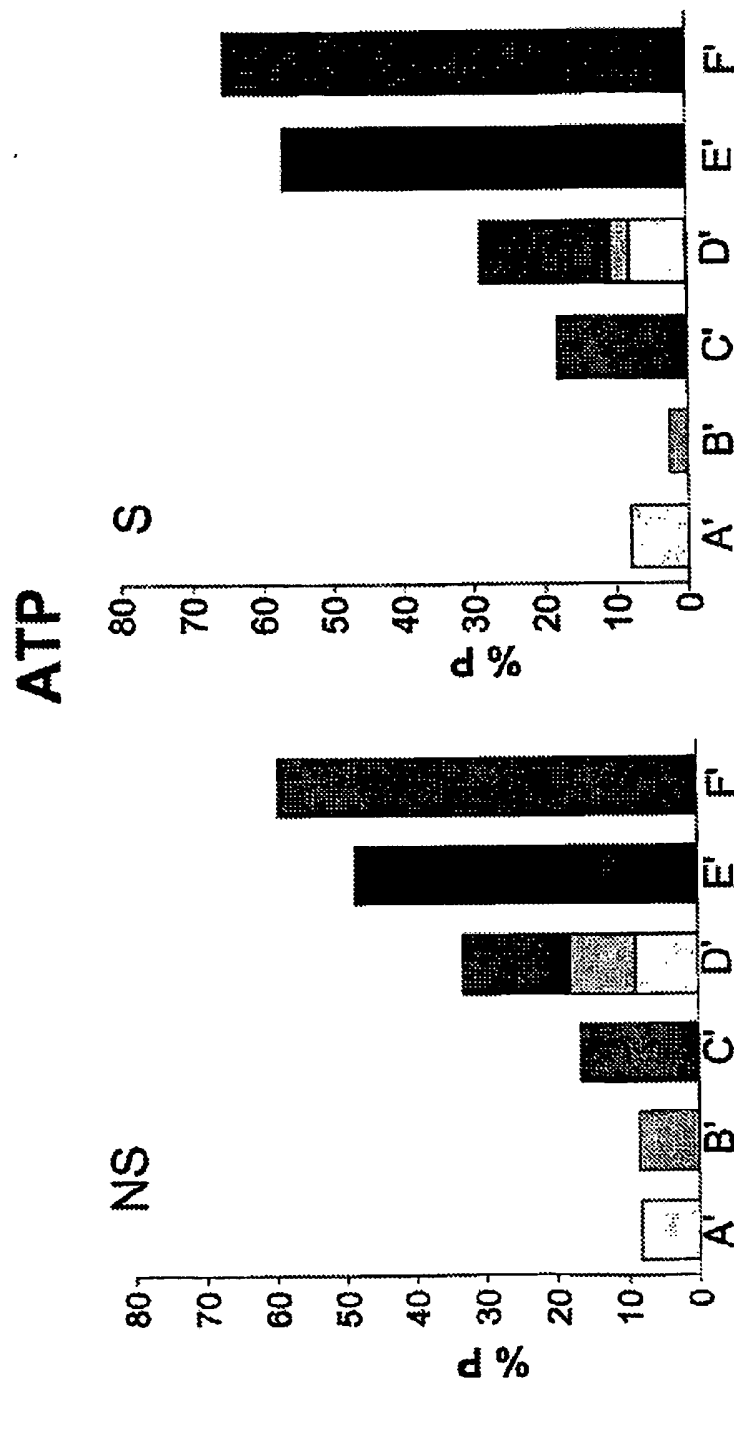


Fig. 10