

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN
DE CHIPS DE TEJIDO ÓSEO ESPONJOSO DESMINERALIZADO EN
EL BANCO DE TEJIDOS DEL HOSPITAL LUIS VERNAZA**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGÍSTER EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

WINSTON EDUARDO JARAMILLO CAÑAS,

ASESOR:

FANNY LYS CASADO PEÑA

LIMA- PERU

Octubre 2020



A mi madre quien me ha
apoyado toda la vida.

A mi esposa y mis hijas quienes
alegran mis días e inspiran a dar lo mejor.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Fanny Casado PhD, quien con sus conocimientos y apoyo me guio a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba.

También quiero agradecer a la Junta de Beneficencia de Guayaquil por el financiamiento de la maestría., al Hospital Luis Vernaza por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación. No hubiese podido arribar a estos resultados de no haber sido por su incondicional ayuda. Especialmente al Ing. Jorge Tola Miranda y al Dr. Joseph McDermott por su confianza para el desarrollo de nuevos proyectos en bioingeniería

A la Dra. María Candela Ceballos por sus consejos y apoyo durante todo el desarrollo del proyecto, a mis compañeros del banco de tejidos del Hospital Luis Vernaza

Por último, quiero agradecer a todos mis compañeros, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo.

Muchas gracias a todos.

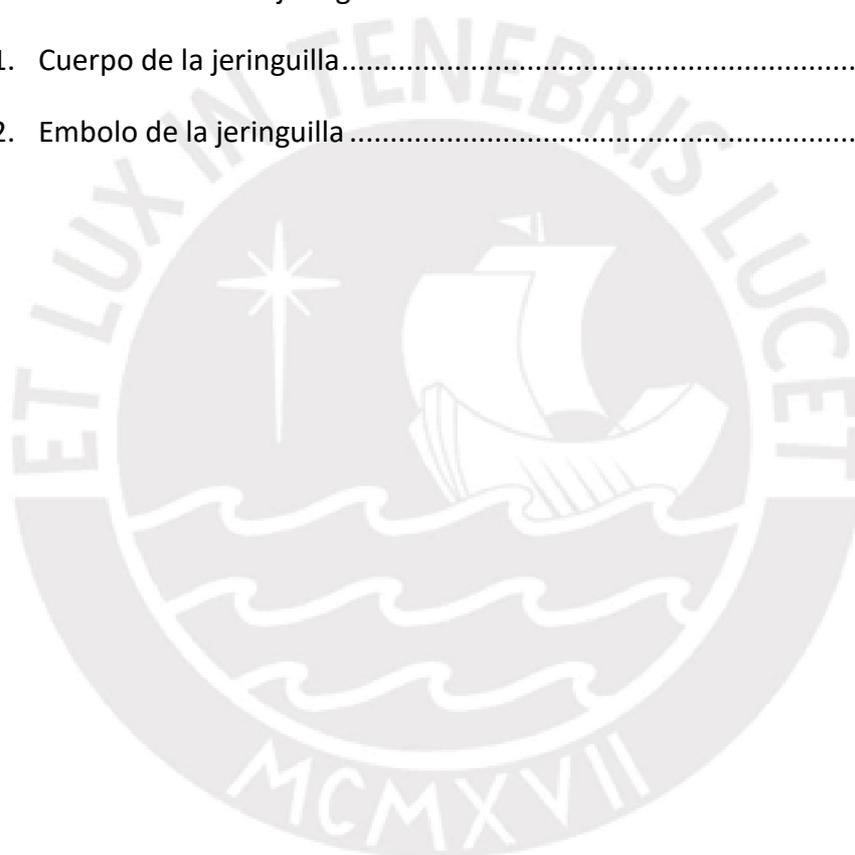


Índice de contenido

Resumen	11
1. Introducción	12
1. Aplicaciones clínicas del tejido óseo desmineralizado.....	13
1.1. Generalidades	13
1.2. El Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza.....	14
1.3. Substitutos óseos para aplicaciones clínicas	15
1.4. Definición y características de los injertos óseos.....	16
1.5. Tipos de injertos óseos	17
A. Hueso Autólogo	17
B. Hueso alogénico	17
2. Tecnologías para la obtención de tejido óseo desmineralizado.....	21
2.1. Manufactura de tejido óseo desmineralizado.....	21
2.2. Importancia del desengrase y extracción de células del tejido esponjoso o cortical	22
2.3. Proceso de desmineralización	24
3. Objetivos de la investigación.....	28
3.1. Objetivo General.....	28
3.2. Objetivos específicos	28
3.3. Hipótesis	28
4. Metodología	29
4.1. Tipo de investigación	29
4.2. Variables	29
A. Variables independientes	29
B. Variables dependientes	29
5. Materiales y Equipos	30

5.1.	Descripción de materia prima.....	30
5.1.1.	Selección de la fuente de hueso cadavérico	30
5.1.1.1.	Obtención del tejido óseo esponjoso.....	31
5.1.2.	Preparación de la solución de ácido clorhídrico para el proceso de desmineralizado	32
5.2.	Ingeniería del Proyecto	33
5.2.1.	Requerimientos tecnológicos	33
5.2.2.	Objetivos de diseño	35
5.2.3.	Descripción del micro-reactor de flujo.....	36
6.	Procedimiento	49
6.1.	Experimento Piloto	49
6.2.	Resultados del experimento piloto.....	50
6.3.	Diseño del experimento general.....	50
6.4.	Desarrollo del procedimiento	54
6.5.	Cuantificación del calcio residual.....	58
6.6.	Cuantificación de lípidos totales.....	58
6.7.	Evaluación histológica del producto final.....	59
7.	Resultados y discusión.....	61
7.1.	Validación de los modelos estadísticos	62
7.2.	Respuesta porcentaje de lípidos totales.....	63
7.3.	Optimización de factores para minimizar el % de lípidos totales.	67
7.4.	Respuesta porcentaje de calcio residual	69
7.5.	Optimización de factores para minimizar el % de calcio residual	72
8.	Conclusiones.....	78
9.	Recomendaciones.....	79
10.	Referencias bibliográficas.....	81

11.	Anexos	86
11.1.	Ficha técnica del Ácido clorhídrico usado en el trabajo	86
11.2.	Aprobación por el comité científico del Hospital Luis Vernaza	88
11.3.	Especificaciones técnicas del biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado	90
11.4.	Componentes utilizados para construcción del micro reactor de flujo.....	91
11.5.	Configuración de temperatura usada en micro reactor de flujo	92
11.6.	Características de la jeringuilla de 20 ml marca CEGAMED.....	94
11.6.1.	Cuerpo de la jeringuilla.....	94
11.6.2.	Embolo de la jeringuilla	94



Índice de figuras

Figura 1. Proceso de corte de pieza ósea para obtención de láminas.	32
Figura 2 Biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado con dispensador automático de fluidos.....	36
Figura 3. Cámara de reacción de flujo.....	37
Figura 4 Medidas de componentes de cámara de reacción de flujo.....	38
Figura 5 Vista explosionada de la cámara de reacción.....	39
Figura 6 Componentes de la bomba de jeringuilla.....	40
Figura 7 Vista explosionada de servoválvula de tres vías.....	41
Figura 8 Componentes del dispensador automático de fluidos.....	42
Figura 9 Vista explosionada de válvula múltiple; modificada del modelo Turbodostat.....	42
Figura 10 Diagrama de conexión de sensores y actuadores conectado al RAMPS.....	44
Figura 11 Validación de temperatura del reactor de flujo.....	45
Figura 12 Tiempo requerido para elevar la temperatura de un volumen.....	46
Figura 13 Interfaz de control del biorreactor de flujo unidireccional.....	47
Figura 14 Procedimiento realizado en el experimento piloto.....	49
Figura 15 Ejecución de experimentos en el biorreactor de flujo unidireccional.....	56
Figura 16 Evaluación histológica del tejido desmineralizado.....	60
Figura 17 Gráfica de la normalidad de residuos para las respuestas % de lípidos totales y % de calcio residual.....	62
Figura 18 Residuos versus valores ajustados.....	63
Figura 19 Residuos versus orden de experimentación.....	63
Figura 20 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del porcentaje de lípidos residuales.....	65
Figura 21 Superficie de respuesta para el porcentaje de lípidos totales.....	66
Figura 22. Rampas de solución óptima para factores y respuestas de porcentaje de lípidos totales.....	67

Figura 23. Gráfica de predicción de zona óptima de porcentaje de lípidos totales 68

Figura 24 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el porcentaje de calcio residual..... 71

Figura 25 Superficie de respuesta para el porcentaje de calcio residual..... 72

Figura 26. Rampas de solución óptima para factores y respuesta de calcio residual 73

Figura 27. Gráfica de predicción de zona óptima de porcentaje de calcio residual 74

Figura 28 Experimento de validación a 45 °C y 120 minutos 75



Índice de tablas

Tabla 1 Pruebas serológicas y moleculares realizadas en la evaluación de donantes de tejido.....	19
Tabla 2 Resumen de las propiedades de injertos óseos en relación con sus propiedades	21
Tabla 3 Materiales utilizados	31
Tabla 4 Insumos utilizados en el proceso.....	31
Tabla 5 Proceso de obtención y limpieza del tejido.....	33
Tabla 6 Comandos de control utilizados en la interface.....	48
Tabla 7 Etapas del experimento piloto.....	49
Tabla 8 Resumen de factores y sus niveles para la variable concentración de lípidos totales.....	53
Tabla 9 Combinación de factores a para evaluar respuesta a porcentaje de lípidos totales.....	54
Tabla 10 Resumen de factores y sus niveles para la variable concentración de calcio residual.....	54
Tabla 11 Combinación de factores a para evaluar respuesta a porcentaje de calcio residual.....	56
Tabla 12 Etapas el proceso experimental.....	57
Tabla 13 Cuantificación de volumen para obtener concentración deseada de Peróxido de hidrógeno en 20 mL.....	57
Tabla 14 Cuantificación de volumen para obtener concentración deseada de Alcohol Iso-propílico en 20 ml.....	58
Tabla 15 Respuesta obtenida en el experimento de porcentaje de lípidos totales.....	64
Tabla 16 ANOVA - Modelo cuadrático del porcentaje de lípidos totales.....	66
Tabla 17 Ajuste estadístico del modelo para el porcentaje de lípidos totales.....	67
Tabla 18 Resumen de requerimientos de optimización lípidos.....	68
Tabla 19 Soluciones propuestas por el modelo de optimización lípidos.....	68
Tabla 20 Resumen del proceso de optimización calcio.....	69
Tabla 21 Respuesta obtenida en el experimento de porcentaje de calcio residual.....	69
Tabla 22 ANOVA - Modelo cuadrático del porcentaje de calcio residual.....	70
Tabla 23 Ajuste estadístico del modelo para porcentaje de calcio residual.....	71
Tabla 24 Resumen de requerimientos de optimización calcio.....	73
Tabla 25 Soluciones propuestas por el modelo de optimización calcio.....	73
Tabla 26 Resumen del proceso de optimización calcio.....	74

Tabla 27 Especificaciones técnicas del biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado.....	90
Tabla 28 Componentes del biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado.....	91
Tabla 29 Consumibles del reactor de flujo.....	91



Resumen

El objetivo principal de este estudio fue diseñar un proceso para elaborar tejido óseo desmineralizado en forma de chip para el Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza (Guayaquil, Ecuador) con un porcentaje de calcio residual por debajo del 8%. La optimización de factores fue realizada usando la metodología de respuesta de superficie (RSM) mediante un diseño central compuesto (DCC) usando el software Design Expert 12.

Se evaluó la influencia de las concentraciones de peróxido de hidrógeno y alcohol iso-propílico en la reducción de lípidos. Una vez obtenido un producto con una cantidad de lípidos mínima (menor a 4 %) se procedió con la desmineralización sometiendo el tejido esponjoso con ácido clorhídrico al 0.5 N. Se evaluó la influencia de la temperatura y el tiempo en la desmineralización de tejido óseo. Se realizaron once corridas experimentales por grupo de factores a evaluar y tres corridas para evaluación de resultados de optimización. Las variables usadas en el estudio fueron la concentración de peróxido de hidrógeno entre 10 y 25 %, concentración de alcohol iso-propílico entre 50 y 90 %, temperatura en la que ocurre la reacción entre 25 y 60 °C y el tiempo que dura la reacción entre 30 y 120 minutos. Además, para lograr estudiar la reacción de desmineralizado de forma controlada y reproducible, se fabricó un reactor de flujo utilizando tecnología de prototipado rápido.

Los resultados de optimización en el reactor de flujo mostraron que la combinación de peróxido de hidrógeno 12% y alcohol iso-propílico 80% a una temperatura controlada de 45°C por un tiempo de 120 minutos logra un porcentaje de lípidos totales del 4 % y un producto con una concentración de calcio residual por debajo del 8%. Las condiciones establecidas pueden implementarse como un proceso de manufactura viable y eficiente para producir en mediana escala chips de matriz ósea desmineralizada proveniente de tejido óseo esponjoso para su uso como aloinjerto.

1. Introducción

El uso de tejido óseo desmineralizado como osteoinductor que promueve una recuperación en fracturas ha sido descrito en los años 60 por el Dr. Marshall Urist[1,2]. La técnica de desmineralizado óseo ha sido implementada desde los años 80 por los bancos de tejidos[3]. El principio es relativamente simple, se usa como materia prima el hueso cortical y esponjoso molido en la forma de polvo (menos de 1000 micrones) y es mezclado con ácido clorhídrico al 0.5N. Con esta técnica se logra remover las sales de calcio exponiendo las proteínas morfogénicas óseas, las cuales tienen el potencial osteoinductor. Para su correcta colocación, este polvo de hueso desmineralizado debe integrarse tales como glicerina, colágeno bovino e hidrogeles. Con la finalidad de mantener una forma estable y se fácilmente manipulable al momento de integrarlo en defectos óseos.

Para evitar el uso de aglutinantes, es preferible desmineralizar tejido esponjoso mientras se conserva su forma trabecular (chips o cubos de hueso esponjoso). La desventaja de este método reside en su limitada interacción física entre el ácido clorhídrico y el interior de las trabéculas, debido a la formación de dióxido de carbono (CO₂) gaseoso producto de la reacción, originando una desmineralización incompleta del tejido óseo. Al ser un producto de carácter comercial no se dispone de mucha información libre para transferencia tecnológica, por lo cual cada banco de tejidos debe elaborar su propio protocolo y validarlo. El presente trabajo tiene como finalidad implementar una nueva tecnología en el procesamiento de matriz ósea desmineralizada cuya finalidad es elaborar chips de tejido óseo esponjoso desmineralizado, el cual por su forma trabeculada permite una adecuada migración de células facilitando la regeneración.

1. Aplicaciones clínicas del tejido óseo desmineralizado

1.1. Generalidades

Cuando se requiere corregir defectos óseos de gran tamaño como en las cirugías de traumatología, maxilofacial y neurocirugía, uno de los mayores retos es obtener una adecuada cicatrización y consolidación del tejido óseo. Actualmente, se utiliza tejido óseo proveniente del propio paciente, conocido como autoinjerto que se obtiene de la cresta iliaca. El autoinjerto tiene una buena aceptación gracias a las propiedades de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción [4], las cual favorecen la recuperación rápida gracias al proceso de remodelación ósea. Sin embargo, el riesgo de complicaciones e infecciones se incrementa en los casos en que se requiere realizar un segundo acto quirúrgico por lo que hay un límite a la cantidad de autoinjerto que se pueda recuperar del propio paciente. En esos casos, una alternativa viable es procurar tejido óseo proveniente de un donante cadavérico que también se conoce como aloinjerto.

Los bancos de tejidos son unidades hospitalarias encargadas de obtener tejido de donantes, procesarlo y preservarlo asegurando que esté libre de patógenos transmisibles para su entrega a las diversas especialidades quirúrgicas que lo soliciten. Un banco de tejidos se encarga de transformar el tejido óseo donado en productos estandarizados como, por ejemplo: chips o astillas de tejido óseo esponjoso de 30 centímetros cúbicos (C.C.), tejas de hueso cortical, cuñas de hueso tri-cortical, entre otros.

La matriz ósea desmineralizada (MOD) es un producto obtenido por la descalcificación ácida del hueso que remueve elementos celulares y las sales minerales dejando una matriz de colágeno para exponer a las proteínas morfogénicas ósea (BMP). Las BMP son un subtipo de la familia del factor de crecimiento tisular $-\beta$ [5] y son las únicas citoquinas que han demostrado la capacidad de inducir la formación de nuevo hueso in vivo[6] mediante la

diferenciación de las células progenitoras primitivas del huésped a condroblastos y osteoblastos, capaces de formar nuevo hueso en el huésped [7].

Existen múltiples formas de presentación comercial de MOD [4] como esponjas, tablas, plastilina inyectable, pasta, fibras, chips con pasta y molido de cortical, e incluso se pueden encontrar presentaciones que incluyen suplementos tales como sales de calcio o factores de crecimiento [8]. Actualmente en el mercado nacional, sólo se obtiene MOD importada de otros países en sus diferentes presentaciones [9] debido a que en Ecuador no es manufacturada. Principalmente, se utiliza en forma de polvo por lo que se requiere el uso de un material viscoelástico como aglutinante que brinda una consistencia plástica. Mediante esta estrategia, se facilita su aplicación en sitios con mala unión ósea y se evita la disgregación del material.

Al ser un producto comercial, cada banco de tejidos suele implementar sus propios procedimientos de cómo obtener MOD acorde con la infraestructura, capacidades de los recursos humanos y disponibilidad de la materia prima. En la región latinoamericana, se suele emplear como principios rectores a los estándares de la American Association of Tissue Bank [10] (AATB, por sus siglas en inglés).

1.2. El Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza

El Hospital Luis Vernaza de la Junta de Beneficencia de Guayaquil es un hospital de adultos que brinda atención a todos los ciudadanos de la región costa del país. Fundado en 1564, ha sido parte de la historia de la ciudad. El tiempo de existencia del Hospital ha permitido evolucionar su cartera de servicios en función de la población y la nueva tecnología. Gracias a esa filosofía, el hospital desde el año 2009 implemento su primer programa de trasplante órganos. Llevando a la ejecución de toda la actividad relacionada al trasplante, en especial la procuración de donantes. Gracias a esta actividad ha permitido aprovechar no solo los órganos de los donantes, sino el uso de sus tejidos para fines de trasplante.

El Banco de Tejidos forma parte de la Unidad de Trasplantes e inició sus actividades en el año 2012 acreditado por el INDOT; contando con el apoyo del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), gracias a la aprobación de un proyecto por el cual se recibieron cursos de capacitación del personal, asesoría de expertos, becas y equipos; conforme un plan de actividades que se cumplió durante el ciclo de asistencia técnica en los años 2012-2013. Es un banco multi-tejidos, que obtiene, procesa, almacena y distribuye tejidos laminares (piel y membrana amniótica), osteomusculares (huesos, tendones, meniscos, fascias), cardiovasculares (arterias, venas, válvulas cardíacas, pericardio) y oculares (córneas y esclera). El Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza elabora injertos óseos provenientes de donantes cadavéricos desde el 2014, por lo que cuenta con una provisión en almacén de una amplia gama de aloinjertos que pueden ser utilizados en cirugía reconstructiva ósea tanto en el hospital como en otros establecimientos de salud [11]. Sin embargo, no cuenta con una provisión de MOD a pesar de la potencial alta demanda. El presente trabajo busca optimizar y elaborar un protocolo propio y validado de fabricación que incluya controles de calidad de producto intermedio para la elaboración de chips de MOD en las presentaciones solicitadas y bajo las condiciones de manufactura del Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza.

1.3. Substitutos óseos para aplicaciones clínicas

En cirugía reconstructiva (traumatológica, neurocirugía y cirugía maxilofacial) uno de los principales retos es la restitución de la anatomía ósea de un paciente, varios son los factores que logran alterar la estructura ósea como el caso de tumores óseos o que desarrollan metástasis a huesos, eventos traumáticos como las fracturas en los cuales se altera la estructura anatómica ósea. Para lograrlo recurren a técnicas quirúrgicas [5] cuyo objetivo es de restituir la anatomía normal del hueso afecto, esto se logra mediante el uso de material de osteosíntesis que logran fijar los segmentos dispersos del hueso en su posición correcta permitiendo su recuperación gracias al proceso de regeneración ósea. Pero, durante el proceso de reconstrucción ósea, hay pérdida de masa de tejido óseo que dificulta restituir su anatomía normal

[6], ante lo cual se hace necesario establecer estrategias para lograr llenar esos espacios durante la reconstrucción. Actualmente, se utilizan los injertos óseos proveniente del paciente o de donantes cadavéricos, substitutos basados en sales cálcicas, cerámicas, materiales compuestos y tejido óseo proveniente de una fuente animal [9]. Para el presente trabajo nos enfocaremos en los injertos óseos de origen humano.

1.4. Definición y características de los injertos óseos

El injerto óseo es el segundo tejido más frecuente trasplantado a nivel mundial, seguido de la transfusión de sangre [12,13]. Esto es debido a su facilidad de uso y manejo, perfiles de seguridad mejorados, menor costo intraoperatorio y ventajas de tiempo, así como su mayor flexibilidad para adaptarse a las necesidades de una variedad de desafíos clínicos.

La manufactura de injertos de origen humano debe mantener al menos tres propiedades inherentes al injerto que son: osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción que se describen a continuación:

-*Osteogénesis*: el injerto tiene células capacidad de estimular la reparación ósea gracias a la presencia de células mesenquimales y células osteoprogenitoras, Normalmente se encuentra únicamente en los autoinjertos [10].

-*Osteoconducción*: es la capacidad del injerto para proveer un andamio poroso facilitando la adherencia de nuevos osteoblastos y células osteoprogenitoras facilitando su proliferación y depósito de matriz ósea permitiendo regenerar el hueso [13].

-*Osteoinducción*: el injerto puede inducir la migración de células estromales o células precursoras al sitio del defecto permitiendo su proliferación y diferenciación en osteoblastos o precursores de osteoblastos facilitando la regeneración del tejido[7].

La incorporación de un injerto óseo se define como "El proceso de envoltura e interdigitación del hueso donante con el depósito de nuevo hueso del receptor". [14]. Este proceso sigue una cascada típica de varios pasos que se inicia cuando el injerto óseo produce una respuesta que conduce a la acumulación de células inflamatorias, seguida de la quimiotaxis de las células mesenquimales del huésped hacia el sitio del injerto. A partir de entonces, las células progenitoras primitivas del huésped se diferencian en condroblastos y osteoblastos, mediante un proceso bajo la influencia de diversos factores osteoinductivos. Los procesos adicionales de revascularización del injerto óseo y la reabsorción del injerto necrótico ocurren concurrentemente. Finalmente, la producción de hueso por los osteoblastos en el marco tridimensional del injerto ocurre seguida por la remodelación ósea en respuesta al estrés mecánico [13].

1.5. Tipos de injertos óseos

A. Hueso Autólogo

Es el primer tipo de injerto utilizado en la cirugía reconstructiva. Se considera un "Gold standard" debido a su fácil obtención, y la preservación de sus propiedades osteoinductivas, osteoconductoras y osteogénicas [15]. Permite lograr una adecuada recuperación en el sitio a tratar, sin embargo, su uso está limitado por la dificultad de obtener grandes cantidades del injerto de manera segura para el paciente. Se obtiene el injerto a partir de huesos no esenciales como la cresta iliaca, peroné, costillas, o tablas de hueso cortical de calota de cráneo. Sin embargo, su uso está asociado a estados de morbilidad como dolor crónico, infecciones, fracturas iatrogénicas y alteraciones cosméticas en el sitio de la lesión [7,9].

