

**MÉTODO PARA OBTENER UN DISPOSITIVO DE SUSTITUCIÓN
Y REPARACIÓN ÓSEA DE ORIGEN PORCINO A PARTIR DE UN
PROCESAMIENTO MECÁNICO Y LA ACCIÓN QUÍMICA DE
VARIOS COMPUESTOS PARA CONFORMAR UNA MATRIZ ÓSEA
DESMINERALIZADA Y DESCELULARIZADA**

INVENTORES:

CARLOS MARIO JIMÉNEZ

CARLOS MEJÍA

ESTADO DEL ARTE DE LA INVENCION

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con el campo de la sustitución y la reparación ósea, y más específicamente con un dispositivo biocompatible, implantable, que permite la sustitución y reparación de tejido óseo, conformado por compuestos orgánicos provenientes de tejido óseo porcino, xenogénicos para el receptor, sometidos a un proceso de descelularización, desproteínización y desmineralización, generando de esta manera una matriz ósea liofilizada, desproteínizada, desmineralizada y libre de células provenientes del tejido donante. También se relaciona con el método para su elaboración y producción. Esta matriz,

luego de su implantación en un paciente, sirve como soporte estructural o andamio para la formación de hueso, al mismo tiempo que induce la formación de dicho tejido óseo en el huésped receptor.

Descripción del arte previo

Antes de ingresar en la descripción de los dispositivos y sistemas conocidos en el arte y empleados en la sustitución y reparación de tejido óseo o en el tratamiento de defectos óseos, vale la pena revisar los conceptos anatómicos, histológicos, fisiológicos y bioquímicos que permiten entender el funcionamiento del tejido óseo, así como la evolución del diseño y producción de los dispositivos implantables para reparar y generar dicho tejido cuando por alguna razón ha sufrido daño. Como es bien conocido por aquellas personas expertas en el arte, los huesos están compuestos de una matriz de material orgánico consistente en fibrillas de colágeno impregnadas de una sustancia adhesiva a base de mucopolisacáridos, dentro de las cuales se deposita el componente inorgánico, constituido por fosfato cálcico e hidroxapatita. Todo este tejido es altamente complejo en su organización tridimensional, y está atravesado por una red capilar finamente orientada, así como poblado por diferentes células que están involucradas en la generación y resorción de la sustancia ósea. La osteogénesis

y la reparación ósea son intrincados procesos fisiológicos, que involucran un constante equilibrio entre la generación de sustancia osteoide a partir de la actividad de células formadoras de hueso, conocidas como osteoblastos, y células encargadas de la reabsorción de dicha sustancia, conocidos como los osteoclastos. (Ver Moreira C, Dempster D, Baron R: Anatomy and Ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling. Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.June 2019)

La adecuada, efectiva y oportuna reparación del tejido óseo dañado por causa de trauma, enfermedad degenerativa, tumores, infecciones o cirugías previas es un objetivo persistentemente perseguido por especialidades como la ortopedia, la neurocirugía y la cirugía maxilofacial. Buscando alcanzar este fin, varios materiales, compuestos y dispositivos han sido usados o propuestos. Las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de los diferentes compuestos y materiales son los factores que influyen en el desempeño de los dispositivos de sustitución y reparación ósea disponibles. Un material biocompatible es aquel que no estimula en el huésped receptor ninguna respuesta luego de la implantación, o la respuesta provocada es solo leve y transitoria, y no severa, progresiva y persistente. Es bien conocido por aquellos expertos en el arte que una vez las

células y el componente inorgánico son removidos del hueso, el remanente de tejido orgánico, llamado matriz ósea desmineralizada (MOD), puede ser transplantada a animales ó seres humanos vivos sin substanciales efectos deletéreos. Así, la MOD es usada en una gran cantidad de procedimientos médicos debido a su capacidad de soportar e inducir la formación de tejido óseo en el huésped o receptor. (Ver Shehadi JA, Elzeim SM: Review of commercially available demineralized bone matrix products for spinal fusions: A selection paradigm. Surgical Neurology International 2017; 8:203)

En el caso de la reparación de un defecto óseo, un dispositivo implantado para tal fin debe tener esencialmente la capacidad de ser compatible con el tejido óseo, al mismo tiempo que establece un soporte estructural o andamio tridimensional (scaffold) en el cual los osteoblastos se adhieren, proliferan y a continuación generan y depositan la sustancia osteoide y el hueso de novo; a esta propiedad se le llama osteoconductividad. Además, es deseable que un dispositivo útil en la fusión ósea posea propiedades de señalización proteica que induzcan la actividad de producción de sustancia osteoide por parte de los osteoblastos, en lo que ha dado en llamarse la osteoinductividad. Dependiendo de su origen, los materiales a partir de los cuales son obtenidos los dispositivos de

fusión ósea pueden ser autólogos (provenientes del mismo paciente), alogénicos (provenientes de órganos cadavéricos almacenados en bancos de tejidos) o xenogénicos (extraídos de tejidos de origen animal). (Ver US Patent 5,162,114). Entre todos los dispositivos desarrollados en los últimos cuarenta años, desde los 80's se ha destacado la matriz ósea desmineralizada (MOD), la cual consiste en un extracto de tejido óseo cortico-esponjoso constituida por el componente proteico del hueso, libre de minerales y de células, usualmente convertida en partículas liofilizadas para eliminar el agua (Ver US Patent 4,563,350). Esta MOD es un dispositivo tridimensional que sirve de soporte para que nuevo tejido óseo se forme, y después de un tiempo es degradada y reabsorbida. Como ocurre con toda matriz de tejido extracelular, una vez removidas las células de un tejido, aparece un andamio poroso. En el caso de la MOD, este andamio consta al mismo tiempo de propiedades osteoconductivas y osteoinductivas, estas últimas originadas en los factores de crecimiento retenidos a partir del tejido donante. Las MOD provenientes de algunas especies animales, específicamente las bovinas y las porcinas, conservan las mismas propiedades de las alogénicas, con tres ventajas: disponibilidad ilimitada, bajo costo y menor tasa de transmisión de enfermedades.

