



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0912815-8 A2



(22) Data do Depósito: 18/05/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 19/11/2019

(54) Título: SOLUÇÃO AQUOSA PARA A PRESERVAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS

(51) Int. Cl.: A01N 1/02.

(30) Prioridade Unionista: 19/05/2008 ES p200801560.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDAD DE BARCELONA; INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYER; CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

(72) Inventor(es): CARMEN PERALTA UROZ; JOAN ROSELLÓ-CATAFAU; ISMAIL BEN MOSBAH; RAMON BARTRONS BACH.

(86) Pedido PCT: PCT ES2009000267 de 18/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/141470 de 26/11/2009

(85) Data da Fase Nacional: 19/11/2010

(57) Resumo: SOLUÇÃO AQUOSA PARA A PRESERVAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS Proporciona-se uma solução aquosa aperfeiçoada para a preservação de tecidos e órgãos que compreende 5 carvedilol, tacrolimus, e trimetazidina. Observa-se um efeito sinérgico para esta solução de preservação que é particularmente efetivo em órgãos marginais, tais como fígados esteatósicos.

SOLUÇÃO AQUOSA PARA A PRESERVAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS

Refere-se a presente invenção a uma solução aquosa para preservar tecidos e órgãos, ao seu uso, com particularidade para preservar órgãos marginais e a um método para preservar tecidos e órgãos.

Técnica Anterior

O transplante de órgãos é o tratamento de escolha para pacientes que padecem de enfermidades crônicas em fase terminal. Apesar dos avanços no aperfeiçoamento das técnicas de transplante, a lesão que sofre o inserto durante o período de isquemia a subsequente reperfusão continua sendo um problema não solucionado na prática clínica.

Depois da remoção a partir de um doador e antes do transplante de enxerto em um receptor, o(s) órgão(s) e tecidos são submetidos a um período inerente de isquemia. Desta forma, as soluções líquidas usadas para preservar os órgãos e tecidos têm de cumprir uma série de requisitos: remoção do sangue do doador, conseguir um resfriamento rápido do órgão, e assegurar uma prevenção e proteção efetiva contra as lesões causadas pela isquemia.

A preservação hipotérmica estática é um método efetivo para a preservação dos órgãos durante curtos períodos de isquemia. Entretanto, períodos prolongados de isquemia estão associados com o não funcionamento primário do enxerto no transplante hepático, e com disfunção do enxerto no transplante renal. Adicionalmente à necessidade de ampliar o período de isquemia, a escassez de doadores e o subsequente aumento das listas de espera no transplante de órgãos derivou para a aceitação de órgãos marginais, os quais apresentam pouca tolerância face à lesão ocasionada por uma isquemia prolongada. No caso do transplante de fígado, a utilização de órgãos marginais tais como enxertos esteató-

sicos está associada com um risco aumentado de um não funcionamento primário ou disfunção do enxerto depois do transplante, comparado com os não esteatósicos. Além disso, alguns fígados esteatósicos são considerados não adequados para o transplante, acentuando ainda mais a falta de
5 órgãos para o transplante. É amplamente conhecido que a maioria das lesões apresentadas por um órgão marginal durante o transplante está relacionada com o período de preservação hipotérmica. Estas observações indicam que a preservação do órgão deve ser otimizada. Portanto, o objetivo principal na preservação de órgãos é procurar prolongar a tolerância do órgão à isquemia.
10

Existe evidência que indica que a composição das soluções de preservação é um fator da maior importância para a qualidade dos órgãos conservados durante períodos de isquemia prolongados. A solução de preservação, University of Wisconsin (UW), é considerada como a solução padrão para a preservação hepática, já que há resultado efetivo para reduzir o dano ocasionado pela isquemia fria e prolongou os limites dos tempos de armazenamento. Esta solução de preservação contém diferentes componentes encaminhados para melhorar a preservação do órgão, incluindo o colóide hidroxiletilamido, para prevenir o edema celular, a adenosina como uma fonte de ATP durante a reperfusão, o alopurinol e a glutathione com efeitos antioxidantes, e agentes impermeáveis à membrana celular, tais como o ácido lactobiônico e a rafinose. Entretanto, esta solução de preservação, UW, apresenta limitações relacionadas com a eficácia, uma vez que se observaram lesões irreversíveis nos órgãos submetidos a transplante quando se prolonga o período de isquemia fria (16 h-24 h).
15
20
25
30

O tacrolimus (TCR) é um composto macrólido com efetiva atividade imunossupressora, atividade antimicrobiana e

outras atividades farmacológicas e é de valor para a prevenção de reações de rejeição no transplante de órgãos e tecidos, bem como para desordens de origem auto-imune e infecciosa. É conhecido que a sua adição às soluções de preservação pode proteger contra a lesão ocasionada por reper-

5 fusão. Na literatura descreveu-se uma solução de preservação UW que contém tacrolimus (K. G. Rajesh et al., "Mitochondrial Permeability transition-pore inhibition enhances functional recovery after long-time hypothermic heart pre-

10 servation", Transplantation, 2003, vol. 76 (9), pp. 1314-20). A sua ação na preservação foi testada em corações. Não obstante, concluiu-se que o tacrolimus não tinha nenhum efeito na preservação.