B. Hueso alogénico

Conocido también como aloinjerto óseo, se obtiene de donantes cadavéricos de tejido óseo. El aloinjerto de hueso, en su forma final, es esencialmente un almacén de colágeno con hidroxiapatita depositada por encima. Este material sirve de andamiaje para el crecimiento del hueso nuevo después de la implantación [16].

Es procesado en bancos de tejidos, donde los huesos sufren una transformación para lograr múltiples presentaciones siguiendo condiciones de asepsia y antisepsia cumpliendo con normas y estándares de calidad como los del Reino Unido [17]. Los bancos de tejidos siguen el método de procesamiento de tejido óseo basado en el descrito por el Profesor Frank Dexter, del Banco de Tejidos Regional de Yorkshire, que ha sido ampliamente difundido en la Región Asia-Pacífico.

En el caso del Ecuador, el tejido proviene de donantes cadavéricos, que previo a su muerte manifestaron la voluntad de ser donantes de órganos y tejidos. Los donantes son evaluados clínicamente en busca de enfermedades y condiciones preexistentes que contraindiquen la donación de tejidos. En el caso del banco de tejidos del Hospital Luis Vernaza se utiliza el manual de instrucciones que incorpora las recomendaciones internacionales respecto a la procuración de donantes[11].

Tabla 1

Pruebas serológicas y moleculares realizadas en la evaluación de donantes de tejido

Pruebas serológicas	Pruebas moleculares
HIV I y II	NAT-HIV
HTLV I y II	NAT-HCV
Citomegalovirus IgM e IgG	NAT-HBV
Toxoplasmosis IgM e IgG	
VDRL	
Epstein Barr IgM e IgG	
Herpes I y II IgM e IgG	
AG.Hbs	
AC.antiHbc	
AC.antiHbs	
HCV	
Chagas	

En la tabla 1 se describen las pruebas serológicas realizadas a los donantes de tejidos, además en la evaluación se incluyen pruebas moleculares realizadas por amplificación de ácidos nucleicos (NAT, por sus siglas en inglés) del HIV y de los virus causantes de Hepatitis B y C para identificar su presencia en etapas tempranas

de infección, y así poder evitar el periodo de ventana que se genera en las otras pruebas que generan resultados falsos negativos [10,11]. Todas estas medidas de seguridad se implementan para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas al receptor.

El aloinjerto se puede obtener en varias presentaciones tales como chips de hueso esponjoso o como aloinjertos corticales estructurales, que pueden ser vascularizados o no vascularizado. La incorporación depende de las características del huésped y características del injerto [16]. Las propiedades del aloinjerto están influenciadas por la forma de preparación y esterilización del material. El aloinjerto puede conservarse en fresco, crio preservado, liofilizado o desmineralizado. La esterilización puede ser mediante antibióticos, óxido de etileno o por radiación [3].

La matriz ósea desmineralizada (MOD) es un aloinjerto óseo cortical o esponjoso que es procesado para remover células, lípidos, tejido conectivo y componentes minerales a través de los procesos de lavado con antibióticos, descalcificación ácida, pulverización, liofilización y radio esterilización con la finalidad de ser usada como material de relleno solo o combinado con otros factores como proteínas estimulantes o células viables. La MOD no tiene respuesta inmune, debido a que la estructura de los antígenos de superficie del tejido óseo es destruida durante la desmineralización ácida [18]. La MOD es un compuesto heterogéneo cuyo contenido puede variar dependiendo del proceso de fabricación, pero en general contiene proteínas de colágeno tipo I con algunos tipos IV y X, proteínas no relacionadas al colágeno, factores de crecimiento, fosfato de calcio mineral que varía en composición entre el 1 al 6% y detritus celulares.

En la Tabla 2, se presenta un resumen de cómo las diferentes propiedades son favorecidas en los diferentes tipos de tejido óseo que se emplean en la práctica clínica.

Tabla 2*Resumen de las propiedades de injertos óseos en relación con sus propiedades.*

Tipo de tejido	Propiedades del tejido		
	Osteogénesis	Osteoconducción	Osteoinducción
Autoinjerto	+++	+++	++
Aloinjerto esponjoso	-	++	+
Matriz ósea desmineralizada	-	+	++

Se recopiló información de los trabajos de Zhang M. et al [19], Vukičević S et al [20] y Maye T. et al [10].

El primero en realizar estudios de las propiedades de la MOD fue el Dr. Marshall R. Urist en 1965 [1,2], cuando identificó la capacidad osteoinductora del hueso desmineralizado, luego de insertar MOD a nivel de tejido muscular en modelos animales observando la formación de tejido conectivo, neovascularización y núcleos de calcificación en los animales de experimentación. El estudio de Urist, fue el precursor para el descubrimiento de las proteínas morfogénicas ósea, las cuales son un subtipo de la familia del factor de crecimiento tisular $-\beta$ [20] y son las únicas citoquinas que han demostrado la capacidad de inducir la formación de nuevo hueso in vivo [12].

En función del tamaño específico del diámetro del gránulo de hueso esponjoso, se presentan varios productos de MOD. Actualmente, la presentación de los productos óseos se clasifica según el tamaño en micrones (1 micrón = 0.001 mm). Cuando el diámetro se encuentra entre 80 y 1000 micrones se define como polvo, chip cuando mide entre 1000 - 3000 micrones, y bloque si es mayor de 3000 micrones. Esta clasificación es bastante útil dado que la aplicación clínica está en función del tamaño del diámetro promedio del gránulo [21].

2. Tecnologías para la obtención de tejido óseo desmineralizado

En la revisión del estado del arte se usaron bases de datos académicas como: Pubmed (1 846 resultados), Science Direct (4 870 resultados) y Google Scholar (37000 resultados). La búsqueda se realizó utilizando los términos en inglés: "*Demineralized bone*" y "*Graft*". Se evaluaron estas palabras claves debido a que en los motores de búsqueda el término hueso desmineralizado (*demineralized bone*, en inglés) hace referencia a estudios de uso del producto y comparativas terapéuticas, sin referencia a su manufactura. Luego, se buscaron trabajos de investigación y manuales técnicos que hagan énfasis en la manufactura. Además, se consideraron artículos relacionados a etapas claves del proceso unificando criterios técnicos con la finalidad de construir un nuevo proceso de manufactura, el cual es el objetivo del presente trabajo.

Las etapas claves relacionadas con el proceso de manufactura del tejido esponjoso desmineralizado se pueden resumir de la siguiente manera:

- Limpieza y desengrasado del tejido
- Etapa de desmineralizado y sus variables
- Esterilización y preservación

2.1. Manufactura de tejido óseo desmineralizado

Actualmente la información encontrada sobre tejido desmineralizado primariamente hace referencia al uso del tejido óseo desmineralizado como producto comercial y sus efectos en pacientes, comparaciones o usado como andamio biológico para cultivo celular. Muy pocos artículos científicos detallan sobre el proceso de manufactura del tejido óseo desmineralizado por lo que se evaluó en el repositorio de patentes de Google, el cual mostro varios resultados relacionados con "manufactura de matriz ósea desmineralizada". La información

encontrada hacía referencia a varias formas de elaboración usando diversos tipos de tejido óseo como la fibra de hueso cortical o el hueso tricortical maquinado desmineralizado. Se utilizó como referencia del proceso aquellas patentes que expliquen sobre el mecanismo que utilizaban para desmineralizar el tejido óseo esponjoso que fueran técnicamente viable y replicables.

La matriz ósea se produce cuando al aloinjerto se somete a un baño con ácido clorhídrico al 0,5 N, luego de un proceso de lavado y desengrasado, obteniéndose un tejido desprovisto de células y matriz cálcica [3,4]. La MOD está formada de colágeno y proteínas, de las cuales son de interés las proteínas morfogénicas óseas.

2.2. Importancia del desengrase y extracción de células del tejido esponjoso o cortical

El uso de aloinjertos presenta un riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, por lo cual se requiere que se lleven a cabo, de manera particularmente cuidadosa, acciones adecuadas para disminuir el riesgo de propagación de infecciones, por ejemplo, eliminar las células en donde se alojan virus y otros patógenos.

En el caso de aloinjertos óseos, el procedimiento más importante consiste en el desengrase y extracción de células, en particular de células de la sangre y de la médula ósea del tejido esponjoso o cortical. Simultáneamente, esta medida aumenta el valor biológico mejorando las propiedades osteoconductoras del injerto al no tener componentes lipídicos que eviten la migración de las células precursoras y osteoblastos del huésped. Esta etapa de trabajo debe realizarse luego de la limpieza mecánica y del corte, pero antes de la esterilización [22].

Usualmente se utilizan varios métodos para el desengrase del tejido, desde el uso de solventes (cloroformo, metanol y etanol) y aplicación de solución salina caliente.

El uso de solventes orgánicos como cloroformo o metanol para el desengrasado, en el banco de tejidos del Hospital Luis Vernaza, no se aplica debido a que presenta un riesgo a la salud del personal y el ambiente, referido por el departamento de salud de Estados Unidos en su perfil toxicológico sobre el uso de cloroformo[23].

El uso de una serie de lavados con agua tibia (56 – 59 °C) acompañados de centrifugación (1850G) y adicionando peróxido de hidrógeno al 3% con etanol al 70%, permite obtener los mismos resultados manteniendo las propiedades osteoinductoras y osteoconductiva del tejido óseo evitando el uso de solventes orgánicos [24]. Se ha reportado un método más amigable con el medio ambiente y costo-efectivo que es el desengrasado con solución salina caliente. Este método implica colocar el aloinjerto en máquinas de lavar donde se programa una serie de ciclos oscilantes en un rango de 30°C a 50°C y que duran un tiempo entre 60 y 120 minutos. Durante el procesamiento del aloinjerto óseo la temperatura de lavado debe mantenerse debajo de 70°C, debido a que por encima de ese valor se desnaturalizan las proteínas, de manera particular, la proteína morfogénica ósea de tipo 2 [18,25].

El uso de agua caliente y ultrasonido combinado con peróxido de hidrógeno y bicarbonato de sodio disminuye la cantidad de restos y lípidos en el tejido esponjoso [26]. El peróxido de hidrogeno es una molécula inestable que reacciona con la materia orgánica causando disociación de la molécula H_2O_2 con la liberación de radicales libres interactuando con la materia orgánica en una reacción de óxido-reducción hasta finalmente producir H_2O [27]. Específicamente, el lavado de hueso esponjoso en combinación con ultrasonido, agua tibia (56-59°C), centrifugado (1850G) y tratamientos químicos (etanol 70% y peróxido de hidrogeno 3%) es capaz de remover el 99% de proteína soluble y ADN sin alterar las cualidades el tejido [28]. La incorporación de peróxido de hidrogeno al 3% en una proporción de 14 mL por

gramo de tejido a 35°C por 1 hora y el uso de alcohol desnaturalizado al 70% mejora la limpieza del tejido y no altera las propiedades mecánicas ni osteoinductoras el hueso [20]. El uso de agua caliente entre 30 a 50°C por un a dos horas o un solvente como cloroformo/etanol (2:1) por dos horas mejora el proceso de desengrase de tejidos, y el proceso de desmineralizado para la forma de polvo se realiza con una proporción de 250 mL/5g de hueso por 90 minutos [1,3].

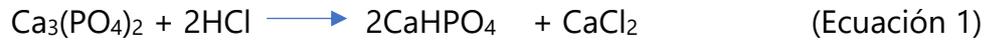
Finalmente, se sabe que el lavado de pulso con un volumen de 0,8 litros de agua estéril a 0,14 MPa de presión, a temperatura ambiente es un método eficiente para remover lípidos del tejido óseo morselizado. El método es comparable con un lavado de con 12 litros de agua a 55°C [29].

2.3. Proceso de desmineralización

El objetivo en la desmineralización de matriz ósea es remover la mayor cantidad del mineral calcio, sin sobre-exponer la matriz desmineralizada al efecto del ácido clorhídrico. El monitoreo continuo del calcio residual es un indicador del grado de desmineralización adecuado. El cual indica el tiempo y condiciones a modificar en el proceso [13]. Wolfenbarger et al [19], encontraron que un calcio residual de un 2% provee una excelente osteoconductividad gracias a que la presencia del calcio provee un núcleo para la mineralización del nuevo hueso. La Asociación Americana de Bancos de Tejidos en sus estándares para banco de tejidos, refiere en la sección ***E2.612 Calcio residual: Hueso desmineralizado*** establece que para su clasificación como desmineralizado no debe exceder un valor del 8% de calcio residual [10]. Además, se sabe que el uso de agitación magnética aumenta el flujo de ácido hacia las estructuras más internas y acelera el proceso de desmineralización [30].

Durante el proceso de la desmineralización, el ácido clorhídrico reacciona con el fosfato de calcio en el hueso, produciendo fosfato di-cálcico y cloruro de calcio

(Ecuación 1). Además, el ácido clorhídrico reacciona con el carbonato de calcio y produce dióxido de carbono (Ecuación 2).



El tejido óseo descalcificado estimula al tejido conectivo para la formación y diferenciación de células osteoprogenitoras acelerando el proceso de recuperación en fractura. La desmineralización del tejido óseo tiene una relación entre la concentración de ácido y la temperatura, lo que afecta el tiempo total del proceso [31]. Este tejido desmineralizado se obtiene mediante la incorporación de tejido óseo de una solución ácido débil de HCl al 0,6 N por 5 días [1]. El ácido per-acético es una alternativa al uso de ácido clorhídrico para la desmineralización de tejido óseo [32]. Durante el proceso de desmineralizado, el HCl reacciona con las sales de fosfato de calcio y con el carbonato de calcio el cual produce CO_2 y H_2O . El problema se presenta al momento de trabajar con hueso esponjoso, la forma de la trabécula retiene a las burbujas de CO_2 y estas actúan como tapón impidiendo el contacto de HCl con la superficie del hueso. Logrando una desmineralización ineficiente. Por tal motivo, el autor implementó el uso de vacío a 270 mbar, logrando una extracción continua del gas que se forma durante el proceso. Obteniendo una desmineralización uniforme en el hueso trabécula. Llegando a obtener cubos de hueso esponjoso de 1 cm^3 hasta 8 cm^3 [33]. El ácido per-acético es una alternativa al uso de ácido clorhídrico para la desmineralización de tejido óseo [32].

Alternativamente, el uso de un lavado múltiple con agua destilada a 56 a 59 °C posterior a centrifugado mejora la etapa de desengrase y prepara el material para la aplicación de vacío en el proceso de desmineralizado lo cual se ha reportado que disminuye el tiempo del proceso [22]. También, se desarrolló un lavado con agua

destilada seguido de una inmersión en etanol al 70 %, y luego en peróxido de hidrógeno al 30% por 48 horas. El tejido fue preservado temporalmente en una solución de formaldehído al 4 %. Se colocó en un horno al vacío a 40°C y se desmineralizó en una concentración de ácido de 0,6 M, 1,2 M y 2,4 M en una proporción de 21 cm³ por 1 g de tejido. Se concluyó que independientemente de la concentración de ácido, la estructura microscópica básica se mantiene [34].

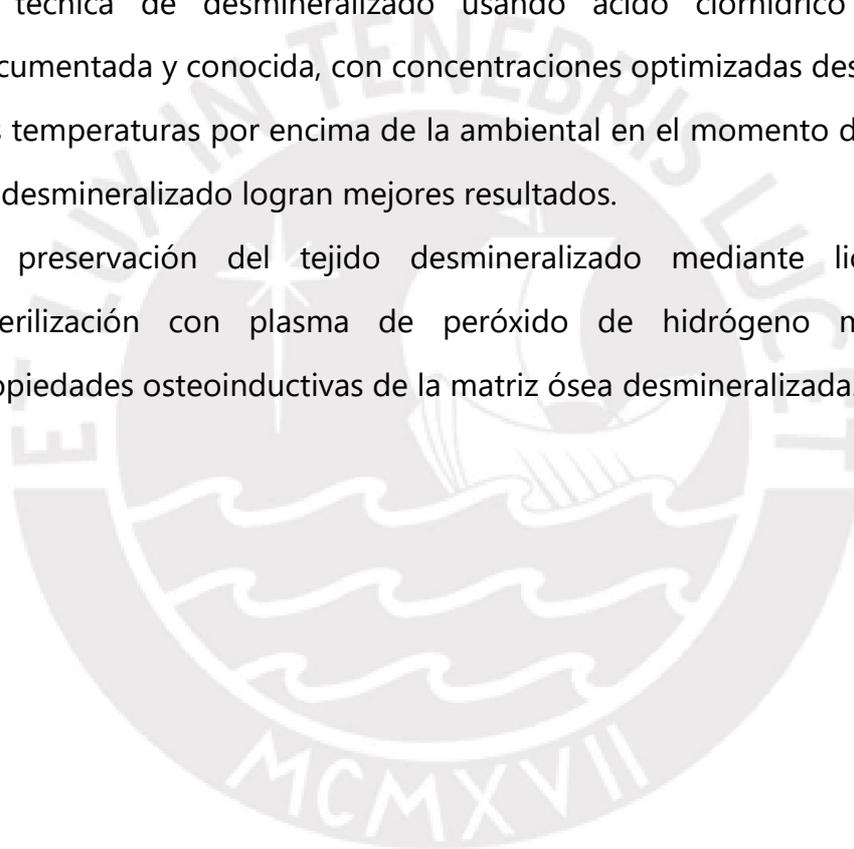
También, se desarrolló un lavado con agua destilada seguido de una inmersión en etanol al 70 %, y luego en peróxido de hidrógeno al 30% por 48 horas. El tejido fue preservado temporalmente en una solución de formaldehído al 4 %. Se colocó en un horno al vacío a 40°C y se desmineralizó en una concentración de ácido de 0,6 M, 1,2 M y 2,4 M en una proporción de 21 cm³ por 1 g de tejido. Se concluyó que independientemente de la concentración de ácido, la estructura microscópica básica se mantiene[34].

Finalmente, cuando se evaluó el mejor método para desinfección y esterilización de tejido óseo mediante la proliferación y adherencia de osteoblastos cultivados, se demostró que hubo gran afinidad de adherencia de osteoblastos para el tejido óseo tratado mediante liofilización y plasma a baja temperatura, uso de solventes químicos y termo desinfección [35].

La revisión del estado de la técnica para la manufactura de tejido óseo desmineralizado para aplicaciones clínicas permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- La información disponible sobre el proceso de elaboración de tejido esponjoso desmineralizado no es muy popularmente divulgada y cuando se reporta normalmente se describe la manufactura de la presentación en polvo.
- Es necesario un lavado eficiente que logre retirar restos hemáticos y lípidos para lograr un desmineralizado prolijo y eficiente.

- La temperatura de lavado entre 40 y 56 °C aumenta la disolución de lípidos facilitando su remoción.
- Se tienen excelentes resultados en el desengrasado del hueso usando solventes como peróxido de hidrogeno en concentraciones de 3 al 30 %, etanol 70% y alcohol isopropílico, en lugar de utilizar cloroformo y metanol los cuales presentan inconvenientes para la salud y el ambiente.
- La aplicación del lavado de pulso en la limpieza de tejido ayuda a la remoción de lípidos y restos, con una menor cantidad de uso de volumen de agua.
- La técnica de desmineralizado usando ácido clorhídrico es la más documentada y conocida, con concentraciones optimizadas desde 0,5 N.
- Las temperaturas por encima de la ambiental en el momento de la reacción de desmineralizado logran mejores resultados.
- La preservación del tejido desmineralizado mediante liofilización y esterilización con plasma de peróxido de hidrógeno mantiene las propiedades osteoinductivas de la matriz ósea desmineralizada.



3. Objetivos de la investigación

3.1. Objetivo General

Implementar un proceso de manufactura viable y eficiente que permita producir en mediana escala chips de matriz ósea desmineralizada proveniente de tejido óseo esponjoso de donantes cadavéricos del Banco de tejidos del Hospital Luis Vernaza.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar las etapas y factores relevantes en la producción de chips de tejido esponjoso desmineralizado con un porcentaje de calcio residual menor al 8%.
- Elaborar un flujo de proceso reproducible para elaboración de tejido desmineralizado óseo.
- Desarrollar la tecnología necesaria para un proceso automatizado altamente eficiente.
- Optimizar el proceso para la remoción de lípidos y restos hemáticos del tejido óseo.
- Aplicar la metodología de superficie de respuesta para identificar la mejor configuración de los factores a evaluar.

3.3. Hipótesis

Si se identifican los factores adecuados que tienen influencia en la manufactura, es posible optimizar el proceso de la elaboración en mediana escala de chips de tejido esponjoso desmineralizado mediante un protocolo estandarizado que cumpla con las recomendaciones de la AATB [10] en el Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza.

4. Metodología

4.1. Tipo de investigación

El tipo de investigación es el exploratorio, descriptivo y experimental, al no encontrarse en la literatura información concreta para la elaboración de chips de hueso esponjoso desmineralizado, se basa en trabajos previos de técnicas de desmineralizado de tejido óseo, los cuales se encuentran validados y considerados para transferencia tecnológica.

4.2. Variables

A. Variables independientes

- Tiempo de desmineralizado
- Temperatura de desmineralizado
- Concentración de peróxido de hidrógeno
- Concentración de alcohol iso-propílico

B. Variables dependientes

- Porcentaje de lípidos totales
- Porcentaje de calcio residual

5. Materiales y Equipos

En la tabla 3 y 4 se detallan los equipos e insumos utilizados en el proceso, y en el anexo “11.4. Componentes utilizados para construcción del micro reactor de flujo” se describen los elementos necesarios para la fabricación del micro reactor de flujo, necesario para el desarrollo del proyecto.

Tabla 3

Materiales utilizados

Equipo	Marca	Modelo
• Cabina de flujo laminar tipo A2	Baker	SG603A-HE-INT
• Ultrasonido	Labmed	N/A
• Agitador magnético	Labmed	N/A
• Balanza analítica	Radwag AS 220/C2	220
• Centrífuga refrigerada	SIGMA	3-16PK
• Liofilizador	SFK- SYSTEMTECLINIK	OT2-BASIC
• Bomba de vacío	Vacuum	
• Sierra oscilante	Stryker	GPL 650
• Biorreactor de flujo unidireccional con calefactor y sistema automático dispensador de reactivos.	Desarrollado por el autor	versión 10

Tabla 4

Insumos utilizados en el proceso

Ítem	Marca
• Ácido clorhídrico al 36%	J.T. Barker
• Peróxido de Hidrogeno al 30 %	Fisher Scientific
• Alcohol iso-propílico 100%	Fisher Scientific
• Solución salina 0,9%	Baxter
• Solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) pH 7,2	Gibco

5.1. Descripción de materia prima

5.1.1. Selección de la fuente de hueso cadavérico

Se utilizaron chips de tejido esponjoso obtenido de cóndilos femorales, procedentes de donantes cadavéricos del Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza. Estos chips

cumplieron todo el proceso normativo y legal previo a la procuración de tejidos, normativa provista por el Instituto Nacional de Donación de Órganos, Tejidos y Células (INDOT). Para este estudio, se realizó el análisis de la base de datos de donantes y productos distribuidos en el Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza en el periodo 2012 -2018. En el anexo 11.2 se encuentra la autorización por parte del comité científico del Hospital Luis Vernaza, para el desarrollo del trabajo.

