

BIOMATERIALES DE HIDROXIAPATITA DE ORIGEN ACUÁTICO Y MÉTODOS RELACIONADOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a biomateriales de origen acuático que comprenden hidroxiapatita o derivados de la misma y métodos relacionados. Por ejemplo, la presente invención se refiere a métodos para obtener un biomaterial basado en hidroxiapatita colagenizada (HAPCS) a partir de desechos generados por la industria del salmón.

ANTECEDENTES

Las técnicas de osteogénesis suponen un reto importante en la industria, propiciando el desarrollo continuo de biomateriales que promuevan este fenómeno biológico. Los biomateriales particularmente eficaces en este sentido son los basados en hidroxiapatita, que encuentra aplicaciones en medicina regenerativa, específicamente en la regeneración ósea y en la modificación de tejidos. Las soluciones actualmente disponibles para generar biomateriales de hidroxiapatita en general provienen de orígenes humanos, bovinos, equinos, porcinos y sintéticos.

Sin embargo, existen consideraciones éticas, religiosas o culturales que impiden el uso de injertos humanos, porcinos y bovinos en muchos países del mundo, tal como comunidades Kosher y Halal. De forma adicional, las enfermedades como la enfermedad de las vacas locas contraindican el uso de biomateriales derivados de bovinos. Si bien los derivados sintéticos carecen de las consideraciones éticas y culturales mencionadas anteriormente, ofrecen una menor efectividad clínica, lo que los convierte en una opción menos deseable. En este contexto, existe la necesidad de encontrar fuentes naturales alternativas de biomateriales que sean eficaces en la osteogénesis, no citotóxicos y rentables.

El documento IN202031021533 describe un biomaterial de hidroxiapatita derivado de los huesos del pez *Puntius conchoni*, poli(ácido láctico-co-glicólico) y poli(metacrilato de metilo), y un método para obtener hidroxiapatita a partir de huesos de *P. conchoni*. Si bien este biomaterial proporciona una alternativa a las fuentes convencionales, requiere

combinaciones con polímeros adicionales, lo que complica y aumenta el costo del proceso. Adicionalmente, el biomaterial resultante demostró resistencias a la compresión inferiores a 12 MPa, lo que indica una desventaja debido a su fragilidad.

5 Actualmente, no existen biomateriales alternativos a base de hidroxiapatita que sean fáciles de obtener, de bajo costo, posean una alta resistencia mecánica, no citotóxicos y altamente efectivos para la osteogénesis. Por consiguiente, se necesitan composiciones, materiales y métodos mejorados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere en general a biomateriales de hidroxiapatita de origen acuático y métodos relacionados.

En un aspecto, se proporcionan biomateriales. En algunas modalidades, el biomaterial es un biomaterial de origen acuático. En algunas modalidades, el biomaterial de origen acuático comprende una primera composición presente en el biomaterial en una cantidad mayor o igual al 10% en peso y menor o igual al 100% en peso con respecto al peso total del biomaterial, una segunda composición presente en el biomaterial en una cantidad mayor o igual al 0,1% en peso y menor o igual al 90% en peso con respecto al peso total del biomaterial, la primera composición comprende mayor o igual al 50% en peso y menor o igual al 90% en peso una hidroxiapatita de origen acuático o un derivado de la misma, opcionalmente sustituida, mayor o igual al 5% en peso y menor o igual al 40% en peso de biomaterial amorfo, el biomaterial amorfo comprende: mayor o igual al 10% en peso y menor al 20% en peso de fosfato β -tricálcico con respecto al peso total de la primera composición, mayor o igual al 0,1% en peso y menor o igual al 5% en peso de óxido de calcio, mayor o igual al 0,1% en peso y menor o igual al 20% en peso de óxido de magnesio, y la segunda composición comprende uno o más de colágeno y/o derivados del mismo, colágeno sintético y/o derivados del mismo, gelatina y/o derivados de la misma, fibrina y/o derivados de la misma, fibrina y/o derivados de la misma.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para producir biomateriales de origen acuático. En algunas modalidades, el método comprende retirar material no óseo que comprende incubar un hueso de origen acuático durante más de o igual a 20 minutos a menos

de o igual a 4 horas a una temperatura de más de o igual a 700 °C y menos de o igual a 120 °C, retirando de esta manera el material no óseo, desproteinizar el hueso de origen acuático que comprende incubar el hueso de origen acuático en hidróxido de sodio a una temperatura de más de o igual a 15 °C y menos de o igual a 25 °C durante más de o igual a 30 minutos a
5 menos de o igual a 4 horas, desproteinizando de esta manera el hueso, deslipidar el hueso de origen acuático que comprende incubar el hueso de origen acuático en acetona a una temperatura de más de o igual a 15 °C y menos de o igual a 30 °C durante más de o igual a 4 horas a menos de o igual a 8 horas, deslipidando de esta manera el hueso, secar el hueso de origen acuático a una temperatura de más de o igual a 50 °C y menos menor o igual a 70
10 °C durante mayor o igual a 6 horas y menor o igual a 48 horas, moler el hueso seco, calentar el hueso molido a una temperatura mayor o igual a 800 °C y menor o igual a 1200 °C durante mayor o igual a 1 hora y menor o igual a 3 horas, produciendo de esta manera un biomaterial de origen acuático, y agregar una segunda composición que comprende uno o más de colágeno y/o derivados del mismo, actina y/o derivados de la misma, gelatina y/o derivados
15 de la misma, aditivos porogénicos y proteínas morfogenéticas óseas al biomaterial de origen acuático.

Otras ventajas y características novedosas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varias modalidades no limitantes de la invención cuando se consideren junto con las figuras adjuntas. En los casos en que la
20 presente especificación y un documento incorporado por referencia incluyan una divulgación conflictiva y/o inconsistente, prevalecerá la presente especificación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las modalidades no limitantes de la presente invención se describirán a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas, que son esquemáticas y no pretenden dibujarse a escala.
25 En las figuras, cada componente idéntico o casi idéntico ilustrado se representa habitualmente con un solo número. Para fines de claridad, no todos los componentes están etiquetados en cada figura, ni se muestran todos los componentes de cada modalidad de la invención donde la ilustración no es necesaria para permitir que los expertos en la técnica entiendan la invención. En las figuras:

30 La figura 1 muestra un método de ejemplo para producir un biomaterial de origen

acuático, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

La figura 2A muestra los espectros Raman de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo obtenidos durante la optimización de la etapa de desproteínización, de acuerdo con un conjunto de modalidades. La curva 1 corresponde al uso de las variables NaOH 2 M y 20°C, la curva 2 corresponde al uso de las variables NaOH 2 M y 50°C, y la curva 3 corresponde al uso de las variables NaOH 2,5 M y 20°C.

La figura 2B muestra los espectros Raman de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo obtenidos durante la optimización de la etapa de deslipidación, de acuerdo con un conjunto de modalidades. La curva 1 corresponde al uso de variables acetona y 6 horas, la curva 2 corresponde al uso de variables acetona y 12 horas, la curva 3 corresponde al uso de variables hexano y 6 horas, y la curva 4 corresponde al uso de variables hexano y 12 horas.

La figura 3 muestra los espectros Raman de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo obtenidos durante la optimización de la etapa de calcinación, de acuerdo con un conjunto de modalidades. La curva 1 corresponde al uso de las variables 800°C y 6 horas, la curva 2 corresponde al uso de las variables 800°C y 4 horas, y la curva 3 corresponde al uso de las variables 800°C y 2 horas.

La figura 4 muestra los espectros Raman de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo obtenidos durante la optimización de la etapa de calcinación, de acuerdo con un conjunto de modalidades. La curva 4 corresponde al uso de variables 900°C y 6 horas, la curva 5 corresponde al uso de variables 900°C y 4 horas, y la curva 6 corresponde al uso de variables 900°C y 2 horas.

La figura 5 muestra los espectros Raman de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo obtenidos durante la optimización de la etapa de calcinación, de acuerdo con un conjunto de modalidades. La curva 7 corresponde al uso de variables 1000°C y 6 horas, la curva 8 corresponde al uso de variables 1000°C y 4 horas, y la curva 9 corresponde al uso de variables 1000°C y 2 horas.

La figura 6 muestra el espectro Raman del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 1, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

La figura 7 muestra el espectro Raman del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 2, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

La figura 8 muestra el espectro Raman del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 3, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

5 La figura 9 muestra el difractograma de rayos X del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 1, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

10 La figura 10 muestra el difractograma de rayos X del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 2, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

La figura 11 muestra el difractograma de rayos X del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 3, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

15 La figura 12 muestra el cambio de peso en función de la temperatura después de realizar un análisis termogravimétrico en el biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 1, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

La figura 13 muestra el cambio de peso en función de la temperatura después de realizar un análisis termogravimétrico en el biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 2, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

20 La figura 14 muestra el cambio de peso en función de la temperatura después de realizar un análisis termogravimétrico en el biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 3, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

25 La figura 15 muestra imágenes de microscopía electrónica de escaneo del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo de ejemplo 1 a aumentos de 220x (izquierda) y 4600x (derecha), de acuerdo con un conjunto de modalidades.

La figura 16 muestra imágenes de microscopía electrónica de escaneo del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo 2 de ejemplo a aumentos de 10x (izquierda) y 2900x (derecha), de acuerdo con un conjunto de modalidades.

5 La figura 17 muestra imágenes de microscopía electrónica de escaneo del biomaterial de hidroxiapatita de ejemplo obtenido mediante el protocolo 3 de ejemplo a aumentos de 10x (izquierda) y 2500x (derecha), de acuerdo con un conjunto de modalidades.

La figura 18 muestra los resultados de la resistencia a la compresión, que muestran las curvas de fuerza-distancia para los biomateriales de hidroxiapatita obtenidos mediante los protocolos de ejemplo 1, 2 y 3, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

10 La figura 19 muestra los resultados obtenidos para la viabilidad y proliferación celular a partir de ensayos MTT, de acuerdo con un conjunto de modalidades. Se muestran los resultados a las 24 horas para las células cultivadas en presencia de biomateriales comerciales de hidroxiapatita de origen humano, origen bovino, origen de salmón de cada uno de los 3 protocolos de ejemplo seleccionados y un control negativo.

15 La figura 20 muestra los resultados obtenidos para la viabilidad y proliferación celular a partir de ensayos MTT, de acuerdo con un conjunto de modalidades. Se muestran los resultados a las 48 horas para las células cultivadas en presencia de biomateriales comerciales de hidroxiapatita de origen humano, origen bovino, origen de salmón de cada uno de los 3 protocolos de ejemplo seleccionados y un control negativo.

20 La figura 21 muestra imágenes 10x de células mesenquimatosas cultivadas durante 21 días en presencia de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo del protocolo 1 de ejemplo (imagen 1), protocolo 2 de ejemplo (imagen 2), protocolo 3 de ejemplo (imagen 3), aloinjerto humano (imagen 4), xenoinjerto bovino (imagen 5), control libre de biomaterial de hidroxiapatita (imagen 6) y células indiferenciadas (imagen 7), de acuerdo con un conjunto de
25 modalidades.