O carvedilol (CVD) é um agente bloqueador β -

15 adrenérgico não seletivo e lipofílico com efeitos vasodilatores exercidos principalmente através do bloqueio seletivo do receptor α_1 e com um potente efeito antioxidante. A capacidade do carvedilol inibir a peroxidação de lipídeos é muito maior do que aquela obtida com outros bloqueadores β -

20 adrenérgicos testados, o que pode explicar os seus efeitos de proteção superiores em modelos de isquemia/reperfusão. Muito embora a adição de antioxidantes, tais como carvedilol, às soluções de preservação fosse sugerida na literatura (cf. B. Yard et al., "Prevention of cold-preservation

25 injury of cultured endothelial cells by catecholamines unrelated compounds", American Journal of transplantation, 2004, vol. 4, pp. 22-30), não se descreveu nenhuma solução de preservação específica que compreenda carvedilol.

Um trabalho recente indica que a adição de trimetazidina (TMZ) à solução de preservação UW melhorou a capacidade desta solução de preservação padrão proteger os dois, fígados não esteatósicos e, especialmente, fígados esteatósicos submetidos a períodos de isquemia prolongados (cf. I.

30

Ben Mosbah et al. "Trimetazidine: Is it a promising drug for use in esteatósico grafts?", World J Gastroenterol, 2006, vol. 12(6), pp. 908-914).

Não obstante, algumas das propriedades da solução UW, como o são a alta concentração de potássio (requerida para lavar o órgão antes da reperfusão do enxerto no receptor) e a presença de hidroxietil amido (HES) como suporte oncótico (que poderia ser responsável pela agregação dos glóbulos vermelhos) não favorece a preservação do órgão. Estudos recentes demonstraram que os dois tipos de enxertos de fígado (enxertos esteatósicos e não esteatósicos) são mais bem preservados em uma solução de preservação modificada a partir da UW (chamada IGL-1), que se caracteriza pela inversão nas concentrações de K^+ e Na^+ e na substituição do HES por polietilenoglicol (PEG) na solução UW original (cf. I. Ben Mosbah et al., "Preservation of esteatósico fígados in IGL-1 solution", Liver Transpl, 2006, vol. 12 (8), pp. 1215-23). Por outro lado, apesar dos aperfeiçoamentos oferecidos pela solução IGL-1, os efeitos prejudiciais ocasionados pela isquemia-reperfusão (I/R) permanecem sem resolver.

Permanece ainda uma necessidade de encontrar soluções de preservação que permitam prolongar a tolerância do órgão à isquemia e reduzir ao mínimo o risco inerente que sofrem os órgãos marginais submetidos ao transplante.

Sumário da Invenção

Muito embora se conheçam ou fossem sugeridas no estado da técnica soluções de preservação que contêm tacrolimus, carvedilol, ou trimetazidina, nunca foi sugerida uma solução aquosa para a preservação de órgãos e tecidos que compreenda uma combinação dos três princípios ativos farmacêuticos. Surpreendentemente, os inventores descobriram uma solução de preservação que contém uma combinação de ta-

crolimus, carvedilol, e trimetazidina aperfeiçoa de forma sinérgica a capacidade de preservação dos órgãos e tecidos submetidos a um período de isquemia prolongado. Particularmente, este efeito sinérgico é especialmente evidente em
5 órgãos marginais, tais como fígados esteatósicos, que torna a solução especialmente vantajosa uma vez que melhoraria as condições iniciais dos órgãos marginais que estão disponíveis para transplante, mas com deficientes resultados pós-operatórios, e poderia aumentar também o uso de órgãos que
10 atualmente são descartados para transplante e, portanto, aumentar a quantidade de órgãos disponíveis para serem transplantados.

Desta forma, um aspecto da presente invenção refere-se a uma solução de preservação aquosa para a preservação
15 ção de tecidos e órgãos que compreende uma quantidade efetiva de carvedilol, uma quantidade efetiva de tacrolimus, e uma quantidade efetiva de trimetazidina.