Se seleccionaron piezas de donantes femeninas con un rango de edad entre 31 y 40 años y donantes masculinos con un rango de edad entre 41 a 50 años debido a que el tejido de este grupo etario posee mayores propiedades osteoinductoras según el estudio de Zhang et al [19]. El tejido óseo fue obtenido de los donantes cadavéricos siguiendo el protocolo de extracción y recuperación de tejidos, elaborado por el Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza[11]. Con la finalidad de ahorrar el uso de un producto de alto valor y lograr la reproducibilidad en este estudio, en lugar de extraer el tejido en gránulos se cortaron láminas de 15 x 20 x 5 mm de hueso esponjoso que se usaron como las unidades mínimas de ensayo.

5.1.1.1. Obtención del tejido óseo esponjoso

Se ejecutó un protocolo modificado para elaboración de chips de tejido esponjoso siguiendo las indicaciones del Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza el cual se describe a continuación.

Las piezas se encuentran almacenadas en -80°C , por lo cual para su utilización se colocaron en un refrigerador a una temperatura de -4 a 8°C para su descongelado por un lapso de 12 horas. Una vez preparada la cabina de seguridad biológica se procedió a cortar los cóndilos con una sierra oscilante (Stryker GPL 650), cortando en sentido axial con un grosor de 1 cm; obteniéndose láminas de tejido cortical esponjoso de 15 x 20 x 5 mm (figura 1). Se procedió con la limpieza del tejido siguiendo la secuencia detallada en la Tabla 5:

Tabla 5

Proceso de obtención y limpieza del tejido

	Paso	Tiempo
1	Lavado y agitación con suero fisiológico a 40 °C	5 min
2	Escurredo	3 min
3	Lavado y agitación con suero fisiológico a 40 °C	5 min
4	Escurredo	3 min
5	Lavado y agitación con suero fisiológico a 40 °C	5 min
6	Centrifugado 1800 RPM	10 min
7	Empaque	

Se omitieron el lavado con peróxido de hidrógeno y la desinfección con antibiótico debido a que son procesos finales, y pueden alterar los ensayos de interés para el presente trabajo. El tejido fue almacenado en el área de cuarentena a -20°C hasta su uso.



Figura 1. Proceso de corte de pieza ósea para obtención de láminas.

5.1.2. Preparación de la solución de ácido clorhídrico para el proceso de desmineralizado

Para el proceso de desmineralización de las muestras se utilizó ácido clorhídrico marca J.T. Barker (Anexo 11.1) y se procedió a preparar 1000 mL de solución acuosa de ácido clorhídrico a 0,5 de concentración. Para obtener la cantidad de ácido a utilizar se realizó el siguiente cálculo [36]:

$$\text{cantidad de soluto}(g) = \frac{Nf (\text{equivalentes/L}) \times Vf (\text{mL}) \times PM \text{ del soluto } (g/mol)}{1000 (\text{equivalentes/mol})}$$

Donde: Nf: normalidad final; Vf: volumen final; PM: peso molecular del soluto.

Luego para obtener la cantidad en mL de ácido:

$$\text{mL de ácido HCl} = \frac{100(g \text{ ácido})}{(\text{densidad})(\text{pureza})}$$

Fórmula para preparar 1000 mL de HCl a 0,5 N

$$g = \frac{HCl(0,5N) \times (1000 \text{ ml}) \times (36,5g/mol)}{(1)1000}$$

$$\text{gramos de soluto} = 27,37g$$

$$\text{mL HCl} = \frac{100(27,37g)}{(1,18g/ml)(36,5)}$$

$$\text{mL HCl} = 63,54$$

Se vertió la cantidad de 63,5 mL de ácido clorhídrico sobre 300 mL de agua destilada en un matraz aforado. Luego, se agregó agua destilada hasta completar un volumen de 1,000 mL. Se envasó en frascos ámbar de vidrio de 500 mL de capacidad. Se sabe que la solución se conserva estable durante 90 días, a una temperatura entre 10 °C a 25 °C y debe ser protegida de la luz.

5.2. Ingeniería del Proyecto

5.2.1. Requerimientos tecnológicos

Para poder implementar los procesos objeto de este estudio, se encontraron algunas limitaciones como:

- A. La cantidad de tejido óseo a utilizar para los ensayos:** El hueso esponjoso de donante cadavérico es un producto de alta demanda en el hospital y de

difícil obtención, ante lo cual es necesario evitar desperdiciar grandes cantidades. Se deberá realizar los ensayos con la menor cantidad de tejidos. Se considera que la unidad para los ensayos será una lámina de 12 x 24 x 5 mm de hueso esponjoso.

- B. La falta de equipos de laboratorio capaces de procesar muestras pequeñas con manejo de soluciones acuosas en condiciones de vacío:** Con la premisa anteriormente expuesta, fue difícil replicar los ensayos para una muestra tan pequeña en condiciones de vacío. Es decir, no se contaba con los dispositivos de laboratorio adecuados para manipular el tejido en condiciones de vacío, temperatura, flujo de soluciones y etapas de lavado. Además, la cantidad de las soluciones a utilizar excedía la cantidad de tejido, lo que dificultaba la adecuada cuantificación de reactivos.
- C. Cambios en la densidad o peso específico del hueso durante el procesamiento:** Durante el proceso de desmineralizado, se formaba CO₂ en las trabéculas del hueso generando flotabilidad en el hueso, lo que impedía una desmineralización homogénea. Siguiendo las recomendaciones de Eagle et al [33] se optó por utilizar una rejilla de polietileno para la fijación física del tejido. Pero esto originó un aumento en el consumo de reactivos y mayores dificultades para calcular las proporciones con respecto a las cantidades de hueso disponible.
- D. Persistencia y contaminación cruzada de lípidos:** Se observó que en el proceso convencional de lavado mediante agitación mecánica; se generaba emulsificación de los lípidos. Esto contaminaba el tejido con lípidos al momento del cambio de soluciones o manipulación del tejido, y es un fenómeno para considerar cuando se realizan procesos de desengrasado ya referido por Rheineck et al [37]. Por este motivo, se propuso emplear la configuración de un sistema de lavado por flujo unidireccional.

Para desarrollar correctamente los ensayos se revisó la literatura en búsqueda de algún instrumento especializado de laboratorio. No se encontró un dispositivo que

se ajuste a nuestras necesidades, motivo por el cual se desarrolló un biorreactor de flujo unidireccional que se detalla a continuación.

5.2.2. Objetivos de diseño

- Acomodar muestras pequeñas de dimensiones de 12 x 24 x 5 mm.
- Implementar un sistema de lavado por flujo unidireccional.
- Permitir una adecuada visualización de la reacción para la adquisición de imágenes
- Lograr manejar temperaturas de 25-70 °C.
- Resistir ácidos y solventes no halogenados (HCl, Peróxido de Hidrógeno al 30%, Alcohol iso-propílico).
- Tolerar condiciones de vacío -700 mm Hg
- Permitir la cuantificación de líquidos administrados al sistema y tolerar la aspiración brusca.
- Debe ser de material químicamente inerte que no altere las propiedades del tejido durante su proceso de desmineralizado.
- Reutilizable y de fácil limpieza para cumplir con condiciones de bioseguridad esperadas en un Banco de Tejidos.

Inspirados en la tecnología de prototipado rápido para la construcción de dispositivos de micro-fluidos [38], se optó por fabricar un micro-reactor de flujo con sus elementos anexos, bomba de jeringuilla automática y válvula múltiple para la gestión de líquidos. El desarrollo incluyó la elaboración e iteración de varios prototipos hasta que se adaptaran al cumplimiento de los objetivos estipulados.

Adicionalmente a los componentes electrónicos y conectores comerciales, el biorreactor fue construido en el taller del autor. Para la producción, se empleó un cortador láser de 40 W, una impresora 3D delta y una fresadora CNC 1610. Las pruebas se implementaron en el Banco de Tejidos del Hospital Luis Vernaza. La especificaciones técnicas y descripción del dispositivo se detallan en el Anexo 11.3.

5.2.3. Descripción del micro-reactor de flujo

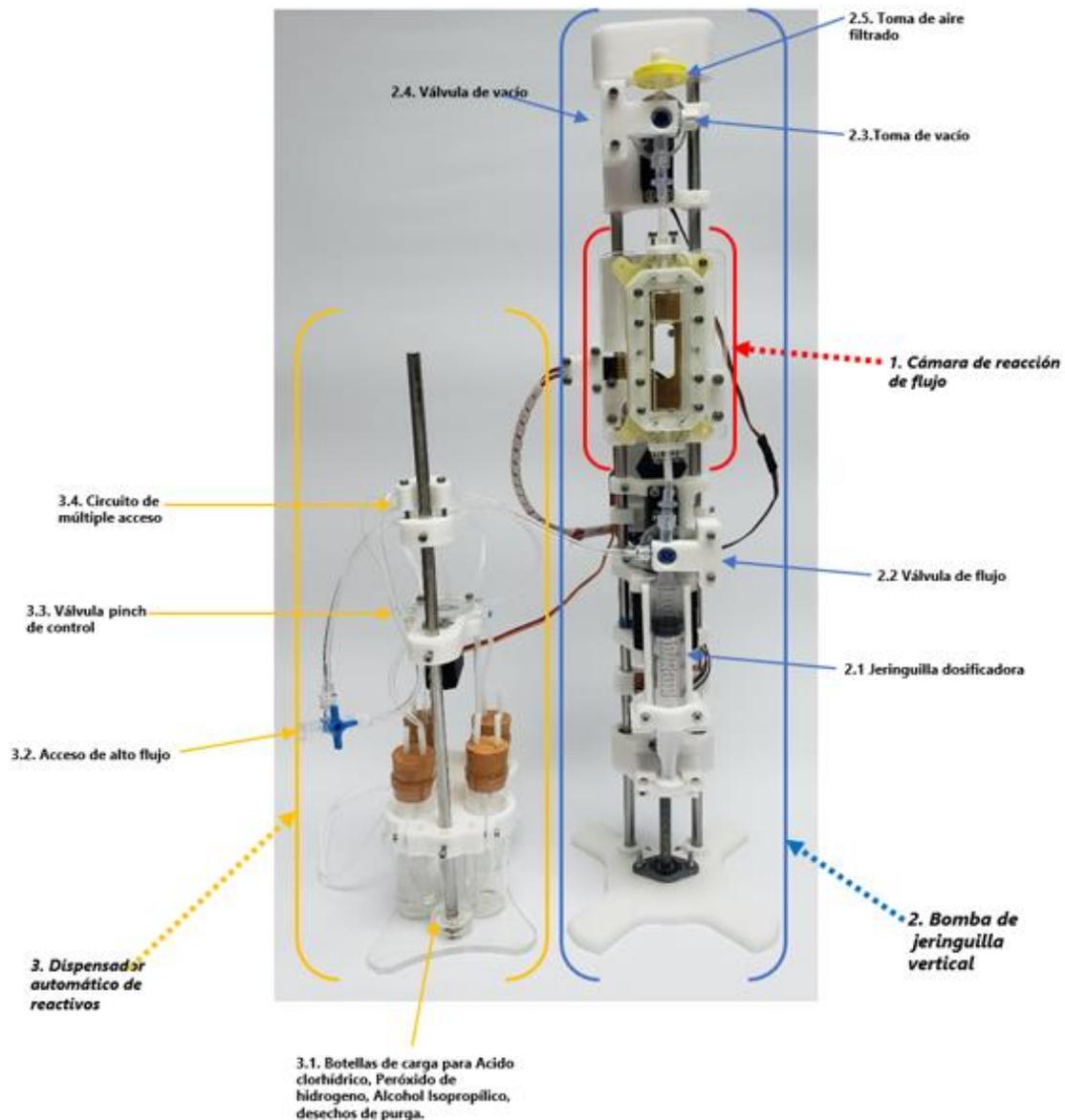


Figura 2 Biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado con dispensador automático de fluidos

El biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado es un dispositivo que se desarrolló para lograr cumplir con el experimento brindando las condiciones ideales como el lavado de pulso, la temperatura ajustable en la cámara de reacción y la gestión de mezclas de líquidos por parte del dispensador de líquidos automáticos, permitiendo lograr la reproducibilidad del experimento.

El dispositivo consta de tres componentes descritos en la Figura 2: (i) Cámara de reacción de flujo, (ii) bomba de jeringuilla y (iii) dispensador automático de reactivos.

A continuación, se describe cada componente desde su fabricación y aspectos técnicos.

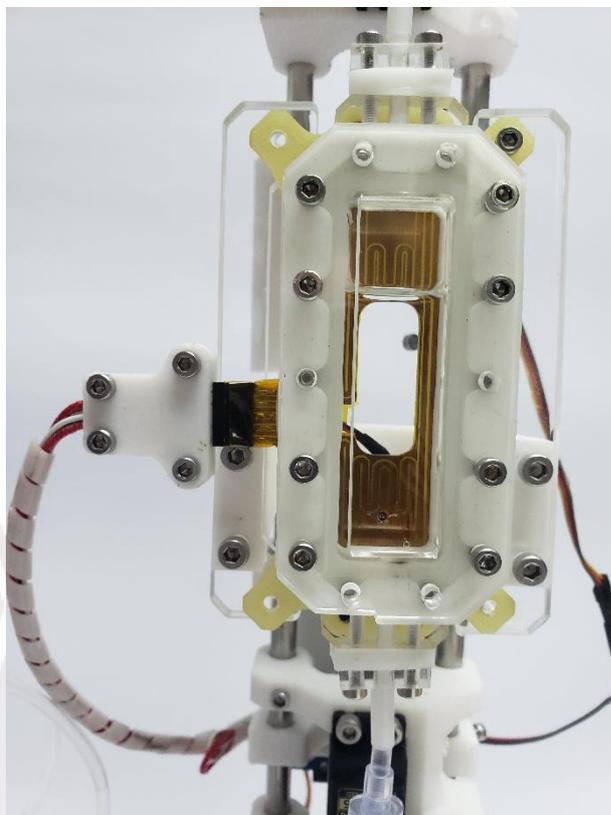


Figura 3. Cámara de reacción de flujo

5.2.3.1. Cámara de reacción de flujo

El cuerpo del reactor es una cámara de 8 mm de grosor en PMMA transparente maquinada por CNC con dos tomas en su extremo superior e inferior para un acople de PTFE y su inserto de conexión en Luer lock y sus respectivos sellos de silicona de platino de grado alimenticio. De esta manera, se logra mantener un flujo de inferior a superior dentro de la cámara, figura 4-a. Esta cámara se encuentra cubierta por dos láminas de portaobjetos en vidrio borosilicato. La cámara se fija sobre una placa calefactora elaborada en un circuito impreso basado en material laminado epoxi reforzado con fibra de vidrio (FR4) de una sola capa de cobre de 70 micrómetros; grabada mediante un CNC con un diseño personalizado con un ancho de 1 mm en pista y fresada en los bordes. La figura 4-b muestra las medidas y la forma del

calefactor de PCB. El control de temperatura se realiza mediante la colocación dentro del PCB de un termistor NTC de 100K.

La base del dispositivo se forma por la integración de la placa calefactora, lámina de portaobjeto, sello inferior de silicona y cámara de acrílico. Fijados con 6 tornillos M3 de 15 mm de cabeza hexagonal formando la base de la cámara en donde se colocará la muestra (Figura 3). Posteriormente, se coloca el sello de silicona anterior, la lámina de portaobjeto y la tapa la cual se fija con 12 tornillos M3. El proceso de ensamblaje se describe en la figura 5. Una vez armado la cámara de reacción con la muestra, esta se coloca en la bomba de jeringuilla y la válvula de vacío mediante la toma de Luer lock en los extremos superior e inferior.

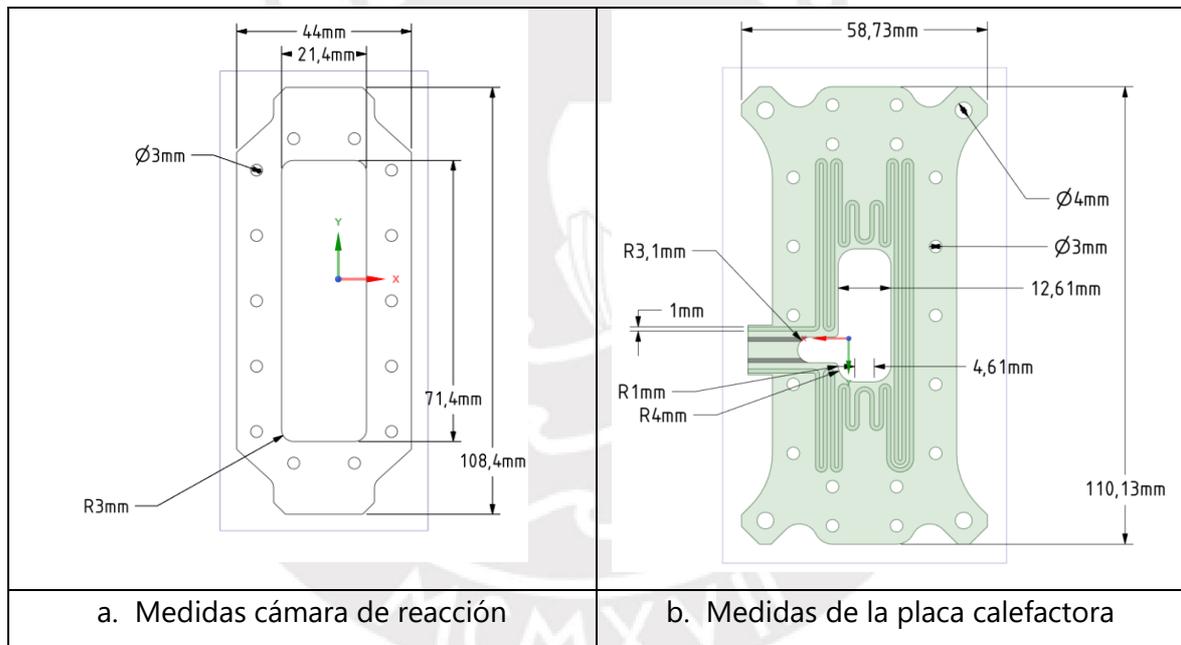


Figura 4 Medidas de componentes de cámara de reacción de flujo

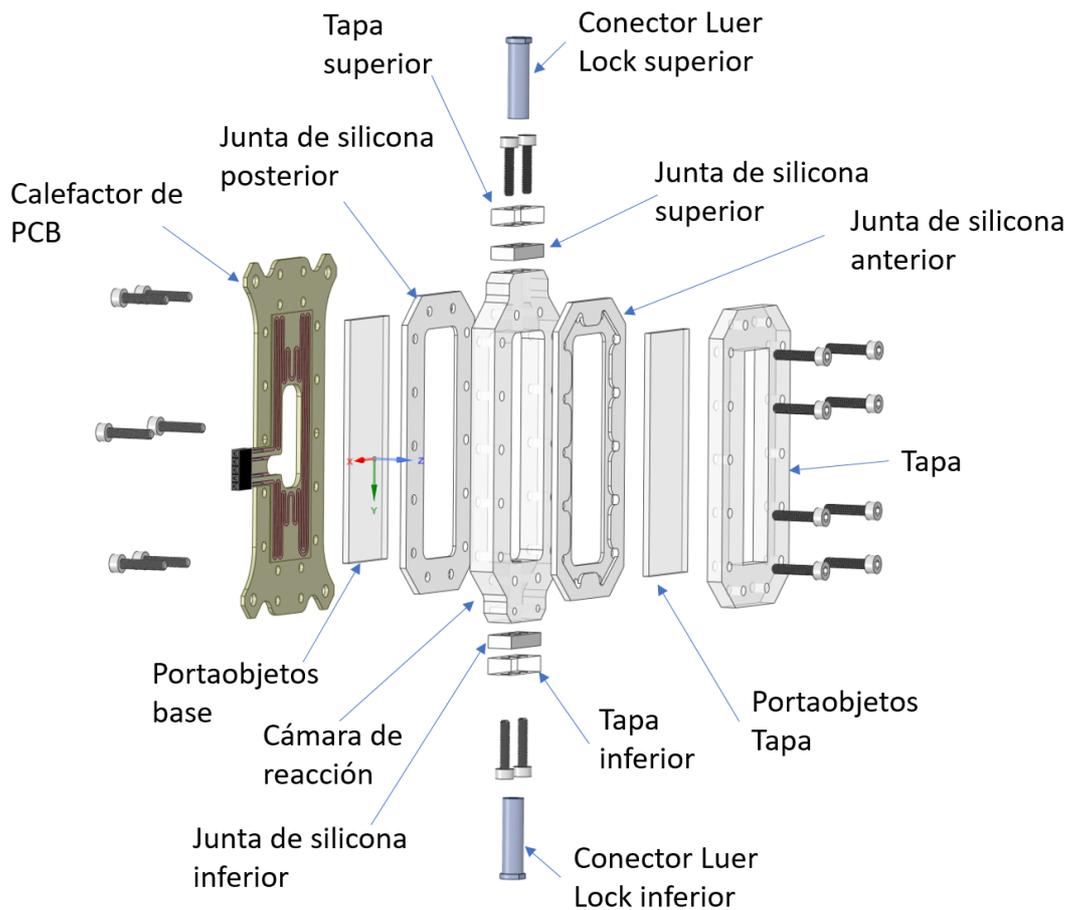
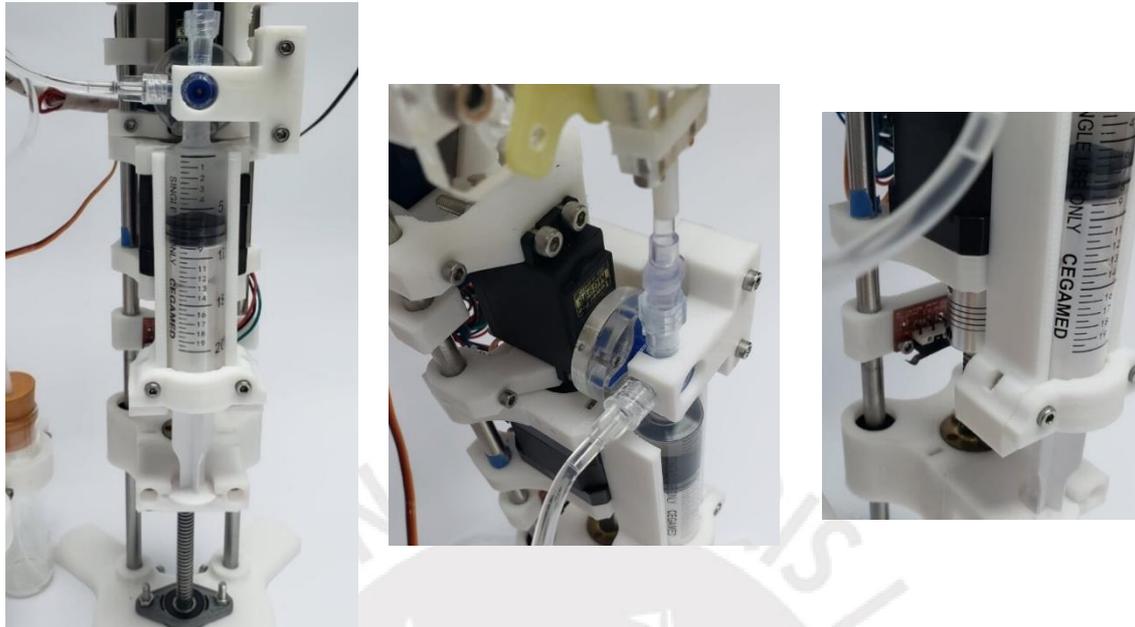


Figura 5 Vista explosionada de la cámara de reacción

5.2.3.2. Bomba de jeringuilla continua con llave de tres vías

Para este proyecto se usó una bomba de jeringuilla en lugar de bombas peristálticas debido a que, por el uso de un entorno de vacío, se genera un efecto de aspiración abrupta por el diferencial de presión entre la cámara y el contenido. Además, permitió la correcta admisión de líquidos en dos tiempos (admisión, eyección) evitando la contaminación de los reactivos al minimizar el espacio muerto colapsable generado por las mangueras. Otro efecto gracias a la automatización fue lograr realizar las mezclas para conseguir soluciones a diferentes concentraciones. Se usó como base una jeringuilla de 20 mL de volumen controlada por un motor de paso bipolar Nema 17 y un sensor mecánico (mech endstop v1.2) de fin de carrera para posicionar el émbolo. Se integró una llave de tres vías acoplada a un

servomotor (MG995) para la admisión de líquidos al sistema y el control del vacío como se detalla en la figura 6 a-b y c.



a-Bomba de jeringuilla

b- Válvula de tres vías controlada por servomotor

c- Sensor de fin de carrera

Figura 6 Componentes de la bomba de jeringuilla

Para el desarrollo del dispositivo, es necesario que la jeringuilla se ajuste adecuadamente al reactor. En el mercado encontramos que hay variaciones de forma de las jeringuillas principalmente la altura del barril y la amplitud de la lengüeta de apoyo. Por tal motivo se decidió a utilizar solo una marca de jeringuilla facilitando el diseño del reactor permitiendo un perfecto ajuste de los componentes. Se usó la jeringuilla de 20 mL la marca CEGAMED, en el anexo 11.6 se detalla las medidas específicas. Para el control del motor de paso Nema 17, se usó el driver A4988 en la configuración de micro pasos (1/16 pasos), se configuró el firmware Marlin en la instrucción "# define DEFAULT_AXIS_STEPS_PER_UNIT" al valor para eje Z de 5860 pasos para lograr 3,5 mm lineales que en la jeringuilla logra la eyección de 1 ml con una precisión de +/- 0,08 ml. De esta manera, se logra controlar la bomba de jeringuilla usando el código G.