La figura 22 muestra la distribución de tamaños de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo obtenidos mediante los protocolos de ejemplo 1, 2 y 3, usando un tiempo de molienda de 2 segundos, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

La figura 23 muestra la distribución de tamaños de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo obtenidos mediante los protocolos de ejemplo 1, 2 y 3, usando un tiempo de molienda de 6 segundos, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

5 La figura 24 muestra la distribución de tamaños de biomateriales de hidroxiapatita de ejemplo obtenidos mediante los protocolos de ejemplo 1, 2 y 3, usando un tiempo de molienda de 10 segundos, de acuerdo con un conjunto de modalidades.

10 La figura 25 muestra imágenes mediante microscopía de luz polarizada de los materiales obtenidos con tiempos de molienda de 2 segundos, de acuerdo con un conjunto de modalidades. La parte superior izquierda corresponde al protocolo de ejemplo 1, la parte superior derecha al protocolo de ejemplo 2 y la imagen inferior al protocolo de ejemplo 3.

La figura 26 muestra imágenes mediante microscopía de luz polarizada de los materiales obtenidos con tiempos de molienda de 10 segundos, de acuerdo con un conjunto de modalidades. La parte superior izquierda corresponde al protocolo de ejemplo 1, la parte superior derecha al protocolo de ejemplo 2 y la imagen inferior al protocolo de ejemplo 3.

15 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere en general a biomateriales de origen acuático que comprenden hidroxiapatita o derivados de la misma, y métodos relacionados. En algunas modalidades, los biomateriales de origen acuático comprenden una mezcla de una primera composición que comprende hidroxiapatita de origen acuático o derivados de la misma y una
20 segunda composición que comprende colágeno (u otras proteínas de andamiaje). Ventajosamente, los biomateriales de origen acuático pueden comprender hidroxiapatita y/o colágeno (u otras proteínas de andamiaje) derivadas principalmente de fuentes acuáticas. Por ejemplo, en algunas modalidades, la presente invención se refiere a métodos para obtener un biomaterial basado en hidroxiapatita colagenizada (HAPCS) a partir de desechos generados
25 por la industria pesquera, tal como la industria del salmón. En algunas modalidades, los biomateriales pueden estar ventajosamente sustancialmente libres de polímeros sintéticos.

En algunas modalidades, la invención se refiere en general a la obtención de un biomaterial que comprende hidroxiapatita, que es de bajo costo, no citotóxico y/o promueve

la osteogénesis, a partir de huesos de origen acuático, tal como huesos de salmón, sirviendo de este modo como una alternativa efectiva a los biomateriales derivados de fuentes humanas u otras fuentes naturales. En algunas modalidades, la invención en general se refiere a una composición que incluye esta hidroxiapatita derivada del hueso de origen acuático, y
5 adicionalmente incluye colágeno y/u otras proteínas de andamiaje (actina, gelatina, fibrina, entre otras). Los biomateriales descritos en la presente pueden ser útiles en un número de aplicaciones que incluyen aplicaciones médicas para el tratamiento de un sujeto.

Un "sujeto" se refiere a cualquier animal tal como un mamífero (por ejemplo, un humano). Los ejemplos no limitantes de sujetos incluyen un humano, un primate no humano,
10 una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato o un roedor tal como un ratón, una rata, un hámster, un pájaro, un pez o un conejillo de indias. En general, la invención se refiere al uso con humanos. En algunas modalidades, un sujeto puede demostrar beneficios para la salud, por ejemplo, tras la administración del biomaterial de origen acuático. Por ejemplo, los biomateriales de origen acuático descritos en la presente pueden ser útiles
15 para su uso como un xenoinjerto (por ejemplo, un xenoinjerto que comprende el biomaterial de origen acuático que comprende una primera composición y una segunda composición). El término "xenoinjerto" en general se refiere a un tipo de trasplante que se realiza entre dos especies diferentes. Este proceso implica la transferencia de tejidos, órganos o células de un organismo (el donante) a otro organismo de una especie diferente (el receptor). Un ejemplo
20 común de un xenoinjerto es el uso de tejido de cerdo en la reparación de válvulas cardíacas humanas. Esta técnica se utiliza en la investigación médica y la medicina clínica para estudiar enfermedades, probar tratamientos y, en algunos casos, tratar directamente las condiciones en los pacientes.

En algunas modalidades, el biomaterial de origen acuático descrito en la presente se
25 puede administrar a un sujeto (por ejemplo, para cicatrización de heridas, regeneración de tejidos, entre otros). En algunas modalidades, el biomaterial se administra quirúrgicamente (por ejemplo, implantado). En algunas modalidades, el biomaterial se administra por vía endoscópica. En algunas modalidades, el biomaterial se administra por vía tópica (por ejemplo, en una piel y/o capa mucosa). También son posibles otras vías de administración (por ejemplo,
30 oral, ureteral, rectal, entre otras).

En algunas modalidades, el biomaterial de origen acuático comprende una primera

composición (por ejemplo, que comprende una hidroxiapatita de origen acuático o un derivado de la misma) y una segunda composición (por ejemplo, que comprende un andamiaje proteico tal como colágeno). El término "derivado acuático" como se usa en la presente en general se refiere a un material derivado de una fuente acuática. Por ejemplo, un hueso de origen

5 acuático, como se usa en la presente, en general se refiere al hueso que se encuentra en una especie acuática. Ejemplos no limitantes de fuente acuática para los biomateriales descritos en la presente incluyen peces (por ejemplo, salmón, atún, anchoa, pez ángel, bagre, bacalao, suela, lucio, char, arenque, tiburón, peces killi, pez globo, pescado azul, trucha, anguila, raya, pez globo, platija, pez lechón, esturión, pez tigre, mero, etc.), mamíferos marinos (por ejemplo,

10 cetáceos (por ejemplo, ballena, delfín, marsopa), pinnípedos (por ejemplo, sello, león marino, morsa), sirenios (por ejemplo, manatíes, dugongos), nutrias marinas, etc.), crustáceos (por ejemplo, camarones, gambas, cangrejo, langosta, cangrejo de río, krill, percebes, o similares) reptiles marinos (por ejemplo, iguanas, serpientes, tortugas, cocodrilos), organismos marinos (por ejemplo, algas (por ejemplo, algas, algas verdes, algas rojas), liquen, coral, esponja de

15 mar), entre otros.

En algunas modalidades, el biomaterial de origen acuático está libre de hidroxiapatita derivada no acuática. Por ejemplo, el biomaterial de origen acuático no comprende hidroxiapatita derivada de bovinos, humanos, equinos, pollos y/o cerdos. En algunas modalidades, la segunda composición está libre de material de andamiaje derivado no

20 acuático. Por ejemplo, en algunas modalidades, el material de andamiaje no se deriva de bovinos, humanos, equinos, pollos y/o cerdos. En algunas modalidades, la primera composición no se deriva de fuentes bovinas, humanas, equinas, de pollo, sintéticas o porcinas y el material de andamiaje se deriva de una fuente bovina, humana, equina, de pollo, sintética y/o porcina.

25 En algunas modalidades, la primera composición comprende una hidroxiapatita de origen acuático y/o derivados de la misma. En algunas modalidades, la hidroxiapatita de origen acuático o derivado de la misma se deriva de la espina de un pez (por ejemplo, salmón). Por ejemplo, en algunas modalidades, el hueso (por ejemplo, del cual se deriva la hidroxiapatita) se obtiene de un pez de agua dulce. En algunas modalidades, el hueso (por

30 ejemplo, del cual se deriva la hidroxiapatita) se obtiene de un pez de agua salada. En algunas modalidades, la primera composición deriva de un organismo diferente a la segunda composición. En algunas modalidades, la primera composición deriva del mismo organismo que la segunda composición. Por ejemplo, en una modalidad ilustrativa, la primera

composición comprende hidroxiapatita y/o derivados de la misma, derivados de hueso de salmón, y la segunda composición comprende colágeno derivado de piel de salmón. Los expertos en la técnica entenderán, con base en las enseñanzas de esta especificación, que también son posibles otras fuentes acuáticas para la primera composición y/o la segunda composición.

Los biomateriales de origen acuático descritos en la presente pueden proporcionar ventajosamente un biomaterial útil para xenoinjertos que no presenta consideraciones éticas, religiosas o culturales (por ejemplo, que impiden el uso de injertos humanos, porcinos y bovinos en muchos países de todo el mundo, tal como las comunidades kosher y halal) sin dejar de ser clínicamente eficaces y/o rentables.

En algunas modalidades, la primera composición puede estar presente en el biomaterial de origen acuático en cualquier cantidad adecuada. Por ejemplo, en algunas modalidades, la primera composición está presente en el biomaterial de origen acuático en una cantidad mayor o igual al 10% en peso, mayor o igual al 20% en peso, mayor o igual al 30% en peso, mayor o igual al 40% en peso, mayor o igual al 50% en peso, mayor o igual al 60% en peso, mayor o igual al 70% en peso, mayor o igual al 80% en peso, mayor o igual al 90% en peso, mayor o igual al 95% en peso, o mayor o igual al 99,9% en peso con respecto al peso total del biomaterial de origen acuático. En algunas modalidades, la primera composición está presente en el biomaterial de origen acuático en una cantidad menor que 100% en peso, menor o igual a 99,9% en peso, menor o igual a 95% en peso, menor o igual a 90% en peso, menor o igual a 80% en peso, menor o igual a 70% en peso, menor o igual a 60% en peso, menor o igual a 50% en peso, menor o igual a 40% en peso, menor o igual a 30% en peso, o menor o igual a 20% en peso con respecto al peso total del biomaterial de origen acuático. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales al 10% en peso y menores al 100% en peso). También son posibles otros intervalos.

En algunas modalidades, como se describe en la presente, la primera composición comprende hidroxiapatita de origen acuático o derivados de la misma (por ejemplo, hidroxiapatita deficiente en calcio, hidroxiapatita dopada y/o hidroxiapatita sustituida). Por ejemplo, en algunas modalidades, al menos una porción de la hidroxiapatita puede estar sustituida iónicamente (por ejemplo, en donde la estructura reticular de la hidroxiapatita

incorpora una o más de sustituciones catiónicas (por ejemplo, Sr^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , Li^+ , Ag^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) y/o aniónicas (por ejemplo, CO_3^{2-} , SiO_4^{4-} , SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , F^- , Cl^- , Br^- , etc.)). Si bien gran parte de la especificación a continuación y en la presente se refiere a hidroxiapatita de origen acuático en general, un experto en la técnica entendería basándose en las enseñanzas de esta especificación que estas partes de la especificación en general también se aplican a derivados de hidroxiapatita de origen acuático y/o hidroxiapatita de origen acuático sustituida (por ejemplo, tal como la cantidad presente en la primera composición), a menos que se indique lo contrario.

La hidroxiapatita de origen acuático puede estar presente en la primera composición en cualquier cantidad adecuada. En algunas modalidades, la hidroxiapatita de origen acuático está presente en la primera composición en una cantidad mayor o igual al 50% en peso, mayor o igual a 54 % en peso, mayor o igual al 60% en peso, mayor o igual al 65% en peso, mayor o igual al 70% en peso, mayor o igual al 80% en peso, mayor o igual al 85% en peso, mayor o igual al 90% en peso, mayor o igual al 95% en peso, o mayor o igual al 98% en peso con respecto al peso total de la primera composición. En algunas modalidades, la hidroxiapatita está presente en la primera composición en una cantidad menor o igual al 100% en peso, menor o igual al 98% en peso, menor o igual al 95% en peso, 90% en peso, menor o igual al 85% en peso, menor o igual al 80% en peso, menor o igual al 75% en peso, menor o igual al 70% en peso, menor o igual al 65% en peso, menor o igual al 60% en peso, o menor o igual al 55% en peso con respecto al peso total de la primera composición. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayor o igual al 50% en peso y menor o igual al 90% en peso, mayor o igual al 54% en peso y menor o igual al 65% en peso, mayor o igual al 50% en peso y menor o igual al 100% en peso). También son posibles otros intervalos.