El estándar de oro como material de un injerto o dispositivo de fusión ósea es el hueso autólogo, proveniente del mismo paciente; es osteoinductivo y no inmunogénico, y cumple con todos los requisitos biológicos, mecánicos y físicos del injerto o dispositivo ideal. Lamentablemente su disponibilidad es limitada, y se acompaña de importantes reacciones desfavorables y efectos secundarios en el sitio de donde es tomado el material en el paciente. (Ver Kubosch J, Bernstein A, Wolf L, et al: Clinical trial and in-vitro study comparing the efficacy of treating bony lesions with allografts versus synthetic or highly- processed xenogeneic bone grafts. BMC Musculoskeletal Disorders 2016; 17:77). Es por esto que progresivamente se ha abandonado la fuente autóloga de MOD y hoy en día la inmensa mayoría de los productos de MOD disponibles comercialmente son del tipo alogénico, elaborados a partir de hueso proveniente de cadáveres humanos, almacenados en los bancos de tejidos; desafortunadamente los injertos o dispositivos de fusión ósea de este tipo adolecen de algunos problemas: baja capacidad osteogénica, alta tasa de reabsorción, relativamente importante y desfavorable respuesta inmunogénica, costo elevado, su disponibilidad es limitada y además pueden resultar en la transmisión de enfermedades infecciosas. Por estas razones algunos abogan por la utilización de tejido óseo proveniente de animales, es decir,

xenogénico, como la mejor opción para obtener matriz ósea desmineralizada; este material es adecuado siempre y cuando haya sido convenientemente descelularizado y desproteínizado, pues de esta manera el tejido óseo de origen animal pierde su capacidad de generar reactividad inmune en el huésped, conservando sus propiedades osteoconductivas y osteoinductivas. (Ver: Sun X, Liu C, Shi Y et al: The assessment of xenogeneic bone immunotoxicity and risk management study. BioMed Eng Online 2019;18:108). La medición de DNA residual es el método por elección para asegurar la adecuada descelularización de un derivado xenogénico (Ver: Nucleic Acid-Based Techniques. Approaches for detecting trace nucleic acids (residual DNA testing). The United States Pharmacopeial Convention. 2012;33:1025). Entre los injertos y dispositivos óseos xenogénicos, los provenientes de las especies porcinas se destacan por su similitud con el tejido humano desde el punto de vista anatómico, fisiológico y genético. El origen porcino está presente en múltiples implantes en el campo de la cirugía maxilofacial, ortopédica, neuroquirúrgica y cardiovascular. Tiene una importante ventaja sobre las MOD provenientes de otras especies como los bovinos: los tejidos de origen porcino transmiten significativamente menos enfermedades, especialmente virales. (Ver David K. C. Cooper, Bernd

Gollackner, and David H. Sachs: will the pig solve the transplantation backlog? Annu. Rev. Med. 2002; 53:133-47)

Cuando se desarrolla una MOD para ser utilizada en pacientes en la práctica clínica, esta debe contar con varias condiciones, nada fáciles de alcanzar: se debe conformar un andamio poroso, con un tamaño de los poros predefinido, que permita ser repoblado con nuevas células del huésped, así como ser atravesado por los capilares del tejido receptor. El logro de tal porosidad se da con base en un delicado proceso que debe cumplir con cinco etapas:

1. Exposición del tejido óseo donante, en este caso hueso porcino, a una solución hipo-osmótica (por ejemplo, agua desionizada) para hacer estallar las células.
2. Agitación mecánica del tejido derivado de la pieza ósea, para potenciar la disrupción de las células, sin afectar la integridad de la matriz extracelular.
3. Inmersión en una solución que contenga un compuesto enzimático, tal como la tripsina, que rompa las uniones celulares.
4. Una vez descelularizado el tejido donante, este debe ser expuesto a la acción de una sustancia detergente, tal como el Tritón X-100 al 0.5% en

hidróxido de amonio, que remueva lo más completamente posible los restos proteicos y celulares, de tal manera que quede una matriz extracelular limpia y libre de detritos, con poros de suficiente tamaño como para que la MOD adquiriera las propiedades osteoconductivas y a ella se adhieran y en su interior proliferen los osteoblastos.

5. Un tratamiento químico adicional debe vencer la natural compartimentalización que poseen todos los tejidos animales, que crea barreras para la migración celular por parte del tejido receptor. Es ideal que los poros que naturalmente quedan en la matriz extracelular después de perder la mayor parte de sus células, se interconecten y sean aumentados entre un 20 y un 100% de su tamaño original, aunque en ocasiones debe ser aumentado hasta en un 350%. A este objetivo de expansión del tamaño de los poros se llega con el uso de un agente oxidante. (Ver US Patent 8,221,777). Es importante diferenciar los conceptos de porosidad y tamaño de los poros; la primera describe el arreglo tridimensional de los espacios que quedan en la matriz extracelular después de la descelularización, y está determinada

naturalmente para cada tipo de tejido, siendo difícilmente manipulable en el procesamiento de las piezas óseas. En contraste, el concepto de tamaño de los poros de la matriz extracelular se refiere al área de cada poro, y esta variable sí puede ser manipulada en el procesamiento de la pieza ósea, específicamente al exponerla a la acción de los agentes oxidantes, logrando un tamaño de poro predefinido que depende del uso clínico que se le vaya a dar a cada matriz orgánica obtenida. Por ejemplo, para efectos de reparación y fusión ósea el tamaño recomendado para los poros es de entre 100 y 1.000 micrones, pues los osteoblastos miden en promedio unos 30 micrones y lo deseable es que, como mínimo, los poros superen en una relación de 3:1 el tamaño de las células que serán las que se adhieran y proliferen en el interior del andamio biológico. (Ver US Patent 6,132,463). El control del tamaño de los poros puede lograrse de manera predeterminada a través de la variación de la temperatura, la concentración del agente oxidante y el tiempo de exposición de la pieza al mismo. Hay que tener cuidado porque existe un mecanismo de intercambio entre el tamaño de los poros y la arquitectura de

la matriz orgánica: en la medida en que aumenta el tamaño de los poros, forzosamente la estructura pierde algo de sus propiedades físicas y mecánicas. (Ver US Patent 8,221,777).