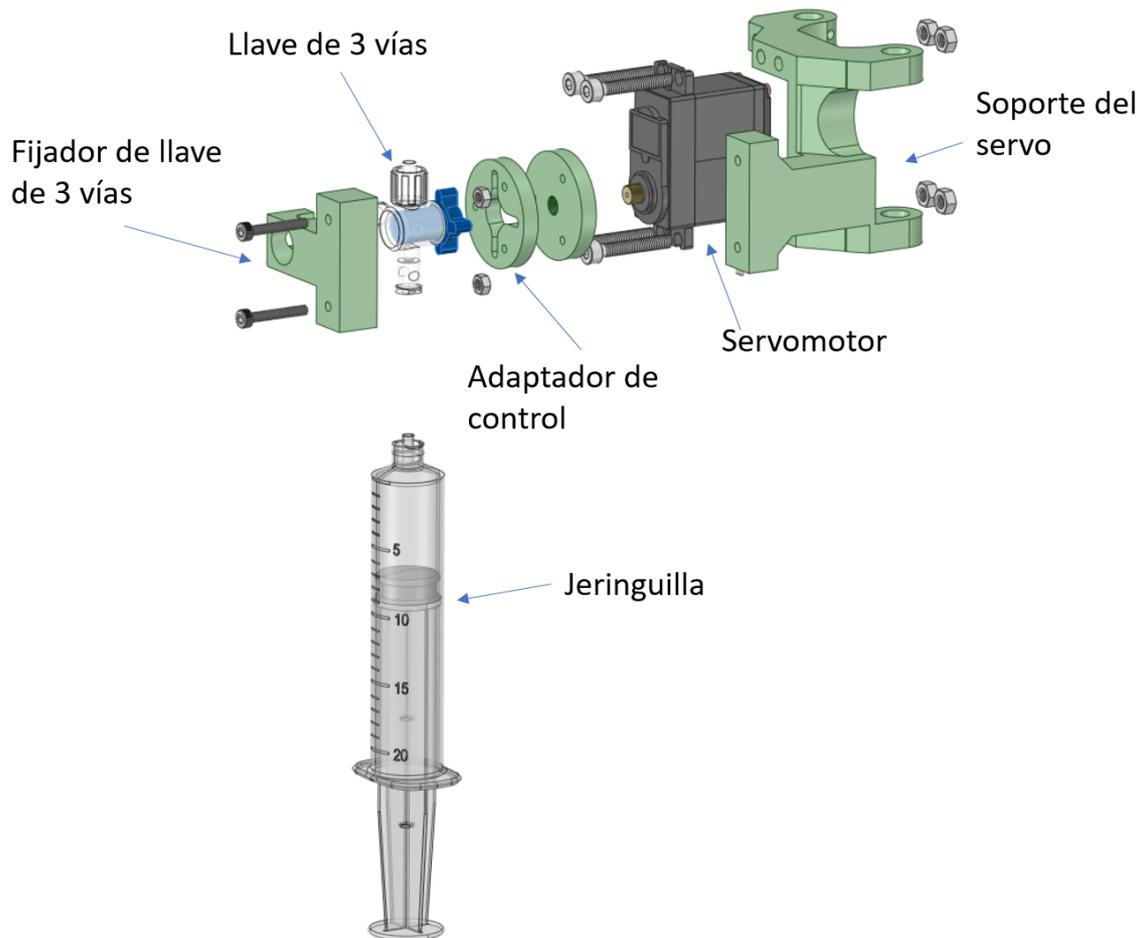
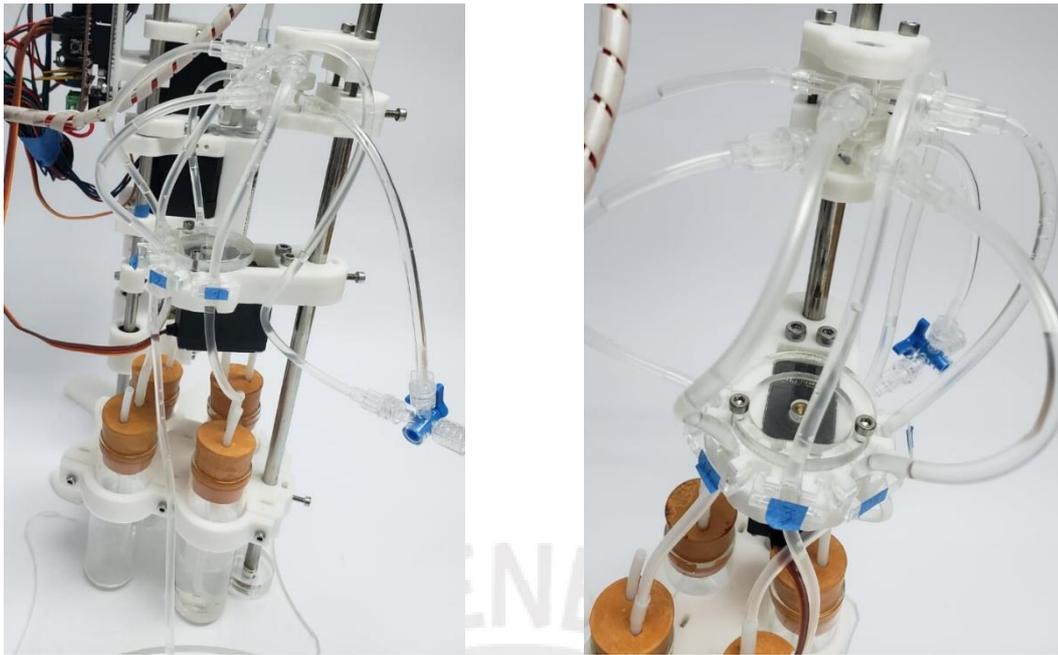


Figura 7 Vista explosionada de servoválvula de tres vías

5.2.3.3. *Dispensador automático de reactivos*

Con la finalidad de lograr una correcta administración y dosificación de líquidos se desarrolló un modelo modificado de la válvula pinch del modelo "turbidostat" elaborado por la universidad de Washington y Klavin Labs disponible para su uso mediante licencia de acceso abierto [39]. Se imprimió el cuerpo y se integró a servomotor MG995 marca HI-TEC, para el control de cinco válvulas de forma automática figura 8 y 9.



a- Vista lateral

b- Vista frontal

Figura 8 Componentes del dispensador automático de fluidos

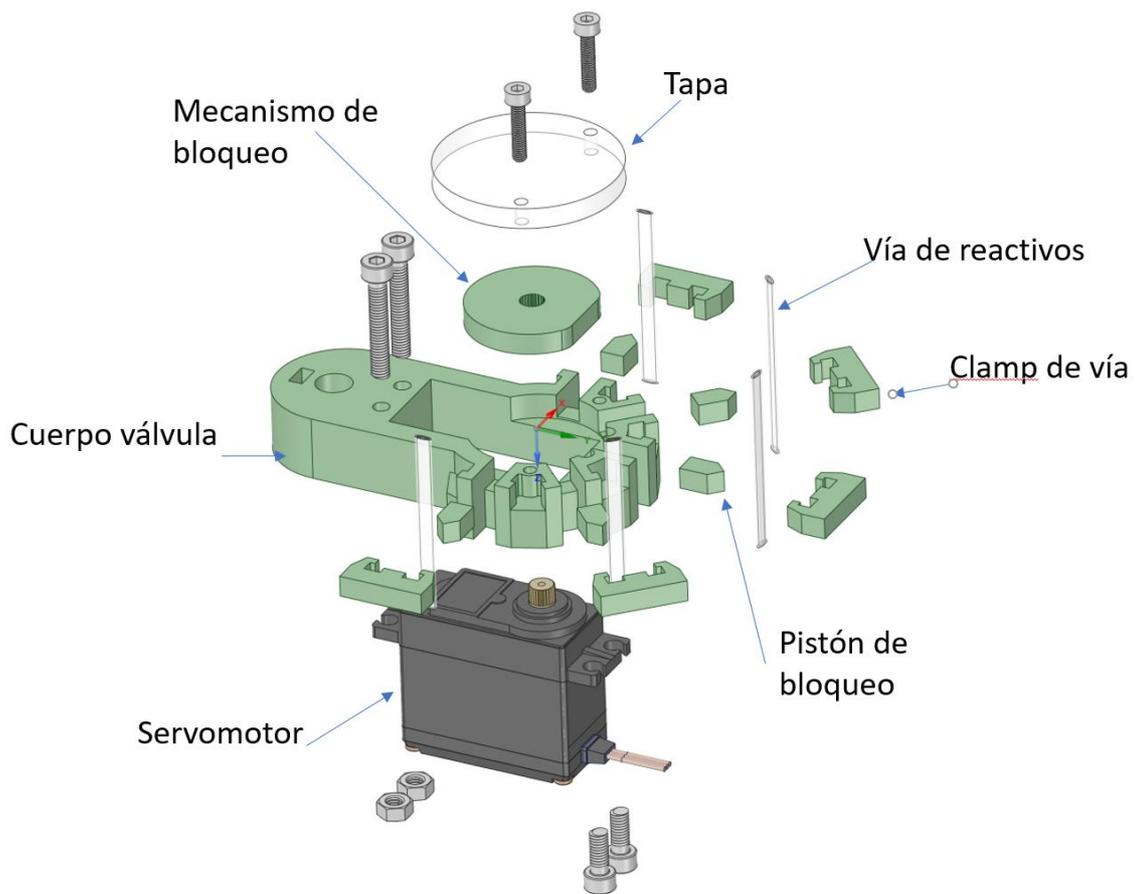
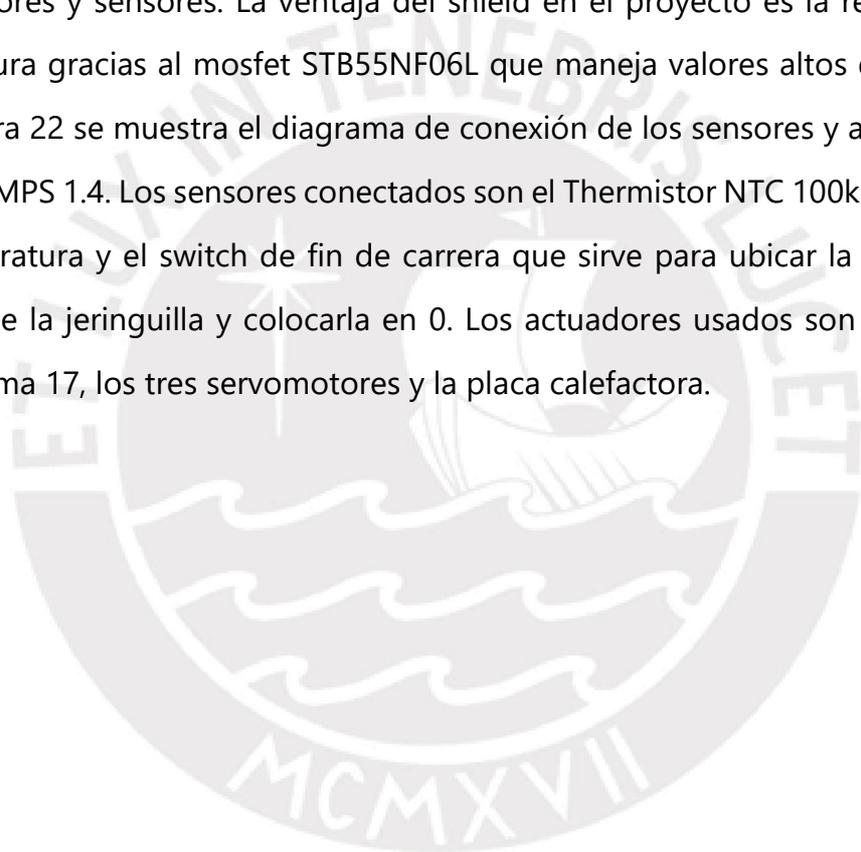


Figura 9 Vista explosionada de válvula múltiple; modificada del modelo Turbodostat

5.2.3.4. Hardware

Por ser un prototipo rápido, se utilizaron placas de prototipado ya existentes. Se escogió el AT MEGA 2560 incorporado en la placa de desarrollo Arduino, por su facilidad de programación y costo. El componente electrónico elegido para el prototipo fue el shield RAMPS 1.4, usado para la elaboración de impresoras 3D y CNC open source. Se eligió este componente por su versatilidad al incorporar todo lo necesario para el control del reactor con una alimentación de 12 voltios. Integra los drivers A4988 para el motor de paso y sus pines libres permitieron controlar los servomotores y sensores. La ventaja del shield en el proyecto es la regulación de temperatura gracias al mosfet STB55NF06L que maneja valores altos de corriente. En la figura 22 se muestra el diagrama de conexión de los sensores y actuadores al shield RAMPS 1.4. Los sensores conectados son el Thermistor NTC 100k para control de temperatura y el switch de fin de carrera que sirve para ubicar la posición del émbolo de la jeringuilla y colocarla en 0. Los actuadores usados son el motor de pasos Nema 17, los tres servomotores y la placa calefactora.



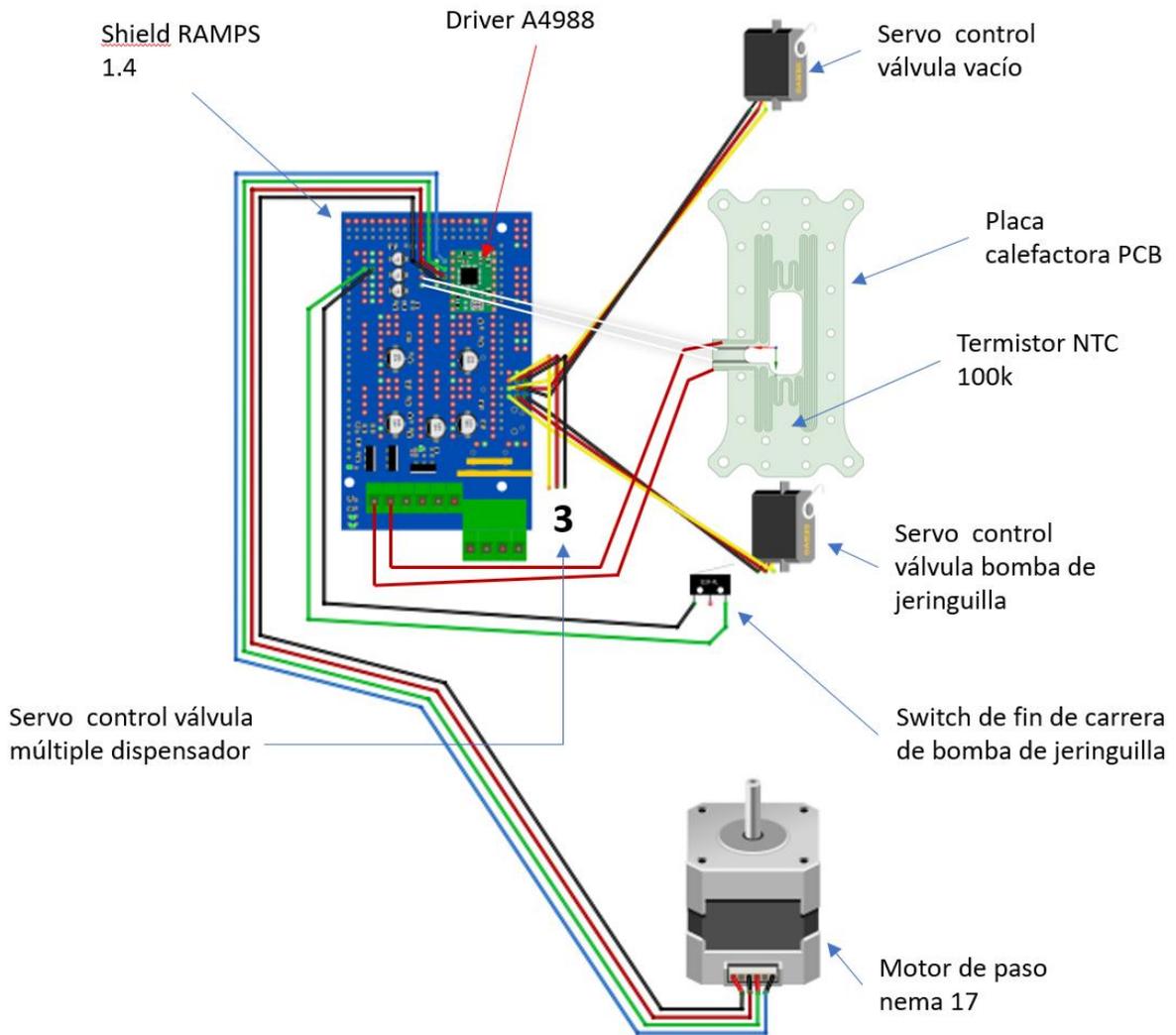


Figura 10 Diagrama de conexión de sensores y actuadores conectado al RAMPS

Control de temperatura

La regulación de la temperatura se realizó mediante el uso de un controlador PID provisto por Arduino y el Mosfet STB55NF06L del RAMPS usado como regulador de corriente hacia el calefactor. La programación del PID se logró mediante la modificación del firmware MARLIN en el apartado de control termal, se limitó la corriente al 15% usando el comando "#define BANG_MAX 40" y colocando el valor a 40. Los valores de PID usados son los que se establecieron para el modelo Ultimaker (Anexo 11.5 configuración de temperatura Marlin)

Se realizó una validación del control de temperatura del sensor NTC100k ubicado en la base de la placa (figura 11), comparándolo con la termocupla incorporada al multímetro digital Fluke 179 y colocada cerca del sensor NTC100k. En la figura 23, se observa que la respuesta del sensor de temperatura y el calefactor hay una diferencia de $\pm 0,4$ °C entre temperatura deseada y medida. La diferencia de temperatura encontrada no afecta demostrando un correcto control de temperatura necesario para el experimento. En la figura 12, se muestra la capacidad de la cámara para elevar la temperatura de un volumen de líquido de una temperatura de 31 grados hasta los 60°C en un tiempo promedio es de 6 minutos. Esto se realizó al sumergir el sensor en el centro de la cámara y posterior la carga de líquido a la temperatura descrita en una temperatura ambiental de 21°C. Se realizaron 5 ensayos para obtener un tiempo promedio.

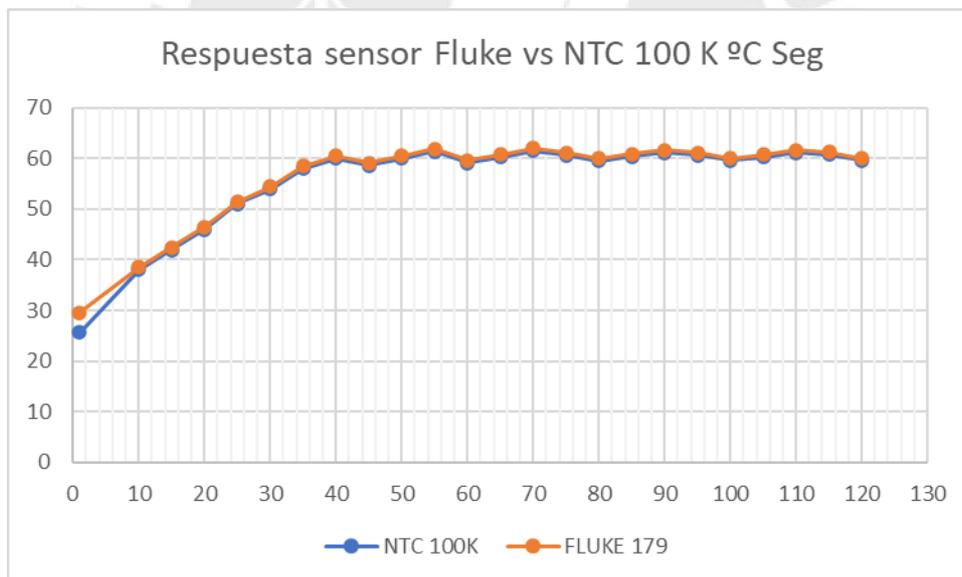


Figura 11 Validación de temperatura del reactor de flujo

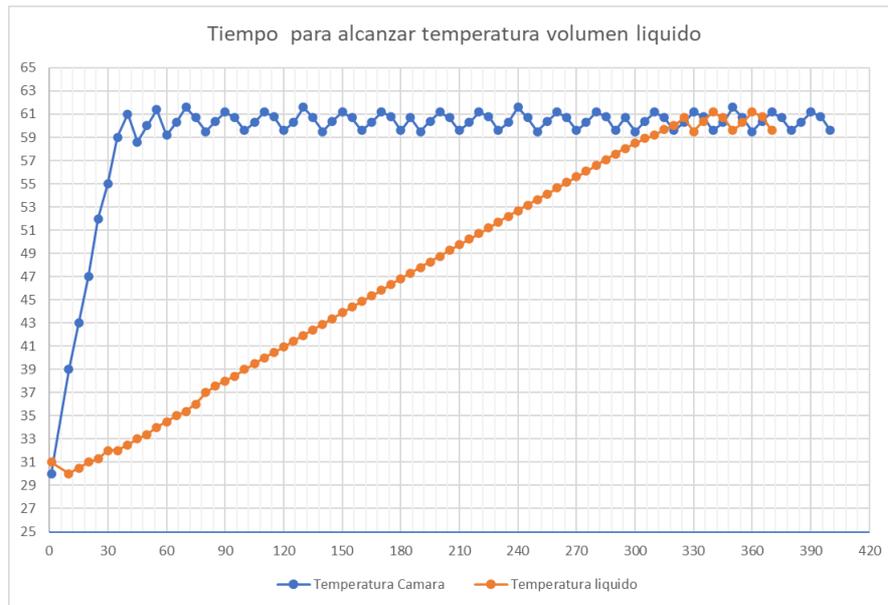


Figura 12 Tiempo requerido para elevar la temperatura de un volumen

5.2.3.5. Interfaz de control

Se implementó para el control del Arduino y la placa RAMPS 1.4 el firmware de control Marlin 2.0.5.3 (<https://marlinfw.org/>) modificado por el autor, para controlar el reactor mediante la programación usando el firmware Marlin 2.0 y controlando el dispositivo mediante código G se describe los comandos en la tabla 6.