El biomaterial de origen acuático puede tener una relación deseable de hidroxiapatita a colágeno (u otro andamiaje) presente en el biomaterial. Por ejemplo, en algunas modalidades, una relación de hidroxiapatita o derivado de la misma a colágeno puede ser mayor o igual a 70:30, mayor o igual a 80:20, o mayor o igual a 90:10 (por ejemplo, menor o igual a 95:5, menor o igual a 90:10, menor o igual a 80:20, menor o igual a 70:30).

En algunas modalidades, la primera composición comprende uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en biomaterial amorfo, fosfato β -tricálcico,

óxido de calcio, óxido de magnesio y β -renanita.

En algunas modalidades, la primera composición comprende un biomaterial amorfo (por ejemplo, fosfato de calcio amorfo, calcio no cristalizado, fósforo no cristalizado, etc.) en una cantidad mayor o igual al 5% en peso, mayor o igual al 10% en peso, mayor o igual al 15% en peso, mayor o igual al 19% en peso, mayor o igual al 20% en peso, mayor o igual al 25% en peso, mayor o igual al 30% en peso, mayor o igual al 32% en peso, o mayor o igual al 35% en peso con respecto al peso total de la primera composición. En algunas modalidades, la primera composición comprende el biomaterial amorfo en una cantidad menor o igual al 40% en peso, menor o igual al 35% en peso, menor o igual al 32% en peso, menor o igual al 30% en peso, menor o igual al 25% en peso, menor o igual al 20% en peso, menor o igual al 19% en peso, menor o igual al 15% en peso, o menor o igual al 10% en peso con respecto al peso total de la primera composición. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayor o igual al 5% en peso y menor o igual al 40% en peso, mayor o igual al 5% en peso y menor o igual al 25% en peso, mayor o igual al 19% en peso y menor o igual al 32% en peso). También son posibles otros intervalos.

En algunas modalidades, la primera composición comprende fosfato β -tricálcico en una cantidad mayor o igual al 10% en peso, mayor o igual al 12% en peso, mayor o igual al 14% en peso, mayor o igual al 16% en peso, o mayor o igual al 18% en peso con respecto al peso total de la primera composición. En algunas modalidades, la primera composición comprende fosfato β -tricálcico en una cantidad menor o igual al 20% en peso, menor o igual al 18% en peso, menor o igual al 16% en peso, menor o igual al 14% en peso, o menor o igual al 12% en peso con respecto al peso total de la primera composición. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayor o igual al 10% en peso y menor o igual al 20% en peso, mayor o igual al 12% en peso y menor o igual al 16% en peso). También son posibles otros intervalos.

En algunas modalidades, la primera composición comprende óxido de calcio, si está presente, en una cantidad mayor o igual a 0,1% en peso, mayor o igual a 0,5% en peso, mayor o igual a 1% en peso, mayor o igual a 1,5% en peso, mayor o igual a 2% en peso, mayor o igual a 2,5% en peso, mayor o igual a 3% en peso, mayor o igual a 3,5% en peso, o mayor o igual a 4% en peso con respecto al peso total de la primera composición. En algunas modalidades, la primera composición comprende óxido de calcio en una cantidad menor o

igual al 5% en peso, menor o igual al 4% en peso, menor o igual al 3,5% en peso, menor o igual al 3% en peso, menor o igual al 2,5% en peso, menor o igual al 2% en peso, menor o igual al 1,5% en peso, menor o igual al 1% en peso, o menor o igual al 0,5% en peso con respecto al peso total de la primera composición. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 0,1% en peso y menores o iguales a 5% en peso, mayores o iguales a 1% en peso y menores o iguales a 2% en peso). También son posibles otros intervalos.

En algunas modalidades, la primera composición comprende óxido de magnesio, si está presente, en una cantidad mayor o igual a 0,1% en peso, mayor o igual a 0,5% en peso, mayor o igual a 1% en peso, mayor o igual a 1,5% en peso, mayor o igual a 2% en peso, mayor o igual a 2,5% en peso, mayor o igual a 3% en peso, mayor o igual a 3,5% en peso, mayor o igual a 4% en peso, mayor o igual a 5% en peso, mayor o igual a 10% en peso, o mayor o igual a 15% en peso con respecto al peso total de la primera composición. En algunas modalidades, la primera composición comprende óxido de magnesio en una cantidad menor o igual al 20% en peso, menor o igual al 15% en peso, menor o igual al 10% en peso, menor o igual al 5% en peso, menor o igual al 4% en peso, menor o igual al 3,5% en peso, menor o igual al 3% en peso, menor o igual al 2,5% en peso, menor o igual al 2% en peso, menor o igual al 1,5% en peso, menor o igual al 1% en peso, o menor o igual al 0,5% en peso con respecto al peso total de la primera composición. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 0,1% en peso y menor o igual a 5% en peso, mayor o igual a 1% en peso y menor o igual a 2% en peso, mayor o igual a 0,1% en peso y menor o igual a 20% en peso). También son posibles otros intervalos.

En algunas modalidades, la primera composición comprende β -renanita, si está presente, en una cantidad mayor o igual a 0,1% en peso, mayor o igual a 0,5% en peso, mayor o igual a 1% en peso, mayor o igual a 1,5% en peso, mayor o igual a 2% en peso, mayor o igual a 2,5% en peso, mayor o igual a 3% en peso, mayor o igual a 3,5% en peso, mayor o igual a 4% en peso, mayor o igual a 5% en peso, mayor o igual a 10% en peso, o mayor o igual a 15% en peso con respecto al peso total de la primera composición. En algunas modalidades, la primera composición comprende β -renanita en una cantidad menor o igual al 20% en peso, menor o igual al 15% en peso, menor o igual al 10% en peso, menor o igual al 5% en peso, menor o igual al 4% en peso, menor o igual al 3,5% en peso, menor o igual al 3% en peso, menor o igual al 2,5% en peso, menor o igual al 2% en peso, menor o igual al 1,5% en peso, menor o igual al 1% en peso, o menor o igual al 0,5% en peso con respecto al

peso total de la primera composición. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 0,1% en peso y menor o igual a 5% en peso, mayor o igual a 1% en peso y menor o igual a 2% en peso, mayor o igual a 0,1% en peso y menor o igual a 20% en peso). También son posibles otros intervalos.

- 5 En algunas modalidades, la primera composición tiene una o más propiedades deseables que incluyen, por ejemplo, densidad, termoestabilidad, relación Ca/P, fuerza de compresión máxima, viabilidad celular, proliferación celular, osteoinductividad, porosidad, absorción y/o moldeabilidad.

- 10 Por ejemplo, en algunas modalidades, la primera composición tiene una densidad similar a la de hidroxiapatita pura. En algunas modalidades, la densidad de la primera composición es mayor o igual a 2 g/cm³, mayor o igual a 2,2 g/cm³, mayor o igual a 2,4 g/cm³, mayor o igual a 2,6 g/cm³, mayor o igual a 2,8 g/cm³, mayor o igual a 3 g/cm³, mayor o igual a 3,1 g/cm³, mayor o igual a 3,15 g/cm³, mayor o igual a 3,2 g/cm³, mayor o igual a 3,25 g/cm³, mayor o igual a 3,3 g/cm³, mayor o igual a 3,4 g/cm³, mayor o igual a 3,5 g/cm³, mayor o igual a 3,6 g/cm³, mayor o igual a 3,8 g/cm³, o mayor o igual a 4 g/cm³. En algunas modalidades, la primera composición tiene una densidad menor o igual a 4,2 g/cm³, menor o igual a 4 g/cm³, menor o igual a 3,8 g/cm³, menor o igual a 3,6 g/cm³, menor o igual a 3,5 g/cm³, menor o igual a 3,4 g/cm³, menor o igual a 3,3 g/cm³, menor o igual a 3,2 g/cm³, menor o igual a 3,25 g/cm³, menor o igual a 3,2 g/cm³, menor o igual a 3,15 g/cm³, menor o igual a 3,1 g/cm³, menor o igual a 3 g/cm³, menor o igual a 2,8 g/cm³, menor o igual a 2,6 g/cm³, menor o igual a 2,4 g/cm³, o menor o igual a 2,2 g/cm³. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 2 g/cm³ y menor o igual a 4,2 g/cm³, mayor o igual a 3 g/cm³ y menor o igual a 3,4 g/cm³). También son posibles otros intervalos. La densidad como se describe en la presente se puede medir usando picnometría de gas.

- 25 En algunas modalidades, la primera composición puede ser térmicamente estable en un intervalo de temperatura deseado. Por ejemplo, en algunas modalidades, el biomaterial es térmicamente estable (por ejemplo, no demuestra pérdida de masa sustancial) a una temperatura mayor o igual a 0 °C, mayor o igual a 10 °C, mayor o igual a 25 °C, mayor o igual a 50 °C, mayor o igual a 100 °C, mayor o igual a 150 °C, mayor o igual a 200 °C, mayor o igual a 300 °C, mayor o igual a 400 °C, mayor o igual a 500 °C, mayor o igual a 600 °C, mayor o igual a 700 °C, mayor o igual a 800 °C, o mayor o igual a 900 °C. En algunas modalidades, la

primera composición es térmicamente estable a una temperatura menor o igual a 1000 °C, menor o igual a 900 °C, menor o igual a 800 °C, menor o igual a 700 °C, menor o igual a 600 °C, menor o igual a 500 °C, menor o igual a 400 °C, menor o igual a 300 °C, menor o igual a 200 °C, menor o igual a 150 °C, menor o igual a 100 °C, menor o igual a 50 °C, menor o igual a 25 °C, o menor o igual a 10 °C. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 0 °C y menores o iguales a 1000 °C, mayores o iguales a 50 °C y menores o iguales a 800 °C). Es decir, la primera composición puede ser térmicamente estable en un intervalo de temperaturas relativamente grande. También son posibles otros intervalos. La estabilidad térmica se puede medir mediante análisis termogravimétrico.

En algunas modalidades, la primera composición tiene una relación deseable de calcio a fósforo (Ca/P) (por ejemplo, similar a la del valor estequiométrico de la hidroxiapatita). En algunas modalidades, la relación Ca/P de la primera composición es mayor o igual a 1,5, mayor o igual a 1,55, mayor o igual a 1,6 mayor o igual a 1,65, mayor o igual a 1,7, o mayor o igual a 1,75. En algunas modalidades, la relación Ca/P de la primera composición es menor o igual a 1,8, menor o igual a 1,75, menor o igual a 1,7, menor o igual a 1,65, menor o igual a 1,6, o menor o igual a 1,55. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 1,5 y menores o iguales a 1,8, mayores o iguales a 1,6 y menores o iguales a 1,75). También son posibles otros intervalos. La relación Ca/P como se describe en la presente se puede medir usando microscopía electrónica de escaneo junto con espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (SEM-EDX).