Es importante resaltar que durante el procesamiento de la MOD, tanto la rigurosa remoción de los detritos celulares como de los materiales que son extraños a la estructura de la matriz extracelular, reducen significativamente la probabilidad de una reacción inflamatoria indeseable en el huésped receptor, o sea en el paciente, así como la transmisión de enfermedades que eventualmente pudiesen estar presentes en el órgano donante, en este caso el tejido óseo porcino.

A pesar de las ventajas anotadas del tejido porcino como material orgánico de origen para la elaboración de matrices óseas, es relativamente limitada la disponibilidad comercial de una MOD de origen porcino, y la inmensa mayoría de ellas con alogénicas, existiendo unas cuantas xenogénicas, la mayoría de las cuales son de origen bovino. Es por esto que se considera que, en virtud del actual estado de la técnica de reparación y sustitución ósea y dada la variedad y complejidad de materiales y dispositivos que ofrece el mercado, así como los riesgos y efectos secundarios que se derivan de su uso, resultaría muy conveniente contar con un dispositivo que conserve las ventajas de otros de

origen xenogénico, en el caso del presente proceso de origen porcino, pero con una muy baja tasa de transmisión de enfermedades, que sigue siendo significativa en los de origen bovino. (Ver: Bracey DN, Seyler TM, Jinnah AH, et al. A porcine xenograft-derived bone scaffold is a biocompatible bone graft substitute: An assessment of cytocompatibility and the alpha-Gal epitope. Xenotransplantation. 2019;26(5):e12534) y que al mismo tiempo permita conducir e inducir la formación de hueso de forma efectiva, oportuna y segura, propiedades que son logradas por la matriz ósea de origen porcino, desmineralizada y libre de células, cuyo método de obtención, preparación y producción, diseñado por los autores, es descrito más adelante. (Ver: Nie Z, Wang X, Ren L, Kang Y. Development of a decellularized porcine bone matrix for potential applications in bone tissue regeneration. Regen Med. 2020;15(4):1519-1534)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A la luz de los inconvenientes citados, es un objeto de la presente invención proveer un método para obtener de forma costo:efectiva y en un tiempo racionalmente corto un dispositivo de fusión y reparación ósea implantable,

consistente en una matriz ósea desmineralizada y libre de células, proveniente de tejido óseo porcino.

Es aún otro objeto de la presente invención proveer un método para la elaboración de dicho dispositivo a partir de la metáfisis distal de fémur porcino, debidamente lavada, liberada de tejidos blandos y de médula ósea amarilla, a la cual se le hacen cortes para obtener bloques de entre 5 y 10 mm de espesor y 5 mm de diámetro. Tales bloques óseos de hueso porcino son sometidos a un protocolo de descelularización y oxidación química que conduce a la obtención de fragmentos de matriz orgánica de hueso esponjoso libres de material inorgánico y desprovisto al menos en un 95% de sus células; estos bloques finalmente son liofilizados y almacenados a temperaturas de congelación para su uso posterior.

Es aún otro objeto de la presente invención proveer un método imaginológico que demuestre la arquitectura tridimensional de la presente invención.

Es además otro objeto de la presente invención proveer un conjunto de métodos que demuestren el proceso de aislamiento de la matriz de colágeno desprovisto de la mayor parte de sus células, comprobado tal logro mediante la captación de imágenes tridimensionales estereoscópicas y de imágenes provenientes del análisis de su estructura histológica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para mayor claridad y comprensión del objeto de la presente invención, la misma ha sido ilustrada en varias figuras, en las que se ha representado al invento en una de las formas preferidas de realización, todo a título de ejemplo, en donde:

Las figuras 1 y 2 muestran unas ilustraciones esquemáticas del método diseñado por los autores para llevar a cabo la descelularización y desmineralización ósea en su fase mecánica. Como se puede inferir de dicha ilustración, el cilindro óseo es colocado en una cámara-trampa de vidrio, ubicada dentro de un circuito cerrado de circulación de un fluido impulsado por una bomba peristáltica, de tal manera que el fluido ejerce su efecto de estrés mecánico erosivo sobre el cilindro óseo al encontrarse este atrapado en un punto determinado del circuito, bajo el obstáculo impuesto por una trampa de una malla metálica que no lo deja avanzar según el influjo de la corriente líquida. El estrés cizallante del fluido cuando pasa a través del espécimen óseo, impulsado por la bomba peristáltica, genera el efecto mecánico des-celularizante y des-mineralizante, el cual es complementado por el efecto químico de las sustancias contenidas en dicho fluido.

La figura 3 muestra una imagen tridimensional estereoscópica de la matriz ósea desmineralizada y descelularizada luego de ser obtenida mediante el método diseñado por los autores.

La figura 4 muestra las imágenes histológicas siguiendo la coloración de hematoxilina/eosina. El estudio se hizo tanto en el fragmento de hueso porcino sometido al proceso de desmineralización y descelularización según el método diseñado por los autores, como en el hueso porcino no procesado, llamado muestra de control.

La figura 5 muestra las imágenes histológicas siguiendo la coloración del tricrómico de Masson, que identifica el tejido rico en colágeno. El estudio se hizo tanto en el fragmento de hueso porcino sometido al proceso de desmineralización y descelularización según el método diseñado por los autores, como en el hueso porcino no procesado, llamado muestra de control.