La interfaz de trabajo se realizó en PC usando el software MegunoLink 1.32 (<https://www.megunolink.com/>) programándose los botones para controlar el reactor (figura 13).

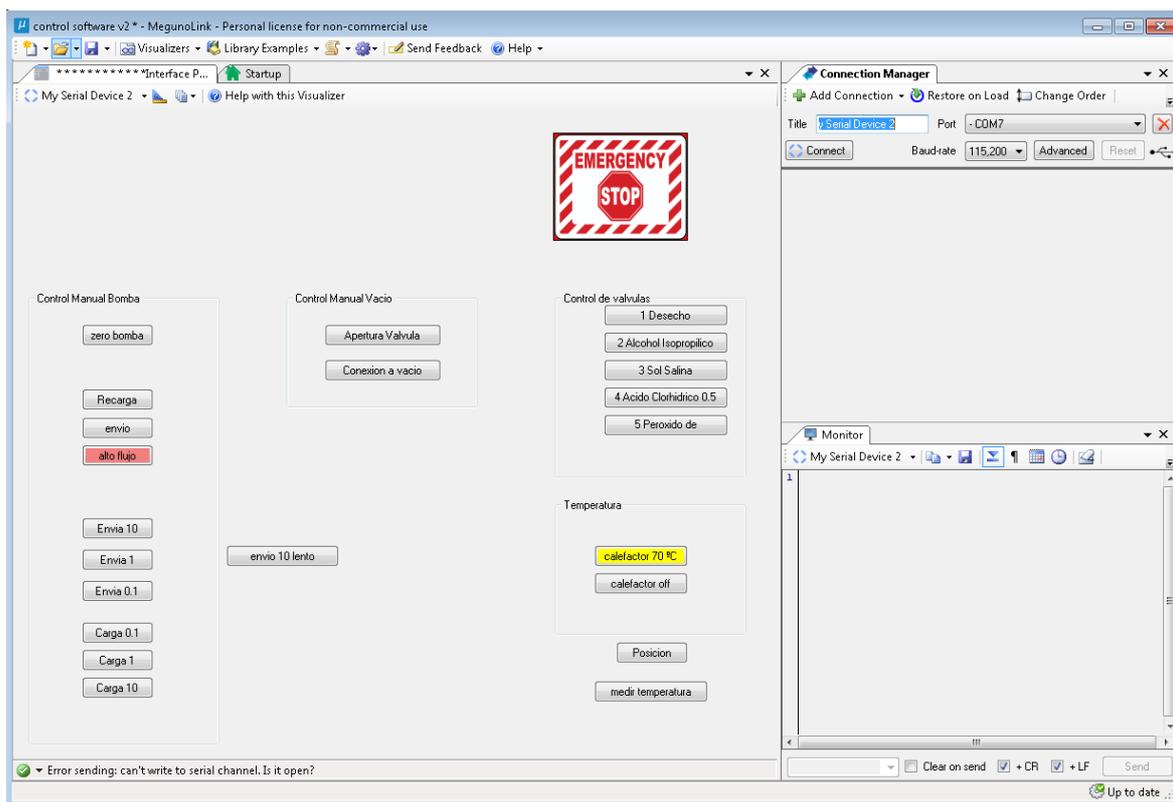


Figura 13 Interfaz de control del biorreactor de flujo unidireccional

Tabla 6

Comandos de control utilizados en la interfase

Comando de control	Código G
Control válvula de bomba	
Zero Bomba	G28 Z0 F30\r\n
Recarga	M280 P0 S0\r\n
Envío de líquido	M280 P0 S94\r\n
Alto Flujo	M280 P0 S180\r\n
Control de bomba	
Envía 10 mL	\rG91\r\nG1 Z-10 F30\r\nG90
Envía 1 mL	\rG91\r\nG1 Z-1 F30\r\nG90
Envía 0,1 mL	\rG91\r\nG1 Z-0.1 F30\r\nG90
Carga 0,1 mL	\rG91\r\nG1 Z0.1 F30\r\nG90
Carga 1 mL	\rG91\r\nG1 Z1 F30\r\nG90
Carga 10 mL	\rG91\r\nG1 Z10 F30\r\nG90
envía 10 mL lento	\rG91\r\nG1 Z-10 F3\r\nG90
Control válvula vacío	
Apertura válvula	M280 P1 S90\r\n
Conexión a vacío	M280 P1 S170\r\n
Control válvula múltiple	
1 Desecho	M280 P2 S180\r\n
2 Alcohol Isopropílico	M280 P2 S135\r\n
3 Solución Salina	M280 P2 S90\r\n

4 Ácido Clorhídrico 0.5N M280 P2 S45\r\n

5 Peróxido de Hidrógeno M280 P2 S0\r\n

Control temperatura

Calefactor 60 °C M104 S60 T0\r\n

Calefactor OFF M104 S0 T0\r\n

Medir temperatura M105\r\n

Emergency Stop (Parada de emergencia) M112\r\n



6. Procedimiento

6.1. Experimento Piloto

Considerando las instrucciones encontradas en patentes y artículos en las cuales se describe que el proceso de desmineralizado se procede a realizar un experimento piloto. De esta manera permite observar los elementos considerados claves en el proceso y los problemas que se pudiesen presentar. Con los resultados obtenidos se logró identificar los requerimientos tecnológicos y metodológicos para este proyecto.

Para la realización del experimento se colocó una muestra de tejido en una botella de vidrio templado de 50 mL con llave para vacío, luego se colocó la botella sobre un calefactor con agitación magnética. Los volúmenes de líquidos fueron administrados y retirados mediante una bomba peristáltica. En la tabla 7 se describe los pasos a seguir y en la figura 14, se muestran las etapas del proceso.

Tabla 7

Etapas del experimento piloto

Pasos para realizar	
1	Colocar el tejido en contenedor
2	Lavar con solución salina caliente a 40°C con agitación x 5 min
3	Agregar 50 mL de HCl al 0,5 N a temperatura ambiente x 4 horas con agitación magnética
4	Lavar con 50 mL de PBS a temperatura ambiente con agitación magnética y repetir este paso tres veces
5	Retirar la pieza del contenedor, y escurrir el agua por centrifugación a 1800 G x 15 min
6	Enviar a laboratorio para su análisis.



1. Lavado por agitación



2. Desmineralizado con agitación magnética y temperatura controlada



3. Lavado del tejido desmineralizado

Figura 14 Procedimiento realizado en el experimento piloto

6.2. Resultados del experimento piloto

El proceso de desmineralizado de tejido óseo es relativamente simple, el tejido se sumerge en un volumen de una concentración débil de ácido clorhídrico al 0,5 N por un tiempo determinado a temperatura ambiente. El ácido interactúa con la matriz inorgánica del hueso removiéndola y dejando expuesta la matriz orgánica rica en colágeno y en proteínas morfogénicas óseas que tienen una alta capacidad osteoinductora, y obtenemos como resultado nuestro producto objetivo. Sin embargo, la dificultad en el proceso reside en el tiempo de exposición del tejido al ácido. Si el tiempo es mayor a la masa de tejido óseo, la actividad corrosiva del ácido puede afectar la matriz de colágeno dañando el producto. Por otro lado, si no se agrega la cantidad necesaria de solución de HCl el tejido no llega a desmineralizarse de forma óptima.

Durante el experimento piloto, el tejido presentó una baja desmineralización. Esto se observó debido a que aún mantenía su forma rígida, no se deformaba con facilidad. El resultado del análisis reveló que tenía un 23% de calcio residual y 34% de lípidos totales. Por lo tanto, fue necesario optimizar la limpieza del tejido para lograr una desmineralización eficiente.

Originalmente, la idea era poder utilizar los chips de hueso esponjoso que producía el Banco de Tejidos. Estos chips eran gránulos irregulares entre 4 y 5 mm de diámetro obtenidos por troceado mediante una gubia, pero fue difícil cuantificar la cantidad de masa a utilizar. Además, en el proceso de desmineralizado se producía una pérdida del 60% del volumen inicial dificultando su manipulación y uso. Por tal motivo, se prefirió usar láminas de tejido esponjoso.

La aplicación del vacío fue fundamental para evitar que se formen burbujas de CO₂ en las trabéculas, porque las burbujas actúan tapando las trabéculas y bloqueando el acceso del ácido al interior del tejido, lo que da una pobre desmineralización en el centro.

6.3. Diseño del experimento general

Luego de evaluar la bibliografía y observar los resultados del experimento piloto, en los cuales se encontró la relación entre a mayor cantidad de lípidos en el tejido

menor era el desmineralizado, se identificó a los factores más críticos que influyen en la elaboración del producto final son:

a. Lavado y desengrasado del tejido usando alcohol iso-propílico y peróxido de hidrógeno

Esta etapa afecta la producción debido a que mientras persistan los residuos de grasa y restos en el tejido, la acción del ácido es deficiente dejando un producto parcialmente desmineralizado. El peróxido de hidrógeno es un compuesto químico que presenta una alta reactividad frente a residuos orgánicos formando radicales OH, de esa manera limpia la matriz ósea. Un factor importante para conocer es que su reactividad se relaciona con su concentración. Asimismo, el alcohol iso-propílico facilita la solubilidad a los lípidos. Lo más importante es conocer el punto óptimo de concentración exacta donde se logre buenos resultados minimizando el desperdicio de recursos.

b. Temperatura

Una temperatura alta incrementa la energía cinética a las moléculas logrando un aumento de la actividad de solventes y del ácido clorhídrico, este fenómeno fue reportado en el estado del arte [31]. Se sabe que una temperatura mayor a la ambiental mejora el desmineralizado del tejido de forma eficiente. Sin embargo, es importante mantener la temperatura por debajo de 70°C debido a que se presenta el riesgo de dañar a la matriz osteoinductora por acción del calor alterando sus propiedades de interés. Además, la aplicación de temperatura por encima de la ambiental permite estabilizarla a un valor fijo logrando una reproducibilidad idónea.

c. Aplicación del vacío

El inconveniente de usar hueso esponjoso es que durante la desmineralización se genera CO₂, quedando atrapado en las trabéculas del tejido óseo actuando como tapón e impidiendo el flujo de solución ácida, lo que resulta en una desmineralización incompleta. La aplicación del vacío favorece a la extracción del CO₂ por un fenómeno de arrastre del gas.

d. Tiempo de desmineralizado

El tiempo de contacto del tejido con el ácido es un factor que ha variado entre autores y también se relaciona con la presentación del tejido (polvo, fibras) y tiene relación directa con la aplicación de los otros factores. Además, la exposición prolongada puede dañar el tejido por sobre exposición por tal motivo se justifica conocer el tiempo mínimo de exposición en la reacción.

Con la información obtenida en el experimento piloto. El proceso se dividió en 2 etapas: (i) Lavado y desengrasado del tejido y (ii) Reacción de desmineralizado.

El flujo de trabajo del experimento será dividido en 2 etapas en la primera se estudiará cual es el valor adecuado de peróxido de hidrogeno y alcohol iso-propílico requerido para lograr un tejido óseo desengrasado, valor de concentración de lípidos deseada menor al 5%. Luego con el tejido óseo desengrasado se procede con la desmineralización del tejido, requiriendo conocer el tiempo y temperatura adecuada de la reacción para alcanzar un valor menor al 8% de calcio residual.

Para identificar los mejores tratamientos se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para estudiar la relación de la concentración del peróxido de hidrogeno y el alcohol iso-propílico en la concentración de lípidos residuales Tabla 8 y 9.

Y conocer la relación entre el tiempo y temperatura adecuada para llegar obtener un producto que cumpla lo requerido por la AATB teniendo un mínimo de 8% de calcio residual tabla 10 y 11.

Se escogió esta metodología debido a que permite identificar las condiciones óptimas de la operación del proceso [40]. Además, puede extraer información importante con pocas unidades experimentales. Para ambos experimentos, se aplicó un diseño central compuesto (DCC) de dos factores continuos con tres puntos centrales, cuatro axiales y cuatro del cubo para un total de once corridas experimentales. Esto significa que se estableció un valor con un rango mínimo y

máximo en donde se encuentra el fenómeno a estudiar además de valores extremos e intermedios en función al valor de alfa seleccionado por el software ($\alpha=1.633$). Se seleccionó 3 repeticiones para el valor del punto central con la finalidad de lograr una predicción adecuada en la curvatura de superficie. Los resultados generados durante la optimización fueron reproducidos por tres ocasiones con la finalidad de evaluar si se encuentran en la media esperada. La tabla de experimentos y el análisis estadístico se realizó usando el software Design Expert 12. Una de las premisas es usar la menor cantidad de tejido en cada etapa experimental.

Tabla 8

Resumen de factores y sus niveles para la variable concentración de lípidos totales.

Factores para estudiar				
Factor	Nombre	Unidades	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+) *
Peróxido	Porcentaje de peróxido de hidrogeno	Porcentaje en solución	10	25
IPA	Porcentaje de alcohol iso-propílico	Porcentaje en solución	50	90
Variable de respuesta				
	Concentración de lípidos totales	Porcentaje de lípidos totales		

*Por ser un diseño compuesto central se minimizaron los niveles de alto y bajo para que los valores de punto axial se encuentren dentro del rango adecuado de las concentraciones reales que se pueden elaborar.

Tabla 9

Combinación de factores para evaluar la respuesta a porcentaje de lípidos totales

Orden experimento	Orden aleatorio	Factor 1	Factor 2
		A: Peróxido	B: IPA
		%	%
1	7	10	50
2	1	25	50
3	11	10	90
4	10	25	90
5	4	7	70
6	6	30	70
7	3	17	42
8	9	17	100

9	8	17	70
10	5	17	70
11	2	17	70

Factores, niveles y combinaciones de tratamientos a estudiar en la etapa de reacción de desmineralizado

Tabla 10

Resumen de factores y sus niveles para la variable concentración de calcio residual

Factores para estudiar				
Factor	Nombre	Unidades	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
Temp	<i>Temperatura de reacción</i>	Grados centígrados	25	60
Time	<i>Tiempo de reacción</i>	minutos	30	120
Variable de respuesta				
	<i>Porcentaje de calcio residual</i>		<i>Porcentaje de calcio residual</i>	

Tabla 11

Combinación de factores a para evaluar respuesta a porcentaje de calcio residual

Orden Experimento	Orden aleatorio	Factor 1	Factor 2
		A: Temperatura Grados centígrados	B: Tiempo minutos
1	9	25	30
2	1	60	30
3	2	25	120
4	6	60	120
5	11	17	75
6	10	67	75
7	3	42	11
8	5	42	140
9	4	42	75
10	7	42	75
11	8	42	75

6.4. Desarrollo del procedimiento

El tejido fue cargado en el reactor y sometido a un lavado previo con solución salina por pulsos asistidos por vacío como se muestra en la Figura 3. Se incorpora peróxido

de hidrógeno y alcohol iso-propílico en las proporciones indicadas en el experimento a una temperatura estable de 40 °C. Posterior al lavado se incorporó el ácido clorhídrico al 0,5 N. La temperatura y el tiempo fueron definidos por las combinaciones experimentales cuyos pasos de aplicación se detallaron en la tabla 12.

Las pruebas de cada unidad experimental detalladas en las tablas 9 y 11 se realizaron de forma aleatoria, bajo las mismas condiciones ambientales (temperatura 22°C y humedad relativa ambiental de 50% ($\pm 10\%$)) y de operación, minimizando el error entre unidades experimentales. Las corridas experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio del Banco de Tejidos utilizando el biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado descrito en la sección 4.6. El biorreactor controla la temperatura y fluidos que llegan a la cámara de reacción. La temperatura ambiente se estableció a 25°C con el fin de mantener una temperatura estable y disminuir la humedad del ambiente. Las piezas óseas para estudiar se encuentran a temperatura ambiente previo al estudio. El vacío aplicado se estableció a -700 mm Hg. Los insumos pertenecen al mismo lote y los ensayos se realizaron el mismo día para evitar alguna variabilidad ambiental u operativa. La capacidad volumétrica de la cámara del biorreactor es de 12 mL, por lo cual se prepararon las soluciones hasta completar 20 mL. Esto se realizó empleando el dispensador de fluidos del reactor y la bomba de jeringuilla (figura 15). La tabla 13 y 14 explica la proporción en mililitros de solución de peróxido de hidrogeno y alcohol iso-propílico.

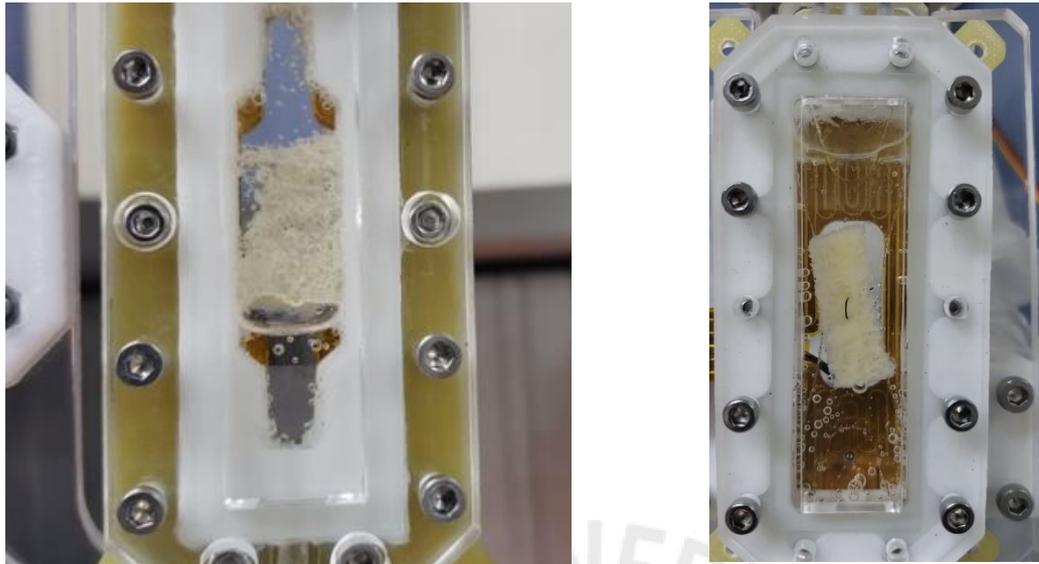


Figura 15 Ejecución de experimentos en el biorreactor de flujo unidireccional

Tabla 12

Etapas el proceso experimental

	Proceso	Observaciones
1	Colocar tejido en el micro reactor	
2	Lavado por pulso 10 mL/5 s, a 40°C	Repetir por tres veces
3	Lavado con peróxido de hidrógeno 20 mL a X%	Los valores de concentración son proporcionados por la tabla de experimentos
4	Lavado por pulso 10 mL/5 s, a 40 °C	Repetir por tres veces
5	Lavado con alcohol iso-propílico 20 mL a X%	Los valores de concentración son proporcionados por la tabla de experimentos
6	Lavado por pulso 10 mL/5 s, a 40 °C	Repetir por tres veces
7	Carga de 18 mL de HCl a X °C por X minutos	Los valores de temperatura y tiempo son proporcionados por la tabla de experimentos
8	Lavado con PBS 50 mL a flujo lento	
9	Centrifugado a 1 500 RPM por 15 min	
10	Almacenamiento a -20°C	

Tabla 13

Cuantificación de volumen para obtener concentración deseada de Peróxido de hidrógeno en 20 mL

Concentración	Peróxido de hidrógeno	Solución salina 0.9%
%	mL	mL
25	5	15
17	3,4	16,6
17	3,4	16,6
7	1,4	18,6
17	3,4	16,6
30	6	14
10	2	18
17	3,4	16,6
17	3,4	16,6
25	5	15
10	2	18

Tabla 14

Cuantificación de volumen para obtener concentración deseada de Alcohol Isopropílico en 20 ml

Concentración	Alcohol Isopropílico	Solución salina 0.9%
%	mL	mL
50	10	10
70	14	6
42	8,4	11,6
70	14	6
70	14	6
70	14	6
50	10	10
70	14	6
100	20	0
90	18	2
90	18	2

6.5. Cuantificación del calcio residual

Al finalizar cada unidad experimental, el tejido fue colocado en un horno de secado a 120°C por 8 horas para extraer el agua. Luego, el tejido fue pesado utilizando una balanza analítica para obtener y registrar el peso seco en mg.

El tejido fue colocado en un tubo de ensayo de vidrio y se hidrolizó con 1 mL de HCL a 6 N en un baño maría a 40°C hasta obtener la hidrólisis del tejido. Una vez disuelto, el contenido fue colocado en un vaso de precipitados con 99 mL de agua destilada para obtener una solución expresada en mg/dL.

La medición del calcio residual se realizó mediante la técnica de electroquimioluminiscencia usando el kit Calcium CA2 gen 2 para ser usado en el equipo Cobas 501c de ROCHE con la técnica descrita por el fabricante (method sheet Cobas Calcium gen 2 [41]). El principio de la prueba se basa en la medición fotométrica de los cambios en la absorbancia generada por la interacción de los iones de calcio en presencia de 5-nitro.5'-metil-BAPTA y comparándola proporcionalmente con la concentración de calcio. Para los cálculos de la muestra, se consideró la configuración de orina, el resultado es expresado como calcio total en mg/dL. El límite de detección de la prueba es de 0,8 a 30 mg/dL. En caso de valores altos como en las muestras de orina, se aplica la dilución de 1:5 de la muestra, para que de esta manera se puede incrementar el rango de detección a 150 mg/dL tal como es recomendado por el fabricante.

Los resultados se expresan en porcentaje de calcio residual mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{calcio residual} = \frac{\text{Ca total} \times 100}{P \text{ tejido}}$$

P tejido = el peso seco del tejido expresado en mg/dL

Ca total = el valor de calcio total expresado en mg/dL

6.6. Cuantificación de lípidos totales

Se aplicó el mismo tratamiento para el tejido descrito anteriormente en la determinación del calcio residual. El uso de hidrólisis ácida permitió la extracción de lípidos en áreas de difícil acceso y que no pueden extraerse fácilmente con otros solventes. Esto debido a que

el hueso trabeculado presenta una conformación espacial compleja. La determinación de lípidos totales es una técnica manual que se realiza siguiendo el protocolo del laboratorio del Hospital Luis Vernaza usando el reactivo lípidos totales de marca Spinreact [42].