En algunas modalidades, la primera composición tiene propiedades mecánicas deseables. Por ejemplo, en algunas modalidades, la primera composición tiene una fuerza de compresión máxima mayor o igual a 250 N, mayor o igual a 275 N, mayor o igual a 300 N, mayor o igual a 325 N, mayor o igual a 350 N, mayor o igual a 375 N, mayor o igual a 400 N, o mayor o igual a 500 N. En algunas modalidades, la primera composición tiene una fuerza de compresión máxima menor o igual a 600 N, menor o igual a 500 N, menor o igual a 400 N, menor o igual a 375 N, menor o igual a 350 N, menor o igual a 325 N, o menor o igual a 300 N. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 250 N y menor o igual a 600 N). También son posibles otros intervalos. La fuerza de compresión máxima como se usa en la presente se puede medir usando un analizador de textura TA.XT plus para determinar la resistencia a la compresión.

En algunas modalidades, la segunda composición está presente en el biomaterial de origen acuático en una cantidad mayor o igual a 0,1% en peso, mayor o igual a 1% en peso, mayor o igual a 5% en peso, mayor o igual a 10% en peso, mayor o igual a 20% en peso, mayor o igual a 30% en peso, mayor o igual a 40% en peso, mayor o igual a 50% en peso, mayor o igual a 60% en peso, mayor o igual a 70% en peso, o mayor o igual a 80% en peso con respecto al peso total del biomaterial de origen acuático. En algunas modalidades, la segunda composición está presente en el biomaterial de origen acuático en una cantidad menor o igual al 90% en peso, menor o igual al 85% en peso, menor o igual al 80% en peso, menor o igual al 70% en peso, menor o igual al 60% en peso, menor o igual al 50% en peso, menor o igual al 40% en peso, menor o igual al 30% en peso, menor o igual al 20% en peso, menor o igual al 10% en peso, menor o igual al 5% en peso, menor o igual al 3% en peso, menor o igual al 2% en peso, menor o igual al 1% en peso, o menor o igual al 0,5% en peso con respecto al peso total del biomaterial de origen acuático. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 0,1% en peso y menores a 90% en peso). También son posibles otros intervalos.

En algunas modalidades, la segunda composición comprende uno o más materiales de andamiaje tal como un andamiaje proteico. Los ejemplos no limitantes de materiales de andamiaje adecuados incluyen colágeno (por ejemplo, uno o más de colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III, colágeno tipo IV) y derivados de los mismos, colágeno sintético y derivados de los mismos, gelatina y derivados de la misma, fibrina y derivados de la misma, fibroína y derivados de la misma, fibronectina y derivados de la misma, e hidrocoloides (por ejemplo, goma guar, goma arábica, goma gellan, goma xantana, agar, pectina, almidón, carragenano, pectina y/o alginato) y derivados de los mismos. En un conjunto ejemplar de modalidades, la segunda composición comprende colágeno y/o derivados del mismo. En un conjunto ejemplar de modalidades, el material de andamiaje es de origen acuático (por ejemplo, derivado de agua dulce, derivado marino). En algunas modalidades, el material de andamiaje se deriva de una fuente bovina, humana, equina, de pollo, sintética y/o porcina. En un conjunto ejemplar de modalidades, el material de andamiaje comprende colágeno derivado de salmón. En otro conjunto ejemplar de modalidades, el material de andamiaje comprende colágeno derivado de bovino.

En algunas modalidades, la segunda composición comprende además un aditivo porogénico (por ejemplo, un porógeno tal como una solución salina sobresaturada (por ejemplo, que comprende un álcali, material alcalinotérreo y haluro, ácido inorgánico

parcialmente neutralizado, ácido orgánico neutralizado) y/o un aceite) y/o una proteína morfogenética ósea.

En algunas modalidades, el biomaterial de origen acuático se produce usando un método que comprende una combinación de pasos que incluyen la incubación inicial de un hueso de origen acuático, desproteínización del hueso de origen acuático, deslipidación del hueso de origen acuático y descalcificación del hueso de origen acuático. En algunas modalidades, se pueden realizar uno o más pasos adicionales (por ejemplo, secar y/o moler el hueso de origen acuático). Si bien las modalidades descritas en la presente presentan los pasos en un orden particular, también pueden ser posibles otras disposiciones/órdenes de los pasos. En un método de ejemplo, como se muestra ilustrativamente en la figura 1, el hueso de origen acuático (por ejemplo, hueso de salmón) se puede incubar primero, desproteínizar, deslipidar, secar, moler, calcinar y se puede agregar un material de andamiaje formando así el biomaterial de origen acuático.

En algunas modalidades, el material no óseo (por ejemplo, músculo, tejidos conectivos, entre otros) se retira del hueso de origen acuático. Por ejemplo, en algunas modalidades, el hueso de origen acuático se incuba primero durante más de o igual a 20 minutos, más de o igual a 30 minutos, más de o igual a 1 hora, más de o igual a 2 horas, más de o igual a 3 horas, o más de o igual a 3,5 horas, retirando de esta manera al menos una porción del material no óseo. En algunas modalidades, el hueso de origen acuático se incuba primero durante menos de o igual a 4 horas, menos de o igual a 3,5 horas, menos de o igual a 3 horas, menos de o igual a 2,5 horas, menos de o igual a 2 horas, o menos de o igual a 1 hora. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 20 minutos y menores o iguales a 4 horas, mayores o iguales a 1 hora y menores o iguales a 2 horas). También son posibles otros intervalos y duraciones.

En algunas modalidades, el primer paso de incubación se realiza a una temperatura mayor o igual a 70 °C, mayor o igual a 80 °C, mayor o igual a 90 °C, mayor o igual a 100 °C, mayor o igual a 110 °C, o mayor o igual a 120 °C. En algunas modalidades, el primer paso de incubación se realiza a una temperatura menor o igual a 120 °C, menor o igual a 110 °C, menor o igual a 100 °C, menor o igual a 90 °C, o menor o igual a 80 °C. También son posibles combinaciones del intervalo mencionado anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 70 °C y menor o igual a 120 °C). También son posibles otros intervalos y temperaturas.

En algunas modalidades, el primer paso de incubación se realiza en aire o una solución acuosa (por ejemplo, agua, solución salina). En un conjunto ejemplar de modalidades, el retiro de material no óseo comprende incubar un hueso de origen acuático durante más de o igual a 20 minutos a menos de o igual a 4 horas a una temperatura de más de o igual a 70 °C y
5 menos de o igual a 120 °C, retirando de este modo el material no óseo.

En algunas modalidades, el hueso de origen acuático se desproteiniza (por ejemplo, después del primer paso de incubación). En algunas modalidades, el paso de desproteinización comprende incubar el hueso de origen acuático en una solución alcalina. Los ejemplos no limitantes de soluciones alcalinas incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de
10 potasio, bicarbonato de sodio e hidróxido de magnesio. Los expertos en la técnica serían capaces de seleccionar soluciones alcalinas adecuadas basadas en las enseñanzas de esta especificación.

En algunas modalidades, el paso de desproteinización se realiza durante más de o igual a más de o igual a 30 minutos, más de o igual a 1 hora, más de o igual a 2 horas, mayor
15 o igual a 3 horas, o mayor o igual a 3,5 horas. En algunas modalidades, el paso de desproteinización se realiza durante menos de o igual a 4 horas, menos de o igual a 3,5 horas, menos de o igual a 3 horas, menos de o igual a 2,5 horas, menos de o igual a 2 horas, o menos de o igual a 1 hora. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 30 minutos y menores o iguales
20 a 4 horas, mayores o iguales a 1 hora y menores o iguales a 2 horas). También son posibles otros intervalos y duraciones.

En algunas modalidades, el paso de desproteinización se realiza a una temperatura mayor o igual a 15 °C, mayor o igual a 16 °C, mayor o igual a 18 °C, mayor o igual a 20 °C, mayor o igual a 22 °C, o mayor o igual a 24 °C. En algunas modalidades, el paso de
25 desproteinización se realiza a una temperatura menor o igual a 25 °C, menor o igual a 24 °C, menor o igual a 22 °C, menor o igual a 20 °C, menor o igual a 18 °C, o menor o igual a 16 °C. También son posibles combinaciones del intervalo mencionado anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 15 °C y menor o igual a 25 °C). También son posibles otros intervalos y temperaturas.

30 En un conjunto ejemplar de modalidades, desproteinizar el hueso de origen acuático

comprende incubar el hueso de origen acuático en hidróxido de sodio a una temperatura mayor o igual a 15 °C y menor o igual a 25 °C durante mayor o igual a 30 minutos a menor o igual a 4 horas, desproteinizando de esta manera el hueso.

5 En algunas modalidades, el hueso de origen acuático se deslipida (por ejemplo, después del primer paso de incubación, después del paso de desproteinización). En algunas modalidades, deslipidar el hueso de origen acuático comprende incubar el hueso de origen acuático en un solvente de deslipidación. Ejemplos no limitantes de solventes de deslipidación adecuados incluyen acetona, hexano, heptano, metanol, etanol, isopropanol, butanol, cloroformo, éter y combinaciones de los mismos. En un conjunto ejemplar de modalidades, el
10 solvente de deslipidación es acetona, hexano o una mezcla de los mismos.

En algunas modalidades, el paso de deslipidación se realiza durante más de o igual a más de o igual a 4 horas, más de o igual a 5 horas, más de o igual a 6 horas, más de o igual a 7 horas, más de o igual a 8 horas, más de o igual a 9 horas, más de o igual a 10 horas, más de o igual a 11 horas, más de o igual a 12 horas, o más de o igual a 13 horas. En algunas
15 modalidades, el paso de deslipidación se realiza durante menos de o igual a 14 horas, menos de o igual a 13 horas, menos de o igual a 12 horas, menor o igual a 11 horas, menor o igual a 10 horas, menor o igual a 9 horas, menor o igual a 8 horas, menor o igual a 7 horas, menor o igual a 6 horas, o menor o igual a 5 horas. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 4 horas y menores
20 o iguales a 12 horas, mayores o iguales a 6 horas y menores o iguales a 12 horas, mayores o iguales a 4 horas y menores o iguales a 8 horas). También son posibles otros intervalos y duraciones.

En algunas modalidades, el paso de deslipidación se realiza a una temperatura mayor o igual a 15 °C, mayor o igual a 16 °C, mayor o igual a 18 °C, mayor o igual a 20 °C, mayor o
25 igual a 22 °C, o mayor o igual a 24 °C. En algunas modalidades, el paso de deslipidación se realiza a una temperatura menor o igual a 25 °C, menor o igual a 24 °C, menor o igual a 22 °C, menor o igual a 20 °C, menor o igual a 18 °C, o menor o igual a 16 °C. También son posibles combinaciones del intervalo mencionado anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 15 °C y menor o igual a 25 °C). También son posibles otros intervalos y temperaturas.

30 En un conjunto ejemplar de modalidades, deslipidar el hueso de origen acuático

comprende incubar el hueso de origen acuático en acetona a una temperatura mayor o igual a 15 °C y menor o igual a 30 °C durante mayor o igual a 4 horas a menor o igual a 8 horas, deslipidando de esta manera el hueso.