A solução de preservação aquosa da presente invenção permite manter tecidos ou órgãos durante um período de
20 tempo maior do que se consegue com outras soluções de preservação conhecidas. Outra vantagem da solução de preservação da invenção é que ela permite prolongar o tempo em que um tecido ou um órgão funcionam apropriadamente e em que é útil para transplante em comparação com o que se alcançaria com outras soluções de preservação.
25

Um segundo aspecto desta invenção refere-se ao uso da solução aquosa da presente invenção para preservar tecidos ou órgãos. A solução pode ser aplicada a tecidos ou órgãos de mamíferos, incluindo seres humanos. Exemplos dos
30 ditos tecidos compreendem veias e artérias.

Também forma parte desta invenção um método para preservar tecidos e órgãos que compreende manter os ditos tecidos ou órgãos na solução aquosa da presente invenção

sob uma temperatura compreendida entre 2-10°C. Ao mergulhar-se um tecido ou um órgão na solução de preservação aquosa da presente invenção, previne-se a lesão por reperfusão associada com a implantação do tecido ou órgão e a rejeição do transplante.

Da maneira que é usada neste caso, a frase "uma concentração efetiva de" um ingrediente ativo é a quantidade do ingrediente ativo que é de utilidade para a preservação de tecidos ou órgãos.

Qualquer valor em uma faixa dada neste caso pode estender-se ou ser alterado sem perder os efeitos procurados, tal como será evidente para a pessoa versada na técnica. Assim, as faixas dadas, tais como concentrações, e assemelhadas, deverão ser considerados aproximados, a não ser que estabelecido em contrário.

Por todas a descrição e nas reivindicações a palavra "compreende" e suas variantes não pretendem excluir outras características técnicas, aditivos, componentes ou etapas.

20 Descrição Breve dos Desenhos

As figuras (1-10) ilustram o efeito da adição de tacrolimus (TCR), carvedilol (CVD), e trimetazidina (TMZ) a algumas soluções de preservação, e os efeitos da solução de preservação do Exemplo 1 (P1) quando fígados esteatósicos (S) e não-esteatósicos (NS) foram submetidos a um período de isquemia prolongado. Nas Figuras, %P significa percentagem de proteção.

A Figura 1 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação UW quando os valores ALT foram avaliados no final do período de isquemia (0 min).

A Figura 2 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação UW quando os valores ALT foram avaliados no final da reperfusão (120 min.).

A Figura 3 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação UW quando a produção de bÍlis foi avaliada ao final da reperfusão (120 min.).

5 A Figura 4 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação UW quando se avaliou a % de desobstrução hepática de BSP na bÍlis durante a reperfusão.

A Figura 5 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação UW quando os nÍveis de ATP foram avaliados ao final da reperfusão (120 min.).

10 A Figura 6 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação IGL-1 quando os valores de ALT foram Avaliados ao final do período de isquemia (0 min.).

A Figura 7 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação IGL-1 quando os valores de ALT foram avaliados ao final da reperfusão (120 min.).

15 A Figura 8 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação IGL-1 quando a produção de bÍlis foi avaliada ao final da reperfusão (120 min.).

A Figura 9 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação IGL-1 quando a % de desobstrução hepática de BSP em bÍlis foi avaliada durante a reperfusão.

A Figura 10 ilustra a percentagem de proteção contra a solução de preservação IGL-1 quando os nÍveis de ATP foram avaliados ao final da reperfusão (120 min.).

25 Descrição Detalhada da Invenção

A solução aquosa da presente invenção pode ser aplicada a tecidos ou órgãos na ocasião da remoção do doador, e durante o seu armazenamento, transporte e eventual implante dentro do receptor. Ela pode ser usada para períodos curtos de isquemia e principalmente para períodos de isquemia prolongados.

30 Em uma concretização preferida da solução aquosa da presente invenção, a concentração de carvedilol varia de 5

até 10 microM, a concentração de tacrolimus varia de 5 até 10 microM, e a concentração de trimetazidina varia de 0,01 microM até 10 microM.

A fim de evitar a formação de edema de tecido e celular, a solução aquosa da presente invenção compreende polietileno glicol (PEG) que tem um peso molecular acima de 15.000, o que permite assegurar a pressão oncótica. Preferentemente, o PEG usado é um PEG de um peso molecular de 35.000. Ainda com maior preferência, o PEG é um PEG purificado não linear, o que quer dizer um PEG sintetizado partir de moléculas PEG de baixo peso molecular.

conseqüentemente, em outra concretização preferida, a solução aquosa da presente invenção tem um pH que varia de 6,5 a 8 e uma osmolaridade de 290 a 320 milimols/kg, e compreende ainda PEG dotado de um peso molecular superior a 15.000 em uma concentração de 0,01 até 5 mM, rafinose em uma concentração de 20 até 40 mM, MgSO₄ em uma concentração de 1 até 10 mM, H₂PO₄⁻ em uma concentração de 10 até 40 mM, íons de potássio em uma concentração de 30 até 50 mM, íons de sódio em uma concentração de 110 até 160 mM, e ácido lactobiônico em uma concentração de 70 até 140 mM.