La muestra es analizada mediante espectrofotometría comparando la absorbancia de la muestra con una curva de calibración a 520 nanómetros. El resultado es expresado en mg/dL indicando la concentración de lípidos en la muestra. El rango de detección de la prueba es de 10 a 800 mg/dL

Los resultados se expresan en porcentaje de calcio residual mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{lipidos totales residuales} = \frac{\text{Lip total} \times 100}{P \text{ tejido}}$$

P tejido = el peso seco del tejido expresado en mg/dL

Lip total = el valor de lípidos totales expresado en mg/dl

6.7. Evaluación histológica del producto final

Una muestra de tejido resultante de cada optimización fue enviada al Servicio de Anatomía Patológica, para evaluar el tejido esponjoso desmineralizado. Previamente, el tejido fue deshidratado e incluido en un bloque de parafina para obtener cortes de entre 5 a 10 μm de grosor. Los cortes fueron teñidos con la tinción de Hematoxilina y Eosina para lograr una visualización general. Los cortes fueron examinados mediante un microscopio invertido, y las imágenes fueron adquiridas mediante una cámara digital adaptada al microscopio. La Figura 16 muestra que las trabéculas del hueso se encuentran desprovistas de células y que además la estructura de la matriz de colágeno se encuentra intacta.

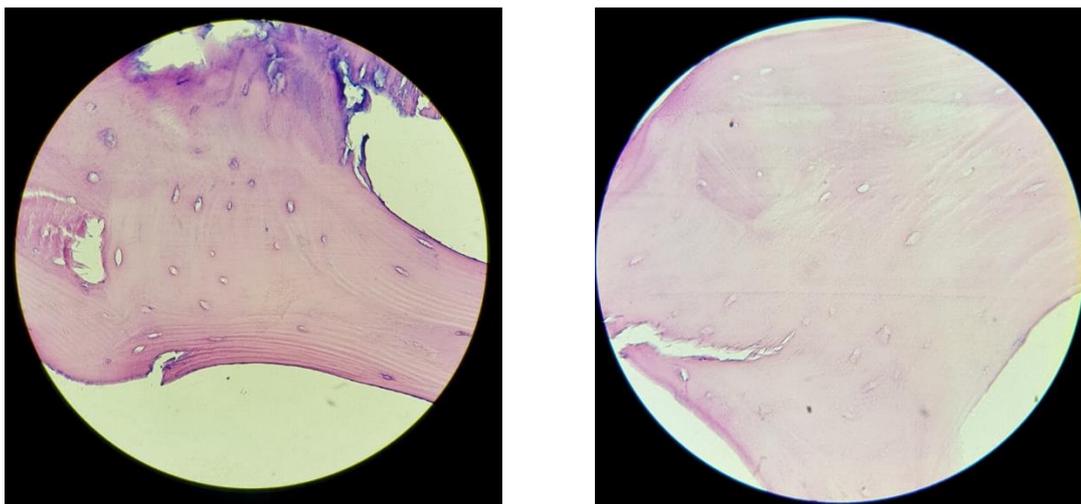


Figura 16 Evaluación histológica del tejido desmineralizado



7. Resultados y discusión

El modo automático del reactor permitió controlar y reproducir las variables estudiadas. El empleo de la metodología de respuesta de superficie permitió encontrar un punto ideal de proceso que primero identifique la configuración ideal de remoción de lípidos previo a la desmineralización. De esta manera, se estandarizó el desmineralizado minimizando el error previsto.

Se analizaron los datos de los dos grupos de experimentos de manera simultánea. Sin embargo, cabe aclarar que, en la secuencia experimental, primero se realizó el experimento de lavado y desengrasado y con los valores óptimos resultantes, se procesaron las muestras que entraron a la etapa de desmineralizado.

Los resultados de los experimentos se encuentran detallados en las Tablas 15 y 21, y fueron analizados en conjunto debido a que siguen la misma metodología experimental y de análisis de información. El análisis estadístico de los factores, sus interacciones y efectos sobre porcentaje de lípidos y calcio residual fueron analizados de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA), usando el modelo polinómico mediante el software de diseño de experimentos Design Expert 12.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para un modelo cuadrático el cual se ajusta al modelo experimental, en donde se evaluarán los siguientes estadísticos:

Suma de cuadrados: Suma de las diferencias cuadradas entre el promedio general y la cantidad de variación explicada por esa fuente de filas.

Grados de libertad (GL): el número de parámetros estimados que se utilizan para calcular la suma de cuadrados de la fuente.

Cuadrado medio: la suma de cuadrados dividida por los grados de libertad. También se llama varianza.

Valor F: El valor F es la estadística de prueba usada para determinar si el término está asociado con la respuesta.

Valor p: Es una probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula. Las probabilidades más bajas proporcionan una evidencia más fuerte en contra de

la hipótesis nula. Se consideró significativo los valores de p por debajo de 0,005 cuyo valor fue proporcionado por defecto por la aplicación.

7.1. Validación de los modelos estadísticos

Se utilizaron gráficos de probabilidad normal de los residuos para identificar si el modelo cumple con el supuesto de la distribución normal [43]. Se determinó que los modelos no presentan desviaciones importantes en la línea de la normalidad y esa condición se mantiene en ambos modelos (Figura 17). Una vez confirmado el supuesto de la normalidad, se procedió a efectuar el análisis de varianza a cada una de las respuestas. En la figura 18, se presentan residuos versus valores ajustados y se identifica la dispersión aleatoria sin la presencia de tendencias que indiquen una variación desigual o residuos grandes o que requiera el ajuste del modelo. Asimismo, en la figura 19, se presentan residuos versus el orden de experimentación y se evidencian patrones aleatorios, sin observarse tendencias, cambios rápidos o ciclos. Podemos concluir que en el análisis de ambos estudios no se presenta un patrón de comportamiento indicando alguna desviación apreciable del valor de la respuesta y por lo que no se establece ninguna incongruencia con la condición de la normalidad establecida.

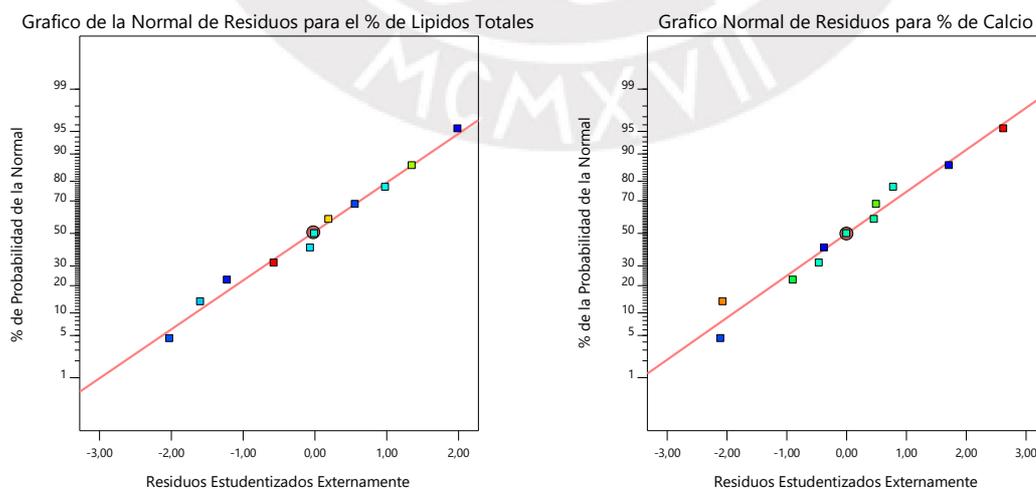


Figura 17 Gráfica de la normalidad de residuos para las respuestas % de lípidos totales y % de calcio residual

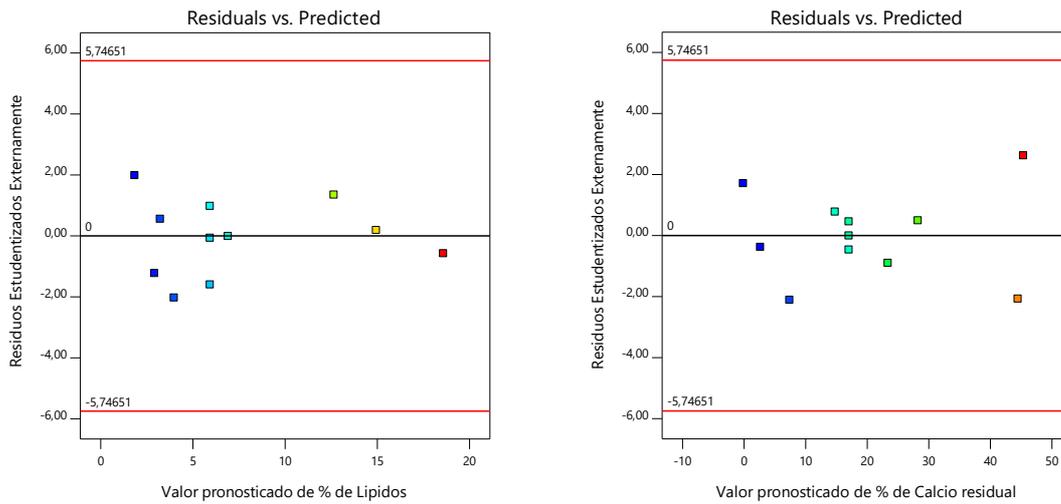


Figura 18 Residuos versus valores ajustados

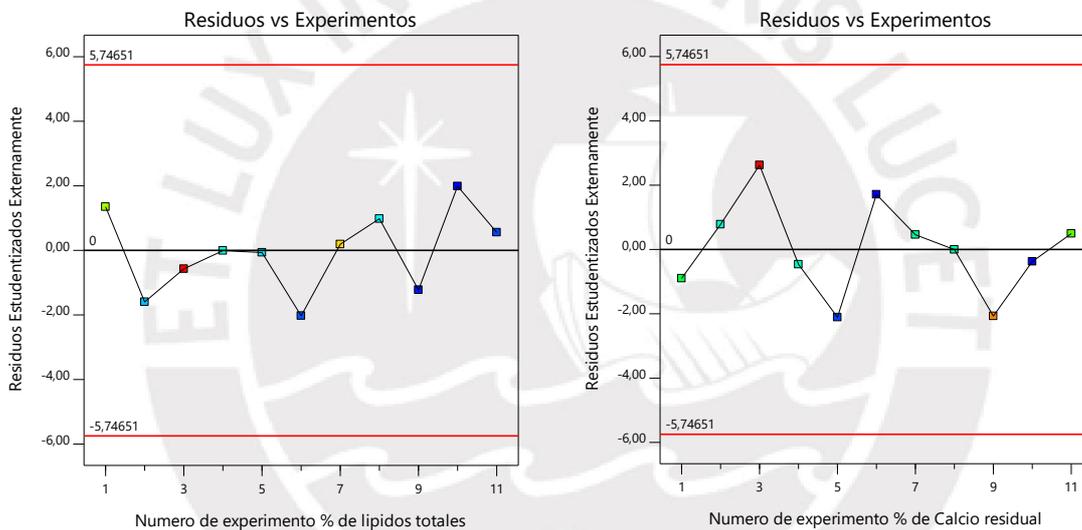


Figura 19 Residuos versus orden de experimentación

7.2. Respuesta porcentaje de lípidos totales

El porcentaje de lípidos totales es la cantidad de lípidos remanentes en el tejido luego del proceso de lavado, el tejido posteriormente es pesado y mediante hidrólisis ácida se logra evaluar la cantidad de lípidos totales del tejido estudiado. Los resultados se presentan en la Tabla 14. El rango de lípidos totales se encontró entre 2,3 y 18,4 %

Tabla 15*Respuesta obtenida en el experimento de porcentaje de lípidos totales*

Orden	Orden aleatorio	Factor 1	Factor 2	Respuesta
		A: Peróxido %	B: IPA %	Lípidos %
2	1	25	50	13
11	2	17	70	5,4
7	3	17	42	18,4
5	4	7	70	6,9
10	5	17	70	5,9
6	6	30	70	3,6
1	7	10	50	15
9	8	17	70	6,3
8	9	17	100	2,6
4	10	25	90	2,3
3	11	10	90	3,4

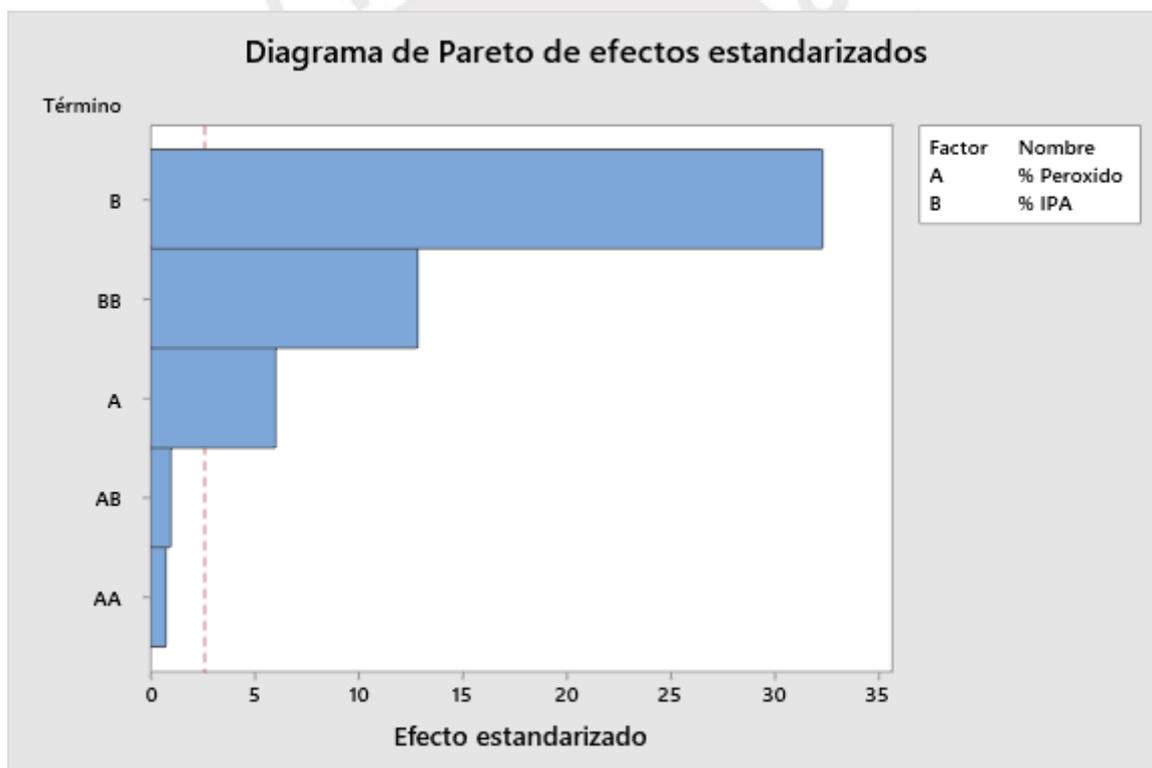
Basados en el análisis estadístico el modelo polinómico dado para la respuesta del porcentaje de lípidos totales está en la siguiente ecuación que describe el modelo buscado:

$$\text{Porcentaje de lípidos totales} = + 58,56412 - 0,149283 * \text{Peróxido} - 1,15618 * \text{IPA} - 0,001524 * \text{Peróxido} * \text{IPA} - 0,002287 * \text{Peróxido}^2 + 0,006057 * \text{IPA}^2$$

La Tabla 16 muestra que el modelo cuadrático utilizado es significativo con un valor de F de 278,44 con una probabilidad menor que 0,0001. Además, evidencia que los factores de tratamiento en este caso el peróxido de hidrógeno (peróxido) y el alcohol iso-propílico (IPA) tienen un efecto significativo en la respuesta de porcentaje de lípidos totales. Además, se observa que el alcohol iso-propílico tiene un mayor efecto que el peróxido de hidrógeno.

Tabla 16*ANOVA - Modelo cuadrático del porcentaje de lípidos totales*

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	296,08	5	59,22	278,44	< 0,0001
A-Peróxido	7,02	1	7,02	33,03	0,0022
B-IPA	258,03	1	258,03	1213,25	< 0,0001
AB	0,2096	1	0,2096	0,9853	0,3665
A²	0,1200	1	0,1200	0,5643	0,4864
B²	35,16	1	35,16	165,31	< 0,0001
Residual	1,06	5	0,2127		
Falta de ajuste	0,6567	3	0,2189	1,08	0,5147
Error Puro	0,4067	2	0,2033		
Total	297,14	10			

*Figura 20 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados del porcentaje de lípidos residuales*

El diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el porcentaje de lípidos residual (figura 20) se observa la interacción de los efectos en relación la respuesta obtenida. Se identifica que el alcohol iso-propílico (B y BB) es más significativo que

el peróxido de hidrógeno(B) este fenómeno se debe principalmente a las propiedades desengrasantes del alcohol iso-propílico.

El valor F de falta de ajuste de 1,08 implica que la falta de ajuste no es significativa en relación con el error puro. Existe una probabilidad del 51,47% de que un valor F de falta de ajuste tan grande se produzca debido al ruido. La falta de ajuste no significativa es óptima porque el objetivo es que el modelo se ajuste. El análisis en la superficie de respuesta para el porcentaje de lípidos totales se puede observar en la figura 21.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Lípidos (%)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
2,3  18,4

X1 = A: Peroxido
X2 = B: IPA

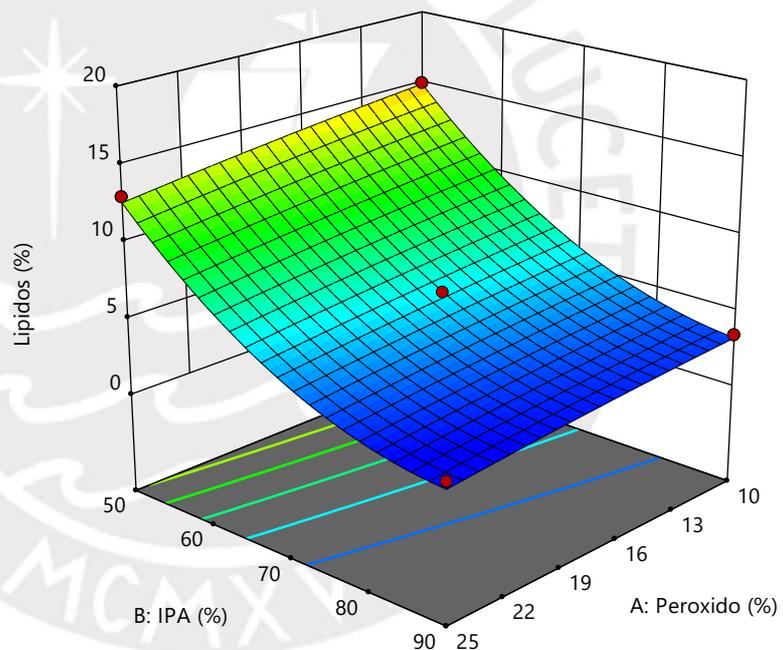


Figura 21 Superficie de respuesta para el porcentaje de lípidos totales

Usando el coeficiente de determinación R^2 expuesto en la Tabla 17, se demuestra que el R^2 previsto está razonablemente de acuerdo con el R^2 ajustado, es decir, la diferencia es menor que 0,2. Esto quiere decir que del 99 % de R^2 es el 97,8% de los datos del modelo para el porcentaje de lípidos totales. Un valor alto también se

debe a la falta de réplicas experimentales por las consideraciones de materia prima en el experimento.

Tabla 17

Ajuste estadístico del modelo para el porcentaje de lípidos totales

R² (1)	R² Ajustado (2)	R² Predicción (3)	(2)-(3)	Precisión Adecuada
0,9964	0,9928	0,9784	0,0145	49,1454

7.3. Optimización de factores para minimizar el % de lípidos totales.

En el caso de la reducción del porcentaje de lípidos, se minimizaron los factores de concentración de peróxido de hidrógeno y alcohol iso-propílico con la finalidad de disminuir costos en el uso de reactivos

La configuración optimizada es una solución de peróxido de hidrógeno al 12% y el alcohol iso-propílico al 80 %. La deseabilidad general o combinada fue del 0,43 establecida en la tabla 18. Con esos requisitos, se estimaron cinco posibles soluciones que se resumen en la tabla 19.

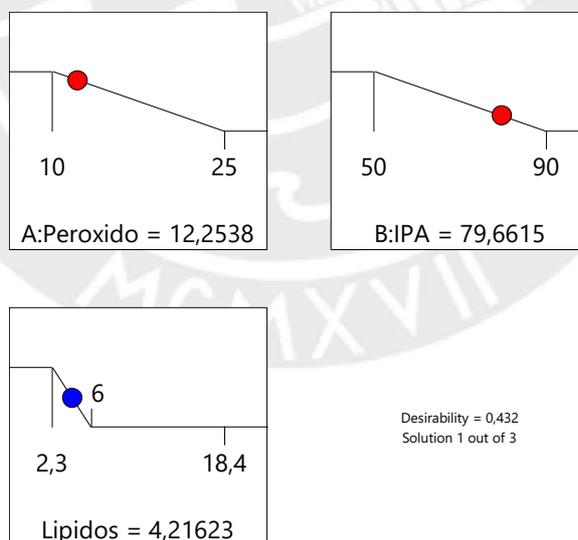


Figura 22. Rampas de solución óptima para factores y respuestas de porcentaje de lípidos totales

Tabla 18

Resumen de requerimientos de optimización lípidos

Factor	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Peso inferior	Peso superior	Importancia
A: Peróxido	Minimizar	10	25	1	1	3
B: IPA	Minimizar	50	90	1	1	5
lípidos	Minimizar	2,3	6	1	1	5

Tabla 19

Soluciones propuestas por el modelo de optimización lípidos

Número	peróxido	IPA	lípidos	Deseabilidad
1	12,254	79,662	4,216	0,432 Seleccionado
2	12,200	79,673	4,219	0,432
3	12,308	79,645	4,215	0,432
4	12,184	79,672	4,22	0,432
5	12,121	79,692	4,222	0,432

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Overlay Plot
Lípidos
● Design Points

X1 = A: Peróxido
X2 = B: IPA

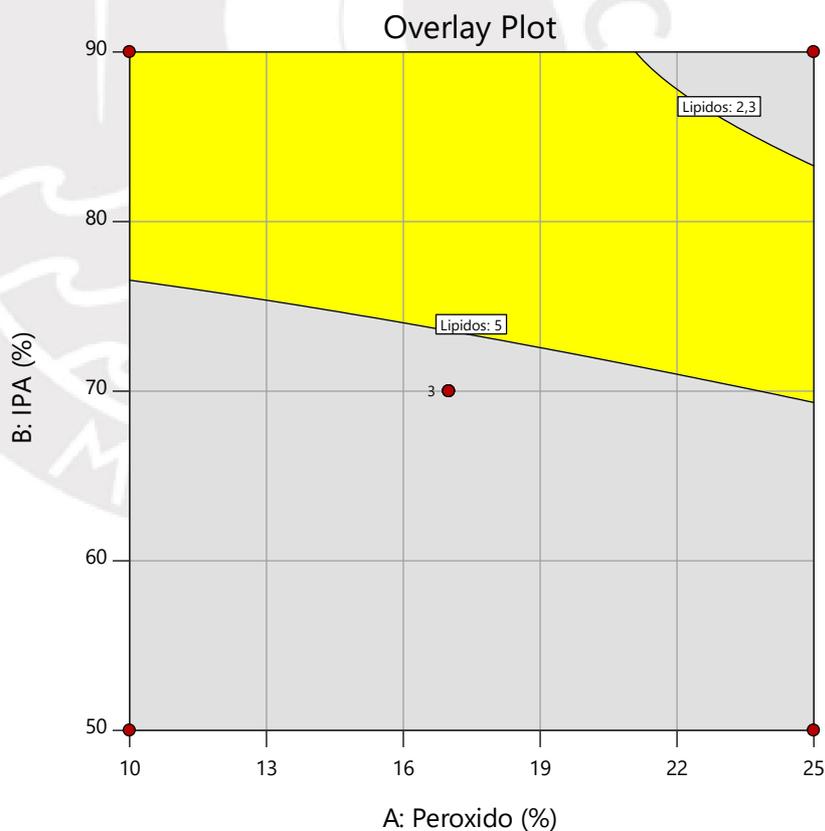


Figura 23. Gráfica de predicción de zona óptima de porcentaje de lípidos totales

No hay mucha diferencia entre las soluciones de optimización proporcionadas por el software y las respuestas se diferencian por decimales ante lo cual se redondeó el primer valor a una solución de peróxido de hidrogeno al 12% y alcohol iso-propílico al 80%. En la figura 23 se muestra la zona optima de porcentaje de lípidos totales. Utilizando el modelo de optimización calculado se prepararon por triplicado soluciones de peróxido de hidrógeno de 12% y el alcohol iso-propílico a 80 %. Se realizó el experimento y se logró obtener el valor de la media calculada de 4 % de lípidos totales con lo cual se logró optimizar el proceso con la predicción del modelo utilizado. El resumen se describe en la tabla 20.

