

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 456**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

A61N 7/00 (2006.01)

A61F 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/EP2015/080688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15813848 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3232777**

54 Título: **Conservación y transporte de una muestra biológica ex-vivo que comprende la aplicación de ultrasonido**

30 Prioridad:

19.12.2014 EP 14382548

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

23.08.2024

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ DE RECERCA CLÍNIC BARCELONA-
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES
AUGUST PI I SUNYER (100.0%)
c/Rosselló, 149-153
08036 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

PERALTA, CARMEN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 977 456 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conservación y transporte de una muestra biológica *ex-vivo* que comprende la aplicación de ultrasonido

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un dispositivo para el transporte y la conservación de una muestra biológica *ex-vivo* que comprende una cámara para contener la muestra biológica, delimitada por paredes hechas de un material aislante térmico y medios de refrigeración para mantener la temperatura dentro de la cámara por debajo de la temperatura exterior del dispositivo, así como a un método correspondiente para la conservación de la muestra biológica.

La invención también se refiere al uso del dispositivo de acuerdo con la invención para el transporte y la conservación de una muestra biológica *ex-vivo* con vistas a su posterior trasplante en un ser humano o animal vivo, o para una investigación de laboratorio posterior.

15 **Estado de la técnica**

En la invención, el concepto de "muestra biológica *ex-vivo*" se refiere a un órgano o tejido que puede ser transportado para su posterior trasplante en un ser humano o animal vivo, o para su posterior investigación en laboratorio.

Por ejemplo, es bien conocido en el campo de los trasplantes que el síndrome de isquemia/reperfusión (I/R) es una de las principales causas tanto de disfunción primaria del injerto (PGD) como de fracaso primario del injerto (PGF), siendo necesario otro trasplante en este último caso. A pesar de los avances logrados en las técnicas quirúrgicas en las últimas décadas, la lesión que sufre el injerto durante el periodo en el que se transporta el órgano donante hasta que se implanta en el receptor (tiempo de isquemia fría) sigue siendo un gran problema social y clínicamente relevante aún por resolver. La incidencia de PGF es del 5-10 % y la incidencia de PGD es del 20-30 % entre los órganos trasplantados. Todo esto da como resultado negativamente una mala calidad de vida del paciente, la necesidad de volver a trasplantar y más problemas en la disponibilidad de órganos para trasplante.

Existen diferentes métodos para almacenar un injerto desde que se retira del donante hasta que se implanta en el receptor. En el caso de la conservación dinámica normotérmica, las condiciones *in vivo* del injerto se imitan en la mayor medida posible durante todo el periodo de conservación. Para tal fin, se evita la hipotermia, y se proporciona la entrada de oxígeno al injerto para evitar la hipoxia y un reservorio para la salida del producto de desecho.

En la conservación hipotérmica estática, que es el método de conservación convencional, antes de que el injerto del donante sea trasplantado en un receptor, el órgano u órganos y tejidos del donante están sometidos a un tiempo de isquemia inherente. En tales condiciones, el método utilizado para conservar el órgano y los tejidos debe cumplir los siguientes requisitos: extraer la sangre del injerto y enfriar rápidamente el injerto mediante perfusión del injerto con la solución a 4 °C, cubriendo el injerto con hielo para asegurar condiciones de frío (2-6 °C) y condiciones isquémicas. Como resultado, la lesión que sufre el injerto durante la isquemia fría, es decir, debido a la falta de suministro de sangre y oxígeno en condiciones de frío, se reduce.

Desde el momento en que se extrae el órgano del donante, el injerto se coloca en un refrigerador, se sumerge en la solución conservante y se suele mantener a 4 °C hasta su implantación en el receptor. La solución más utilizada en la técnica es la solución de la Universidad de Wisconsin, a continuación en el presente documento solución UW.

La lesión que sufre el injerto durante el transporte en el refrigerador hasta su implantación en el receptor (tiempo de isquemia fría, que no suele ser inferior a 6 horas) es un factor clave. Este factor es responsable de la PGD y del PGF y afecta negativamente a los resultados postoperatorios, la calidad de vida y supervivencia del paciente. Se sabe que cuanto más tiempo permanezcan los órganos en el refrigerador, menor será la viabilidad del injerto que se trasplantará. La lesión que sufren los injertos durante la fase de isquemia fría es la principal razón por la que un número considerable de órganos (35 %) no pueden considerarse adecuados para trasplante dadas sus condiciones patológicas (injertos de riñón de personas mayores, donantes diabéticos y/o hipertensos, injertos de hígado graso, etc...). Estos órganos son extremadamente vulnerables a las lesiones que sufren durante el transporte, antes de ser implantados en el receptor, y tienen un mayor riesgo de experimentar PGD y PGF. Por tanto, no son viables para el trasplante. Estas observaciones indican que existe una necesidad de encontrar alternativas para reducir la lesión que sufren los injertos durante la isquemia fría antes de ser implantados en el receptor.

Muchos de los componentes presentes en los fluidos de conservación, cuyo objetivo es proteger el injerto en condiciones de isquemia fría en el refrigerador durante su transporte hasta su implantación en el receptor, no entran en el injerto y si lo hacen, no llegan al sitio de acción en concentraciones óptimas para protegerlo. De hecho, se ha descubierto que cuando algunos de los componentes se eliminan de dichos fluidos de conservación, los resultados postoperatorios y postrasplante son los mismos que si no se hubieran extraído.

El documento de patente US 6 673 594 B1 describe un aparato de perfusión de órganos para sostener, monitorear y/o restaurar la viabilidad del órgano perfundiendo el órgano con un fluido médico oxigenado a temperatura hipotérmica

y/o temperaturas normotérmicas. Este aparato está delimitado por paredes hechas de un material aislante térmico y puede comprender además medios de refrigeración y un recipiente auxiliar con una o dos tapas para contener un órgano a perfundir. Este recipiente auxiliar puede formarse con una parte inferior hermética a los fluidos en la que se puede acumular el fluido médico efluente cuando se perfunde el órgano.

5 El documento de patente WO 2007/143715 A2 se refiere a la aplicación de ultrasonidos para permitir el suministro de oxígeno a las heridas y ayudar a la cicatrización. A modo de ejemplo, el documento de patente describe muy brevemente un dispositivo para conservar órganos después de haber sido extraídos del donante. Para tal fin, el órgano se coloca en un recipiente al que se le suministra un gas o líquido sobresaturado de oxígeno. Es un sistema de
10 conservación dinámico porque el oxígeno o las soluciones líquidas saturadas con oxígeno contenidas en el mismo ingresan gradualmente con un flujo controlado desde un depósito de oxígeno al recipiente y los productos de desecho se eliminan gradualmente. El recipiente para el órgano se coloca dentro de un contenedor semirrígido. El contenedor exterior comprende además un sistema de ultrasonido para dirigir ultrasonido sobre el contenedor. No existen medios para transmitir ultrasonido entre el recipiente interior y el contenedor exterior, de modo que el sistema no puede
15 funcionar tan bien como si el ultrasonido se aplicara directamente sobre una herida con el fin de cicatrizarla.

Estudios que indican que la aplicación de ultrasonido ayuda a administrar fármacos y sustancias a través de los tejidos, como la piel y al torrente sanguíneo, también son conocidos. No obstante, en dichos estudios se aplica el ultrasonido *in vivo*, es decir, en presencia de flujo sanguíneo. El documento de patente US 4,767,402 A, relacionado con el campo
20 de la administración transdérmica de fármacos mediante la aplicación de ultrasonido, también se relaciona con los riesgos asociados con el uso de los mismos. El documento de patente desaconseja especialmente el uso prolongado de ultrasonidos debido a los riesgos asociados con el aumento de la temperatura de la piel y los posibles daños que esta técnica puede provocar. El mismo documento de patente también divulga que el ultrasonido se transmite mal a través del aire y que, por tanto, su aplicación preferida requiere un medio líquido. Como resultado, no es aconsejable
25 aplicar ultrasonido para la conservación de órganos y tejidos debido a los factores mencionados de: calentamiento local del tejido, dificultad para penetrar tejidos u órganos de espesor considerable y dificultad de transmisión en medios gaseosos.

El documento de patente US 5,267,985 A divulga un método y aparato para mejorar la difusión de una sustancia a un área local de un material o tejido por medio de ultrasonido en dos o más frecuencias distintas. Este documento de
30 patente también divulga que el aumento de temperatura local cuando se aplica ultrasonido es beneficioso para ayudar a aumentar la penetración de las sustancias que se van a difundir.

El artículo (Sen Wang *et al.*, Medial hypothesis, 74, 2010; 147-149) sugiere aplicar ultrasonido a intensidad media (0,3-1,2 W/cm²) *in vivo* para dañar un área específica del órgano donante de modo que solo se activen las células madre y el órgano pueda regenerarse, formando un órgano híbrido que puede ser más compatible con el receptor.
35

El documento de patente WO 2005/013799 A1 divulga un método basado en la aplicación de ultrasonido *in vivo* durante la reperfusión, es decir, el suministro de sangre entra en el tejido, después de un tiempo de isquemia. El ultrasonido sólo se aplica por un lapso de tiempo corto (no más de 15 minutos) para favorecer la entrada de sangre y oxígeno en un tejido y reducir los trastornos de la microcirculación provocados por la reperfusión.
40

Por lo tanto, se puede inferir de la técnica que la aplicación de ultrasonido genera calor tanto en medios acuosos como en tejidos. El ultrasonido aplicado durante sólo entre 1-10 minutos (tiempos utilizados en la mayoría de las aplicaciones
45 médicas) y en frecuencias e intensidades que son habituales en la técnica provoca por sí solo el calentamiento de los tejidos, lo cual se interpreta como un factor negativo para el correcto almacenamiento de una muestra biológica *ex-vivo*. Cuando la temperatura supera los 38 °C, la exposición a ultrasonido suele interrumpirse porque daña los tejidos. Por ejemplo, el documento de patente US 5,267,985 divulga la posibilidad de utilizar ultrasonido durante 15-30 minutos para lograr una penetración en el tejido de entre 1 y 2 cm.
50

De hecho, el ultrasonido se ha aplicado a menudo en la práctica clínica precisamente como terapia para provocar el calentamiento del tejido. Además del calentamiento causado únicamente por ultrasonido, los transductores cerámicos tienden a calentarse con la vibración, aumentando aún más el efecto térmico sobre el tejido (Watson T *et al.*, 2008,
55 48: 321-329; Baker KG, *et al.*, 2001; 81: 1351-1358; Legay M *et al.*, 2011, ID670108; 1-17).

El documento JPH 01-308201 A divulga un aparato de conservación de órganos que comprende una cámara aislada, una carcasa de órgano, un circuito de perfusión, medios de oxigenación, medios de refrigeración para mantener la temperatura del perfundido a aproximadamente 7 °C, y un sistema de ultrasonido para generar una tomografía del
60 órgano.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

65 Es un objeto de la invención proporcionar un dispositivo para el transporte y la conservación de una muestra biológica *ex-vivo* y un método del tipo indicado anteriormente que reduce el daño a la muestra biológica y, en consecuencia,

aumenta la viabilidad de la misma en comparación con lo que podría obtenerse con dispositivos conocidos. La invención también considera, en el caso de los trasplantes, el problema de mejorar la calidad de vida de los pacientes trasplantados y, en el peor de los casos, de reducir significativamente la necesidad de otro trasplante.