Em outra concretização de maior preferência, a solução aquosa da presente invenção tem um pH de 7,4, uma osmolaridade de 320 milimols/kg, e uma concentração de PEG tendo um peso molecular superior a 15.000 de 0,03 mM, a concentração de rafinose é 30 mM, a concentração de MgSO₄ é 5 mM, a concentração de H₂PO₄⁻ é 25 mM, a concentração de íons de potássio é 40 mM, a concentração de íons de sódio é 120 mM, a concentração de ad lactobiônico 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. Preferentemente, o PEG tem um peso molecular de aproximadamente 35000.

É amplamente conhecido que a principal causa da não aceitação de órgãos para ser transplantados é a esteatose. As concretizações preferidas mencionadas anteriormente de uma solução de preservação da invenção permite aumentar a tolerância dos fígados esteatósicos à lesão ocasionada por isquemia-reperfusão associada com o transplante de fígado. Este fato permite melhorar a funcionalidade pós-transplante do enxerto esteatósico, e aumentar a disponibilidade de órgãos aptos para o transplante.

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

- polietileno glicol dotado de um peso molecular de cerca de 35000 em uma concentração de 0,03 mM,
 - rafinose em uma concentração de 30 mM,
 - MgSO₄ em uma concentração de 5 mM,
 - H₂PO₄⁻ em uma concentração de 25 mM,
 - íons de potássio em uma concentração de 40 mM,
 - íons de sódio em uma concentração de 120 mM,
 - ácido lactobiônico em uma concentração de 100 mM.
 - tacrolimus em uma concentração de 5 microM,
 - carvedilol em uma concentração de 10 microM, e
 - trimetazidina em uma concentração de 1 microM,
- e tem um pH de 7,4 e uma osmolaridade de 320 milimols/kg.

Ainda com maior preferência esta solução de preservação compreende, além disso, dexametasona em uma concentração de 16 g/l, e penicilina em uma concentração de 200.000 U/l.

Estas duas concretizações preferidas de uma solução de preservação da invenção não contêm alguns fármacos, tais como GSH, HES, insulina, alopurinol, e adenosina, que são incluídos em outras soluções de preservação já conhecidas (tais como as soluções de preservação UW e/ou IGL-1) e que demonstraram ser ineficazes ou mesmo ter efeitos prejudici-

ais no órgão preservado. Uma sinergia particularmente relevante foi observada para estas soluções de preservação preferidas pelo fato de que elas conferem proteção para os fígados tanto esteatósico quando não esteatósico em comparação com os resultados obtidos para outras soluções de preservação.

Tal como se mencionou anteriormente, um aspecto adicional da presente invenção refere-se ao uso de uma solução aquosa tal como descrita e reivindicada neste contexto para preservar tecidos ou órgãos. Em uma concretização preferida, o órgão é um órgão abdominal, tal como fígado, rim, e pâncreas. Preferentemente, o órgão abdominal é um órgão marginal, e ainda com maior preferência é um fígado esteatósico.

A solução de preservação de acordo com a presente invenção aplica-se à preservação hipotérmica estática e é usada sob uma temperatura situada entre 2 e 10°C, preferentemente entre 3 e 5°C, e ainda com maior preferência a 4°C.

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

Objetivos, vantagens e aspectos adicionais da invenção tornar-se-ão evidentes para aqueles versados na técnica em parte a partir da descrição e em parte a partir da prática da invenção. Os exemplos seguintes e desenhos são proporcionados a título de ilustração e não pretendem ser limitativos da presente invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Preparação de uma solução de preservação aquosa

Uma solução aquosa, cuja composição está ilustrada na Tabela 1, foi preparada de acordo com o processo exposto adiante.

Tabela 1:

	Concentração (mM)
Ácido lactobiônico	100
H ₂ PO ₄ ⁻	25
MgSO ₄	5
Rafinose	30
PEG 35000	0,03
Íons de potássio	40
Íons de sódio	120
Tacrolimus	5·10 ⁻³
Carvedilol	10·10 ⁻³
Trimetazidina	1·10 ⁻³

Etapa 1:

A uma solução que continha 1 g de polietileno glicol dialisado (PEG 35.000), adicionaram-se 4,11 mg de tacrolimus (TCR) e submeteu-se a agitação para formar uma primeira solução.