Tabla 20

Resumen del proceso de reducción de lípidos

Configuración	Peróxido 12%; IPA 80%		
Resultado pruebas realizadas	4,1	3,8	4,3
Media Calculada	4,17959	Media Obtenida	4,06667

7.4. Respuesta porcentaje de calcio residual

En el caso del porcentaje residual de calcio, se encontró que la respuesta obtenida luego de los tratamientos fue del 2 al 22 %. Las respuestas se describen en la tabla 21.

Tabla 21

Respuesta obtenida en el experimento de porcentaje de calcio residual

Orden	Orden aleatorio	Factor 1	Factor 2	Respuesta
		A: Temperatura Grados centígrados	B: Tiempo minutos	Calcio residual %
2	1	60	30	22
3	2	25	120	16
7	3	42	11	48
9	4	42	75	16
8	5	42	140	5
4	6	60	120	2
10	7	42	75	18
11	8	42	75	17
1	9	25	30	42
6	10	67	75	2
5	11	17	75	29

La siguiente ecuación describe y resume el modelo polinómico para la respuesta al porcentaje de calcio residual.

$$\text{Porcentaje de Calcio residual} = 75,3619 + -0,447922 * \text{Temp} + -0,722069 * \text{Time} + 0,00197017 * \text{Temp} * \text{Time} + -0,0025215 * \text{Temp}^2 + 0,0022848 * \text{Time}^2$$

Para el análisis de la respuesta porcentaje residual de calcio se utilizó un modelo cuadrático tipo 3 el cual se describe en la tabla 22. Se observa que el modelo es significativo por poseer un valor de p por debajo del 0,001. Los factores estudiados tiempo (time) y temperatura (temp) tienen un efecto significativo sobre la variable de respuesta, y en la evaluación de los cuadrados nos indica que el tiempo de exposición al ácido clorhídrico tiene una respuesta favorable. El valor de F de la falta de ajuste del modelo es de 9,25 con un valor de p de 0,09 indicando que el modelo se ajusta a los datos del experimento. El análisis en la superficie de respuesta para el porcentaje de lípidos totales se puede observar en la figura 25.

Tabla 22
ANOVA - Modelo cuadrático del porcentaje de calcio residual

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	Valor F	Valor p
Modelo	2240,42	5	448,08	75,27	0,0001
A-Temp	654,76	1	654,76	109,99	0,0001
B-Time	1433,99	1	1433,99	240,90	< 0,0001
AB	9,63	1	9,63	1,62	0,2593
A²	3,46	1	3,46	0,5816	0,4801
B²	125,56	1	125,56	21,09	0,0059
Residual	29,76	5	5,95		
Falta de ajuste	27,76	3	9,25	9,25	0,0991
Error Puro	2,00	2	1,0000		
Total	2270,18	10			

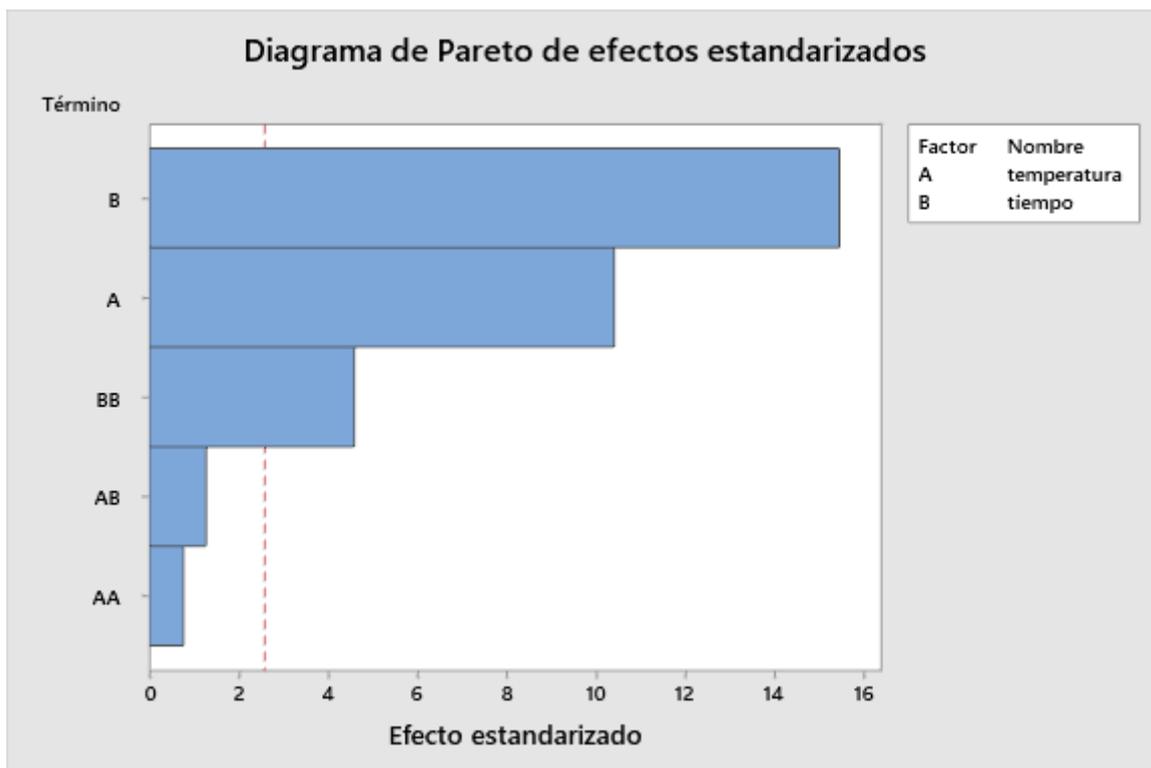


Figura 24 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el porcentaje de calcio residual

El diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el porcentaje de calcio residual (figura 24) se observa la interacción de los efectos en relación la respuesta obtenida. Se identifica que el tiempo de reacción (B y BB) es más significativo que la temperatura de reacción (A) incluso no se evidencia aporte del sinergismo de tiempo y temperatura de reacción tenga una mayor significancia que sus factores por sí solos.

El valor del R^2 previsto está relacionado con el valor del R^2 ajustado, es decir, la diferencia es menor que 0,2. Esto quiere decir que del 98 % de R^2 el 91% de los datos del modelo para % de calcio residual son confiables. La información se encuentra detallada tabla 23.

Tabla 23

Ajuste estadístico del modelo para porcentaje de calcio residual

R^2 (1)	R^2 Ajustado (2)	R^2 Predicción (3)	(2)-(3)	Precisión Adecuada
0,9869	0,9738	0,9108	0,063	25,2498

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

%ca (%)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

2  48

X1 = A: Temp

X2 = B: Time

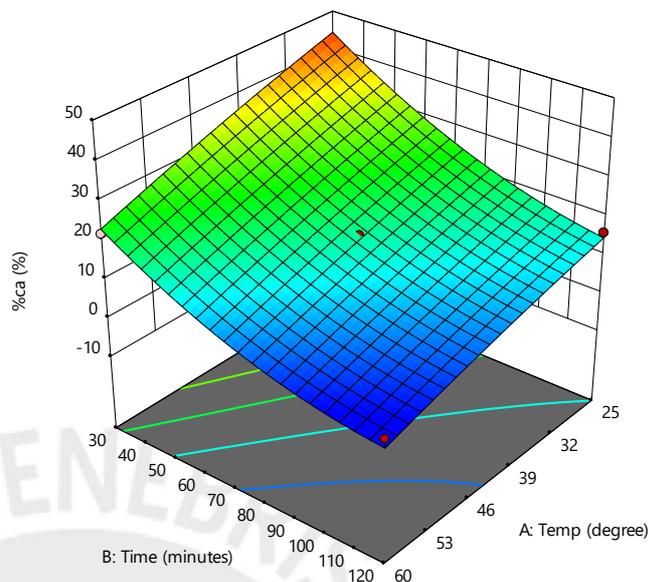


Figura 25 Superficie de respuesta para el porcentaje de calcio residual

7.5. Optimización de factores para minimizar el % de calcio residual

Al finalizar el experimento anterior, todos los tejidos que se incluían en el reactor de desmineralizado presentaban un 4% de lípidos totales para facilitar el proceso de desmineralizado. El objetivo de optimización es buscar la temperatura estable y el tiempo necesario para obtener un tejido desmineralizado con menos del 8% de calcio residual. En estudios previos, se encontró que más tiempo del necesario reduce el nivel de calcio residual pero también afecta la estructura del tejido, y en algunos casos dañándolo.

La configuración optimizada se planteó en buscar reducir la temperatura, mantener el tiempo necesario y mantener en un rango el porcentaje de calcio residual entre 6 y 7 %. Se describe la optimización en la Tabla 24 y el gráfico de optimización en la figura 27.

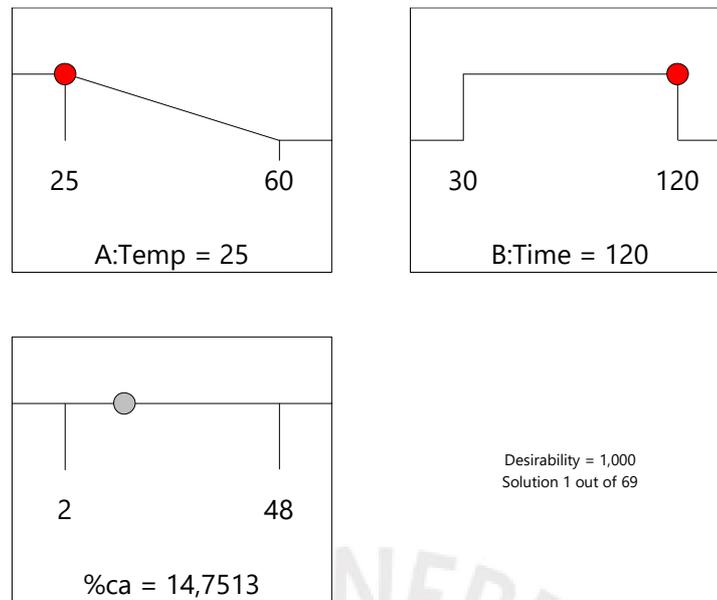


Figura 26. Rampas de solución óptima para factores y respuesta de calcio residual

Tabla 24

Resumen de requerimientos de optimización calcio

Factor	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Peso inferior	Peso superior	Importancia
A: Temperatura	Minimizar	25	60	1	1	3
B: Tiempo	En rango	30	120	1	1	3
% Calcio residual	En rango	6	7	1	1	5

Tabla 25

Soluciones propuestas por el modelo de optimización calcio

Numero	Temperatura	Tiempo	% de Ca	Deseabilidad
1	44,980	120,000	7,000	0,429 Seleccionado
2	45,048	119,651	7,000	0,427
3	45,359	120,000	6,833	0,418
4	45,363	118,101	7,000	0,418
5	45,931	120,000	6,581	0,402

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Overlay Plot
%ca
● Design Points

X1 = A: Temp
X2 = B: Time

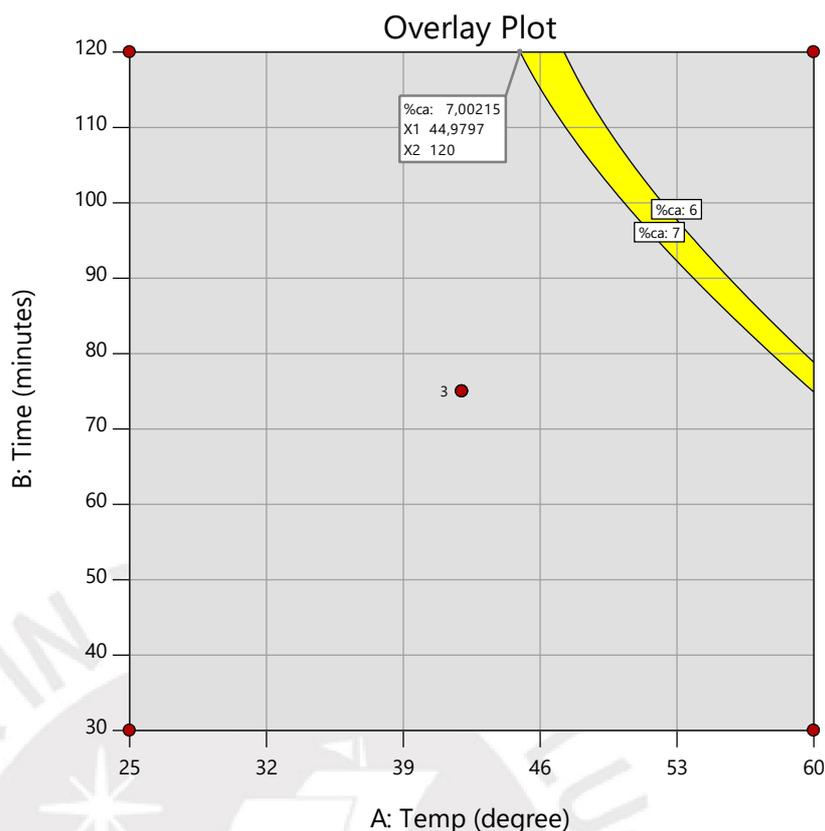


Figura 27. Gráfica de predicción de zona óptima de porcentaje de calcio residual

El modelo de optimización seleccionó 5 posibles soluciones según la deseabilidad (tabla 25), las cuales no difieren mucho entre sí, por lo que se optó por seleccionar la primera para la ejecución de los experimentos de optimización. Se realizaron tres réplicas, logrando una relación de la media calculada con la media obtenida de los resultados. De esta manera, se validan los resultados de la optimización y concluimos que la optimización propuesta cumple con los objetivos establecidos, detallados en la tabla 26.

Tabla 26

Resumen del proceso de optimización calcio

Configuración	Temperatura 45 °C; Tiempo 120 minutos		
Resultado pruebas realizadas	7,2	6,8	6,9
Media Calculada	6,99	Media Obtenida	6,96

En el análisis de los ensayos, se evidenció que al aumentar la temperatura el tiempo de desmineralizado era menor, pero por motivo de seguridad del producto se prefirió minimizar la temperatura sobre el tiempo para lograr los objetivos propuestos (figura28) para evitar degradación del producto.

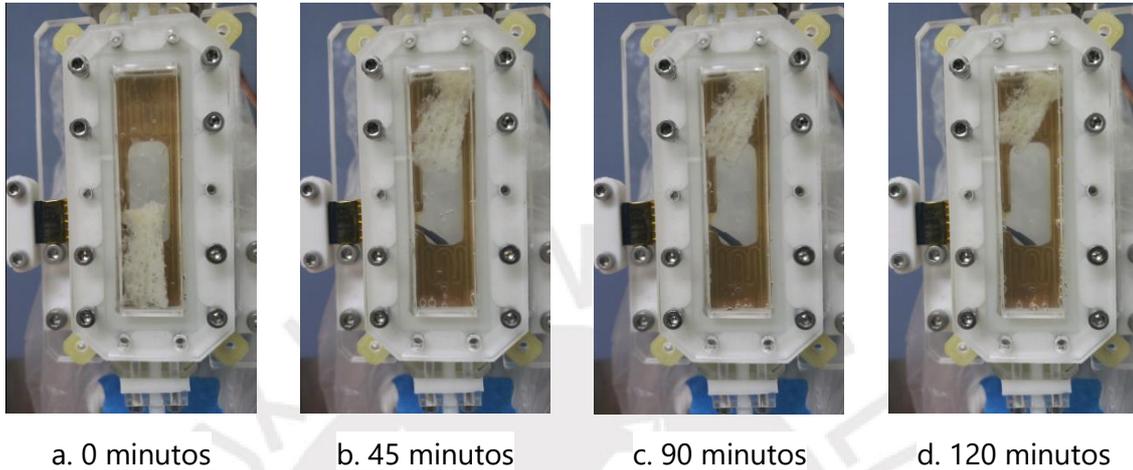


Figura 28 Experimento de validación a 45 °C y 120 minutos

En el desarrollo del presente trabajo, se evidenció uno de los retos clásicos en manufactura de bioprocesos en ingeniería de tejidos que consiste en poder escalar del desarrollo de un proceso biotecnológico artesanal que son actividades que dependen de la experiencia y destreza del operador de pequeña escala a uno semi-automatizado de mediana escala.

En el artículo *"Tissue engineering and regenerative medicine: manufacturing challenges"* por Willams D.J. et al [44] explica las ventajas de pasar de una industria biotecnológica de primera a segunda generación, los beneficios de la semi-industrialización de procesos se traducen en la reducción de costos, y la viabilidad de establecer posibilidades de escalar ampliando la capacidad de producción, sin afectar los procesos de calidad. Este autor explica que las ventajas de pasar de una industria biotecnológica de primera a segunda generación, los beneficios de la semi-industrialización de procesos se traducen en la reducción de costos, y la viabilidad

de establecer posibilidades de escalar ampliando la capacidad de producción, sin afectar los procesos de calidad.

La ejecución del proyecto aplicado desde la perspectiva de la ingeniería biomédica permitió integrar todos los saberes necesarios (ciencias de la salud e ingeniería) para visualizar el problema y su respectiva solución desde otra perspectiva. Es importante reconocer la participación de la ingeniería biomédica y tecnologías sistémicas en la innovación e investigación en salud [45][46]. Pensar en el proceso de forma integral nos ayudó a comprender que, para llegar a cumplir con el objetivo de optimizar los procesos de manufactura, la tecnología de limpieza de tejidos actual no era suficiente. Se tuvo que desarrollar un prototipo suficiente para emular las condiciones de vacío requeridas [22,33] y generar un lavado por pulso para desengrasar y desmineralizar el tejido [29,30]. Este desarrollo hizo viable el análisis por lo que fue parte fundamental para atender el problema desde otra perspectiva y enfocarnos en otros aspectos como el uso de solventes y tiempo de reacción [46].

En el proceso de desmineralización, se encontró la necesidad de optimizar el método de lavado y desengrasado. Varios autores lo consideran una etapa importante [29,37,47] porque los restos lipídicos interfieren en el proceso de desmineralizado. El alcohol iso-propílico y el peróxido de hidrógeno son una alternativa económica, no tóxica para operadores y el medio ambiente. La combinación de peróxido de hidrógeno 12% y alcohol iso-propílico 80% en una temperatura estable de 40°C mediante un reactor de flujo unidireccional, logran un porcentaje de lípidos totales del 4 %.

En este trabajo, el método de superficie de respuesta facilitó un modelo predictivo estadísticamente validado [40,43], adecuado para un proceso de optimización. El uso del Diseño Central Compuesto de la metodología de superficie de respuesta fue utilizado porque el plan del diseño requirió de un experimento secuencial

permitiendo planificar adecuadamente y minimizando el número de experimentos a ejecutar lo que ha resultado en un ahorro considerable de valiosas muestras de donantes. Sin embargo, hubiera sido óptimo lograr un mayor número de replicas, pero por el difícil acceso a la materia prima solo se realizó las mínimas requeridas.

La etapa de desmineralizado mostró alta eficiencia al realizar la reacción con una solución de ácido clorhídrico al 0,5 N y 18 mL con una temperatura estable de 45 °C y un tiempo de 120 minutos de forma pulsátil. Este efecto se logró gracias a la bomba de jeringuilla a una frecuencia de 10 mL por minuto. Se alcanzó a elaborar un producto con una concentración de calcio residual por debajo del 8%. En los métodos evaluados en la literatura, el factor tiempo llegaba a sobrepasar las 48 horas sin control de la temperatura [21], además de requerir cambio de solución ácida. El aporte de la temperatura facilitó la acción de la solución ácida generando un sinergismo del efecto [[31,34], evitando la necesidad de realizar un recambio de solución.

Al ser un proceso relativamente simple, siendo detallado en artículos y patentes, el proceso de validación del producto y sus características generales ya son conocidas; por lo tanto, las pruebas de material a realizar de forma primaria son la evaluación de las características por histología. Pero en este caso lo que se debería evaluar y será un tema de estudio a futuro es la capacidad osteoinductora del producto mediante la norma "Guía estándar para la evaluación in vivo del potencial osteoinductor de materiales que contienen hueso desmineralizado (DBM) ASTM F2529 – 13". Dicho estudio tiene la finalidad de cuantificar la capacidad de formar hueso ectópico en tejido muscular de ratones atímicos, de esta manera se valida que el proceso de manufactura no altere la capacidad inductora del hueso. Este tipo de ensayo requiere de un bioterio autorizado y certificado para realizar ensayos en animales. Si bien la norma ASTM F2529-13 recomienda este ensayo, su

cumplimiento no es requerido por los entes reguladores en Ecuador ni en el Perú para la manufactura y uso de sustitutos óseos.

8. Conclusiones

Se evidenció la necesidad de fabricar tecnología específica para automatizar procesos logrando pasar de tareas artesanales que son operadores dependientes a tareas semi-automatizadas. Pese a existir, varias patentes específicas para optimizar procesos en bancos de tejidos, cabe resaltar que muchos de estos dispositivos y principios no están disponibles comercialmente, probablemente debido a la falta de demanda o el reducido número de bancos de tejidos con este nivel de complejidad. Alternativamente, es posible que estas tecnologías solo sean para el uso exclusivo de estos bancos que desarrollan sus propios productos para la venta al público.

Un aspecto para resaltar en la parte de ingeniería en general fue el aprovechamiento de las tecnologías de prototipado rápido y manufactura digital, lo que permitió desarrollar un dispositivo que se ajuste a las necesidades del proyecto a un bajo costo y un menor tiempo de desarrollo. De esta manera, se lograron implementar diez iteraciones hasta llegar al prototipo final. Las tecnologías de manufactura digital empleadas abarcaron desde la construcción física de los dispositivos hasta el control por software de sensores y actuadores.