Figura 1: Ilustración esquemática del mecanismo diseñado por los autores para descelularizar y demineralizar mecánicamente el cilindro óseo, utilizando para ello el estrés erosivo de un fluido impulsado por una bomba peristáltica.

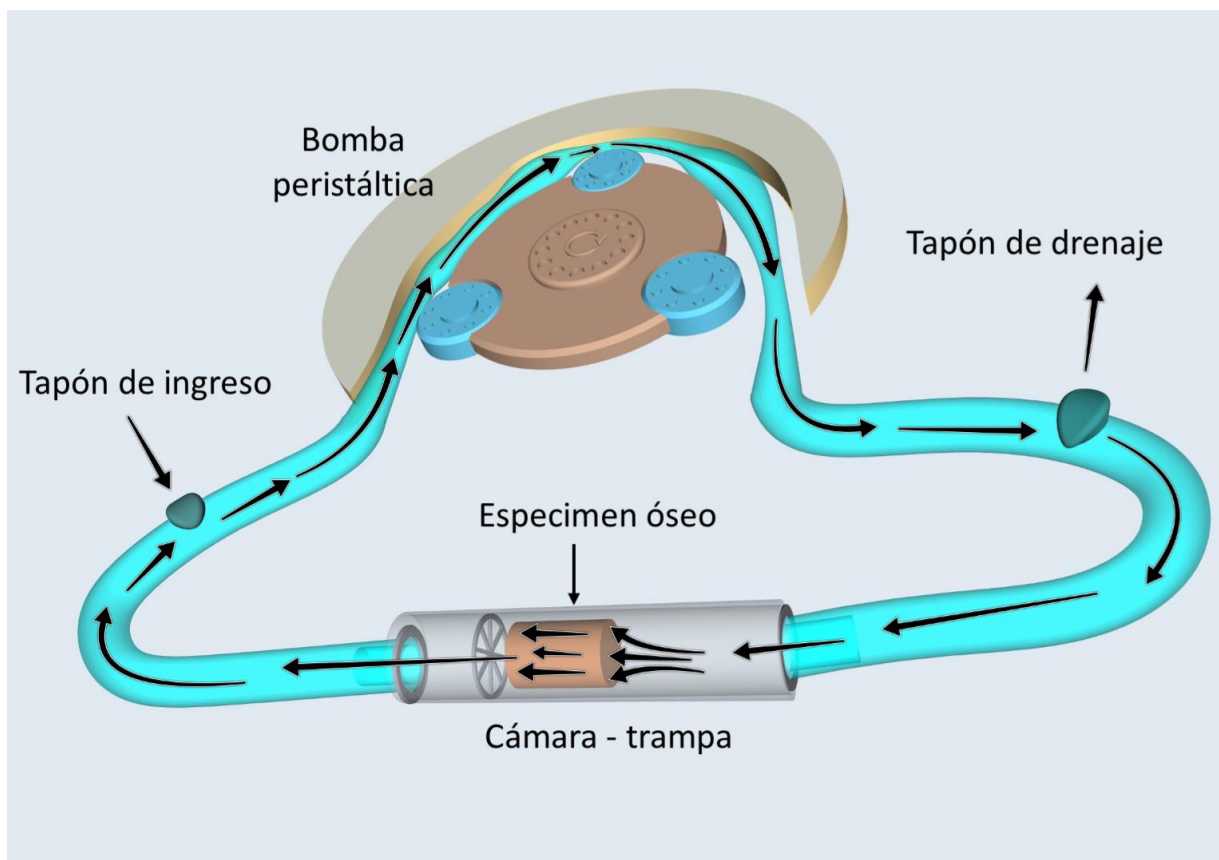


Figura 2: Ilustración esquemática del mecanismo por medio del cual es ingresado el fluido dentro del sistema a la cámara-trampa de vidrio que contiene el espécimen óseo. El estrés cizallante del fluido cuando pasa a través del espécimen óseo, impulsado por la bomba peristáltica, genera el efecto mecánico des-celularizante y des-mineralizante, el cual es complementado por el efecto químico de las sustancias contenidas en dicho fluido.