5 Este objetivo se consigue mediante un dispositivo para el transporte *ex-vivo* del tipo indicado anteriormente, que además comprende al menos un sistema de ultrasonido adecuado para generar y aplicar ultrasonido sobre dicha muestra biológica. Por lo tanto, la aplicación de ultrasonido combinada con el enfriamiento de la cámara interior se puede llevar a cabo de manera que se previene el calentamiento local de la muestra biológica y el posterior aumento de temperatura que causaría daños en la misma. El dispositivo también comprende un contenedor auxiliar que se puede cerrar que contiene una solución de conservación, sin suministro de oxígeno externo y para contener dicha muestra biológica sumergida en dicha solución de conservación.

15 Por lo tanto, al contrario de lo que se esperaba, se ha comprobado en la invención que aplicando ultrasonido, que se aplica de manera que no genere calentamiento local en la muestra, no se afecta negativamente el efecto positivo de enfriar la muestra biológica y, por tanto, tampoco la daña. Asimismo, sin embargo, sorprendentemente se ha comprobado que se consigue una mejoría muy significativa con el ultrasonido, tanto es así que como se verá más adelante en la descripción, se pudo confirmar un efecto sinérgico entre la aplicación de condiciones de frío dentro de la cámara del dispositivo y la aplicación de ultrasonido. Para tal fin, hay muchas configuraciones posibles, como aplicar ultrasonido cerca de la muestra biológica a baja intensidad, o disponer los transductores lejos de la muestra a 20 intensidades más altas y en contacto con un fluido de conservación que contiene la muestra.

25 Asimismo, también contrariamente a lo esperado, en la invención no se verificaron problemas con la duración de la aplicación de ultrasonido. Dicho de otra forma, en el transporte de órganos se conoce la necesidad de mantener la muestra en condiciones de isquemia fría durante varias horas. De acuerdo con la invención, el ultrasonido se puede aplicar continuamente a intensidades adecuadas y, a pesar de lo que se esperaría, tampoco daña la muestra biológica. Por lo tanto, mediante la aplicación de ultrasonido y evitando el calentamiento local de la muestra, se ha verificado una reducción significativa del daño celular. Asimismo, basándose en los ensayos realizados, se ha comprobado que la protección del órgano frente a la lesión inducida por isquemia fría aplicando simultáneamente ambos tratamientos es inesperadamente mejor que la suma de toda la protección obtenida mediante los tratamientos por separado.

30 Asimismo, la invención cubre una serie de características preferidas que son objeto de reivindicaciones dependientes y cuya utilidad se destacará a continuación en la descripción detallada de una realización de la invención.

35 En una realización preferida, se ha comprobado que dicho sistema de ultrasonido es adecuado para emitir dicho ultrasonido a una frecuencia comprendida entre 25 kHz y 1 MHz y una intensidad de sonido comprendida entre 0,01 y 2 W/cm², y preferentemente entre 0,02 y 1 W/cm², y de manera especialmente preferida entre 0,02 y 0,1 W/cm². Se ha comprobado que estos intervalos de frecuencia e intensidad son en particular beneficiosos para reducir el daño celular. En particular a una intensidad más baja, se obtienen mejores resultados y es necesario menos enfriamiento de la muestra y/o separación de los transductores con respecto a la muestra biológica, lo que permite que el dispositivo sea más compacto.

40 También se puede prever preferentemente que el ultrasonido se aplique de manera continua o, alternativamente, de manera pulsada. Asimismo, la invención no descarta aplicar simultáneamente ultrasonido de diferentes frecuencias mediante el correspondiente control individual de cada uno de los transductores del dispositivo.

45 También se ha comprobado que cuanto más baja sea la temperatura, mayor será el efecto sinérgico obtenido con el ultrasonido. Por lo tanto, de manera particularmente preferida, los medios de refrigeración son adecuados para mantener la temperatura dentro de dicha cámara entre 0 y 15 °C, y preferentemente entre 2 y 10 °C, y de manera particularmente preferida entre 2 y 6 °C. Tanto es así que como se ha comprobado, la combinación de condiciones de frío y ultrasonido juntos proporciona mejores resultados de lo que se esperaría en el mejor de los casos de la suma de los efectos de las condiciones de frío y ultrasonido por separado.

50 El dispositivo de acuerdo con la invención comprende un soporte en forma de lámina en dicha cámara adecuado para soportar la muestra biológica, pudiendo vibrar libremente dicho soporte en forma de lámina cuando se aplica dicho ultrasonido, y el sistema de ultrasonido comprende al menos un transductor montado en al menos una de las paredes de dicho soporte en forma de lámina. Como resultado, se minimiza el efecto amortiguador del soporte y se introduce el ultrasonido en la muestra biológica de una manera más eficiente, mejorando el efecto del mismo en muestras 55 biológicas más voluminosas siempre que se evite el calentamiento local excesivo en la muestra biológica.

60 De manera particularmente preferida, dicho al menos un transductor está montado en la cara de dicho soporte en forma de lámina opuesta a la superficie de soporte para dicha muestra biológica para aplicar dicho ultrasonido hacia dicha superficie de soporte. De este modo se obtiene un campo ultrasónico más homogéneo, favoreciendo aún más el efecto combinado de las condiciones de frío y el ultrasonido sobre la muestra biológica. Puede ser apropiado que el soporte en forma de lámina sea una bandeja y que dicha bandeja permita contener un fluido, tal como agua, para mejorar la transmisión del ultrasonido aplicado. La función del fluido es por un lado actuar como refrigerante, y al mismo tiempo favorecer la transmisión de ultrasonido a la muestra biológica.

65 De manera particularmente preferida, dicho soporte en forma de lámina está hecho de metal para aumentar su rigidez y evitar al máximo el amortiguamiento, y conseguir una transmisión más directa del ultrasonido sobre la muestra biológica.

5 El contenedor auxiliar que se puede cerrar contiene una solución de conservación. De nuevo, se ha comprobado que la combinación de condiciones de frío y el ultrasonido más la inmersión de la muestra biológica en una solución de conservación proporciona mejores resultados que la suma de sus efectos individuales en cuanto a reducir el daño a la muestra biológica.

En una realización del dispositivo de acuerdo con la invención, el soporte en forma de lámina es una bandeja adaptada para contener un fluido.

10 En otra realización preferida, el soporte en forma de lámina es una bandeja que contiene agua.
En otra realización, el contenedor auxiliar comprende un fondo falso ubicado lejos de la base de dicho contenedor auxiliar, y estando dicho fondo falso en comunicación fluida con el resto de dicho contenedor auxiliar.

15 También de manera particularmente preferida, el contenedor auxiliar puede incorporar un fondo falso destinado a mantener la muestra biológica alejada de la superficie de soporte del contenedor, estando dicho fondo falso en comunicación fluida con el resto del contenedor auxiliar. Como resultado, la muestra se puede colocar en el contenedor auxiliar como si flotara en la solución de conservación. Por lo tanto, la muestra no recibe una acción tan directa del ultrasonido y puede trabajar a intensidades más altas.

20 Asimismo, la invención también considera un método para el transporte y la conservación de una muestra biológica *ex-vivo* trasplantable que comprende las etapas de extraer y lavar la sangre de la muestra biológica, colocar la muestra biológica en una cámara delimitada por paredes hechas de un material aislante térmico sin suministro externo de oxígeno e irradiar la muestra con ultrasonido.

25 La muestra biológica se mantiene sumergida en una solución de conservación sin suministro externo de oxígeno colocando dicha muestra biológica en una cámara delimitada por paredes hechas de un material aislante térmico.

La muestra biológica se coloca sumergida en un contenedor auxiliar que se puede cerrar, que contiene dicha solución de conservación, y dicho contenedor auxiliar se coloca en dicha cámara.

30 En una realización del método, en la etapa de irradiación para irradiar dicha muestra biológica el ultrasonido tiene frecuencias comprendidas entre 25 kHz y 1 MHz y una intensidad de sonido comprendida entre 0,01 y 2 W/cm² y de manera particularmente preferida entre 0,02 y 1 W/cm², y de manera especialmente preferida entre 0,02 y 0,1 W/cm².

35 En otra realización, el método comprende una etapa de enfriamiento para enfriar la temperatura en la cámara hasta una temperatura entre 0 y 15 °C, y más preferentemente entre 2 y 10 °C, y de manera particularmente preferida de 2 a 6 °C.

El método comprende además una etapa que consiste en mantener dicha muestra biológica sumergida en una solución de conservación.

40 Finalmente, el método comprende además una etapa de colocar dicho contenedor auxiliar sobre un soporte en forma de lámina que es una bandeja adaptada para contener un fluido y pudiendo vibrar libremente dicha bandeja cuando se aplica dicho ultrasonido.

45 La invención también se refiere al uso de un dispositivo para el transporte y la conservación de una muestra biológica *ex-vivo*. Con el dispositivo, la muestra biológica se mantiene sumergida en una solución de conservación sin suministro de oxígeno en condiciones hipotérmicas y dicha muestra se irradia con ultrasonido de manera que la viabilidad, la funcionalidad y la interacción entre las diferentes células de dicha muestra biológica se conservan para que dicha muestra biológica se use en investigación de laboratorio posterior. Asimismo, la invención también cubre otras características detalladas ilustradas en la descripción detallada de una realización de la invención y en los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

55 Otras ventajas y características de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, en la que, sin ningún carácter limitativo, se divulgan las realizaciones preferentes de la invención, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 muestra una vista en perspectiva en despiece ordenado de una primera realización de un dispositivo para el transporte de una muestra biológica *ex-vivo*.

60 La figura 2 muestra una vista frontal seccionada longitudinalmente del dispositivo de la figura 4.

La figura 3 muestra una vista en planta superior de una primera realización de la bandeja de soporte para la muestra biológica del dispositivo de la figura 1.

La figura 4 muestra una vista lateral de la bandeja de la figura 3.

La figura 5 muestra una segunda realización de la bandeja de soporte para la muestra biológica.

65 La figura 6 muestra una segunda realización del dispositivo para el transporte de acuerdo con la invención.

La figura 7A muestra una tercera realización del dispositivo para el transporte de acuerdo con la invención.

La figura 7B muestra una realización alternativa del contenedor auxiliar del dispositivo de la figura 7A. Las figuras 8A a 13 muestran porcentaje de protección de muestras biológicas de hígado y riñón con respecto a las condiciones del estado de la técnica.

Las realizaciones ilustradas en las figuras 1-6 no están abarcadas por el texto de las reivindicaciones, pero se consideran útiles para comprender la invención.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

Las figuras 1 y 2 muestran una primera realización del dispositivo 1 para el transporte y la conservación de una muestra biológica 100 *ex-vivo* trasplantable. De manera particularmente preferida, el dispositivo es un refrigerador portátil. Como ya se ha indicado anteriormente, la muestra biológica 100 comprende tanto órganos que pueden trasplantarse entre donante y receptor, que puede ser humano o animal, como tejidos. Asimismo, la muestra biológica también puede destinarse a investigación sin tener que ser necesariamente trasplantada.

El dispositivo 1 para el transporte y la conservación tiene un contenedor 16 isotérmico principal con forma de paralelepípedo abierto en la cara superior. Las paredes 4 hechas de un material aislante térmico del contenedor 16 principal, incluyendo su tapa superior, delimitan una cámara 2 destinada a contener la muestra biológica 100. Dentro del contenedor principal 16 se proporcionan medios de refrigeración 6 adecuados para mantener la temperatura dentro de la cámara 2 por debajo de la temperatura fuera de dicho dispositivo 1. Estos medios de refrigeración 6 pueden comprender soluciones tan diferentes como bloques de hielo, paquetes de gel refrigerante o soluciones más complejas que comprenden un compresor y un intercambiador de calor. El dispositivo 1 también podría consistir en un refrigerador portátil con o sin fuente de alimentación externa. No obstante, es deseable que la solución sea lo más ligera posible para no afectar la transportabilidad del conjunto. Los medios de refrigeración 6 permiten mantener la temperatura dentro de la cámara 2 entre 0 y 15 °C. En otra realización preferida, la temperatura dentro de la cámara 2 se mantiene entre 2 y 10 °C, y de manera particularmente preferida entre 2 y 6 °C.