Etapa 2:

Adicionaram-se 35,83 g de ácido lactobiônico a um receptáculo de um litro que continha 800 ml de água (destilada e deionizada) sob temperatura ambiente e submeteu-se a agitação até ser dissolvido. Então, adicionaram-se 0,60 g de MgSO₄, 22,5 ml de 5N NaOH, 6 ml de 5N KOH, 3,4 g de KH₂PO₄, e 17,83 g de rafinose para formar uma segunda solução. Subseqüentemente adicionaram-se a esta segunda solução 1 ml de uma solução que continha TMZ a partir de uma solução de estoque (solução de estoque: 2,66 mg de TMZ dissolvido em 10 ml de água) e 10 ml de CVD a partir de uma solução de estoque (solução de estoque: 6,5 mg de carvedilol em 8 ml de ácido tartárico e 8 ml de água).

A solução preparada na etapa 1 foi misturada com a solução preparada na etapa 2, e então se adicionou 5 N NaOH conforme necessário para ajustar o pH para 7,4 ± 0,1.

Finalmente, adicionou-se água ao receptáculo para trazer o volume para 1 litro, e então a solução foi filtrada, e esterilizada. Obteve-se uma solução dotada de uma osmolaridade de 320 ± 10 mOsm/l. Antes do uso, adicionaram-se dexametasona (16 g/l) e penicilina (200.000 U/l).

EXEMPLO 2

Neste exemplo, comparou-se o efeito da solução aquosa da presente invenção sobre o fígado em relação ao efeito obtido quando se usaram soluções de preservação UW e IGL-1.

Avaliaram-se a lesão e funcionalidade hepática pela medição das transaminases, produção de biliar, desobstrução hepática (%BSP) e teor de ATP.

Para realizar o estudo, utilizaram-se ratos Zucker homozigotos (obesos, Ob) e heterozigotos (magros, Ln), com idade entre 16-18 semanas, procedentes de Iffa-Credo (L'Abresle, France). Utilizou-se um modelo de fígado perfundido isolado para avaliar a lesão e funcionalidade, sem a influência de outros órgãos, de constituintes plasmáticos e efeitos neuronais/hormonais. Neste modelo experimental preserva-se a arquitetura hepática, micro circulação e produção de biliar. Este modelo experimental usado foi considerado na literatura como apropriado para testar a eficiência de diferentes soluções de preservação para transplante. Todos os procedimentos foram realizados sob a influência de anestesia inalatória de isoflurano. O estudo respeitou as regulamentações da União Européia sobre a realização de experiências em animais (Directiva 86/609/CEE).

Obtenção do fígado e grupos experimentais

A técnica cirúrgica foi realizada tal como descrita em estudos anteriores (I. Ben Mosbah, et al. "Preservation of esteatósico fígados in IGL-1 solution", Liver Transpl 2006, vol. 12 (8), pp. 1215-23, and I. Ben Mosbah et al.

"Addition of adenosine monophosphate-activated protein kinase activators to University of Wisconsin solution: a way of protecting rat esteatósico fígados", Liver Transpl., 2007, vol. 13(3), pp. 410-25). Depois de canulação do conduto biliar comum, isolou-se a veia porta e ligaram-se as ramificações esplênica e pilórica. Todos os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais tais como descritos adiante.

Soluções de preservação e grupos experimentais

10 A composição das soluções de preservação UW, IGL-1 e P1 está ilustrada na Tabela 2, sendo P1 uma solução de preservação de acordo com a presente invenção.

Tabela 2:

Componentes	Propriedades	UW	IGL-1	P1
Na ⁺ (mmol)	Cátion	30	100	120
K ⁺ (mmol)	Cátion	100	30	40
Mg ²⁺ (mmol)	Cátion	5	5	5
Sulfato (mmol)	Tampão	5	5	5
Fosfato (mmol)	Tampão	25	25	25
Ácido lactobiônico (mmol)	Tampão	100	100	100
Rafinose (mmol)	Açúcar	30	30	30
HES (g/l)	Colóide	50	-	-
PEG (g/l)	Colóide	-	1	1
Adenosina (mmol)	Fonte energética	5	5	-
Allopurinol (mmol)	Antioxidante	1	1	-
GSH (mmol)	Antioxidante	3	3	-
Trimetazidina (µmol)	Protetor Mitochondrial	-	-	1
Carvedilol (µmol)	Antioxidante	-	-	10

Tacrolimus (μmol)	Anti-inflamatório	-	-	5
Insulina (U/l)	Protetor Mitocondrial	40	40	-
Dexametasona (g/l)	Protetor de Membrana	16	16	16
Penicilina (U/l)	Antibiótico	200.000	200.000	200.000

HES = hidroxietil amido; GSH = Glutathiona.