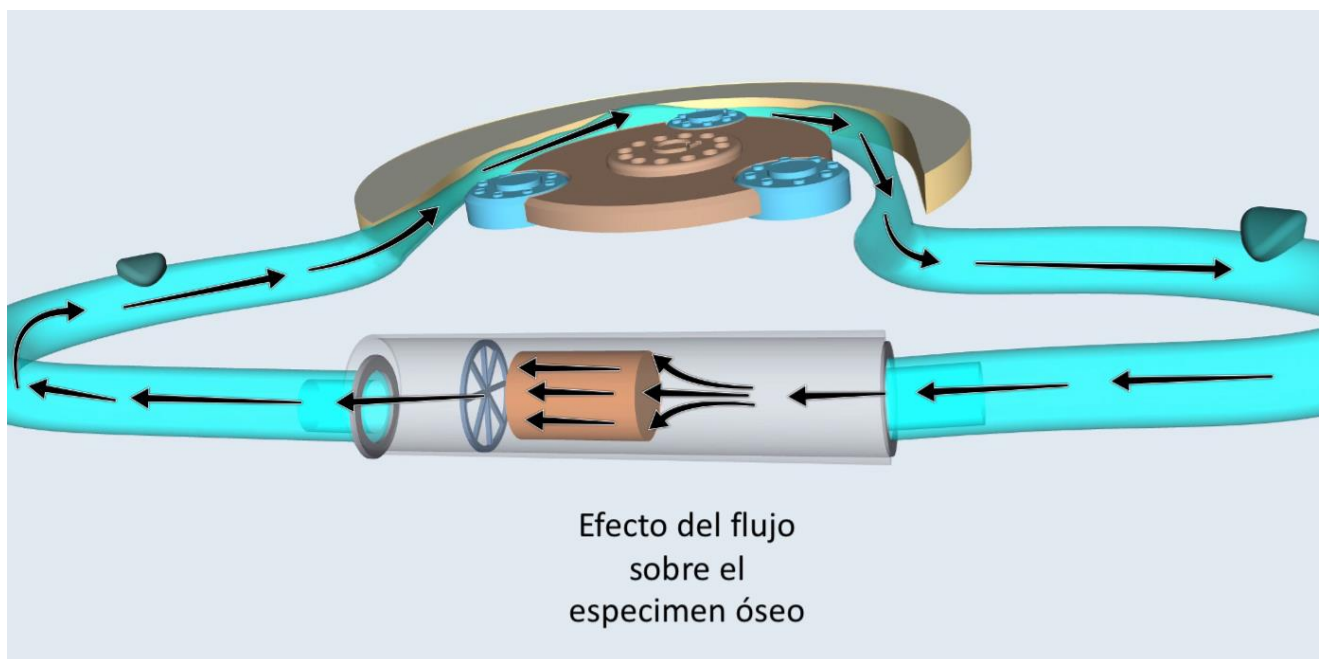


Figura 3: Imagen tridimensional estereoscópica de la matriz ósea desmineralizada y descelularizada obtenida a partir de hueso porcino, siguiendo el método desarrollado por los autores.

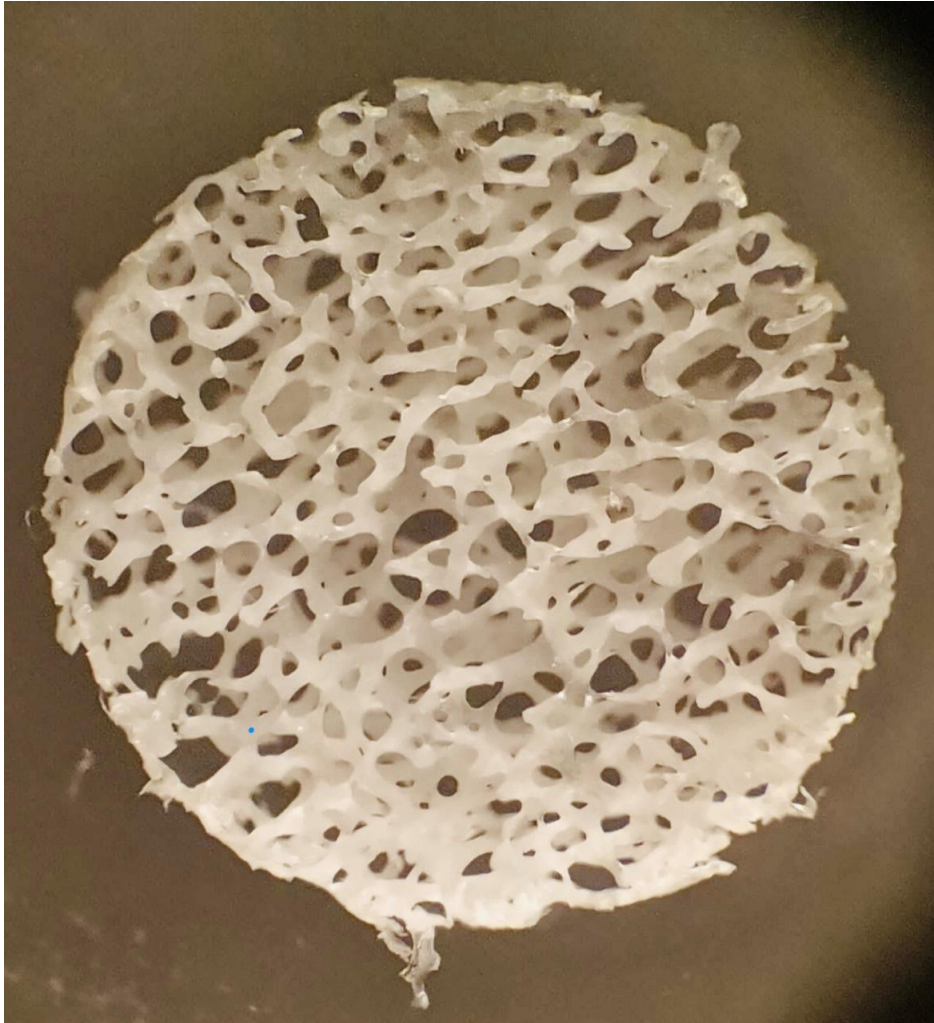


Figura 4: Imágenes del estudio histológico siguiendo la coloración de hematoxilina/eosina, tanto en el fragmento óseo procesado según el método de descelularización - desmineralización desarrollado por los autores (Foto 1) como en el hueso control no procesado (Foto 2). En el hueso procesado se aprecian trabéculas óseas desvitalizadas, sin osteocitos ni osteoclastos viables; el tejido graso ha desaparecido también. (Foto 1). 2. En el hueso control no procesado, las secciones histológicas muestran fragmentos de tejido óseo con adecuada conservación de su celularidad en la forma de osteocitos y médula ósea grasa. (Foto 2).