En este proyecto, se utilizó la impresión 3D para armar los componentes estructurales, el corte láser para elaborar la cámara de reacción, mecanizado por CNC para elaborar los moldes y válvulas y el uso de la placa de prototipado Arduino. El componente clave para este proyecto fue lograr la automatización de procesos, y esto se realiza mediante el uso de sensores y actuadores electrónicos (motores y servomotores) los que brindan control mecánico de las válvulas y bomba de jeringuilla. Esto se logró mediante el uso de la placa de prototipado Arduino, que permite controlar sensores y actuadores mediante un lenguaje C++ desde el

ordenador. Arduino es usado en múltiples proyectos de investigación por la gran comunidad que comparte proyectos y líneas de códigos. Incluso es usado en proyectos de laboratorio que requieren automatización de sus procesos [48].

Se concluyó que la etapa más importante en el proceso es el lavado y desengrasado del tejido, la aplicación de técnicas mecánicas como el lavado de flujo con control de temperatura provisto por el micro-reactor minimizó el uso de solventes o detergentes enzimáticos descritos en otros trabajos consultados.

9. Recomendaciones

Si bien el sistema de lavado por pulso del micro-reactor de flujo que usa la presión negativa por el vacío tuvo un rol importante como un mecanismo de lavado mecánico sin manipulación de tejido en un entorno cerrado; el efecto de cavitación de líquido a temperaturas altas ayudó al lavado del tejido. Este proceso tiene potencial de optimización mediante la aplicación de dinámica de fluidos computacional. Esta tecnología permitiría especificar los requerimientos de líquidos y velocidades reales. Es necesario la construcción de un reactor de flujo para desmineralizado para la producción a gran escala. Además, está en plan de desarrollo la adquisición o construcción de un molino de hueso para lograr aprovechar el tejido óseo cortical para su desmineralizado.

En este proyecto, solo se utilizó tejido óseo proveniente de cóndilos femorales, se debería investigar si el proceso y sus parámetros pueden aplicarse a tejido óseo obtenido de otras zonas como la cresta ilíaca o los cuerpos vertebrales. El factor diferenciador sería la cantidad de trabéculas y las características mecánicas del tejido a desmineralizar. La importancia de este posible estudio radica en la diferencia de la capacidad de procuración de tejidos de los bancos de tejidos.

Hay trabajos que utilizan ácido acético y EDTA, como agente desmineralizador, sería interesante lograr alternativas al uso de ácidos inorgánicos como el Ácido clorhídrico.

Finalmente, sería de una gran utilidad correlacionar los factores estudiados y la capacidad osteoinductiva del tejido óseo desmineralizado aplicando la norma "Guía estándar para la evaluación in vivo del potencial osteoinductor de materiales que contienen hueso desmineralizado (DBM) ASTM F2529 – 13" como método de evaluación biológica de la idoneidad de las variables optimizadas para el protocolo implementado en este estudio.



10. Referencias bibliográficas

1. Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S, Marshall R. Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins. *International Orthopaedics*. 2017;41:1065–9.
2. Urist M. Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, NY)*. 1965;150:893–9.
3. Phillips GO. Multi-Media Distance Learning Package on tissue Banking, Module 4, Procurement. . National University of Singapore, IAEA/NUS Regional Training Center (RCA), IAEA/NUS Interregional Training Centre, Singapore . 1997;
4. Gruskin E, Doll BA, Futrell WF, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:1063–77.
5. grafting GV implant. *Natural history of autografts and allografts*. 1992;
6. Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury*. 2011;42:S26–9.
7. Khan S, Jr CF, the ... SH of. *The biology of bone grafting*. 2005;
8. Shehadi J, international E neurology. Review of commercially available demineralized bone matrix products for spinal fusions: A selection paradigm. 2017;
9. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014;25:2445–61.
10. Maye T. *Standards for Tissue Banking (14th Edition)*. American Association of Tissue Banks. 2017;
11. Ceballos M, Jaramillo W. *Instrucciones Tecnicas del Banco de Tejidos*. Hospital Luis Vernaza. 2018;
12. BURWELL R, GOWLAND G, DEXTER F. STUDIES IN THE TRANSPLANTATION OF BONE. VI. FURTHER OBSERVATIONS CONCERNING THE ANTIGENICITY OF HOMOLOGOUS CORTICAL AND CANCELLOUS BONE. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1963;45:597–608.

13. Jiang T, Rulka JI, Laurencin CT. Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering, 2nd Edition. *astm*. 2014;333–65.
14. Perry C. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clinical orthopaedics and related research*. 1999;71–86.
15. Greenwald A, Boden S, Goldberg V, Khan Y, Laurencin C, Rosier R, et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98–103.
16. Bauer T, Related MG and. Bone graft materials: an overview of the basic science. 2000;
17. Michaud R, Drabu K. Bone allograft banking in the United Kingdom. *J Bone Jt Surg Br Volume*. 1994;76-B:350–1.
18. Ohta H, Wakitani S, Tensho K, Horiuchi H, Wakabayashi S, Saito N, et al. The effects of heat on the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2005;23:420–5.
19. Zhang M, Powers R, Wolfenbarger L. Effects of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *Journal of periodontology*. 1997;68.
20. Vukičević S, Stavljenić A, and PM. Discovery and clinical applications of bone morphogenetic proteins. 1995;
21. Phillips GO. Multi-Media Distance Learning Package on tissue Banking, Module 5, Processing. National University of Singapore, IAEA/NUS Regional Training Center (RCA), IAEA/NUS Interregional Training Centre, Singapore . 1997;
22. Eagle MJ, Rooney P, Kearney JN. Development of an improved bone washing and demineralisation process to produce large demineralised human cancellous bone sponges. *Cell and Tissue Banking*. 2015;16:569–78.
23. Chou S, Spoo W. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR CHLOROFORM. In: SERVICES USDOHAH, editor. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; 1997.

24. Eagle M, Rooney P, Kearney J. Production of an osteoinductive demineralised bone matrix powder without the use of organic solvents. *Cell and Tissue Banking*. 2015;16:433–41.
25. Schallenberger M, Lovick H, Locke J, Meyer T, Juda G. The effect of temperature exposure during shipment on a commercially available demineralized bone matrix putty. *Cell and Tissue Banking*. 2016;17:677–87.
26. Jurema A, Souza M de, Torres C, Borges A, Caneppele T. Effect of pH on whitening efficacy of 35% hydrogen peroxide and enamel microhardness. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 2018;30:E39–44.
27. DePaula CA, Truncale KG, Gertzman AA, Sunwoo MH, Dunn MG. Effects of Hydrogen Peroxide Cleaning Procedures on Bone Graft Osteoinductivity and Mechanical Properties. *Cell and Tissue Banking*. 2005;6:287–98.
28. Eagle M, Man J, Rooney P, Hogg P, Kearney J. Assessment of an improved bone washing protocol for deceased donor human bone. *Cell and Tissue Banking*. 2015;16:83–90.
29. Haimi S, Wahlman M, Mannila M, Virtanen V, Hirn M. Pulse-lavage washing is an effective method for defatting of morselized allograft bone in the operating theater. *Acta Orthop*. 2009;79:94–7.
30. Moore-Smith D, O'leary R, 6 095. Pulsatile acidification wave demineralization process for producing osteoinductive bone; and osteoinductive bone produced thereby. 2003;
31. Castro-Ceseña AB, Novitskaya EE, Chen P-Y, Hirata GA, McKittrick J. Kinetic studies of bone demineralization at different HCl concentrations and temperatures. *Mater Sci Eng C*. 2011;31:523–30.
32. Bracey DN, Seyler TM, Jinnah AH, Lively MO, Willey JS, Smith TL, et al. A Decellularized Porcine Xenograft-Derived Bone Scaffold for Clinical Use as a Bone Graft Substitute: A Critical Evaluation of Processing and Structure. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018;9:45.

33. Eagle MJ, Rooney P, Kearney JN. Optimized demineralization of human cancellous bone by application of a vacuum. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2015;103:1023–9.
34. Figueiredo M, Cunha S, Martins G, Freitas J, Judas F, Figueiredo H. Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. *Chem Eng Res Des*. 2011;89:116–24.
35. Hofmann A, Konrad L, Hessmann MH, Küuchle R, Korner J, Rompe JD, et al. The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function. *J Orthopaed Res*. 2005;23:846–54.
36. Whitten KW, Gailey KD, Davis RE, Sandoval M, Muradás R. *Química general*. McGraw-Hill. 1992;
37. Rheineck AE, Gisvold O. AVOIDANCE OF EMULSIFICATION IN DEFATTING OPERATIONS. *Science*. 1933;78:215–6.
38. Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, Whitesides GM. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem*. 1998;70:4974–84.
39. Takahashi CN, Miller AW, Ekness F, Dunham MJ, Klavins E. A Low Cost, Customizable Turbidostat for Use in Synthetic Circuit Characterization. *Acs Synth Biol*. 2015;4:32–8.
40. Jiménez-Contreras E, Torres-Salinas D, Moreno RB, Baños RR, López-Cózar ED. Response Surface Methodology and its application in evaluating scientific activity. *Scientometrics*. 2008;79:201–18.
41. Diagnostics R. Method sheet Cobas, Calcium gen 2. Roche Diagnostics; 2019.
42. Spinreact. Determinacion cuantitativa de lipidos totales IVD. Spinreact; 2016.
43. R. M, D.C. M, C.M. A-C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc; 2009.
44. Williams DJ, Sebastine IM. Tissue engineering and regenerative medicine: manufacturing challenges. *Iee Proc - Nanobiotechnology*. 2005;152:207.
45. Goodman CS, Gelijns AC. The changing environment for technological innovation in health care. *Baxter Heal Policy Rev*. 1996;2:267–315.

46. Yadav D, Tanveer A, Malviya N, Yadav S. Omics Technologies and Bio-Engineering. 2018;3–23.
47. Kalus U, Müller H, Baudisch H, Birkhahn H-J, Versen R von, Hansen A, et al. A method for the determination of the residual chloroform in defatted cancellous bone transplants. Cell Tissue Bank. 2005;6:71–5.
48. Arasu K. Automated experimental procedure using sensors and Arduino. 2017 Int Conf Inventive Comput Informatics Iccici. 2017;383–7.



11. Anexos

11.1. Ficha técnica del Ácido clorhídrico usado en el trabajo

Ácido clorhídrico 36,5 - 38,0%, J.T. Baker®

Proveedor: AVANTOR PERFORMANCE MATERIALS MX



Peligro

Para el análisis de trazas de metales. Se proporciona certificado de análisis de lotes.

Formula: HCl
MW: 36.46 g/mol
Boiling Pt: 110 °C (1013 hPa)
Mezcla Pt: -30 °C
Densidad: 1,18 g/cm³ (20 °C)
Storage Temperature: Ambiente

MDL Number: MFCD00011324
Núm. CAS: 7647-01-0
EINECS: 231-595-7
UN: 1789
ADR: 8,II

Resultados test especificaciones

ACS - Ensayo (como HCl) (mediante valoración de ácido-base)	36,5 - 38,0 %
ACS - Color (APHA)	<= 10
ACS - Residuo después de encendido	<= 3 ppm
ACS - Gravedad específica a 60°/60 °F	1,185 - 1,192
ACS - Bromuro (Br)	<= 0,005 %
ACS - Sustancias orgánicas extraíbles	<= 5 ppm
ACS - Cloro libre (como Cl ₂)	<= 0,5 ppm
Fosfato (PO ₄)	<= 0,05 ppm
Sulfato (SO ₄)	<= 0,5 ppm
Sulfito (SO ₃)	<= 0,8 ppm
Amonio (NH ₄)	<= 3 ppm
Trazas de impurezas - Arsénico (As)	<= 0,01 ppm
Trazas de impurezas - Aluminio (Al)	<= 10,0 ppb
Arsénico y antimonio (como As)	<= 5,0 ppb
Trazas de impurezas - Bario (Ba)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Berilio (Be)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Bismuto (Bi)	<= 10,0 ppb
Trazas de impurezas - Boro (B)	<= 20,0 ppb
Trazas de impurezas - Cadmio (Cd)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Calcio (Ca)	<= 50,0 ppb
Trazas de impurezas - Cromo (Cr)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Cobalto (Co)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Cobre (Cu)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Galio (Ga)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Germanio (Ge)	<= 3,0 ppb
Trazas de impurezas - Oro (Au)	<= 4,0 ppb
Metales pesados (como Pb)	<= 100,0 ppb
Trazas de impurezas - Hierro (Fe)	<= 15,0 ppb
Trazas de impurezas - Plomo (Pb)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Litio (Li)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Magnesio (Mg)	<= 10,0 ppb
Trazas de impurezas - Manganeso (Mn)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Mercurio (Hg)	<= 0,5 ppb

Trazas de impurezas - Molibdeno (Mo)	<= 10,0 ppb
Trazas de impurezas - Níquel (Ni)	<= 4,0 ppb
Trazas de impurezas - Niobio (Nb)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Potasio (K)	<= 9,0 ppb
Trazas de impurezas - Selenio (Se), solo para información	≤ 9.0 ppb
Trazas de impurezas - Silicio (Si)	<= 100,0 ppb
Trazas de impurezas - Plata (Ag)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Sodio (Na)	<= 100,0 ppb
Trazas de impurezas - Estroncio (Sr)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Tantalio (Ta)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Talio (Tl)	<= 5,0 ppb
Trazas de impurezas - Estaño (Sn)	<= 5,0 ppb
Trazas de impurezas - Titanio (Ti)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Vanadio (V)	<= 1,0 ppb
Trazas de impurezas - Cinc (Zn)	<= 5,0 ppb
Trazas de impurezas - Circonio (Zr)	<= 1,0 ppb
Trace Impurities - Zirconium (Zr)	≤ 1.0 ppb
Product Information (not specifications):	
Appearance (clear, fuming liquid)	
Meets ACS Specifications	

pedido

Núm. Catálogo VWR	Unidad	Price (IVA no incluido)	Cantidad	Supplier No.
JT9530-0	Each(500ml)	\$1,298.22	⊘	9530-00
	Case de 6 (500 ml)	\$7,789.31	⊘	

[MSDS](#) [MSDS](#)
[Certificados](#)

Este producto está marcado como restringido y sólo pueden ser adquiridos por cuentas aprobado para el envío. Si necesita más ayuda, contacte con nosotros e



11.2. Aprobación por el comité científico del Hospital Luis Vernaza



Guayaquil, noviembre 7 del 2018

Señores
Comisión Científica

De mis consideraciones:

Por medio de la presente informo a ustedes que he procedido a la revisión del Proyecto de investigación del Dr. Winston Jaramillo Cañas:

**"IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE CHIPS DE TEJIDO
ÓSEO ESPONJOSO DESMINERALIZADO EN EL BANCO DE TEJIDOS DEL HOSPITAL
LUIS VERNAZA"**

Se han realizado las correcciones pertinentes, por lo tanto pasa a su conocimiento para su evaluación y aprobación definitiva.

Los investigadores se comprometen a presentar los respectivos avances del estudio a este departamento.

Atte


Junta de Beneficencia de Guayaquil
HOSPITAL LUIS VERNAZA
Dr. Daniel Tettamanti M.
REG. MSP: L. 1.30 No. 29-REG. PROF.: 431
M.A.H.I.
Jefe del Dpto. de Investigación Médica
dtettamanti@central.jbgve.org.ec
PBX: (593) 4 2560300 Ext. 2030



Hospital Luis Vernaza
Departamento de Investigación

PRESENTACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

SECUENCIA:



Firma y Nombre

Dr. Winston Jaramillo

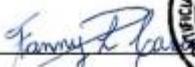
Investigador



Firma y Nombre

Dr. Daniel Tettamanti

Jefe de Departamento de Investigación
Investigación



Firma y Nombre

Dra. Fanny Casado

Asesor Metodológico



Firma y Nombre

Dr. Enrique Uruga

Director de la Comisión de

11.3. Especificaciones técnicas del biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado

Tabla 27

Especificaciones técnicas del biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado

Ítem	Descripción
Energía	Fuente de energía universal para 100-245 V AC/50 -60 Hz, 560 W
Dimensiones	Reactor de flujo y bomba de jeringa: 56 x 15 x 15 cm Dispensador de reactivos: 34 x 10 x 15 cm 8 Cámara de reacción: 12,5 x 5,5 x 2 cm Capacidad cámara de reacción: 7 x 2,5 x 5 cm (Alto x Ancho X Profundidad) 12 cm ³ de capacidad
Control de temperatura	Fuente de calor mediante un calefactor resistivo en una pista
Regulación	Desde 25°C a 100°C
Medición	Desde 25 a 100 en pasos de 1°C
Precisión	+/- 0.4°C (0 hasta 60°C)
Sensor	Termistor NTC de 100K
Presión de trabajo en cámara interna	-240 mm/Hg
válvulas de paso	Servos Mg995 conectado a llave de tres vías marca Baxter controlados por ordenador
Puertos	Permite administrar hasta cinco soluciones
Bombas	Bomba de jeringuilla descartable de 20 mL
Puertos	
Mecanismo de agitación de líquidos	Agitación pulsátil con pistón mediante frecuencia de cinco por minuto
Precisión volumen	+/- 0,08 ml
Temperatura de trabajo	0-40°C
Peso de todos los componentes	1,7 kg
Control del ordenador	Control completo mediante interfaz del software megunlink

11.4. Componentes utilizados para construcción del micro reactor de flujo

Tabla 28

Componentes del biorreactor de flujo unidireccional para desmineralizado

	Nombre del componente	Marca	Cantidad
1	Placa de prototipado Arduino Mega2560 R3	Arduino	1
2	Shield RAMPS 1,4	Genérico	1
3	Endstop v 1.2	Greentech	1
4	Termistor NTC 100k		1
5	Driver A4988	Generico	1
6	Servomotor MG995	Tower pro	3
7	Motor de paso NEMA 17, 1.8º, modelo 42BYGHW811	Generico	1
8	Rodamiento lineal LM8UU		2
9	Acople flexible metálico de 5mm a 8mm		1
10	Varilla Roscada Tornillo 450mm 4 hilos + Tuerca		1
11	Varillas de 8 mm lisa 60 cm		2

Tabla 29

Consumibles del reactor de flujo

	Consumible	Marca	Descripción	Cantidad
1	Llave de tres vías	Marca Nipro	Material policarbonato grado médico, llave de polietileno grado médico;	2
2	Jeringuilla 20 mL	Marca Nipro	Material polipropileno grado medico con escala en 1 ml y adaptador luer lock	1
3	Filtro de jeringa de 0,2 µm; 25 mm diámetro	Marca Sartorius	Membrana de PTFE hidrófobo químicamente inerte	1
4	Llave de tres vías con extensión 20 cm y acople Luer lock	Marca Fortune Medical	Material policarbonato grado médico, llave de polietileno grado médico y extensión de polivinilo	2
5	Equipo de venoclisis	Heiler	Material Polivinilo	2
6	Equipo de extensión de 30 cm	Braun		5

11.5. Configuración de temperatura usada en micro reactor de flujo

```
#define PIDTEMP
#define BANG_MAX 40 // reactor rampa temperatur, valor original 25 o buscar Limits
current to nozzle while in bang-bang mode; 255=full current
#define PID_MAX BANG_MAX // Limits current to nozzle while PID is active (see
PID_FUNCTIONAL_RANGE below); 255=full current
#define PID_K1 0.95 // Smoothing factor within any PID loop
#if ENABLED(PIDTEMP)
  //#define PID_EDIT_MENU // Add PID editing to the "Advanced Settings" menu.
  (~700 bytes of PROGMEM)
  //#define PID_AUTOTUNE_MENU // Add PID auto-tuning to the "Advanced Settings"
  menu. (~250 bytes of PROGMEM)
  //#define PID_DEBUG // Sends debug data to the serial port. Use 'M303 D' to
  toggle activation.
  //#define PID_OPENLOOP 1 // Puts PID in open loop. M104/M140 sets the output
  power from 0 to PID_MAX
  //#define SLOW_PWM_HEATERS // PWM with very low frequency (roughly
  0.125Hz=8s) and minimum state time of approximately 1s useful for heaters driven by a
  relay
  //#define PID_PARAMS_PER_HOTEND // Uses separate PID parameters for each
  extruder (useful for mismatched extruders)
      // Set/get with gcode: M301 E[extruder number, 0-2]
  #define PID_FUNCTIONAL_RANGE 10 // If the temperature difference between the
  target temperature and the actual temperature
      // is more than PID_FUNCTIONAL_RANGE then the PID will be shut off
  and the heater will be set to min/max.

  // If you are using a pre-configured hotend then you can use one of the value sets by
  uncommenting it

  // Ultimaker
  #define DEFAULT_Kp 22.2
```

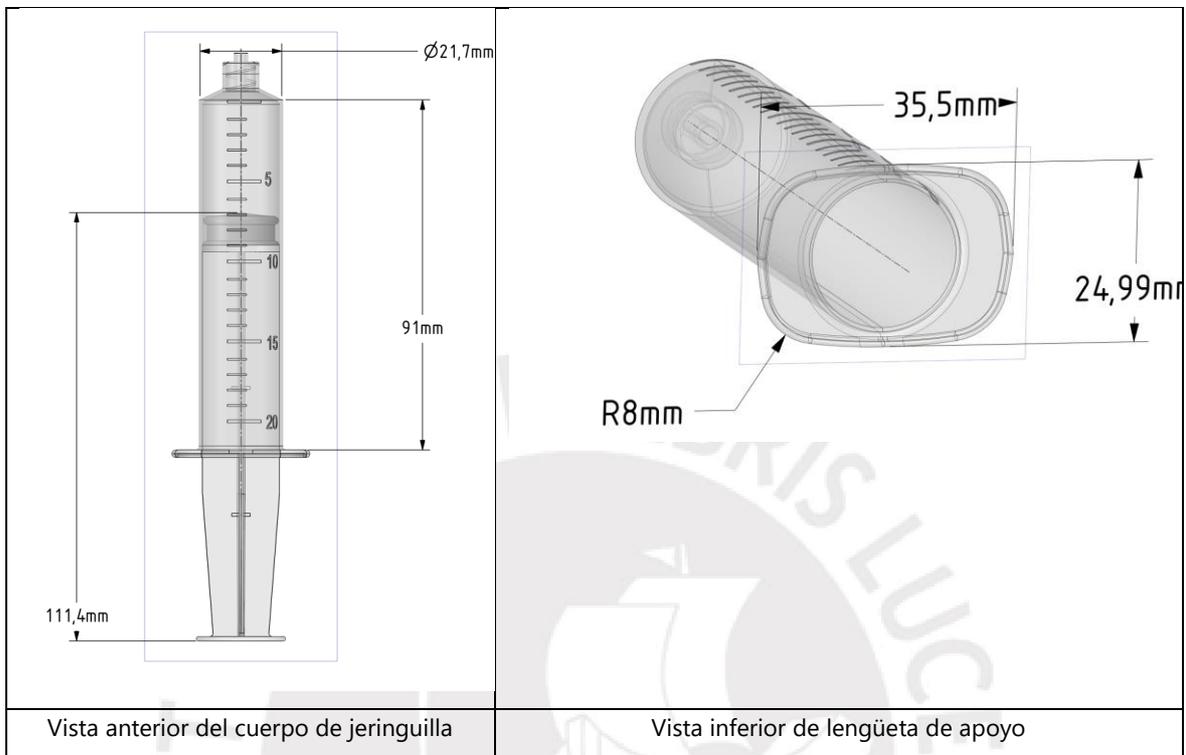
#define DEFAULT_Ki 1.08

#define DEFAULT_Kd 114



11.6. Características de la jeringuilla de 20 ml marca CEGAMED

11.6.1. Cuerpo de la jeringuilla



11.6.2. Embolo de la jeringuilla