A) Estudo I: P1 vs. Solução UW

- 1) UW: Fígados provenientes de 16 ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C na solução UW.
- 5 2) UW+CVD: Fígados provenientes de 16 ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em solução UW contendo 10 μM of carvedilol.
- 3) UW+TMZ: Fígados provenientes de 16 Ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em solução UW
10 contendo 1 μM de trimetazidina.
- 4) UW+TCR: Fígados provenientes de 16 Ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em UW solução que continha 5 μM de tacrolimus.
- 5) UW+CVD+TMZ+TCR: Fígados provenientes de 16 Ratos Zucker
15 (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em solução UW que continha 10 μM de carvedilol, 1 μM de trimetazidina, e 5 μM de tacrolimus.

Os resultados obtidos nos grupos 1-5 foram comparados com aqueles obtidos quando fígados provenientes de 16
20 Ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em P1 solução de preservação.

B) Estudo II: P1 vs. IGL-1

- 1) IGL: Fígados provenientes de 16 Ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h at 4°C in IGL-1 soluti-
25 on.

2) IGL+CVD: Fígados provenientes de 16 Ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em solução IGL-1 que continha 10 µM de carvedilol.

3) IGL+TMZ: Fígados provenientes de 16 Ratos Zucker (8 Ln e 8Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em solução IGL-1 que continha 1µM of trimetazidina.

4) IGL+TCR: Fígados provenientes de 16 Ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em solução IGL-1 que continha 5 µM de tacrolimus.

5) IGL+CVD+TMZ+TCR: Fígados provenientes de 16 Ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em solução IGL-1 que continha 10 µM de carvedilol, 1µM de trimetazidina, e 5 µM de tacrolimus.

Os resultados obtidos nos grupos 1 a 5 foram comparados com aqueles obtidos quando fígados provenientes de 16 Ratos Zucker (8 Ln e 8 Ob) foram preservados durante 24 h a 4°C em solução de preservação P1.

Procedimento

Depois de 24 h de preservação fria do enxerto, mediram-se os níveis de alanina aminotransferase acumulada (ALT) depois de isquemia prolongada. Além disso, depois de 24 h de preservação fria do enxerto, e com a finalidade de imitar o período isquêmico quente sofrido pelo enxerto durante o implante cirúrgico no receptor, expuseram-se os fígados a 22°C durante 30 min. Os fígados foram então conectados por meio da veia porta a um sistema de perfusão circulatória e foram perfundidos durante 120 min a 37°C. Durante os primeiros 15 min de perfusão, o fluxo foi aumentado progressivamente a fim de estabilizar a pressão portal em 12 mm Hg (Pression Monitor BP-1, Instruments, Inc, Sarasota, FL, USA). O fluxo foi controlado utilizando-se uma bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson, France). O líquido de perfusão consistiu de um meio de cultura de células

(William's medium E, Bio Whitaker, Spain) com a solução Krebs-Heinseleit- albumina. O líquido de perfusão foi oxigenado com uma mistura de gases 95% O₂ e 5% CO₂ e a temperatura do líquido de perfusão foi mantida a 37°C. No final da reperfusão normotérmica (120 min) coletaram-se alíquotas de líquido de perfusão para se avaliar a ALT. Também se avaliou a produção de bÍlis e a desobstrução hepática (%BSP) em amostras de bÍlis e o conteúdo de ATP em amostras de fÍgado.

10 Determinações BioquÍmicas

-Ensaio de transaminases. Como parâmetro de lesão hepática, avaliaram-se as transaminases de acordo com as instruções proporcionadas por kits comerciais provenientes de Boehringer Mannheim (Munich, Germany).

15 - Produção de BÍlis. A produção de bÍlis foi avaliadas como um parâmetro da função hepática. A bÍlis foi coletada através do conduto de bÍlis e a produção de bÍlis foi estimada pela medição do volume de bÍlis obtido depois de 120 min de perfusão e reportado como µl/g figado.

20 - Desobstrução hepática de BSP. Da mesma forma que com a produção de bÍlis, a desobstrução hepática de BSP é considerada como outro parâmetro confiável da função Hepática. Adicionaram-se 10 mg de BSP (bromossulfoftaleína) ao líquido de perfusão trinta minutos depois da perfusão de partida. A concentração de BSP nas amostras de bÍlis foi determinada por medição da absorvência sob 580 nm. A desobstrução hepática de BSP foi expressa como % de BSP.

25 -ATP. Homogeneizaram-se amostras de fÍgado em uma solução que continha ácido perclórico, e os níveis de ATP foram medidos por cromatografia líquida de alta resolução.