El dispositivo 1 comprende en la parte central un soporte 10 en forma de lámina a modo de bandeja metálica soportada en el interior de la cámara 2 de manera que pueda vibrar libremente. La bandeja de esta primera realización se puede ver en detalle en las figuras 3 y 4. Una bandeja de aluminio con un espesor inferior a 1 mm, y preferentemente 0,5 mm, se utiliza en la realización.

Asimismo, el dispositivo comprende un sistema de ultrasonido adecuado para generar y aplicar ultrasonido sobre la muestra biológica 100. Para tal fin, el sistema de ultrasonido de acuerdo con los dibujos tiene un generador 20 de señales eléctricas, un amplificador 22, una batería 24, y en este caso cuatro transductores 8 piezoeléctricos.

Las vibraciones se aplican al soporte 10 en forma de lámina por medio de una bandeja de aluminio a través de los cuatro transductores 8. Dichos transductores 8 están montados en la cara inferior de la bandeja. Como resultado de esta configuración, la transmisión entre los transductores y la muestra biológica 100 es más directa, porque las vibraciones se generan directamente debajo de la parte inferior de la muestra biológica. De manera particularmente preferida, como se puede observar en la figura 6, la bandeja puede contener además agua, pero para mejorar la transmisión de ultrasonido, se prevé que la muestra biológica 100 esté contenida en una bolsa o contenedor lleno de solución de conservación. Las soluciones de conservación contempladas en el presente documento son, por ejemplo, solución de Ringer Lactato, solución Celsius o solución de la Universidad de Wisconsin.

En una realización alternativa mostrada en la figura 5, la bandeja puede tener transductores 8 en las paredes laterales para generar un campo vibratorio lateral. Como alternativa, los transductores 8 también podrían estar situados tanto en las paredes laterales como en el fondo de la bandeja.

Los transductores 8 de ultrasonido transmiten ondas mecánicas que tienen una frecuencia comprendida entre 25 kHz y 1 MHz y una intensidad de sonido comprendida entre 0,1 y 2 W/cm² en dicha cámara 2 durante el transporte de dicha muestra biológica 100. La intensidad puede estar comprendida preferentemente entre 0,02 y 1 W/cm², y aún más preferentemente entre 0,02 y 0,1 W/cm². Cuanto mayor sea la intensidad de sonido usada, más lejos estarán los transductores 8 y/o mayor será la cantidad de fluido de conservación o refrigerante que se colocará en el dispositivo 1 para cumplir el objetivo de evitar el calentamiento local en la muestra biológica 100. Asimismo, el ultrasonido se puede aplicar de forma continua. Como alternativa, el ultrasonido también se puede aplicar de forma intermitente, es decir, no se aplica durante todo el tiempo que dure el transporte. Como alternativa, también se puede aplicar de forma pulsada y/o a diferentes frecuencias, ya sea de forma continua o intermitente.

De manera particularmente preferida, la muestra biológica 100 está contenida en un receptáculo que contiene una solución de conservación, lo que mejora los resultados de la aplicación de ultrasonido.

A continuación se muestran otras realizaciones del dispositivo 1 para el transporte que comparten muchas de las mismas características descritas en los párrafos anteriores. Por consiguiente, solo se describirán a continuación en el presente documento aquellos elementos que son diferentes entre dichas realizaciones, mientras que para los elementos comunes se hace referencia a la descripción de la primera realización.

La realización del dispositivo 1 de la figura 6 difiere principalmente en que el soporte 10 en forma de lámina está integrado directamente en las paredes 4 del contenedor principal 16.

Finalmente, en la realización del dispositivo en la figura 7A, se proporciona un contenedor auxiliar 14 dentro del contenedor principal 16 con una solución de conservación. De manera particularmente preferida, el contenedor auxiliar 14 se puede cerrar, con paredes rígidas y tapa abatible en una de sus paredes. De manera particularmente preferida, cuando los transductores están ubicados en la parte inferior de la bandeja, el contenedor auxiliar 14 tiene unas dimensiones destinadas a ocupar toda la superficie de emisión de los transductores 8. Como resultado de llenar el contenedor auxiliar 14 con solución de conservación, el ultrasonido llega a la muestra biológica 100 de una manera más eficiente. De manera particularmente preferida, el contenedor auxiliar 14 se fabrica mediante termoconformado utilizando un plástico conformable, como por ejemplo polietileno de alta densidad, polipropileno, poli(tereftalato de etileno) o similares. También de manera particularmente preferida, el material será transparente para permitir ver la muestra biológica 100 sin necesidad de abrir el contenedor auxiliar 14.

La figura 7B muestra una realización alternativa del contenedor auxiliar 14. En este caso, el contenedor auxiliar 14 comprende un fondo falso 18 ubicado lejos de la base de dicho contenedor auxiliar 14, y dicho fondo falso 18 está en comunicación fluida con el resto de dicho contenedor auxiliar 14. De este modo, el fondo falso coloca la muestra biológica 100 alejada de la superficie de soporte del recipiente auxiliar 14. En este caso, el falso fondo 18 consiste en una lámina de plástico rígido apoyada en las paredes laterales del contenedor auxiliar 14. Entonces, para lograr una comunicación fluida adecuada, en este caso está prevista una pluralidad de aberturas 20 que permiten el paso de la solución de conservación, de manera que dicha solución recibe el efecto directo del ultrasonido proveniente de los transductores 8 inferiores.

Finalmente, de manera particularmente preferida, el contenedor auxiliar 14 contiene un líquido de conservación en condiciones estériles del grupo que consiste en la solución de conservación de Ringer lactato, solución de conservación Celsior o solución de conservación de la Universidad de Wisconsin. Esto permite una manipulación mucho más higiénica de la muestra biológica en condiciones más adecuadas para la adecuada conservación de la misma. Las realizaciones descritas hasta ahora representan ejemplos no limitativos, de tal manera que el experto en la materia entenderá que más allá de los ejemplos que se muestran, son posibles varias combinaciones de las características reivindicadas dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos experimentales

A continuación se describen diferentes pruebas realizadas para poner en práctica el método de acuerdo con la invención.

Metodología

El protocolo experimental se realizó a partir de hígados y riñones de cerdos Landrace. El riñón y el hígado se perfundieron con una solución de conservación a 4 °C para eliminar la sangre contenida en el órgano, y el órgano se mantuvo en condiciones de frío, bañados en hielo hasta sumergir los órganos en diferentes soluciones de conservación. A continuación, las muestras biológicas se colocaron en el refrigerador y se mantuvieron en el refrigerador con o sin ultrasonido durante 8 horas (hígado) y 24 horas (riñón). Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia y el estudio respetó las normas de la Unión Europea relativas a experimentos con animales (Directiva 86/609/CEE).

Diseño experimental

Protocolo 1

Los grupos experimentales formados fueron los siguientes:

GRUPO 1: grupo de isquemia fría en el sistema de transporte convencional y con solución de conservación. Este grupo se dividió en diferentes subgrupos dependiendo de la solución de conservación utilizada.

1.1) Perfusión de injertos de hígado (n=10) y de injertos de riñón (n=10) en solución de Ringer Lactato a 4 °C y conservación de dichos órganos con solución de Ringer Lactato en el sistema de transporte convencional durante 8 y 24 horas para hígado y riñón, respectivamente, entre 2-6 °C;

1.2.) Lo mismo que 1.1 pero utilizando solución Celsior para lavar y conservar el órgano;

1.3) Igual que 1.1 pero usando solución de UW (Universidad de Wisconsin) para lavar y preservar el órgano.

GRUPO 2: grupo de isquemia fría en el sistema con ultrasonido (25 kHz y 0,04 W/cm²) y sin solución de conservación: Perfusión de injertos de hígado (n=10) y de injertos de riñón (n=10) en solución de Ringer lactato a 4 °C para lavar los órganos con el fin de eliminar la sangre contenida en ellos. Después del lavado, los órganos se almacenaron durante 8 y 24 horas para el hígado y el riñón, respectivamente, y sin solución de conservación en el sistema de transporte con ultrasonido (25 kHz y 0,04 W/cm²) entre 2-6 °C.

GRUPO 3: grupo de isquemia fría en el sistema de transporte con ultrasonido (25 kHz y 0,04 W/cm²) y con solución de conservación. El grupo se dividió en diferentes subgrupos dependiendo de la solución de conservación utilizada.

3.1) Perfusión de injertos de hígado (n=10) y de injertos de riñón (n=10) en solución de Ringer Lactato a 4 °C.

Entonces, los órganos se almacenaron con solución de Ringer Lactato durante 8 y 24 horas para hígado y riñón, respectivamente, en el sistema de transporte con ultrasonido a una temperatura comprendida entre 2-6 °C;

3.2). Lo mismo que 3.1 pero utilizando solución Celsior para lavar y conservar el órgano;

3.3) Igual que 3.1 pero usando solución de UW para lavar y conservar el órgano.

También se realizaron experimentos para evaluar si otras frecuencias y/o intensidades podían proporcionar más protección que la que se lograba con frecuencias de 25 kHz y una intensidad de 0,04 W/cm². Para hacer esto, se realizaron los siguientes experimentos.

GRUPO 4: grupo de isquemia fría en el sistema con ultrasonido (40, 80, 200, 580 kHz y 1 MHz) e intensidad de 0,04 W/cm² y con solución de conservación: El grupo se dividió en diferentes subgrupos según la frecuencia utilizada.

4.1) Perfusión de injertos de hígado (n=10) y de injertos de riñón (n=10) en solución de UW a 4 °C. Entonces, los órganos se almacenaron en solución de UW durante 8 y 24 horas para hígado y riñón, respectivamente, en el sistema de transporte con ultrasonido a 40 kHz y una intensidad de 0,04 W/cm² y entre 2-6 °C;

4.2). Igual que 4.1 pero usando 80 kHz y una intensidad de 0,04 W/cm² y entre 2-6 °C;

4.3) Igual que 4.1 pero usando 200 kHz y una intensidad de 0,04 W/cm² y entre 2-6 °C;

4.4) Igual que 4.1 pero usando 580 kHz y una intensidad de 0,04 W/cm² y entre 2-6 °C;

4.5) Igual que 4.1 pero usando 1 MHz y una intensidad de 0,04 W/cm² y entre 2-6 °C.

También se realizaron experimentos para verificar el efecto del ultrasonido a una intensidad superior a 0,04. Para ello se realizaron los siguientes experimentos:

GRUPO 5: grupo de isquemia fría en el sistema con ultrasonido (25 kHz e intensidad de 0,1 W/cm² y con solución de conservación). Perfusión de injertos de hígado (n=10) y de injertos de riñón (n=10) en solución de UW a 4 °C. Entonces, los órganos se almacenaron durante 8 y 24 horas para hígado y riñón, respectivamente, en el sistema de transporte con ultrasonidos a 25 kHz y una intensidad de 0,1 W/cm² y a una temperatura comprendida entre 2-6 °C.

Se agregaron además los siguientes grupos experimentales para evaluar el efecto de la solución de conservación y las condiciones de frío:

GRUPO 6: grupo de isquemia fría en el sistema de transporte convencional pero sin solución de conservación. Perfusión de injertos de hígado (n=10) y de injertos de riñón (n=10) con solución de Ringer Lactato a 4 °C para lavar los órganos con el fin de eliminar la sangre contenida en los órganos. Después del lavado, los órganos se almacenaron sin solución de conservación en el refrigerador convencional (sin ultrasonido) durante 8 y 24 horas para hígado y riñón, respectivamente, entre 2-6 °C.