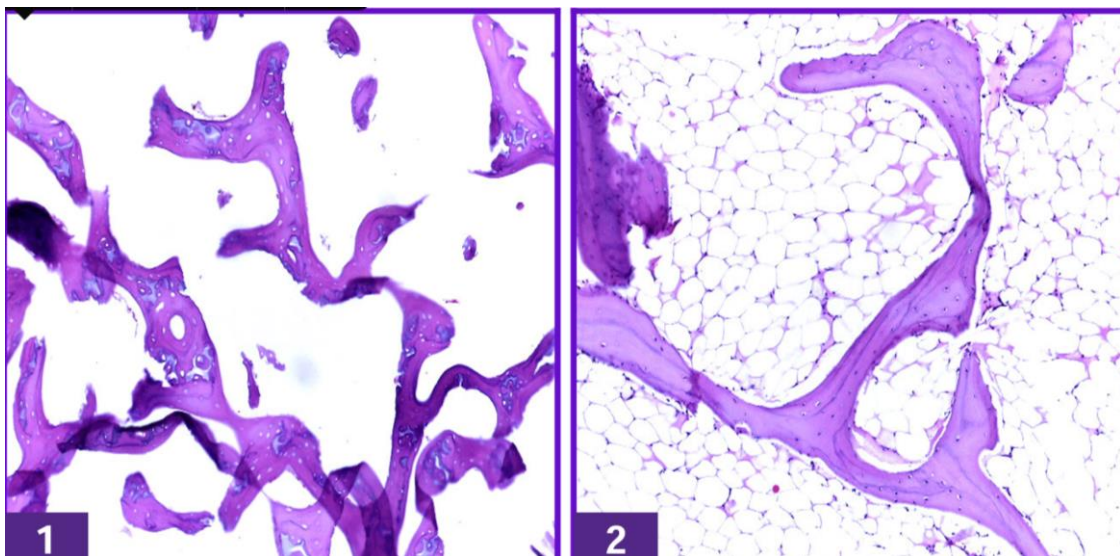
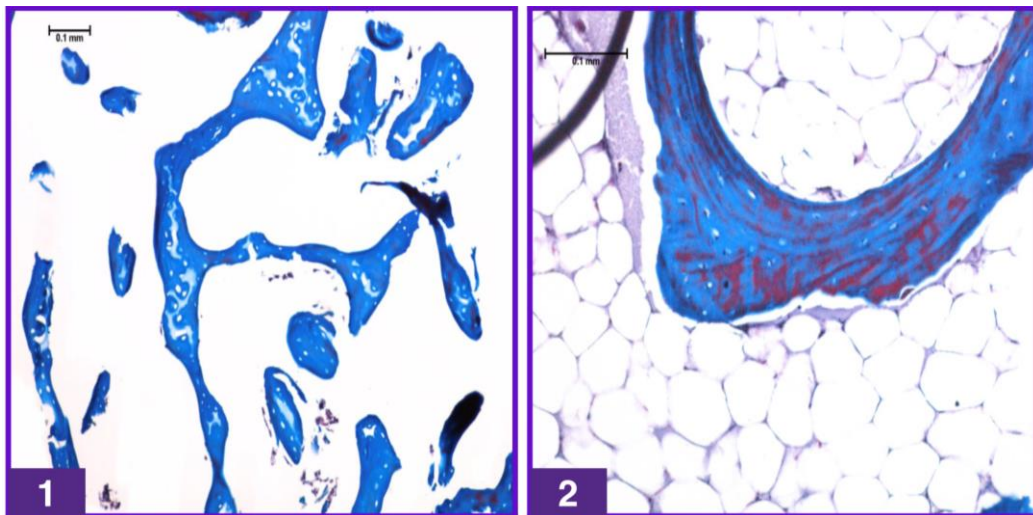


Figura 5: Imágenes del estudio histológico siguiendo la coloración de Tricrómico de Masson, tanto en el fragmento óseo procesado según el método de descelularización - desmineralización desarrollado por los autores (Foto 1) como en el hueso control no procesado (Foto 2). En el hueso procesado se aprecia conservación del colágeno óseo, con pérdida notable de la celularidad. (Foto 1). 2. En el hueso control no procesado, las secciones histológicas muestran conservación de los elementos celulares, con la debida presencia de colágeno óseo. (Foto 2).



DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Haciendo ahora referencia a las figuras vemos que la invención consiste en un método de fabricación de un dispositivo implantable de reparación y fusión ósea, que optimiza la relación costo:efectividad, acortando también los tiempos de fabricación, en comparación con los métodos descritos previamente en el estado del arte.

Más particularmente, el dispositivo de la invención es elaborado a partir de hueso porcino, el cual es sometido a un procedimiento de descelularización y desmineralización que será descrito de forma detallada más adelante, quedando conformado como una matriz ósea desmineralizada y libre casi completamente de células, con una porosidad predefinida, cuyos poros miden entre 100 y 1.000 micrones. Este soporte estructural o andamio biológico que será usado como sustituto óseo se procesa de tal manera que retenga su arquitectura original y conserve sus propiedades biomecánicas naturales, un hecho que tiene relevancia porque permite, al ser implantado en el hueso receptor, una más temprana recuperación funcional de los pacientes, y al mismo tiempo facilita un mejor y más temprano proceso de cicatrización ósea.

De acuerdo con la invención, el dispositivo tiene la finalidad de conducir o inducir, o ambos procesos a la vez,

la formación de tejido óseo de novo en huéspedes humanos que han presentado lesiones óseas bien sea por enfermedad degenerativa, infecciosa, traumática, tumoral o iatrogénica. Este tipo de implantes son usados por diferentes especialidades médicas, como por ejemplo, aunque no limitada a ellas: ortopedia, neurocirugía, cirugía plástica, otorrinolaringología y cirugía maxilofacial.

También de acuerdo con la invención, se provee un método de descelularización y desmineralización del hueso porcino arriba descrito, que conduce a la obtención de una matriz ósea orgánica conformada por componentes de la matriz extracelular, principalmente colágeno tipo 1, que al estar desprovista de sus células originales adquiere una estructura tridimensional altamente porosa y por lo tanto se conforma un soporte estructural o andamio que permite el crecimiento de los osteoblastos (osteoconductividad); además, la presencia de cantidades residuales pero significativas de factores de crecimiento óseo y de moléculas que promueven la adhesión celular inducen la activación de dichos osteoblastos y la ulterior producción de hueso (osteoinductividad) tal y como ha sido suficientemente demostrado. (Ver US Patent 6,962,814; US Patent 8,221,777). Hay que resaltar que la descelularización asegura una mínima respuesta inflamatoria en el huésped receptor, al mismo tiempo que previene una mínima respuesta inmune de su parte.