En algunas modalidades, el hueso de origen acuático se seca (por ejemplo, después de que se realiza el paso de desproteización y/o el paso de dilapidación). En algunas modalidades, el paso de secado se lleva a cabo para retirar ventajosamente cualquier humedad restante en el hueso de origen acuático. En algunas modalidades, el paso de secado se realiza durante más de o igual a 4 horas, más de o igual a 6 horas, más de o igual a 8 horas, más de o igual a 10 horas, más de o igual a 12 horas, más de o igual a 16 horas, más de o igual a 20 horas, o más de o igual a 24 horas. En algunas modalidades, el paso de secado se realiza durante menos de o igual a 48 horas, menos de o igual a 24 horas, menos de o igual a 20 horas, menos de o igual a 16 horas, menos de o igual a 12 horas, menos de o igual a 10 horas, menos de o igual a 8 horas, o menos de o igual a 6 horas. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 4 horas y menores o iguales a 24 horas, mayores o iguales a 6 horas y menores o iguales a 48 horas). También son posibles otros intervalos y duraciones.

En algunas modalidades, el paso de secado se realiza a una temperatura mayor o igual a 40 °C, mayor o igual a 45 °C, mayor o igual a 50 °C, mayor o igual a 55 °C, mayor o igual a 60 °C, o mayor o igual a 65 °C. En algunas modalidades, el paso de deslipidación se realiza a una temperatura menor o igual a 70 °C, menor o igual a 65 °C, menor o igual a 60 °C, menor o igual a 55 °C, menor o igual a 50 °C, o menor o igual a 45 °C. También son posibles combinaciones del intervalo mencionado anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 40 °C y menor o igual a 70 °C). También son posibles otros intervalos y temperaturas.

En un conjunto ejemplar de modalidades, el paso de secado comprende secar el hueso de origen acuático a una temperatura mayor o igual a 50 °C y menor o igual a 70 °C durante mayor o igual a 6 horas y menor o igual a 48 horas.

En algunas modalidades, el hueso de origen acuático se muele (por ejemplo, molienda tal como mediante molienda con bolas, molienda manual o eléctrica, mortero y mano, o similares) para formar partículas del hueso de origen acuático. En algunas modalidades, la molienda se puede realizar a cualquier temperatura adecuada (por ejemplo, temperatura

ambiente, una temperatura de secado) durante más de o igual a 1 segundo, más de o igual a 2 segundos, más de o igual a 4 segundos, más de o igual a 6 segundos, más de o igual a 8 segundos, o más de o igual a 10 segundos. En algunas modalidades, el hueso de origen acuático se muele durante menos de o igual a 12 segundos, menos de o igual a 10 segundos, menos de o igual a 8 segundos, menos de o igual a 6 segundos, menos de o igual a 4 segundos, o menos de o igual a 2 segundos. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 1 segundo y menores o iguales a 12 segundos). También son posibles otros intervalos y duraciones.

En algunas modalidades, la molienda del hueso de origen acuático (por ejemplo, después del paso de secado) da como resultado una pluralidad de partículas. Ventajosamente, la duración de la realización del paso de molienda puede producir una pluralidad de partículas que tienen un tamaño de partícula similar a los aloinjertos y/o xenoinjertos disponibles comercialmente. En algunas modalidades, la pluralidad de partículas tiene ventajosamente un tamaño de partícula suficiente para mantener una porosidad deseable del material de partícula.

En algunas modalidades, al menos una porción de la pluralidad de partículas tiene un tamaño de partícula mayor o igual a 250 micrones y menor o igual a 1000 micrones. Por ejemplo, en algunas modalidades, un tamaño de partícula promedio del hueso de origen acuático después de la trituración es mayor o igual a 100 micrones, mayor o igual a 250 micrones, mayor que o igual a 500 micrones, mayor o igual a 750 micrones, o mayor o igual a 1000 micrones. En algunas modalidades, el tamaño de partícula promedio es menor o igual a 2000 micrones, menor o igual a 1000 micrones, menor o igual a 750 micrones, menor o igual a 500 micrones, o menor o igual a 250 micrones. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 100 micrones y menores o iguales a 2000 micrones, mayores o iguales a 250 micrones y menores o iguales a 1000 micrones). También son posibles otros intervalos y tamaños. Los expertos en la técnica entenderán que si bien el tamaño de partícula promedio puede tener un intervalo como se señaló anteriormente (por ejemplo, mayor o igual a 100 micrones y menor o igual a 2000 micrones), la pluralidad de partículas puede incluir partículas individuales que tienen tamaños de partícula menores que 100 micrones y/o mayores que 2000 micrones.

En algunas modalidades, el hueso de origen acuático (por ejemplo, después del paso de desproteinización, después del paso de dilapidación, después del paso de secado y/o

después de que se realiza el paso de molienda) se calcina. Por ejemplo, en algunas modalidades, el hueso de origen acuático (por ejemplo, partículas óseas derivadas acuáticas) se calcina produciendo de esta manera la primera composición (por ejemplo, una primera composición que comprende hidroxiapatita como se describe en la presente). En algunas modalidades, el paso de calcinación comprende calentar el hueso de origen acuático (molido) a una temperatura mayor o igual a 600 °C, mayor o igual a 650 °C, mayor o igual a 700 °C, mayor o igual a 800 °C, mayor o igual a 900 °C, mayor o igual a 1000 °C, o mayor o igual a 1100 °C. En algunas modalidades, el paso de calcinación comprende calentar a una temperatura menor o igual a 1200 °C, menor o igual a 1100 °C, menor o igual a 1000 °C, menor o igual a 900 °C, menor o igual a 800 °C, menor o igual a 700 °C, o menor o igual a 650 °C. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 600 °C y menores o iguales a 1200 °C, mayores o iguales a 800 °C y menores o iguales a 1200 °C). También son posibles otros intervalos y temperaturas.

En algunas modalidades, el paso de calcinación comprende calentar el hueso de origen acuático (molido) (por ejemplo, partículas óseas derivadas del agua) durante más de o igual a 1 hora, más de o igual a 1,5 horas, más de o igual a 2 horas, más de o igual a 2,5 horas, más de o igual a 3 horas, más de o igual a 4 horas, más de o igual a 5 horas, más de o igual a 6 horas, o más de o igual a 8 horas. En algunas modalidades, el paso de calcinación comprende calentar el hueso de origen acuático (molido) (por ejemplo, partículas óseas de origen acuático) durante menos de o igual a 10 horas, menos de o igual a 8 horas, menos de o igual a 6 horas, menos de o igual a 5 horas, menos de o igual a 4 horas, menos de o igual a 3 horas, menos de o igual a 2,5 horas, menos de o igual a 2 horas, o menos de o igual a 1,5 horas. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 1 hora y menores o iguales a 10 horas). También son posibles otros intervalos y duraciones.

En algunas modalidades, después de la formación de la primera composición, la primera composición y la segunda composición se mezclan entre sí (por ejemplo, en una relación en peso como se describió anteriormente) formando así el biomaterial de origen acuático. En algunas modalidades, la primera composición y la segunda composición se combinan de modo que una relación de hidroxiapatita a la segunda composición (por ejemplo, colágeno o un derivado del mismo) presente en el biomaterial de origen acuático sea mayor o igual a 70:30, mayor o igual a 75:25, mayor o igual a 80:20, mayor o igual a 85:15 o mayor

o igual a 90:10. En algunas modalidades, la relación de hidroxiapatita a la segunda composición (por ejemplo, colágeno o un derivado del mismo) es menor o igual a 95:5, menor o igual a 90:10, menor o igual a 85:15, menor o igual a 80:20, o menor o igual a 75:25. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 70:30 y menores o iguales a 90:10). También son posibles otros intervalos. En un conjunto ejemplar de modalidades, la relación de hidroxiapatita a colágeno (o un derivado del mismo) en el biomaterial es mayor o igual a 70:30 y menor o igual a 90:10).

En un conjunto ejemplar de modalidades, el método para formar la primera composición comprende uno o más de los siguientes pasos:

- 10 1. Incubar los huesos de salmón en agua a 110 °C durante 1 a 2 horas. Este paso corresponde al retiro de sustancias distintas de los huesos, tal como músculos, tejidos conectivos u otros elementos.
- 15 2. Incubar los huesos de salmón en una solución de NaOH a una concentración entre 0,1 M y 0,5 M, preferiblemente entre 0,2 M y 0,3 M, y más preferiblemente a 0,25 M, a una temperatura entre 15°C y 30°C, preferiblemente entre 18°C y 23°C, y más preferiblemente a 20°C, durante un tiempo entre 1 y 3 horas, preferiblemente 2 horas. Este paso corresponde a la desproteinización de los huesos.
- 20 3. Incubar los huesos de salmón en acetona entre 20°C y 30°C, preferiblemente entre 22°C y 28°C, y más preferiblemente a 25°C, durante un tiempo entre 5 y 7 horas, preferiblemente entre 5,5 y 6,5 horas, y más preferiblemente durante 6 horas. Este paso corresponde a la deslipidación de los huesos.
4. Secar los huesos de salmón entre 50°C y 70°C, preferiblemente entre 55°C y 65°C, y más preferiblemente a 60°C, durante más de 6 horas.
- 25 5. Triturar los huesos y calcinarlos a una temperatura entre 900°C y 1100°C, preferiblemente entre 950°C y 1050°C, y más preferiblemente a 1000°C, durante un tiempo entre 1 y 3 horas, preferiblemente entre 1,5 y 2,5 horas, y más preferiblemente durante 2 horas.

6. Obtener el biomaterial que comprende hidroxiapatita.

7. En un conjunto ejemplar de modalidades, el método incluye adicionalmente un paso final en la que se agrega colágeno entre 10 y 90% (p/p) de la composición final, obteniendo de esta manera la composición de la presente invención.

5 En algunas modalidades, el método incluye un un paso adicional de agregar fibrina rica en plaquetas al biomaterial de origen acuático que comprende hidroxiapatita.

10 En un conjunto ejemplar de modalidades, el biomaterial que comprende hidroxiapatita, de bajo costo, no citotóxico y que promueve la osteogénesis, obtenido usando el método descrito anteriormente, comprende entre 54 y 65% de hidroxiapatita, 12 y 16% de fosfato β -tricálcico, entre 1 y 2% de óxido de calcio, entre 0 y 2% de óxido de magnesio y entre 19 y 32% de biomaterial amorfo. El biomaterial de ejemplo tiene una densidad entre 3,2 g/cm³ y 3,3 g/cm³ y es termoestable entre 50°C y 800°C. Otros componentes e intervalos también son posibles como se describió anteriormente y en la presente.

15 En un conjunto ejemplar de modalidades de la invención, el biomaterial de origen acuático está en forma sólida, semisólida o líquida, tal como un bloque sólido, un gel, una pasta, etc.

20 Un conjunto ejemplar de modalidades se refiere al uso del biomaterial de origen acuático que comprende una primera composición que comprende hidroxiapatita derivada de hueso de salmón y una segunda composición que comprende colágeno en la fabricación de un producto útil para promover la osteogénesis.

25 En un conjunto ejemplar de modalidades, la composición que incluye el biomaterial obtenido de hueso de origen acuático comprende adicionalmente colágeno, que puede ser colágeno tipo 1, colágeno tipo 2, colágeno tipo 3 y colágeno tipo 4. Sin desear limitarse a la teoría, en algunas modalidades, la adición de colágeno (u otros materiales de andamiaje como el descrito en la presente) mejora ventajosamente la capacidad del biomaterial para promover la osteogénesis. El colágeno puede estar presente en el biomaterial en cualquier cantidad adecuada tal como las descritas anteriormente en el contexto de la segunda composición.