GRUPO 7: grupo de isquemia sin condición de frío y combinado con ultrasonido (25 kHz e intensidad de 0,04 W/cm²) o no. El grupo se dividió en dos subgrupos.

7.1) Perfusión de injertos de hígado (n=10) y de injertos de riñón (n=10) en solución de UW a una temperatura entre 20-25 °C. Entonces, los órganos se almacenaron durante 8 y 24 horas para hígado y riñón, respectivamente, a una temperatura comprendida entre 20-25 °C;

7.2) Perfusión de injertos de hígado (n=10) y de injertos de riñón (n=10) en solución de UW a una temperatura comprendida entre 20-25 °C. Entonces, los órganos se almacenaron durante 8 y 24 horas para hígado y riñón, respectivamente, a una temperatura comprendida entre 20-25 °C y con ultrasonido a 25 kHz y una intensidad de 0,04 W/cm².

Recogida y procesamiento de muestras

Al final de la isquemia, y en todos los grupos y subgrupos experimentales, se recogieron muestras de perfusión de hígado y riñón para evaluar el daño del hígado y riñón inducido por la isquemia utilizando técnicas ampliamente estandarizadas. El daño del hígado se evaluó determinando los niveles de transaminasas en el perfundido y mediante la determinación de la actividad caspasa 3 en el tejido hepático. El daño del riñón se evaluó mediante la determinación de la actividad lactato deshidrogenasa en el perfundido y caspasa 3 en el tejido renal. Los niveles de MDA (malondialdehído) se determinaron en muestras de tejido de hígado y riñón como índice de estrés oxidativo, y los niveles de ATP (trifosfato de adenosina) se determinaron como índice de conservación del metabolismo energético de órganos (Salahudeen AK *et al.*, Am J Transpl 2003; 3:273-280; Omar R *et al.*, Gut 1989; 30:510-514; Peralta *et al.*, Am J Physiol.2000; 279:G163-71).

El estudio estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA), y entonces se determinó el nivel de significancia estadística con la prueba de Student-Newman-Kels.

Los resultados obtenidos y mostrados esquemáticamente en los dibujos se explican a continuación en detalle.

Figuras 8A a 8E: muestran el porcentaje de protección, o en otras palabras, el porcentaje de reducción de la lesión hepática en muestras biológicas que consisten en injertos de hígado en las condiciones 1 a 6 descritas a continuación frente a la lesión inducida por la siguiente condición: solución de UW + condiciones de frío (2-6 °C) cuando los parámetros indicativos del daño hepático, en concreto, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), actividad caspasa 3, MDA (malondialdehído) y ATP (trifosfato de adenosina), se evaluaron al final de las 8 horas de isquemia fría.

Condiciones (1-6):

- 1: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 25 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 2: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 40 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 3: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 80 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 4: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 200 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 5: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 580 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 6: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 1 MHz y condiciones de frío (2-6 °C). Una intensidad de ultrasonido de 0,04 W/cm² se aplicó en todos los casos 1 a 6.

Figuras 9A a 9D: muestran el porcentaje de protección en muestras biológicas que consisten en injertos de riñón en las condiciones 1 a 6 descritas a continuación frente a la lesión inducida por la siguiente condición: solución de UW + condiciones de frío (2-6 °C) cuando los parámetros indicativos del daño renal, en concreto, LDH (lactato deshidrogenasa), actividad caspasa 3, MDA y ATP, se evaluaron al final de las 24 horas de isquemia fría.

- 1: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 25 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 2: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 40 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 3: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 80 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 4: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 200 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 5: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 580 kHz y condiciones de frío (2-6 °C).
- 6: solución de UW, frecuencia de ultrasonido de 1 MHz y condiciones de frío (2-6 °C).

Una intensidad de ultrasonido de 0,04 W/cm² se aplicó en todos los casos 1 a 6.

Figura 10: muestra el porcentaje de protección en el hígado frente a la lesión inducida por la siguiente condición: no uso de solución de conservación + condiciones de frío (2-6 °C) + no ultrasonido cuando el parámetro indicativo de daño hepático, AST, se evaluó al final de las 8 horas de isquemia fría.

- 1: solución de Ringer Lactato, sin ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 2: solución Celsior, sin ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 3: solución de UW, sin ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 4: solución de Ringer Lactato, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 5: solución Celsior, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 6: solución de UW, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C).

Nota: de las soluciones de conservación utilizadas, la solución estándar en la práctica clínica es la solución de conservación de UW (Universidad de Wisconsin). La solución de Ringer Lactato no contiene fármacos y solo contiene sales minerales. La solución Celsior contiene glutatión y la solución de UW contiene más fármacos, como adenosina, glutatión y alopurinol.

Figura 11: muestra el porcentaje de protección en el riñón frente a la lesión inducida por la siguiente condición: no uso de solución de conservación + condiciones de frío (2-6 °C) + no ultrasonido cuando el parámetro indicativo de daño renal, LDH, se evaluó al final de las 24 horas de isquemia fría.

- 1: solución de Ringer Lactato, sin ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 2: solución Celsior, sin ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 3: solución de UW, sin ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 4: solución de Ringer Lactato, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 5: solución Celsior, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 6: solución de UW, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C).

Figura 12: muestra el porcentaje de protección en el hígado frente a la lesión inducida por la siguiente condición: solución de conservación de UW + sin condiciones de frío (20-25 °C) + sin ultrasonido cuando el parámetro indicativo del daño hepático, AST, se evalúa al final de las 8 horas de isquemia fría.

- 1: solución de UW sin ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 2: solución de UW con ultrasonido y sin condiciones de frío (20-25 °C).
- 3: sin solución de conservación, con ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
- 4: solución de UW, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C). Resultado esperado: Protección 1 + Protección 2 = Protección (1+2)
- 5: solución de UW, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C). Resultado realmente observado. Protección 1 + Protección 2 < Protección (1+2).

Figura 13: muestra el porcentaje de protección en el riñón frente a la lesión inducida por la siguiente condición: solución de conservación de UW + sin condiciones de frío (20-25 °C) + sin ultrasonido cuando el parámetro indicativo del daño renal, LDH, se evalúa al final de las 24 horas de isquemia fría.

- 1: solución de UW sin ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).

- 2: solución de UW con ultrasonido y sin condiciones de frío (20-25 °C).
 3: sin solución de conservación, con ultrasonido y con condiciones de frío (2-6 °C).
 4: solución de UW, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C). Resultado esperado: Protección 1 + Protección 2 = Protección (1 + 2).
 5: solución de UW, con ultrasonido (25 kHz, 0,04 W/cm²) y con condiciones de frío (2-6 °C). Resultado realmente observado. Protección 1 + Protección 2 < Protección (1 + 2).

Discusión de los resultados experimentales

- 10 Es importante señalar que, como era de esperar, sin aplicar ultrasonido la temperatura osciló entre 2-6 °C dentro del refrigerador, en el líquido de conservación y en el órgano. Además, la aplicación de ultrasonido en condiciones de frío (2-6 °C) no modificó la temperatura dentro del refrigerador, que estuvo entre 2-6 °C para todos los experimentos, pero se perdió el enfriamiento del órgano y de la solución de conservación.
 15 Al aplicar ultrasonido, la temperatura osciló entre 2-6 °C dentro del refrigerador, la temperatura del líquido de conservación osciló entre 14-16 °C y la temperatura del órgano entre 16-18 °C.

El efecto de calentamiento provocado por el ultrasonido es un resultado esperado de acuerdo con documentos de interés de antecedentes. No obstante, al contrario de lo que se esperaría, teniendo en cuenta la vital importancia de enfriar el órgano (4 °C) y mantener la temperatura del líquido de conservación y del órgano entre 2-6 °C para almacenar órganos en condiciones de isquemia hipotérmica, los resultados indican que la aplicación de ultrasonido no afecta negativamente el efecto de enfriamiento de la muestra biológica y, en consecuencia, no la daña.

Asimismo, sin embargo, sorprendentemente se ha comprobado que se consigue una mejoría muy significativa, tanto es así que se pudo confirmar un efecto sinérgico entre la aplicación de condiciones de frío dentro de la cámara del dispositivo y la aplicación de ultrasonido.

Figuras 8A a 8E: como se muestra en estos dibujos, en todas las condiciones (a diferentes frecuencias y la misma intensidad de 0,04 W/cm²), la aplicación de ultrasonido protege el injerto de hígado en condiciones de isquemia fría, siendo dichos efectos protectores más evidentes en la condición 1, es decir, a una frecuencia de 25 kHz. Otros resultados que no se muestran en los dibujos indican que a intensidades más altas, como es el caso de 0,1 W/cm², también se obtiene protección del injerto de hígado. Por ejemplo, se obtiene un porcentaje de protección o una reducción de la lesión del 55 % a frecuencias de 25 kHz y una intensidad de 0,1 W/cm² frente a la condición: solución de UW + condiciones de frío (2-6 °C), cuando el parámetro del daño hepático, AST, se evalúa al final de las 8 horas de isquemia fría.

Figuras 9A a 9D: muestran el mismo patrón de protección renal que el mostrado en las Figuras 8A a 8E para el hígado.

Figura 10: como era de esperar, se observa la protección del hígado proporcionada por las soluciones de conservación sin aplicación de ultrasonido (condiciones 1 a 3); la protección del injerto de hígado es mejor si se utiliza la solución de conservación de UW con respecto a ambas soluciones (Ringer o Celsior), y la protección obtenida por la solución Celsior es mejor que la obtenida por la solución de Ringer Lactato. Además, al observar la protección proporcionada por las soluciones de conservación en presencia de ultrasonido (condiciones 4-6), se obtienen resultados inesperados, indicando una mejor protección del ultrasonido, pero dicha protección es similar en todas las condiciones (4-6). Dicho de otra forma, se obtiene el mismo grado de protección independientemente de la solución de conservación utilizada, ya sea la solución de Ringer Lactato, solución Celsior o solución de UW.

Figura 11: muestra el mismo patrón de protección renal que el que se muestra en la Figura 10 para el hígado.

Figura 12: como era de esperar, las condiciones de frío sin aplicar ultrasonido (condición 1) y el uso de la solución de UW aumentan la protección del injerto de hígado en aproximadamente un 30 % en comparación con la conservación con UW a 4 °C y a temperatura ambiente (20-25 °C). De forma inesperada, la protección obtenida por la condición 2 (solución de UW, en presencia de ultrasonido y a temperatura ambiente) es mejor que la de la condición 1 (solución de UW y frío sin ultrasonido). Dicho de otra forma, en presencia de solución de conservación a 4 °C, es mejor aplicar ultrasonido en una cámara a temperatura ambiente que en condiciones hipotérmicas (cámara a una temperatura entre 2-6 °C) y sin ultrasonido. Los resultados que indican que la protección obtenida bajo la condición 3 (sin solución de conservación, en condiciones de frío y con ultrasonido) es mejor que la obtenida bajo las condiciones 1 y 2, también son inesperados. Estos resultados indican que es mejor combinar ultrasonido y condiciones de frío (incluso sin la presencia de una solución de conservación) que combinar la presencia de una solución de conservación con condiciones de frío (condición 1) o con ultrasonido (condición 2). Las condiciones 4 y 5 muestran la protección esperada y observada, respectivamente, cuando se utiliza la solución de UW, ultrasonido y condiciones de frío. La protección esperada sería, en el mejor de los casos, la suma de la protección obtenida en la condición 1 y de la protección obtenida en la condición 2. Dicho de otra forma, debido al efecto de calor inducido por el ultrasonido, no se esperaría que la protección 1 + 2 correspondiera a la suma de las condiciones 1 y 2 consideradas por separado. Sin embargo, estos no fueron los resultados observados. Los resultados obtenidos indicaron un efecto sinérgico cuando

5 se combinan ambos tratamientos (condiciones de frío y ultrasonido) debido a que la protección obtenida cuando se combinan ambos tratamientos es mucho mejor que la suma de protecciones obtenidas cuando ambos tratamientos se aplican por separado. Asimismo, la protección obtenida cuando se combinan ambos tratamientos y en presencia de solución de conservación es mucho mejor que la obtenida cuando se combinan ambos tratamientos sin solución de conservación (condición 3).