Todo lo anterior se logra por medio del tratamiento físico y químico de la pieza ósea porcina original, según el protocolo que será expuesto a continuación; esta intervención física y química busca conseguir dos objetivos: remover todos los materiales extraños a la matriz extracelular, incluyendo las células, así como incrementar de manera predefinida el tamaño de los poros que naturalmente quedan después de la descelularización de la pieza ósea, lo cual se logra al exponer el tejido óseo porcino original a un agente oxidante; estos agentes oxidantes han sido utilizados extensamente en diferentes protocolos de descelularización (Ver US Patent 7,008,545); entre los muchos disponibles, se prefiere en este método el ácido percarboxílico.

**Protocolo de descelularización y desmineralización
desarrollado por los autores:**

1. Siguiendo el estado del arte previo, las piezas óseas de metáfisis del fémur son provenientes de especímenes porcinos de entre 3 y 4 años recién sacrificados, los cuales son obtenidos en una empresa de procesamiento de animales porcinos para consumo humano, que cumple con las normas ISO9000. Los especímenes óseos porcinos son debidamente lavados y sumergidos en agua con

hielo a 4°C, transportados al laboratorio en donde le son retirados los tejidos blandos adheridos, y posteriormente son cortados con una sierra eléctrica de cirugía ortopédica. Para prevenir daño del tejido por efecto térmico del corte mecánico, dicho procedimiento es realizado con las piezas óseas sumergidas en suero salino helado. En el caso de no comenzar el proceso de descelularización se congelan a -20°C. Las muestras se manipulan para lograr unas dimensiones de un cm de longitud y entre 5 y 10 mm de espesor; rápidamente son sumergidas en agua con hielo para evitar su descomposición. Con mangueras a alta presión se hace pasar el agua a través de las piezas para liberarlas del contenido de médula ósea.

Descelularización mecánica. Aquí los autores introducen una novedad en relación con los métodos previamente descritos: Las piezas óseas son introducidas en un circuito cerrado dentro de un sistema de flujo pulsátil generado por el efecto de un motor de una bomba peristáltica, bien conocida por las personas duchas en el arte, ajustada de tal manera que le induce al fluido un caudal de 10 litros/minuto y una velocidad de 212 cms/seg. Las piezas óseas reciben el estrés erosivo mecánico del flujo líquido

a una frecuencia de 100 impulsos por minuto, al ser colocadas dentro del circuito que contiene el fluido impulsado por la bomba, el cual consiste en un tubo de silicona de 10 mm de diámetro; el hueso procesado es colocado en una trampa de una malla de alambre de acero inoxidable, con una porosidad de 3 mm. Esto conduce a un efecto de estrés erosivo del flujo sobre el tejido óseo porcino; el líquido inicial en el cual es sumergido es agua destilada libre de DNA-asa y RNA-asa. El tejido es expuesto al flujo descrito por 72 horas a 40°C de temperatura, cambiando el agua destilada cada 12 horas. Explicando con más detalle el método desarrollado por los autores, el cilindro óseo es colocado en un circuito cerrado de circulación de un fluido que viaja impulsado por una bomba peristáltica, de tal manera que el fluido ejerce su efecto de estrés mecánico erosivo sobre el cilindro óseo al encontrarse este atrapado en un punto determinado del circuito, bajo el obstáculo impuesto por una trampa constituida por una malla metálica que no lo deja avanzar según el influjo de la corriente líquida. (Ver figura 1).

2. Descelularización química. Al cabo de 72 horas el agua es cambiada por 500 ml de una solución de 0.05% de tripsina y EDTA y esta nueva mezcla se coloca bajo el efecto de la bomba peristáltica de flujo pulsátil a la misma presión previamente indicada durante 3 horas a

40°C, al cabo de las cuales se descarta esta solución. Para frenar la acción proteolítica de la tripsina y conservar estériles las muestras, en el circuito de flujo pulsátil se retira el contenido previo y ahora se incluyen 500ml de PBS con glucosa al 5%, SBF al 10% y un cóctel de antibióticos de penicilina 100UI/ml, estreptomicina 100 microgramos/ml por mililitro y anfotericina de 0.25 microgramos/ml; es dejado nuevamente por 24 horas bajo el flujo pulsátil a 40°C.

3. De nuevo se cambia el fluido pulsátil por agua destilada libre de DNA-asa y RNA-asa, y los especímenes se dejan bajo sus efectos por otras 24 horas.
4. Se descarta de nuevo el agua y esta vez se introducen las muestras en flujo pulsátil cuyo contenido está conformado por un litro de una solución oxidante compuesta de 1.5% de ácido percarboxílico y 2% de Tritón X-100, diluidos en agua destilada y desionizada; inmersos en esta mezcla, las muestras se ponen bajo efecto del flujo pulsátil por otras 3 horas a 40°C.
5. Se descarta esta solución, y para retirar residuos o trazas las muestras se lavan

repetidamente en agua destilada y desionizada, durante 5 ciclos de 2 horas cada uno, ajustada de tal manera que le induce al fluido un caudal de 10 litros/minuto y una velocidad de 212 cms/seg a una temperatura de 40°C. Finalmente las piezas se ponen en tubos de centrífuga de 15 ml, se congelan a -80°C, se liofilizan por 24 h y se almacenan a -80°C hasta el momento de ser utilizadas.