El colágeno es una proteína esencial que se encuentra en la matriz extracelular de los tejidos óseos y es crucial para la estructura y resistencia ósea. Sin pretender imponer ninguna teoría, mediante la incorporación de colágeno en el biomaterial, se puede mejorar la integración del biomaterial con el tejido óseo circundante, promoviendo la formación de hueso nuevo. Además, el colágeno puede proporcionar un entorno favorable para la adhesión y proliferación de las células óseas, lo que puede acelerar el proceso de curación de las lesiones óseas.

En otra modalidad ilustrativa, la composición que comprende el biomaterial de hidroxiapatita obtenido a partir de hueso de origen acuático comprende adicionalmente fibrina rica en plaquetas. La fibrina rica en plaquetas (PRF) es un concentrado de plaquetas autólogo obtenido de la propia sangre del paciente. La PRF es rica en factores de crecimiento y otras proteínas bioactivas que pueden promover la regeneración de tejidos. Al incorporar PRF en el biomaterial, se puede mejorar, en algunos casos, la capacidad del biomaterial para promover la osteogénesis, su biocompatibilidad y la curación de lesiones óseas.

En algunas modalidades, el biomaterial de origen acuático comprende además fibrina rica en plaquetas, si está presente, en una cantidad mayor o igual a 0,1% en peso, mayor o igual a 0,5% en peso, mayor o igual a 1% en peso, mayor o igual a 1,5% en peso, mayor o igual a 2% en peso, mayor o igual a 2,5% en peso, mayor o igual a 3% en peso, mayor o igual a 3,5% en peso, o mayor o igual a 4% en peso con respecto al peso total del biomaterial. En algunas modalidades, el biomaterial de origen acuático comprende fibrina rica en plaquetas en una cantidad menor o igual al 5% en peso, menor o igual al 4% en peso, menor o igual al 3,5% en peso, menor o igual al 3% en peso, menor o igual al 2,5% en peso, menor o igual al 2% en peso, menor o igual al 1,5% en peso, menor o igual al 1% en peso, o menor o igual al 0,5% en peso con respecto al peso total del biomaterial. También son posibles combinaciones de los intervalos mencionados anteriormente (por ejemplo, mayores o iguales a 0,1% en peso y menores o iguales a 5% en peso, mayores o iguales a 1% en peso y menores o iguales a 2% en peso). También son posibles otros intervalos.

En aun otra modalidad de la invención, la composición que incluye el biomaterial de hidroxiapatita puede estar en forma sólida, semisólida o líquida.

Otro objeto de la presente invención es el uso de la composición que incluye el

biomaterial que comprende hidroxiapatita derivada de huesos de salmón en un producto útil para promover la osteogénesis y para el tratamiento de lesiones óseas.

Todos los términos técnicos y científicos utilizados para describir la presente invención tienen el mismo significado entendido por una persona con conocimientos básicos en el campo técnico relevante. Sin embargo, para definir el alcance de la invención más claramente, la siguiente es una lista de la terminología utilizada en esta descripción. El término "lesiones óseas" en general se refiere a una variedad de condiciones y trastornos que afectan la integridad estructural y funcional de los huesos y tejidos óseos, incluidas las lesiones dentales. Estos pueden incluir, entre otros, fracturas óseas, osteoporosis, lesiones por estrés, enfermedad periodontal, abscesos dentales, peri-implantitis, osteomielitis, tumores óseos, metástasis óseas, entre otros. El término "osteogénesis" en general se refiere al proceso biológico que abarca la formación y el desarrollo de hueso nuevo en el cuerpo. Es esencial en la etapa de crecimiento de un individuo, durante la curación de fracturas y en la remodelación ósea constante, lo que permite el mantenimiento y la renovación del esqueleto a lo largo de la vida de una persona. La osteogénesis puede ser de dos tipos: intramembranosa y endocondral. En la osteogénesis intramembranosa, el hueso se forma directamente a partir de células mesenquimatosas condensadas que se diferencian en osteoblastos, que a su vez generan hueso. Este tipo de osteogénesis es el principal proceso de formación ósea en la cara y cráneo. Por otro lado, la osteogénesis endocondral implica la formación de hueso a partir de una plantilla de cartílago que se reemplaza gradualmente por tejido óseo. Este es el proceso predominante en la formación de huesos largos en el cuerpo, tal como los del brazo o pierna. En el contexto dental, la osteogénesis es un proceso clave en diversas intervenciones dentales y maxilofaciales. Por ejemplo, en los procedimientos de implantes dentales, donde se inserta un implante de titanio en el hueso mandibular o maxilar, se busca promover la osteogénesis alrededor del implante para lograr una integración sólida y duradera, un fenómeno conocido como oseointegración.

Adicionalmente, en las cirugías ortognáticas destinadas a corregir las deformidades de la mandíbula, se realizan cortes en el hueso que luego se fijan en una nueva posición. Durante la recuperación, la osteogénesis es el proceso que permite la curación y fusión de segmentos óseos reposicionados. Finalmente, en los procedimientos de regeneración ósea guiada, que se utilizan para tratar la pérdida ósea debido a la enfermedad periodontal o para preparar el terreno para un futuro implante dental, se utilizan biomateriales y técnicas que estimulan la osteogénesis para reemplazar el tejido óseo perdido. El término "hidroxiapatita" o "HAPs" se

refiere a un biomineral de calcio, específicamente una forma de fosfato de calcio, con la fórmula química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. La hidroxiapatita es el principal componente mineral de los huesos y dientes humanos, formando aproximadamente el 70% de la masa ósea y hasta el 90% del esmalte dental. Es reconocido por su excelente biocompatibilidad y bioactividad, lo que lo convierte en un biomaterial ideal para aplicaciones en ortopedia, odontología y medicina regenerativa. En forma de cristales microscópicos, la hidroxiapatita proporciona dureza y rigidez estructural en huesos y dientes. Adicionalmente, debido a su composición química como la del hueso, se utiliza con frecuencia en implantes y biomateriales de relleno óseo, ya que puede promover la formación de hueso nuevo y la integración con el tejido circundante.

El término "osteoinducción" se refiere a un proceso biológico que implica la estimulación de células progenitoras indiferenciadas para diferenciarse en células óseas u osteoblastos. Este proceso se produce principalmente a través de señales bioquímicas emitidas por factores de crecimiento óseo y es crucial en la regeneración y remodelación del tejido óseo. Por ejemplo, la osteoinducción juega un papel crucial en el éxito de los injertos óseos, donde el biomaterial injertado induce la formación de hueso nuevo en el sitio del injerto. El potencial de diferenciación en tejido óseo es de gran relevancia y da cuenta de los fenómenos de osteogénesis y osteoinducción, ya que, si las células mesenquimatosas tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, que son células de tejido óseo especializadas en producir matriz ósea, formada por cristales de hidroxiapatita, y compuesta principalmente por Ca y P, también estaría demostrando la capacidad de generar estas estructuras.

Las células osteoprogenitoras presentes en el paciente potencialmente pueden proliferar y diferenciarse en osteoblastos en presencia de un injerto; por lo tanto, con base en lo anterior, un biomaterial en este contexto puede, en algunas modalidades, tener actividad osteogénica y osteoinductora, ya que puede estar relacionado con la formación ósea, además de estimular y activar las células madre mesenquimales del tejido hospedador, respectivamente.

El término "aloinjerto" se refiere a un tipo específico de trasplante en el que el tejido se transfiere de un individuo a otro de la misma especie, pero no es un gemelo genéticamente idéntico. Los aloinjertos son comunes en la práctica médica y se utilizan en una variedad de procedimientos, tal como trasplantes de órganos, tejido cutáneo para tratar quemaduras graves o en cirugías ortopédicas donde se utilizan injertos óseos alogénicos. Dado que los donantes y los receptores no son genéticamente idénticos, es esencial considerar el riesgo de rechazo inmune y, por lo tanto, el uso de medicamentos inmunosupresores a menudo es

necesario para prevenir este problema.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar ciertas modalidades descritas en la presente, incluidos ciertos aspectos de la presente invención, pero no ejemplifican el alcance completo de la invención.

Ejemplo 1 - Optimización de variables de desproteínización

En este ejemplo, se llevó a cabo la optimización de las variables del método de producción de la presente invención, centrándose en la etapa de desproteínización. Se realizaron una serie de experimentos para probar diferentes valores de concentración y temperatura de la solución alcalina durante esta etapa.

Procedimiento:

1. Los huesos de salmón se sometieron inicialmente a una suspensión en agua a 110 °C durante 2 horas para retirar la mayoría de las sustancias distintas de los huesos, tal como músculos y tejidos conectivos.

2. Luego, se implementó la etapa de desproteínización, donde los huesos se trataron con una solución de NaOH a diferentes concentraciones (2 M o 0,25 M) y temperaturas (20°C o 50°C) durante un período de 2 horas.

3. Después de la desproteínización, los huesos se sometieron a una etapa de deslipidación con acetona a temperatura ambiente durante 24 horas.

4. Posteriormente, los huesos se secaron a 60 °C durante la noche para retirar cualquier humedad restante.

5. Finalmente, los huesos secos se molieron en preparación para la etapa final de calentamiento (es decir, calcinación), donde se transformaron en un biomaterial de

hidroxiapatita a través de un proceso a 650° C durante 5 horas.

Resultados: Los resultados del rendimiento basados en las variables de la etapa de desproteinización se muestran en la Tabla 1. La combinación de NaOH 2 M y 20°C mostró el rendimiento más efectivo, con un rendimiento del 12%.

Además, las mediciones de espectros Raman (Figura 2A) para los biomateriales resultantes de cada combinación de condiciones. Se observaron los 4 modos vibracionales asignados al grupo PO₄ de apatita, siendo el pico característico de hidroxiapatita el más relevante.

Tabla 1: Resultados de rendimiento con base en las variables de la etapa de desproteinización

Variables	Rendimiento (%)
NaOH 2 M y 20 °C	12,0
NaOH 2 M y 50 °C	6,0
NaOH 0,25 M y 20 °C	7,8
NaOH 0,25 M y 50 °C	-

Conclusión: Con base en los resultados, se descartaron las condiciones de tratamiento con NaOH 2,5 M y 50°C, ya que no mostraron un rendimiento adecuado. La combinación de NaOH 2 M y 20 °C se identificó como la más eficaz para la desproteinización de los huesos de salmón. Este ejemplo ilustra el proceso de optimización de variables en la etapa de desproteinización, crucial para la obtención de biomaterial de hidroxiapatita de alta calidad y alto rendimiento.

Ejemplo 2 - Optimización de variables de deslipidación

Las variables del método de producción de la presente invención, particularmente el solvente y el tiempo en la etapa de deslipidación, se determinaron a través de una serie de experimentos que prueban diferentes valores para cada variable.

Procedimiento:

1. Los huesos de salmón se sometieron inicialmente a una suspensión en agua a 110 °C durante 2 horas.

2. Posteriormente, se implementó la etapa de desproteínización, donde los huesos se trataron con una solución de NaOH a una concentración de 2 M. Este proceso se llevó a cabo a una temperatura constante de 20°C durante un período de 2 horas.