Figura 13: muestra el mismo patrón de protección renal que el que se muestra en la Figura 5 para el hígado.

10 Por consiguiente, teniendo en cuenta todos los resultados, la combinación de solución de preservación, ultrasonido y condiciones de frío pueden ser una estrategia extremadamente eficaz para el transporte y la conservación de órganos durante la isquemia fría.

15 Se proporcionan un método y equipo para transportar y almacenar muestras biológicas en condiciones hipotérmicas y sin suministro de oxígeno en mejores condiciones que las actualmente disponibles, y con transmisión efectiva de ultrasonido al órgano o tejido dentro de la cámara. Todo ello permite reducir los efectos nocivos de la isquemia fría y aumentar la viabilidad de los injertos antes de su implantación en el receptor, evitando así tener que hacer otro trasplante.

20 El equipo y método para la conservación también podrían ser útiles en órganos secundarios; en consecuencia, el número de órganos disponibles para trasplante podría aumentar, reduciendo así las listas de espera. Asimismo, ya que se reducen las lesiones inducidas por la isquemia fría durante la conservación y el transporte de órganos, se puede ampliar el tiempo durante el cual los órganos son transportados en el refrigerador hasta su implantación en el receptor. Asimismo, el equipo es fácil de transportar para prevenir, entre otros factores, complicaciones logísticas resultantes de la conservación dinámica del órgano.

25

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (1) para el transporte y la conservación de una muestra biológica (100) *ex-vivo* para su posterior trasplante en un ser humano o animal vivo, que comprende una cámara (2) para contener dicha muestra biológica (100), delimitada por paredes (4) hechas de un material aislante térmico, medios de refrigeración (6) para mantener la temperatura dentro de dicha cámara (2) por debajo de la temperatura fuera de dicho dispositivo (1), y al menos un sistema de ultrasonido adecuado para generar y aplicar ultrasonido sobre dicha muestra biológica (100), en donde el dispositivo comprende además un contenedor auxiliar (14) que se puede cerrar para contener una solución de conservación, sin suministro de oxígeno externo y para contener dicha muestra biológica (100) sumergida en dicha solución de conservación, **caracterizado por que** el dispositivo comprende además un soporte (10) en forma de lámina en dicha cámara (2) adecuado para soportar dicho contenedor auxiliar (14) que se puede cerrar que contiene dicha muestra biológica (100), pudiendo vibrar libremente dicho soporte (10) en forma de lámina cuando se aplica dicho ultrasonido, y en donde dicho sistema de ultrasonido comprende al menos un transductor (8) montado en al menos una de las paredes de dicho soporte (10) en forma de lámina.
2. El dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho sistema de ultrasonido es adecuado para emitir dicho ultrasonido a una frecuencia comprendida entre 25 kHz y 1 MHz y una intensidad de sonido comprendida entre 0,01 y 2 W/cm².
3. El dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha intensidad de sonido está comprendida entre 0,02 y 1 W/cm², y preferiblemente entre 0,02 y 0,1 W/cm².
4. El dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichos medios de refrigeración (6) son adecuados para mantener la temperatura dentro de dicha cámara (2) entre 0 y 15 °C, preferentemente adecuados para mantener la temperatura dentro de dicha cámara (2) entre 2 y 10 °C, y en particular preferentemente entre 2 y 6 °C.
5. El dispositivo (1) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho al menos un transductor (8) está montado en la cara de dicho soporte (10) en forma de lámina, preferentemente de metal, opuesta a la superficie de soporte (12) para dicha muestra biológica (100) para aplicar dicho ultrasonido hacia dicha superficie de soporte (12).
6. El dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el soporte (10) en forma de lámina es una bandeja adaptada para contener un fluido.
7. El dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho contenedor auxiliar (14) comprende un fondo falso (18) ubicado lejos de la base de dicho contenedor auxiliar (14), y dicho fondo falso (18) está en comunicación fluida con el resto de dicho contenedor auxiliar (14).
8. Un método para el transporte de una muestra biológica (100) *ex-vivo* para su posterior trasplante en un ser humano o animal vivo, en donde dicho método comprende las siguientes etapas:
 [a] extraer sangre de dicha muestra biológica (100) en condiciones de frío y enfriar rápidamente dicha muestra biológica (100),
 [b] mantener dicha muestra biológica (100) sumergida en una solución de conservación sin suministro externo de oxígeno colocando dicha muestra biológica en una cámara (2) delimitada por paredes (4) hechas de un material aislante térmico,
 [c] irradiar dicha muestra con ultrasonido, y
 en donde dicha muestra biológica (100) se coloca sumergida en un contenedor auxiliar (14) que se puede cerrar que contiene dicha solución de conservación, y dicho contenedor auxiliar (14) se coloca en dicha cámara (2), y en donde dicho contenedor auxiliar (14) se coloca en un soporte (10) en forma de lámina que es una bandeja adaptada para contener un fluido y pudiendo vibrar libremente dicha bandeja cuando dicho ultrasonido se aplica a través de al menos un transductor (8) montado en al menos una de las paredes de dicho soporte (10) en forma de lámina.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde en dicha etapa de irradiación para irradiar dicha muestra biológica (100), el ultrasonido tiene frecuencias comprendidas entre 25 kHz y 1 MHz y una intensidad de sonido comprendida entre 0,01 y 2 W/cm².
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho ultrasonido tiene una intensidad comprendida entre 0,02 y 1 W/cm², y preferentemente entre 0,02 y 0,1 W/cm².
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde éste comprende además una etapa de enfriamiento para enfriar la temperatura en dicha cámara (2) hasta una temperatura entre 0 y 15 °C, en donde preferentemente en dicha etapa de enfriamiento la temperatura en dicha cámara (2) se mantiene entre 2 y 10 °C y en particular preferentemente entre 2 y 6 °C.
12. Uso de un dispositivo (1) para el transporte y la conservación de una muestra biológica (100) *ex-vivo* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha muestra biológica (100) se mantiene sumergida en una

solución de conservación sin suministro de oxígeno en condiciones hipotérmicas y dicha muestra (100) se irradia con ultrasonido de manera que la viabilidad, la funcionalidad y la interacción entre las diferentes células de dicha muestra biológica (100) se conservan para que dicha muestra biológica (100) se use en investigación de laboratorio posterior.