PRUEBAS REALIZADAS. Una vez obtenido el material, este es sometido a las siguientes pruebas, que buscan demostrar el logro del tejido objeto de la presente solicitud de patente de invención:

- **Evaluación imaginológica de la estructura** del tejido obtenido: utilizando para ello cortes transversales de 10 micras de resolución de voxel los especímenes son visualizados y fotografiados en el estereoscopio. (Ver figura 2).
- **Evaluación de la descelularización:** tanto la muestra del tejido óseo original no procesado como las muestras obtenidas luego del proceso de descelularización y desmineralización fueron embebidas en parafina y analizadas mediante el estudio histológico bajo microscopía de luz, con tres coloraciones:

- 1) Hematoxilina-eosina: identificó la presencia de diversos tipos de células. (Ver figura 3)
- 2) Coloración tricrómica de Masson: para valorar el contenido y la disposición de colágeno. (Ver figura 4)

VENTAJAS DE ESTA INVENCIÓN FRENTE A LAS TECNOLOGÍAS YA EXISTENTES EN EL ESTADO DE LA TÉCNICA:

1. Menor tiempo de procesamiento, pues el circuito del líquido circulante que genera el estrés erosivo sobre las piezas óseas sometidas al proceso de descelularización y desmineralización es constante y hay que invertir muy poco tiempo en el recambio de los componentes del mencionado líquido. Este tiempo es más prolongado cuando las piezas deben ser cambiadas de recipiente y migrar de equipo en equipo, como ocurre con los métodos previamente descritos en el estado del arte de la técnica.
2. Menor costo en la operación del proceso de descelularización y desmineralización, considerando que el sistema está constituido por un circuito único, que no obliga al uso de costosos recursos tecnológicos, pues solamente se requiere de una bomba peristáltica de operación bastante

sencilla, eficiencia comprobada y reconocido bajo costo.

3. Riesgo de contaminación relativamente bajo para las piezas óseas de fémur porcino originales que se someten al método de descelularización y descalcificación, en comparación con los métodos descritos en el estado de la técnica, pues en ninguna etapa del procesamiento hay que tocar dichas piezas óseas, las cuales en todo momento permanecen inmersas en el circuito de circulación de las diferentes soluciones, aseguradas dentro de los recipientes tubulares y atrapadas en las trampas de la rejilla porosa dentro de dicho circuito. Lo único que debe ser drenado y cambiado es el líquido circulante con sus diferentes componentes químicos, sin ningún tipo de manipulación de las piezas óseas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un dispositivo implantable en seres humanos, consistente en el sometimiento de una pieza ósea original, conformada por hueso cortico-esponjoso, al estrés erosivo mecánico de un líquido circulante, en el cual están disueltas una pluralidad de sustancias

químicas, todo lo cual conduce a la descelularización y desmineralización de la pieza ósea original; el método de erosión ósea se logra al colocar la pieza ósea original en un circuito cerrado de circulación de líquido mientras ella está atrapada en una trampa consistente en una rejilla interpuesta en el espacio de circulación del líquido, mientras dicho líquido es impulsado por una bomba peristáltica. El dispositivo resultante consiste en una matriz ósea de origen xenogénico o alogénico, configurado para ajustarse en o cerca a un defecto óseo, que promueve el crecimiento o la formación de hueso. Este dispositivo está constituido por tejido extracelular de hueso cortico-esponjoso de origen porcino, conformando una matriz ósea liofilizada, desmineralizada y descelularizada, que comprende fragmentos porosos e insolubles, con un tamaño de los poros de entre 100 y 1.000 micrones.

2. El método de la reivindicación 1, consistente en la exposición del tejido óseo original al estrés erosivo del flujo pulsátil, que resulta del impulso originado en una bomba peristáltica sobre un tubo de silicona lleno de líquido, ajustada de tal manera que le induce al fluido un caudal de entre 8 y 12 litros/minuto y una velocidad de entre 190 y 220 cms/seg, a 40°C de temperatura. De forma mecánica, al quedar atrapado dentro del circuito de

circulación del fluido en una trampa conformada por una malla de acero inoxidable con una porosidad de 3 mm, el tejido es descelularizado y desmineralizado, por el efecto sinérgico de la exposición al estrés erosivo del fluido en movimiento, que en su fase inicial está compuesto de una solución hipoosmótica, en conjunto con el efecto químico de los componentes del fluido en movimiento. A continuación el tejido es expuesto a la acción de la enzima tripsina. Además, a continuación dicho material es expuesto al efecto de detergentes y finalmente a un agente oxidante. Todo esto ocurre a una temperatura, concentración y lapso de tiempo predeterminados para lograr una porosidad de la matriz de entre 100 y 1.000 micrones. En todo momento el hueso procesado es sometido al estrés erosivo del líquido circulante. Solo descansa en los pocos minutos que transcurren mientras se cambian los componentes de la solución que constituye el fluido en movimiento.

RESUMEN

Se presenta un método de fabricación diseñado por los autores para obtener un dispositivo implantable destinado a la reparación y fusión ósea, del tipo matriz ósea desmineralizada, originado en una pieza de metáfisis femoral de origen porcino, de la cual se ha extraído la matriz extracelular, que posteriormente es debidamente descelularizada y desmineralizada. De esta manera el dispositivo puede implantarse en un acto quirúrgico en el hueso lesionado o enfermo de un paciente con el fin de que dicho hueso sea reparado adecuadamente, según las necesidades de cada paciente, como consecuencia de las propiedades osteoconductivas y osteoinductivas del dispositivo.

Se presenta también un método para elaborar dicho dispositivo a partir de hueso femoral porcino, su inmersión en solución salina hipoosmótica y su sometimiento a estrés mecánico erosivo inducido por una bomba peristáltica a una presión de 100 mmHg y a una frecuencia de 100 impulsos por minuto, para proceder a su descelularización, la cual es alcanzada mecánica y químicamente; el

efecto de descelularización mecánica se consigue mediante el efecto del estrés erosivo de un fluido en movimiento, dentro del cual es colocada la pieza ósea, y este efecto mecánico es complementado por el tratamiento químico con tripsina, seguido del lavado con un detergente. El resultado final es una matriz porosa constituida especialmente por colágeno; finalmente la pieza es expuesta a un agente oxidante para provocar un aumento en el tamaño de los poros, que adquieren dimensiones que van entre los 100 y los 1.000 micrones, lo cual permite que la matriz sea colonizada y poblada por los osteoblastos del huésped receptor, y de esta manera se genere nuevo tejido óseo. Este método incluye la posibilidad de que la matriz sea liofilizada, esterilizada y asépticamente empacada para su posterior uso clínico.