3. Después de la desproteínización, los huesos se sometieron a una etapa de deslipidación con acetona o hexano a 25 °C durante 6 o 12 horas.

4. Luego, los huesos se secaron a 60 °C durante la noche para eliminar cualquier humedad restante.

5. Finalmente, los huesos secos se molieron en preparación para la etapa de calcinación final, donde se transformaron en un biomaterial de hidroxiapatita a través de un proceso a 650°C durante 5 horas.

Resultados: Los resultados del rendimiento basado en las variables de la etapa de deslipidación se muestran en la Tabla 2. La combinación de acetona y 6 horas mostró el rendimiento más efectivo con un 17,8%.

Tabla 2: Resultados de rendimiento con base en las variables de la etapa de deslipidación

Variables	Rendimiento (%)
Acetona y 6 horas	17,8
Acetona y 12 horas	17,7
Hexano y 6 horas	16,0
Hexano y 12 horas	17,0

Adicionalmente, se realizaron mediciones de espectros Raman para los biomateriales resultantes de cada combinación de condiciones utilizando un equipo XploRA™ PLUS (Horiba Scientific, Francia), como se muestra en la figura 2B. Si bien no se observaron efectos marcados relacionados con el tiempo, un pico de intensidad a 910 cm⁻¹ fue más pronunciado

para los experimentos con hexano, y se observó un pico de hidroxiapatita menos intenso en comparación con las muestras con acetona.

Ejemplo 3 - Optimización de variables de calcinación

5 Las variables del método de producción de la presente invención, particularmente la temperatura y el tiempo en la etapa de calcinación, se determinaron a través de una serie de experimentos que prueban diferentes valores para cada variable.

Procedimiento:

1. Los huesos de salmón se sometieron inicialmente a una suspensión en agua a 110 °C durante 2 horas.
- 10 2. Posteriormente, se implementó la etapa de desproteización, donde los huesos se trataron con una solución de NaOH a una concentración de 2 M. Este proceso se llevó a cabo a una temperatura constante de 20°C durante un período de 2 horas.
3. Después de la desproteización, los huesos se sometieron a una etapa de deslipidación con acetona a 25 °C durante 6 horas.
- 15 4. Luego, los huesos se secaron a 60 °C durante la noche para eliminar cualquier humedad restante.
5. Finalmente, los huesos secos se molieron en preparación para la etapa de calcinación final, donde se transformaron en un biomaterial de hidroxiapatita a través de un proceso a 800°C, 900°C o 1000°C durante 2, 4 o 6 horas.
- 20 Los resultados del rendimiento basados en las variables de la etapa de calcinación se muestran en la Tabla 3. La combinación de 800° C y 2 horas mostró el rendimiento más efectivo con un 19,0%.

Tabla 3: Resultados de rendimiento con base en las variables de la etapa de

calcinación

Variables	Rendimiento (%)
800°C y 6 horas	18,9
800°C y 4 horas	18,9
800°C y 2 horas	19,0
900°C y 6 horas	18,0
900°C y 4 horas	18,0
900°C y 2 horas	18,8
1000°C y 6 horas	18,0
1000°C y 4 horas	18,0
1000°C y 2 horas	18,0

Adicionalmente, se realizaron mediciones de espectros Raman para los biomateriales resultantes de cada combinación de condiciones utilizando un equipo XploRA™ PLUS (Horiba Scientific, Francia), como se muestra en las figuras 3, 4 y 5.

- 5 La intensidad máxima característica de hidroxiapatita se identificó en todas las muestras en la posición previamente informada. La variable tiempo no pareció influir en la formación de hidroxiapatita, ya que los espectros no mostraron diferencias notables a una temperatura dada, y todos exhibieron los picos característicos de la estructura de hidroxiapatita. Sin embargo, la temperatura sí influyó en la pureza de la hidroxiapatita, con un
- 10 espectro más definido observado a temperaturas más altas.

Ejemplo 4 - Protocolos seleccionados

Se evaluaron tres protocolos completos de la siguiente manera:

- Protocolo 1: Desproteización 0,25 M a 20 °C durante 2 horas / Deslipidación con acetona durante 6 horas / Calcinación a 1000 °C durante 2 horas.
- 15
- Protocolo 2: Desproteización 0,25 M a 20 °C durante 2 horas / Deslipidación con acetona durante 6 horas / Calcinación a 900 °C durante 2 horas.

- Protocolo 3: Desproteinización 0,25 M a 20 °C durante 2 horas / Deslipidación con acetona durante 6 horas / Calcinación a 800 °C durante 2 horas.

A partir de los protocolos anteriores, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 4, donde los biomateriales obtenidos de los 3 protocolos probados se seleccionaron como equivalentes en calidad.

Tabla 4: Resultados de los 3 protocolos completos para la obtención de biomaterial de hidroxiapatita.

Protocolo	Rendimiento (%)	Cantidad de Hidroxiapatita (% p/p)	Cristalinidad (%)
1	19,0	64,1	80,49
7	21,0	60,21	78,45
3	18,9	54,33	68,42

Luego se midieron los espectros Raman para los biomateriales resultantes de cada protocolo utilizando un equipo XploRA™ PLUS (Horiba Scientific, Francia), como se muestra en las figuras 6, 7 y 8.

Los 4 modos vibracionales asignados al grupo fosfato (PO₄) de la apatita se presentaron en cada uno de los espectros, con picos más agudos correspondientes a la hidroxiapatita producida por el protocolo 1, mientras que para el biomaterial de los protocolos 2 y 3, se exhibieron formas ruidosas, junto con los picos de la estructura de la apatita. El pico que aparece en la región de 1070 cm⁻¹ corresponde al pico del grupo carbonato que se superpone con el grupo fosfato v₃. La presencia del grupo carbonato en los tejidos del injerto óseo es importante, ya que se describe como el factor que simula la matriz extracelular, mejorando así las características de osteointegración, biocompatibilidad y reabsorción.

Luego se midió la difracción de rayos X (XRD) para los biomateriales resultantes de cada uno de los 3 protocolos utilizando un difractómetro de rayos X en polvo (Bruker, Alemania). Los

difractogramas obtenidos se pueden ver en las figuras 9, 10 y 11, traducándose en los

resultados mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de los difractogramas de los biomateriales obtenidos de los 3 protocolos.

Protocolo	Hidroxiapatita (% p/p)	Fosfato β -tricálcico (% p/p)	Óxido de calcio (% p/p)	Óxido de magnesio (% p/p)	Material amorfo (% p/p)
1	64,10	15,40	0,99		19,51
2	60,21	14,33	1,91	2,00	21,55
3	54,33	12,62	1,33	0,14	31,58

Ejemplo 5 - Análisis termogravimétrico (TGA)

- 5 El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en los biomateriales resultantes de los protocolos 1, 2 y 3 utilizando un equipo TGA Q50 V20.10 Build 36 (Thermal Analysis, Estados Unidos), variando la temperatura entre 50°C y 800°C. Los resultados para cada protocolo se pueden ver en las figuras 12, 13 y 14. Para la hidroxiapatita de los protocolos seleccionados, no se evidencia pérdida de masa significativa. Sin embargo, se puede observar una pequeña
- 10 variación de la temperatura de 500°C a 600°C, tanto para el protocolo 1 como para el protocolo 2, lo que podría indicar la combustión de trazas de materia orgánica restante en el biomaterial. Esto confirma que la hidroxiapatita producida es térmicamente estable.

Ejemplo 6 - Microscopía electrónica de escaneo, junto con espectroscopía de rayos X con dispersión de energía (SEM-EDX)

- 15 Los biomateriales resultantes de los protocolos 1, 2 y 3 se enviaron para microscopía SEM-EDX utilizando un equipo Phenom Pro X (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Las imágenes obtenidas se pueden observar en las figuras 15, 16 y 17. Adicionalmente, la composición elemental local, extraída del análisis EDX, se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6: Composición elemental local de los biomateriales obtenidos de cada protocolo.

Símbolo químico/ concentración atómica (%p/p)	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Ca	7,64	18,20	18,87
P	4,68	10,46	10,84
Ca/P	1,63	1,74	1,74

La relación Ca/P de las hidroxiapatitas obtenidas es cercana al valor estequiométrico de la hidroxiapatita, que es 1,67. Además de los elementos en la Tabla 5, se presentaron cantidades de C, O, Mg, Na, N, Cu, Al y Si.

Ejemplo 7 - Picnometría de gases

- 5 El análisis de picnometría de gases se realizó en los biomateriales obtenidos mediante cada uno de los 3 protocolos seleccionados utilizando un equipo AccuPyc II 1340 Series (Micromeritics, Estados Unidos). Las densidades medidas se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7: Densidad de los biomateriales obtenidos de cada protocolo de extracción.

Protocolo	Densidad (g/cm³)
1	3,24+1,10
2	3,29 + 0,01
3	3,37 + 0,01

- 10 Los valores obtenidos son cercanos a la densidad teórica para hidroxiapatita pura de 3,156 g/cm³.

Ejemplo 8 - Analizador de textura

- 15 La resistencia a la compresión de las muestras de cada protocolo se analizó utilizando un analizador de textura TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), obteniendo la pendiente como se muestra en la figura 18. Con base en los datos obtenidos, se consideraron 6 réplicas para cada protocolo. Las mediciones se realizaron con una fuerza de compresión de hasta 2 mm. Los cálculos de la pendiente y determinación de la fuerza máxima se realizaron considerando los datos de 0,5 a 1,6 mm de compresión, y se pueden ver en la Tabla

8.

Tabla 8: Fuerza máxima de compresión de los biomateriales obtenidos de cada protocolo de extracción.

Protocolo	Fuerza máxima (N)
1	320,60
2	326,26
3	339,55

Estos resultados indican que a menor densidad (material del protocolo 1) y, por lo tanto, a mayor porosidad, hubo menos resistencia mecánica que los demás. Por lo tanto, sin querer limitarse a la teoría, las temperaturas más altas en el proceso de calcinación de la producción de hidroxiapatita pueden, en algunos casos, interferir con la estructura resultante del biomaterial final, afectando su resistencia a la compresión al presentar una mayor porosidad.

Ejemplo 9 - Viabilidad celular y proliferación

Para evaluar la viabilidad y proliferación de diferentes tipos celulares en presencia de biomateriales de hidroxiapatita obtenidos de los 3 protocolos seleccionados, se cultivaron células mesenquimatosas gingivales en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) durante 48 horas en presencia de biomateriales comerciales de hidroxiapatita de origen humano, de origen bovino, procedentes de cada uno de los 3 protocolos seleccionados, y un control negativo. Luego se midió la viabilidad y la proliferación utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para medir las células metabólicamente activas. Los resultados a las 24 y 48 horas de cultivo se pueden ver en las figuras 19 y 20.

El número de células viables fue similar en todas las condiciones probadas, excepto para el biomaterial de hidroxiapatita del protocolo 1 (HAPS P1), que mostró diferencias significativas en comparación con el control y el biomaterial de hidroxiapatita del protocolo 3 (HAPS P3) ($p < 0,01$) a las 24 h. Luego, en la figura 20, a las 48 horas, la viabilidad celular de HAPS cambia, observando que las células tratadas con HAPS P3 no aumentan en número en comparación con el experimento de 24 h, mientras que las otras condiciones sí aumentan su viabilidad, alcanzando un número similar de células entre ellas.