30 Estudo Estatístico

Os dados expressaram-se como valor da média ± erro padrão da média. Os dados obtidos foram submetidos a um

estudo estatístico mediante um teste de análise de variação, e determinou-se o nível de significação estatística por meio do teste Student-Newman-Keuls. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

Os níveis de ALT foram avaliados para predizer o dano hepático depois do período de preservação do enxerto. Esta determinação constituiu-se em uma ferramenta valiosa para predizer o dano do órgão depois da preservação fria. Ao final da isquemia fria, observaram-se níveis mais altos de transaminases nos fígados esteatósicos do que nos fígados não esteatósicos preservados com soluções seja de UW ou de IGL. Isto confirma a pouca tolerância apresentada pelos fígados esteatósicos aos efeitos danosos causados durante a isquemia fria. Os valores de ALT (U/l) ao final da isquemia fria para enxertos preservados em solução UW foram $32,87 \pm 2,91$ e $152,23 \pm 2,21$ para fígados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente. Os valores de ALT (U/L) ao final da isquemia fria para os enxertos preservados em solução IGL foram de $21,44 \pm 0,62$ e $87,47 \pm 3,20$ para fígados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente.

Observaram-se níveis de transaminase mais altos nos fígados esteatósicos ao final da reperfusão comparados com aqueles encontrados em fígados não esteatósico. Os valores de ALT (U/L) ao final da reperfusão para enxertos preservados em solução de preservação UW foram $45,05 \pm 3,53$ e $159,11 \pm 3,01$ para fígados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente. Os valores de ALT (U/l) ao final da reperfusão para os enxertos preservados em solução de preservação IGL foram $35,62 \pm 2,32$ e $121,41 \pm 1,23$ para fígados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente.

A funcionalidade hepática foi avaliada medindo-se a produção de bÍlis e a desobstrução hepática (%BSP). A pro-

dução de bÍlis e %BSP foram mais baixas nos fÍgados esteatósicos preservados em soluções seja de UW ou em IGL do que nos fÍgados não esteatósicos. Os valores da produção biliar ($\mu\text{l/g/120 min}$) ao final da reperfusão para fÍgados preservados em solução UW foram $9,55\pm 0,25$ e $1,46\pm 0,18$ para fÍgados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente. Is valores de produção de bÍlis ($\mu\text{l/g/120 min}$) ao final da reperfusão para fÍgados preservados em solução IGL foram $14,25\pm 0,63$ e $3,44\pm 0,38$ para fÍgados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente. Os valores de % BSP em bÍlis ao final da reperfusão para fÍgados preservados em solução UW foram $6,13\pm 1,13$ e $4,70\pm 0,65$ para fÍgados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente. Os valores de % BSP em bÍlis ao final da reperfusão para fÍgados preservados na solução IGL foram $8,04\pm 0,61$ e $7,34\pm 0,58$ para fÍgados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente.

Ao final da reperfusão observaram-se nÍveis de ATP menores em fÍgados esteatósicos preservados em soluções seja de UW ou de IGL-1 do que aqueles registrados para fÍgados não esteatósico. Os valores de ATP ($\mu\text{M/g}$) ao final da reperfusão para fÍgados preservados em solução UW foram $0,90\pm 0,02$ e $0,61\pm 0,03$ para fÍgados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente. Os valores de ATP ($\mu\text{M/g}$) ao final da reperfusão para fÍgados preservados em solução IGL foram $1,19\pm 0,09$ e $0,77\pm 0,06$ para fÍgados não esteatósicos e esteatósicos, respectivamente.

As Tabelas 3-6 em seguida mostram o efeito da adição de tacrolimus (TCR), carvedilol (CVD), e trimetazidina (TMZ) s soluções de preservação conhecidas, e o efeito da solução de preservação do Exemplo 1 (P1) quando se submetem fÍgados esteatósico e não esteatósico a perÍodos de isquemia prolongados. Os Valores estão expressos como percentagem de proteção contra soluções de preservação UW ou

IGL-1 de parâmetros de lesão e funcionalidade hepática: ALT ao final de 24 h de isquemia (0 min), ALT ao final de 120 min de reperfusão (120 min.), produção de bÍlis, % BSP, e conteúdo de ATP ao final da reperfusão (120 min.).