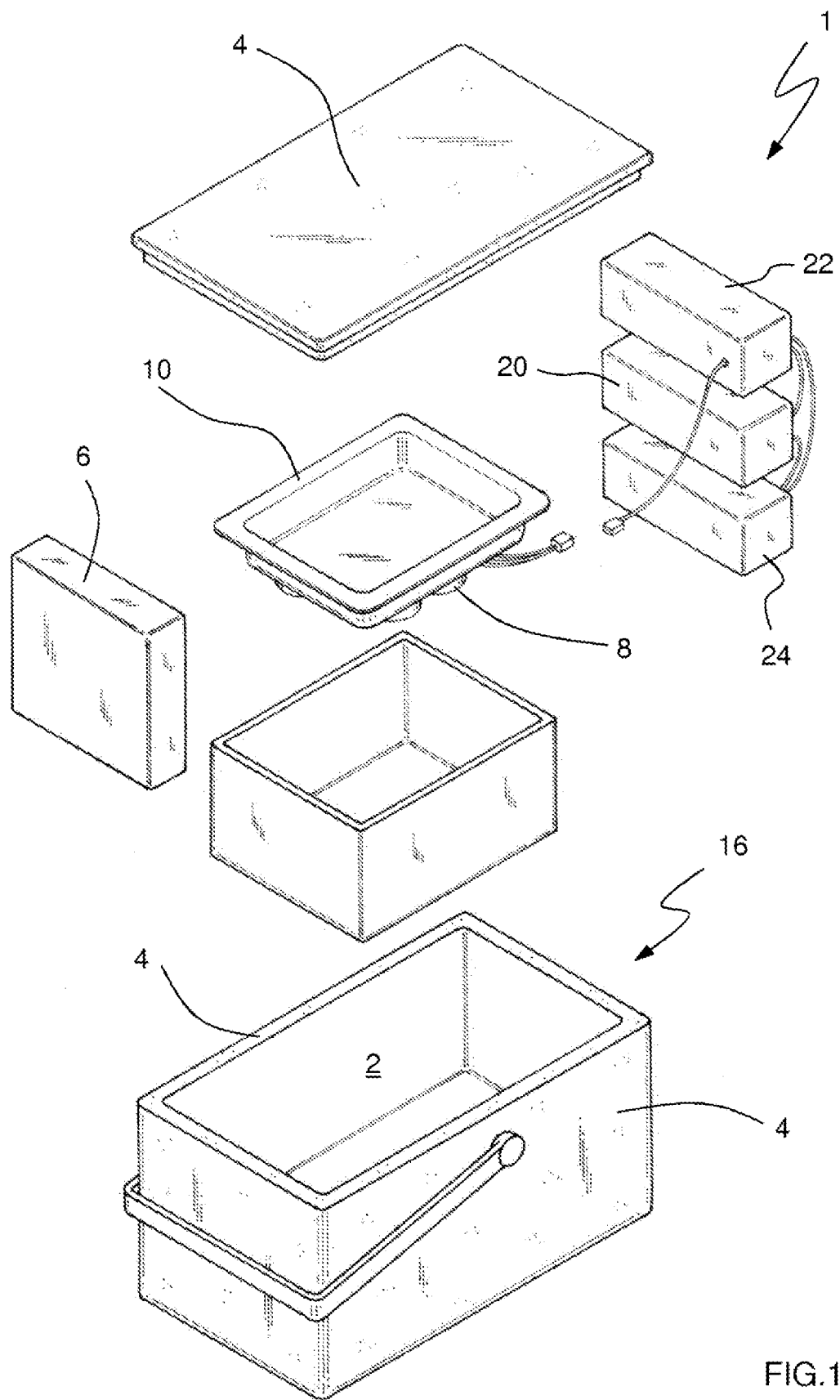


FIG.1

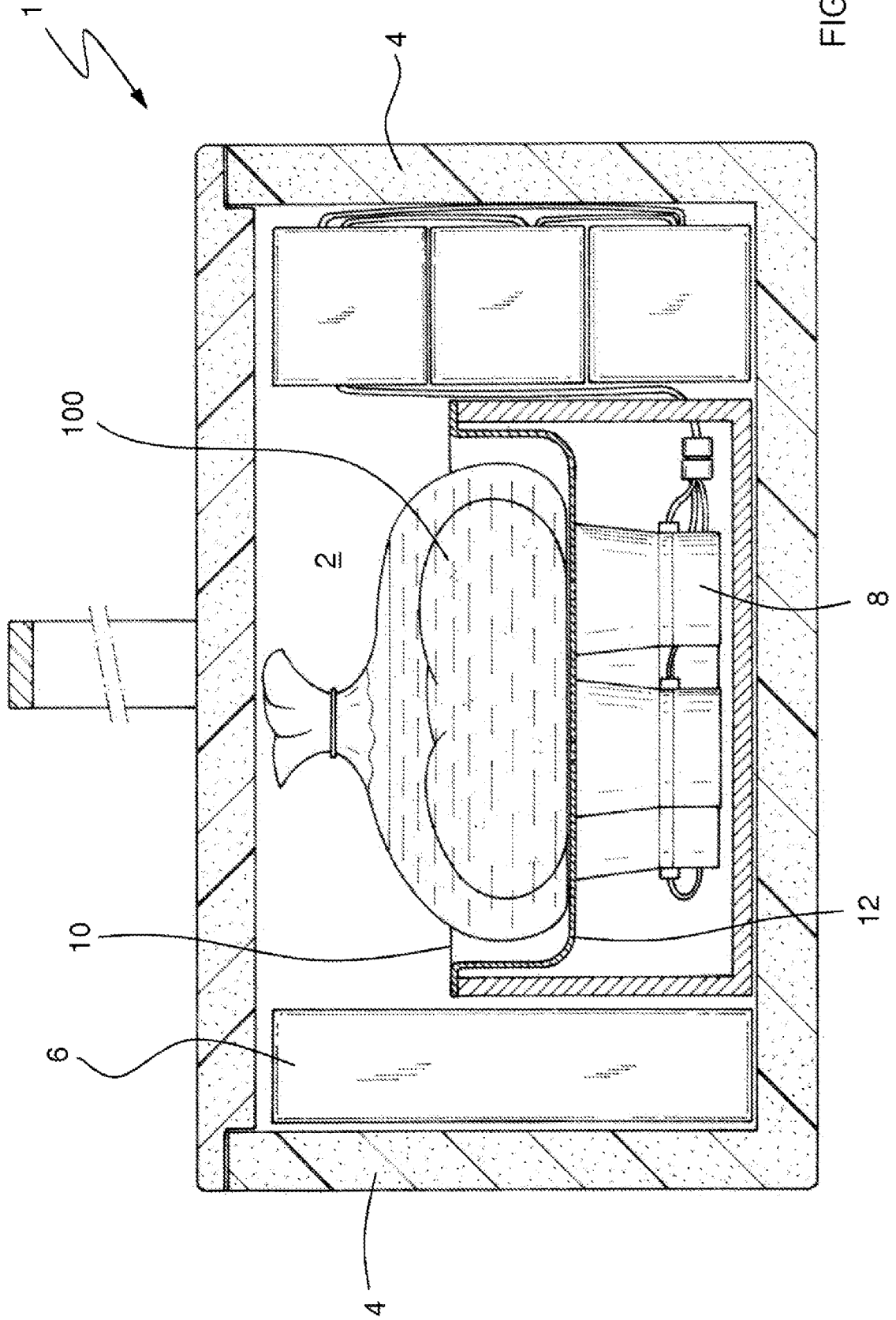
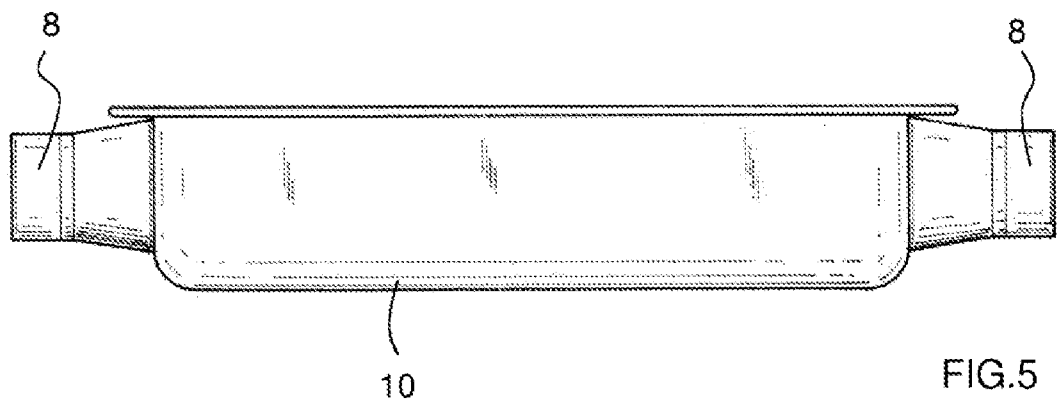
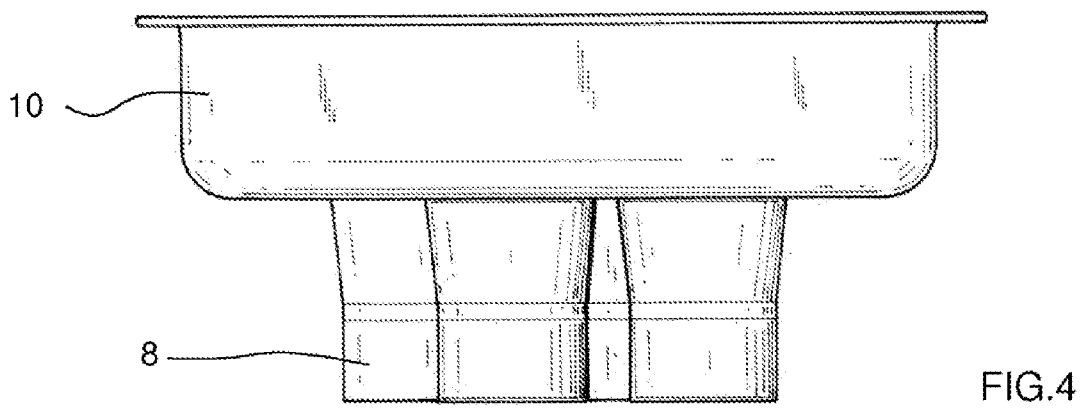
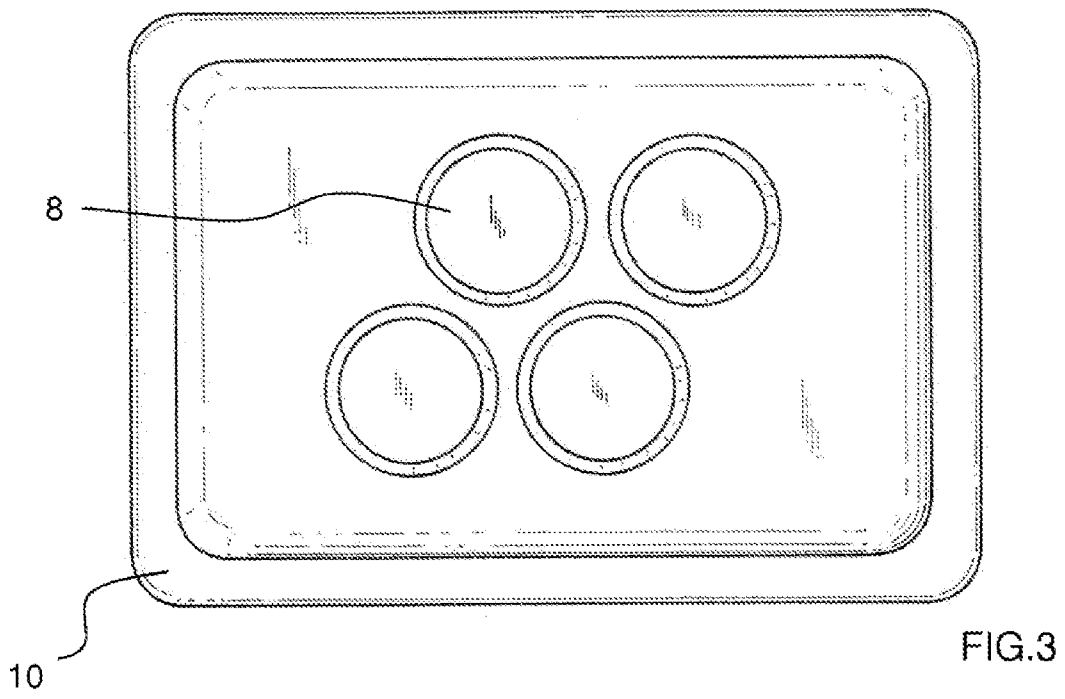