Aunque HAPS P3 muestra diferencias significativas en comparación con los controles y otras hidroxiapatitas a las 48 h, el número de células viables sigue siendo aceptable, lo que sugiere que la hidroxiapatita producida a partir de hueso de salmón, considerada un desperdicio de la industria del salmón, tiene valor para el campo de la reparación ósea.

5 **Ejemplo 10 - Diferenciación celular de células mesenquimatosas en osteoblastos**

Las células mesenquimatosas se cultivaron durante un período de diferenciación de 21 días, que se tiñeron con rojo de alizarina en medio de diferenciación (DMEM complementado con ácido ascórbico, fosfato de sodio y dexametasona) a 37 °C. Las diferenciaciones se realizaron en diferentes condiciones, particularmente en presencia de biomateriales de hidroxiapatita de los tres protocolos seleccionados; HAPS P1, HAPS P2, HAPS P3, aloinjerto humano, xenoinjerto bovino, en ausencia de biomaterial y sin diferenciación. Los resultados después de 21 días se pueden ver en la figura 21, donde las flechas indican los depósitos de calcio presentes en los diferentes cultivos. Estos depósitos, observados con tinción más oscura, son una clara indicación de la mineralización producida por las células osteoblásticas, especializadas en la producción de matriz ósea.

El ensayo de diferenciación celular permitió determinar que los tres protocolos de producción de HAPS inducen la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos, confirmada por la presencia de depósitos de calcio. La mineralización fue notable para HAPS P1, P2 y, en menor medida, para P3, siendo similar a la producida por el xenoinjerto bovino y significativamente mayor que la del aloinjerto humano y las células diferenciadas en ausencia de biomaterial.

Estos resultados demuestran que los biomateriales generados con los tres protocolos son osteoinductivos y que hubo diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos en su presencia.

Ejemplo 11 - Tiempo de molienda

Se midieron los tamaños de partícula obtenidos de cada uno de los tres protocolos seleccionados utilizando 2, 6 y 10 segundos en la etapa de molienda. Los resultados de la

distribución de tamaños se pueden observar en las figuras 22, 23 y 24. Los aloinjertos y xenoinjertos disponibles comercialmente tienen una distribución de tamaño de partícula que varía de 250 a 1000 μm . Con base en esto, la distribución de tamaño que más se asemeja a este perfil se obtiene a través de una molienda de 2 segundos. Luego, los biomateriales obtenidos con tiempos de molienda de 2 y 10 segundos se observaron mediante microscopía de luz polarizada para medir su porosidad. Estos resultados se pueden ver en las figuras 25 y 26.

Estos resultados llevaron a la conclusión de que un tiempo de molienda más corto en general da como resultado un mayor tamaño de partícula, manteniendo la porosidad del biomaterial, mientras que un tiempo de molienda más largo conduce a tamaños de partícula más pequeños y a la pérdida de porosidad del biomaterial. Por lo tanto, con base en los resultados anteriores, la molienda durante 2 segundos proporciona una mejor microestructura, lo que la convierte en la condición seleccionada para producir biomateriales de hidroxiapatita a partir de los protocolos seleccionados.

Ejemplo 12 - Combinación de biomateriales de hidroxiapatita con leucocitos y fibrina rica en plaquetas (L-PRF) y evaluación del contexto clínico

Se realizaron estudios sobre el comportamiento del biomaterial de hidroxiapatita cuando se combina con leucocitos y fibrina rica en plaquetas (L-PRF), obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 9, donde a cada atributo se le asignó un valor máximo de 5 puntos evaluados según su naturaleza cualitativa.

Atributo	P1	P2	P3
Manejo del cirujano	Fácil de llevar al sitio quirúrgico, se puede moldear como se desee.	No es difícil de manejar. Fácil de moldear como se desee en porciones pequeñas, fácil manejo.	Fácil de moldear como se desee en porciones pequeñas, fácil manejo.
Hidrofobicidad	El biomaterial absorbe líquido.	El biomaterial absorbe líquido.	El biomaterial absorbe líquido.

Agregación	Se aglutina en 5 minutos.	Material frágil, se aglutina en pequeñas porciones.	El material se aglutina pero se separa fácilmente.
Consistencia	Firme, soporta la presión.	Material suave.	Material firme que resiste poca presión.
Puntuación total obtenida	20	15	17

El biomaterial obtenido mediante el protocolo 1 (mayor temperatura de calcinación) recibió una puntuación perfecta en la combinación con la evaluación L-PRF. Con este biomaterial de hidroxiapatita, no se produjo pérdida de material durante la manipulación. Los biomateriales de los protocolos P1 y P2 mostraron un exceso de absorción de L-PRF, pero no completamente.

Adicionalmente, PI y P2 no exhibieron agregación completa, perdiendo partículas de biomaterial. A pesar de esto, los biomateriales de P2 y P3 obtuvieron puntajes aceptables en la evaluación.

Si bien se han descrito e ilustrado en la presente varias modalidades de la presente invención, los expertos en la técnica imaginarán fácilmente una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en la presente, y cada una de estas variaciones y/o modificaciones se considera dentro del alcance de la presente invención. De manera más general, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritos en la presente pretenden ser de ejemplo y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las cuales se utilizan las enseñanzas de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en la presente. Por lo tanto, debe entenderse que las modalidades anteriores se presentan solo a modo de ejemplo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes, la invención puede ponerse en práctica de otra manera que no sea la específicamente descrita y reivindicada. La presente invención se refiere a cada característica, sistema, artículo, material, kit y/o método individual descrito en la presente. Además, cualquier combinación de dos o más de estas características, sistemas,

artículos, materiales, kits y/o métodos, si dichas características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos no son mutuamente inconsistentes, se incluye dentro del alcance de la presente invención.

5 Los artículos indefinidos "un" y "una", como se usan en la presente especificación y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, debe entenderse que significan "al menos uno".

10 La frase "y/o", como se usa en la presente especificación y en las reivindicaciones, debe entenderse que significa "uno o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes conjuntivamente en algunos casos y presentes disyuntivamente en otros casos. Opcionalmente, pueden estar presentes otros elementos que no sean los elementos específicamente identificados por la cláusula "y/o", ya sea relacionados o no con esos elementos específicamente identificados, a menos que se indique claramente lo contrario. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, una referencia a "A y/o B", cuando se utiliza junto con un lenguaje abierto tal como "que comprende" puede referirse, en una modalidad, a A sin B (que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra modalidad, a B sin A (que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en aun otra modalidad, tanto A como B (que incluye opcionalmente otros elementos); etc.

20 Como se usa en la presente especificación y en las reivindicaciones, "o" debe entenderse que tiene el mismo significado que "y/o" como se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan elementos en una lista, "o" o "y/o" se interpretarán como inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluyendo más de uno, de una cantidad o lista de elementos y, opcionalmente, elementos adicionales no enumerados. Solo los términos claramente indicados en sentido contrario, como "solo uno de" o "exactamente uno de" o, cuando se usan en las reivindicaciones, "que consiste en", se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de una cantidad o lista de elementos. En general, el término "o" como se usa en este documento solo se interpretará como indicativo de alternativas exclusivas (es decir, "uno u otro, pero no ambos") cuando esté precedido por términos de exclusividad, como "cualquiera", "uno de", "solo uno de" o "exactamente uno de". "Que consiste esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado ordinario como se usa en el campo del derecho de patentes.

Como se usa en la presente en la especificación y en las reivindicaciones, debe entenderse que la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, significa al menos un elemento seleccionado de uno o más de los elementos en la lista de elementos, pero no necesariamente incluye al menos uno de todos y cada uno de los elementos enumerados específicamente dentro de la lista de elementos y no excluye ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos puedan estar presentes opcionalmente distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a los que se refiere la frase "al menos uno", ya sea relacionado o no relacionado con esos elementos específicamente identificados. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos uno de A o B", o, de manera equivalente, "al menos uno de A y/o B") se puede referir, en una modalidad, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, sin B presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra modalidad, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en aun otra modalidad, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A y que incluye al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B (y que incluye opcionalmente otros elementos); etc.

En las reivindicaciones, así como en la especificación anterior, todas las frases de transición tales como "que comprende", "que incluye", "que lleva", "que tiene", "que contiene", "que implica", "que sostiene" y similares deben entenderse como abiertos, es decir, que significan que incluyen, entre otros. Solo las frases de transición "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" serán frases de transición cerradas o semicerradas, respectivamente, como se establece en el Manual de Procedimientos de Examen de Patentes de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos, Sección 2111.03.

Cualquier término como se usa en la presente relacionado con la forma, orientación, alineación y/o relación geométrica de o entre, por ejemplo, uno o más artículos, estructuras, fuerzas, campos, flujos, direcciones/trayectorias y/o subcomponentes de los mismos y/o combinaciones de los mismos y/o cualquier otro elemento tangible o intangible no enumerado anteriormente susceptible de caracterización por dichos términos, a menos que se defina o indique lo contrario, se entenderá que no requiere conformidad absoluta con una definición matemática de este término, sino que, más bien, se entenderá que indica conformidad con la definición matemática de este término en la medida posible para el tema así caracterizado como lo entendería un experto en la técnica más estrechamente relacionado con este tema.

Los ejemplos de estos términos relacionados con la forma, la orientación y/o la relación geométrica incluyen, entre otros, términos descriptivos de: forma, tal como, redonda, cuadrada, gomboc, circular/circular, rectangular/rectángulo, triangular/triangulo, cilíndrica/cilíndrica, elíptica/elipse, (n) polígono poligonal/(n), etc.; orientación angular, tal como perpendicular, ortogonal, paralela, vertical, horizontal, colineal, etc.; contorno y/o trayectoria, tal como, plano/plano, coplanar, hemisférico, semihemisférico, lineal/lineal, hiperbólico, parabólico, plano, curvado, recto, arqueado, sinusoidal, tangente/tangencial, etc.; dirección, tal como, norte, sur, este, oeste, etc.; propiedades del material de la superficie y/o a granel y/o resolución y/o distribución espacial/temporal, tal como, liso, reflectante, transparente, transparente, opaco, rígido, impermeable, uniforme(ly), inerte, no humectable, insoluble, estable, invariante, constante, homogéneo, etc.; así como muchos otros que serían evidentes para los expertos en las técnicas relevantes. Como ejemplo, un artículo fabricado que se describiría en la presente como " cuadrado" no requeriría que este artículo tenga caras o lados que sean perfectamente planos o lineales y que se crucen en ángulos de exactamente 90 grados (de hecho, este artículo solo puede existir como una abstracción matemática), sino que la forma de este artículo debe interpretarse como aproximada a un "cuadrado", como se define matemáticamente, en una medida habitualmente alcanzable y lograda para la técnica de fabricación mencionada como lo entenderían los expertos en la técnica o como se describe específicamente. Como otro ejemplo, dos o más artículos fabricados que se describirían en la presente como " alineados" no requerirían que dichos artículos tengan caras o lados que estén perfectamente alineados (de hecho, este artículo solo puede existir como una abstracción matemática), sino más bien, la disposición de estos artículos debe interpretarse como una aproximación "alineada", como se define matemáticamente, en una medida habitualmente alcanzable y lograda para la técnica de fabricación mencionada como lo entenderían los expertos en la técnica o como se describe específicamente.