5 Tabela 3: Fígados não esteatósicos (provenientes de ratos Zucker Ln) em solução de preservação 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 esteatósicos (provenientes de ratos Zucker Ob) em solução de preservação 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 esteatósicos (provenientes de ratos Zucker Ln) em solução de preservação 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

5 Tabela 6: Fígados esteatósicos (provenientes de ratos Zucker Ob) em solução de preservação 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
Bile	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

De acordo com os parâmetros de lesão e funcionalidade hepática, os presentes resultados indicam que a adição

combinada de tacrolimus, carvedilol e trimetazidina, às soluções de preservação UW ou IGL-1 (UW+TCR+CVD+TMZ ou IGL-1+TCR+CVD+TMZ) resultou em um grau de proteção maior tanto em fígados tanto esteatósicos quanto não esteatósicos, comparados com os resultados obtidos quando se adicionaram tacrolimus, carvedilol e trimetazidina, separadamente da solução de preservação 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 preservação P1 proporcionou um grau de proteção maior para os fígados tanto esteatósicos quanto não esteatósico em comparação com os resultados obtidos para UW+TCR+CVD+TMZ e IGL-1+TCR+CVD+TMZ.

Resumindo, a partir dos resultados expostos nas Tabelas 3-6, pode constatar-se que se observa um efeito sinérgico para as soluções da presente invenção, o que é especialmente evidente para a solução de preservação P1. Este efeito sinérgico é particularmente aperfeiçoado em fígados esteatósicos.

REIVINDICAÇÕES

1. Solução aquosa para a preservação de tecidos e órgãos, compreendendo uma quantidade eficaz de carvedilol, uma quantidade eficaz de tacrolimus, e uma
5 quantidade eficaz de trimetazidina.

2. Solução, de acordo com a reivindicação 1, em que a concentração de carvedilol compreende entre 5 e 10 microM, a concentração de tacrolimus compreende entre 5 e 10 microM e a concentração de trimetazidina compreende
10 entre 0,01 e 10 microM.

3. Solução, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, tendo um pH de 6,5 a 8 e uma osmolaridade de 290 a 320 milimoles/kg e que compreende ainda:

15 - polietileno glicol com um peso molecular acima de 15.000 em uma concentração de 0,01 a 5 mM,

- rafinose em uma concentração de 20 a 40 mM,

- MgSO₄ em uma concentração de 1 a 10 mM,

- H₂PO₄⁻ em uma concentração de 10 a 40 mM,

20 - íons de potássio em uma concentração de 30 a 50 mM,

- íons de sódio em uma concentração de 110 a 160 mM, e

25 - ácido lactobiônico em uma concentração de 70 a 140 mM.

4. Solução, de acordo com a reivindicação 3, em que o pH é 7,4, a osmolaridade é de 320 milimoles/kg, a concentração de polietileno glicol é 0,03 mM, a concentração de rafinose é 30 mM, a concentração de MgSO₄ é de 5 mM, a concentração de H₂PO₄⁻ é 25 mM, a concentração de íons potássio é de 40 mM, a concentração de íons de sódio é de 120 mM, a concentração de ácido lactobiônico é de 100 mM, a concentração de tacrolimus é de 5 microM, a
30

concentração do carvedilol é de 10 microM e a concentração de trimetazidina é de 1 microM.

5. Solução, de acordo com a reivindicação 4, composta por:

- 5 - polietileno glicol com um peso molecular de cerca de 35000 em uma concentração de 0,03 mM,
- rafinose em uma concentração de 30 mM,
- MgSO₄ em uma concentração de 5 mM,
- H₂PO₄⁻ em uma concentração de 25 mM,
- 10 - íons de potássio na concentração de 40 mM,
- íons de sódio em uma concentração de 120 mM,
- ácido lactobiônico em uma concentração de 100 mM,
- tacrolimus em uma concentração de 5 microM,
- 15 - carvedilol em uma concentração de 10 microM, e
- trimetazidina em uma concentração de 1 microM.

6. Solução, de acordo com a reivindicação 5, que compreende ainda a dexametasona em uma concentração de 16 g/l e penicilina em uma concentração de 200.000 U/l.

20 7. Uso da solução tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 para a preservação de um tecido ou órgão.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, em que o órgão é um órgão abdominal.

25 9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, em que o órgão abdominal é um órgão marginal.

30 10. Método para preservar tecidos e órgãos que compreende a manutenção desses tecidos ou órgãos na solução de preservação aquosa, tal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 em uma temperatura compreendida entre 2 a 10 °C.

RESUMO

SOLUÇÃO AQUOSA PARA A PRESERVAÇÃO DE TECIDOS E ÓRGÃOS

Proporciona-se uma solução aquosa aperfeiçoada para a preservação de tecidos e órgãos que compreende
5 carvedilol, tacrolimus, e trimetazidina. Observa-se um efeito sinérgico para esta solução de preservação que é particularmente efetivo em órgãos marginais, tais como fígados esteatósicos.