FIG.2



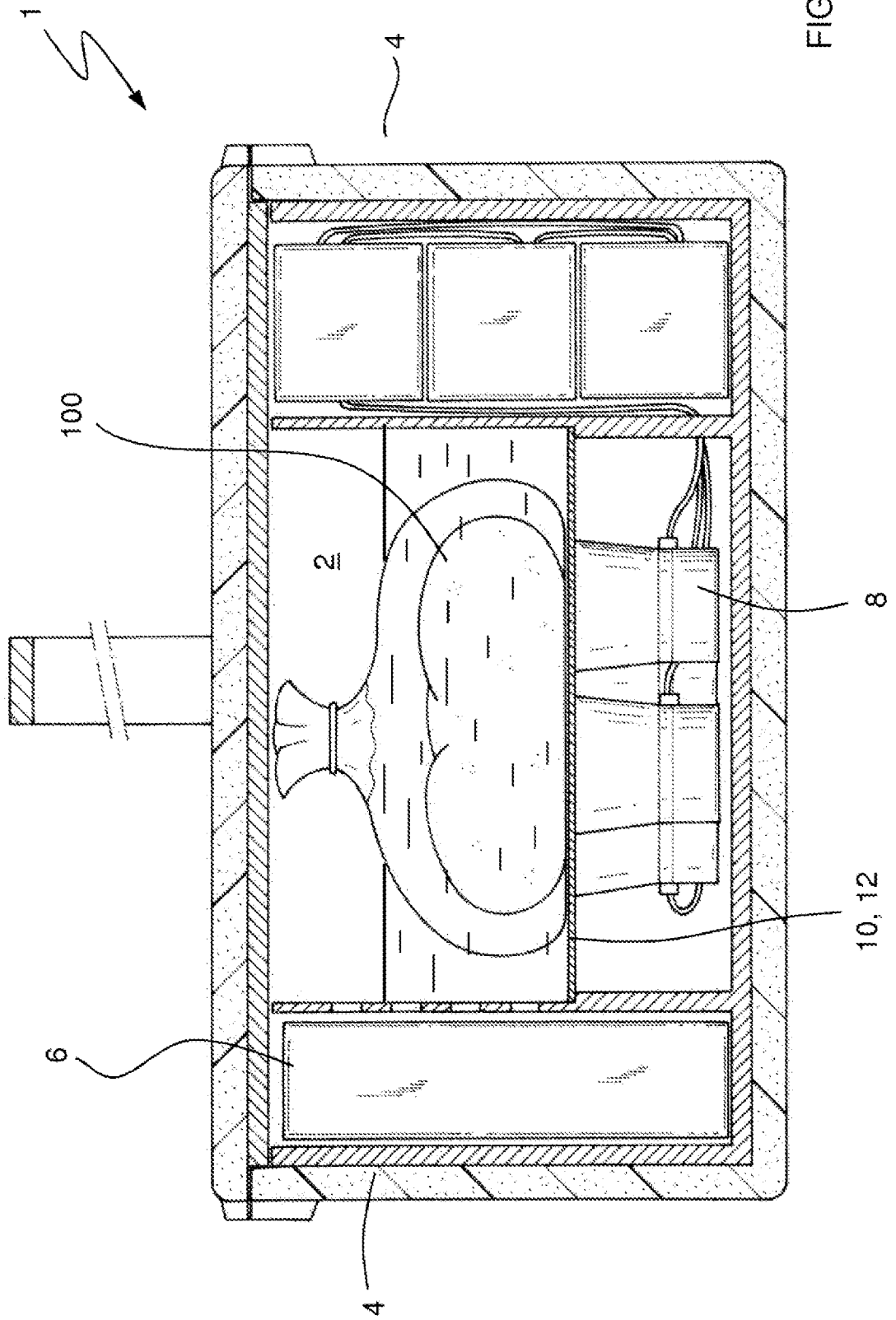


FIG.6

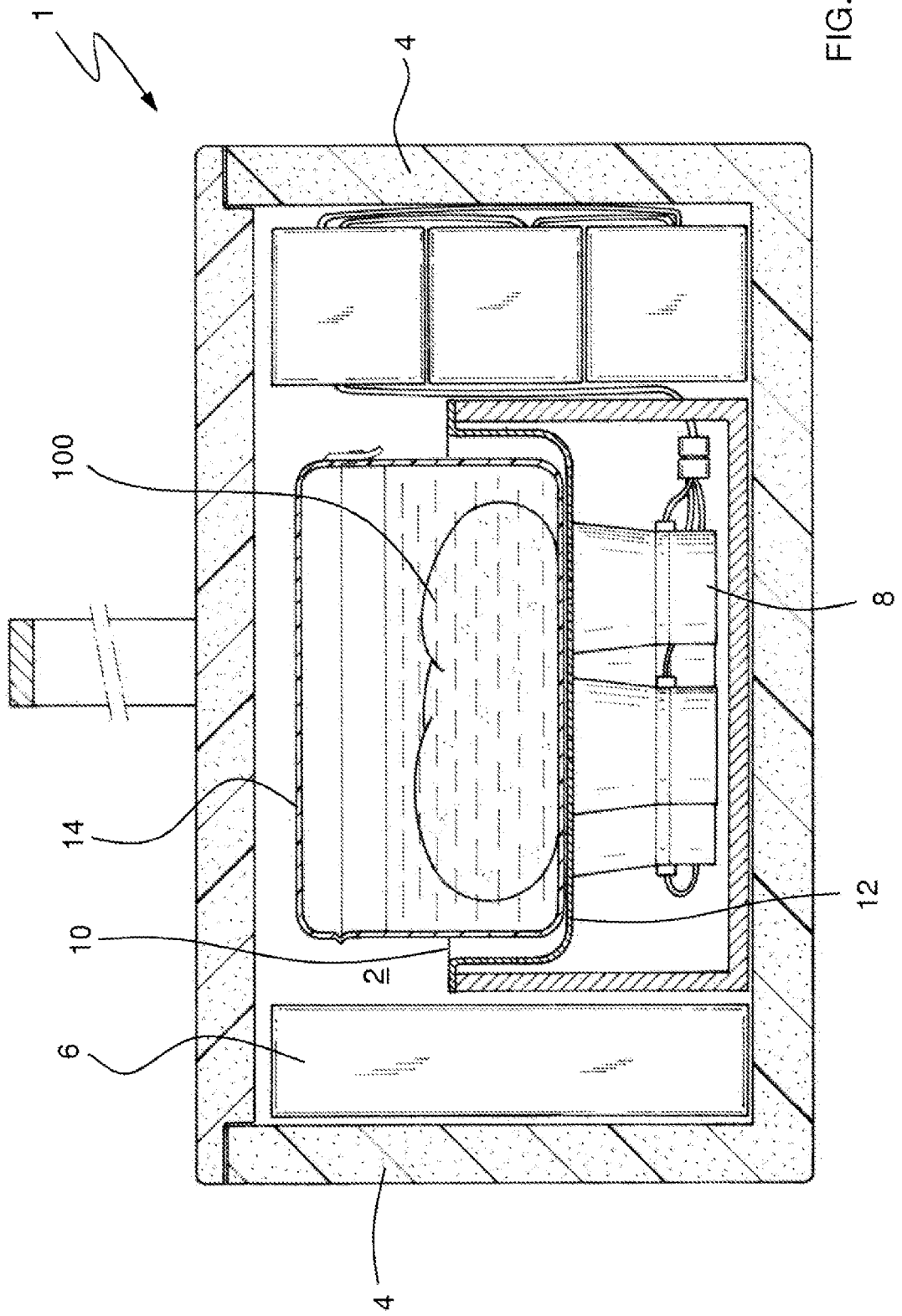


FIG.7A

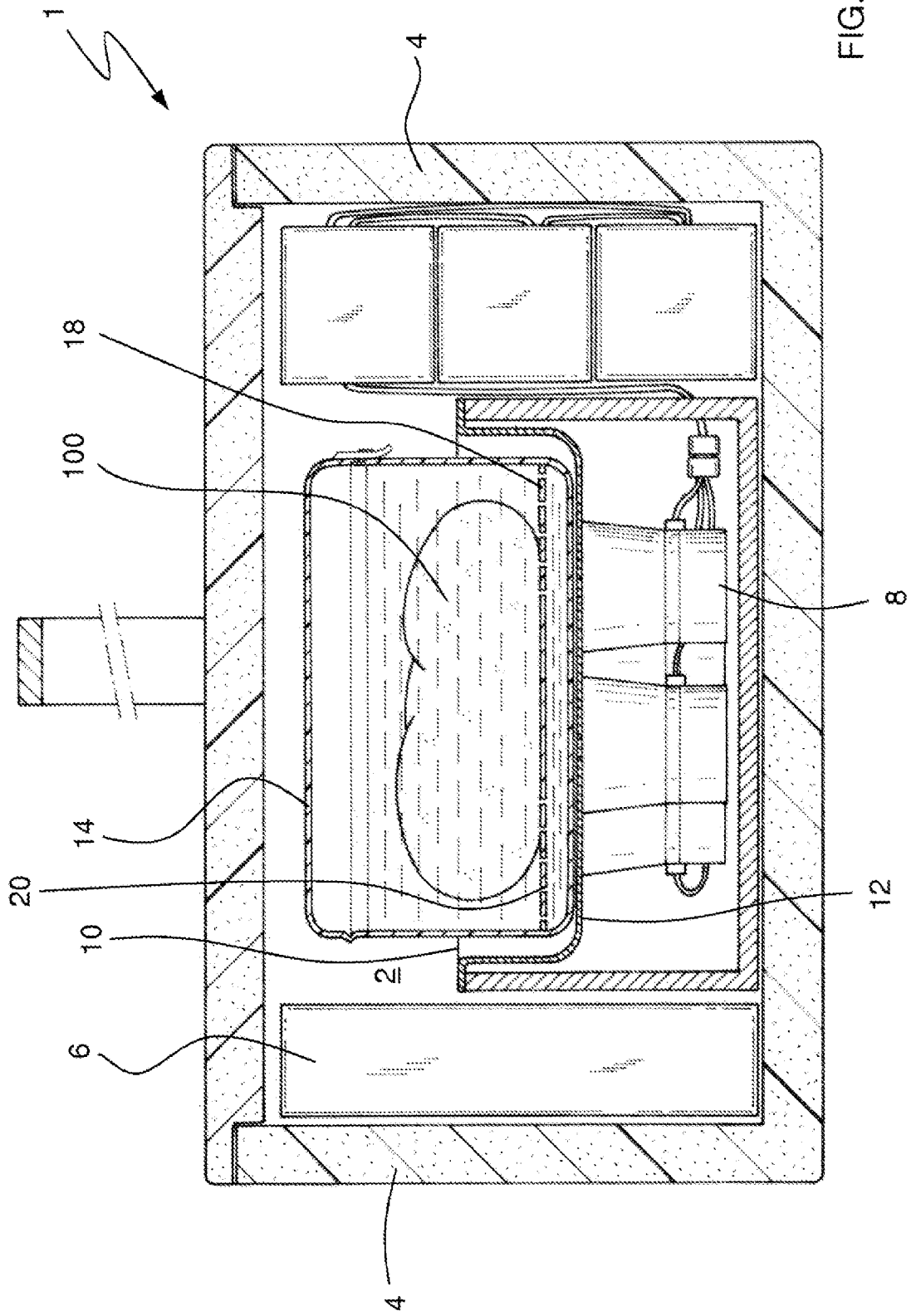


FIG. 7B

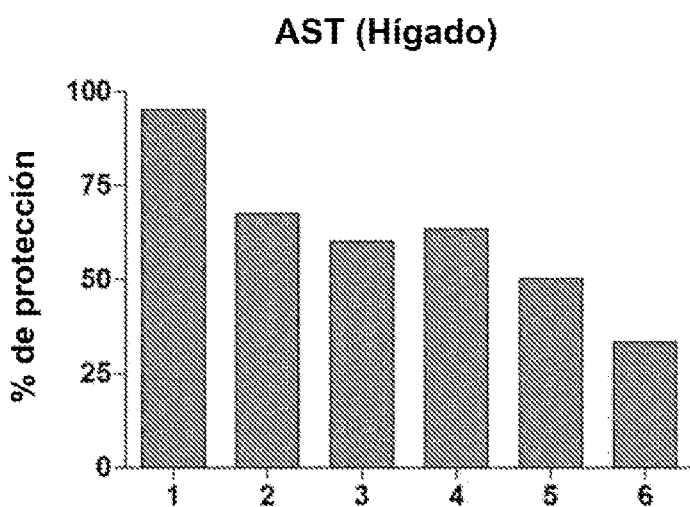


FIG.8A

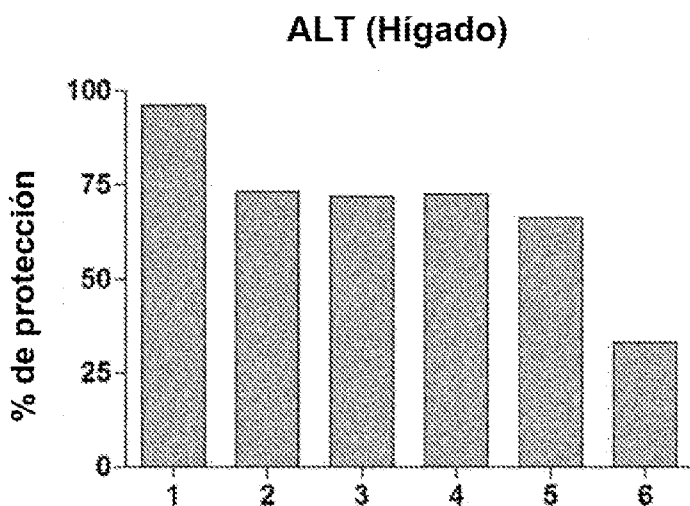


FIG.8B

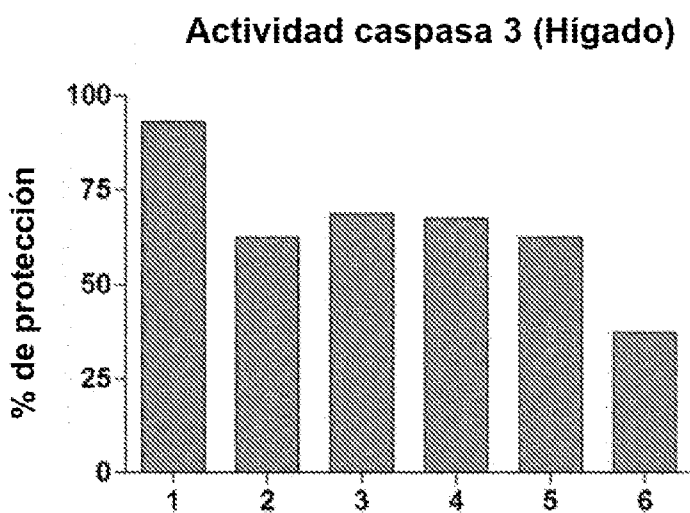


FIG.8C

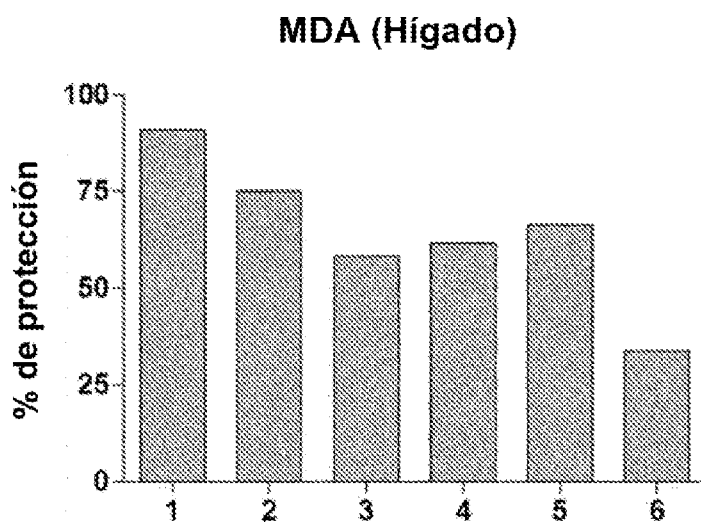


FIG.8D

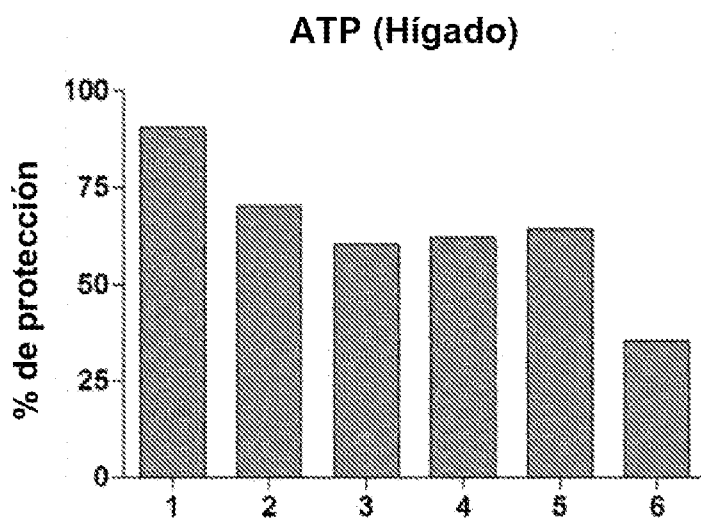


FIG.8E

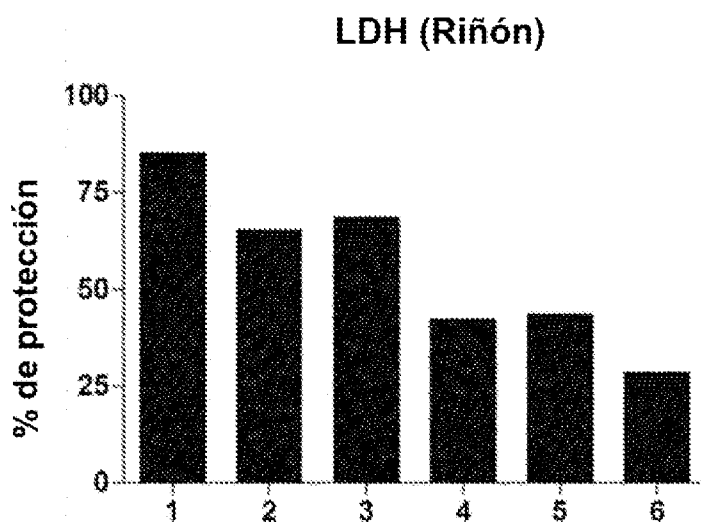


FIG.9A

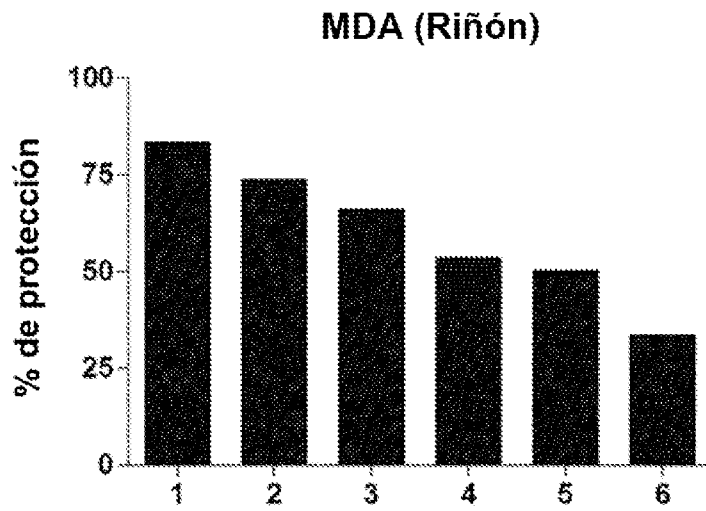


FIG.9B

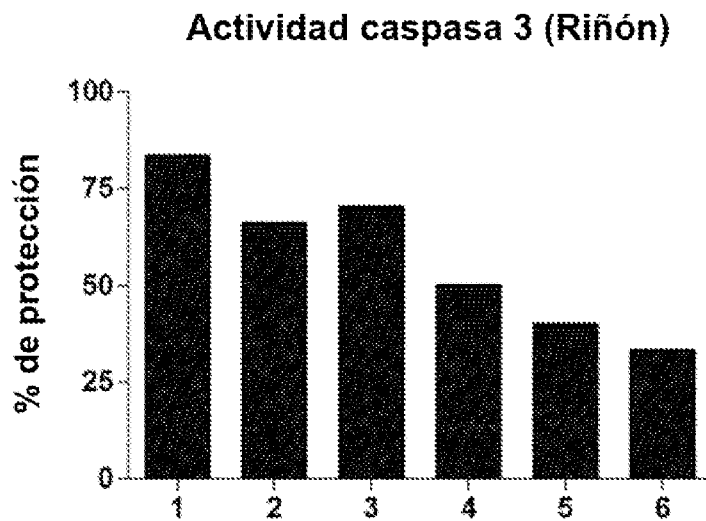


FIG.9C

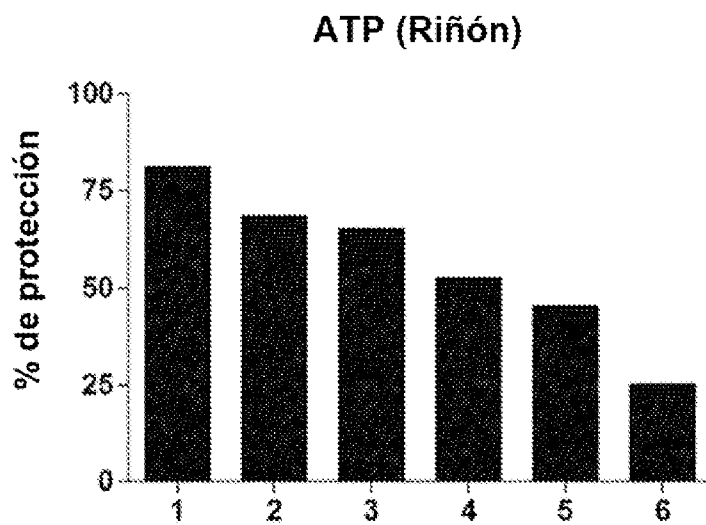


FIG.9D

Diferentes soluciones de conservación de AST (Hígado)

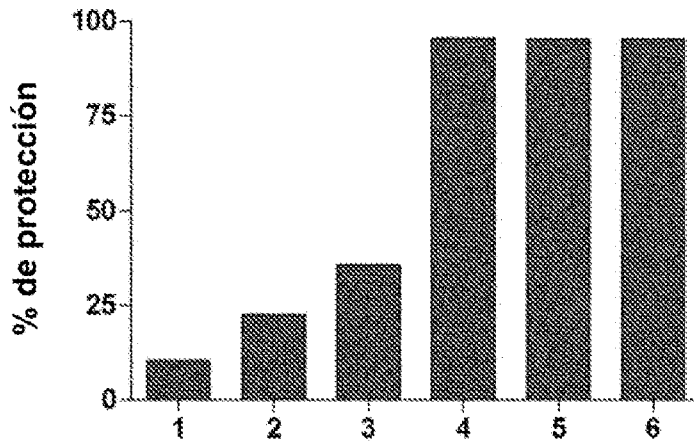


FIG.10

Diferentes soluciones de conservación de LDH (Riñón)

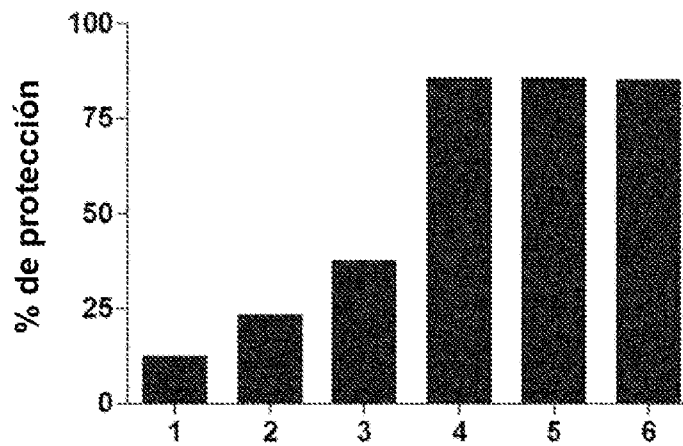


FIG.11

Resultados esperados frente a observados de AST (Hígado)

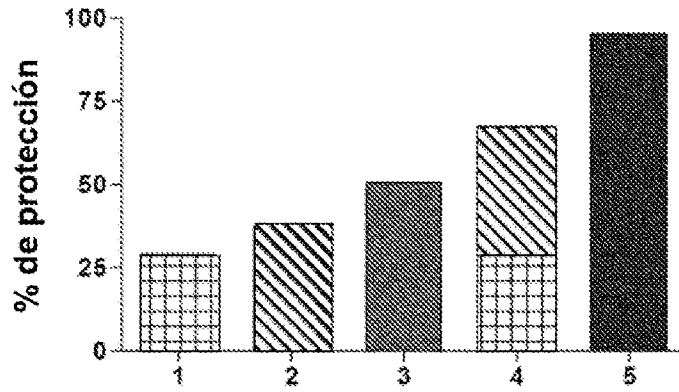


FIG.12

Resultados esperados frente a observados de AST (Riñón)

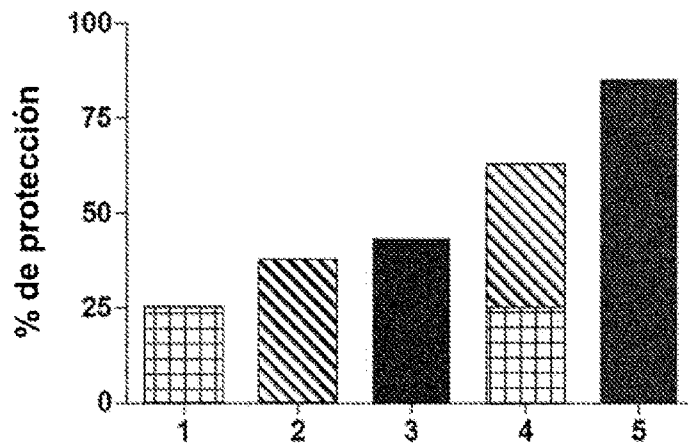


FIG.13