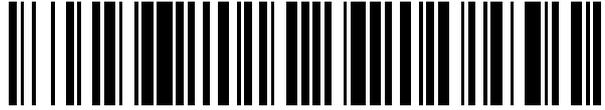


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 302**

51 Int. Cl.:

A61N 1/32 (2006.01)

A61N 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2006 E 06771526 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1888162**

54 Título: **Sistema para modular el desarrollo osteocondral utilizando terapia de campo electromagnético pulsante**

30 Prioridad:

03.06.2005 US 687430 P

23.06.2005 US 693490 P

07.04.2006 US 790128 P

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

26.10.2015

73 Titular/es:

**MEDRELIEF INC. (100.0%)
4800 Montgomery Lane, Suite 801
Bethesda, Maryland 20814, US**

72 Inventor/es:

**KRONBERG, JAMES, W.;
GANNEY, TIMOTHY y
GORDON, STEPHEN, L.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 549 302 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema para modular el desarrollo osteocondral utilizando terapia de campo electromagnético pulsante

5 ANTECEDENTES

Las enfermedades y las lesiones asociadas con los huesos y los cartílagos tienen un impacto significativo en la población. Anualmente se producen aproximadamente cinco millones de fracturas de hueso solo en los Estados Unidos. Aproximadamente el 10% de estas tienen una curación dilatada y, de ellas, se producen entre 150.000 y 200.000 fracturas sin unión a las que acompaña una pérdida de capacidad laboral y de independencia. En el caso del cartílago, las formas graves y crónicas de daños en el cartílago de la articulación de la rodilla pueden conducir a un mayor deterioro del cartílago de la articulación y pueden, en última instancia, conducir a una sustitución total de la articulación de la rodilla. Se llevan a cabo cada año aproximadamente 200.000 operaciones de reemplazo total de la rodilla, y la articulación artificial generalmente dura tan solo entre 10 y 15 años y conduce a pérdidas similares de capacidad laboral y de independencia.

15 Por otra parte, se espera también que la incidencia de las fracturas óseas siga siendo alta a la vista de la incidencia de la osteoporosis como una importante amenaza para la salud pública de unos estimados 44 millones de norteamericanos. Hoy en día, en los Estados Unidos, se estima que 10 millones de personas ya padecen la enfermedad, y se estima que casi 34 millones más tienen una baja masa ósea que les sitúa en un riesgo mayor de osteoporosis. Una de cada dos mujeres y uno de cada cuatro hombres con más de 50 años tendrán una fractura relacionada con la osteoporosis en lo que les queda de vida. La osteoporosis es responsable de más de 1,5 millones de fracturas anualmente, que incluyen 300.000 fracturas de cadera, 700.000 fracturas de vértebras, 250.000 fracturas de muñeca y 300.000 fracturas de otras partes del cuerpo. Los gastos directos nacionales estimados (hospitales y casas de salud) para las fracturas de cadera por osteoporosis fueron de 18.000 millones de dólares en 2002 (Informe Anual de la Fundación Nacional de Osteoporosis –“National Osteoporosis Foundation Annual Report” –, 2002).

Se dispone en la actualidad de algunos tratamientos para tratar fracturas pertinaces, tales como la fijación interna y externa, los injertos óseos o sustitutos de injerto, incluyendo la matriz ósea desmineralizada, los extractos de plaquetas y la proteína de matriz ósea, y la estimulación biofísica, tal como la deformación mecánica aplicada a través de elementos de fijación externos o ultrasonidos y campos electromagnéticos.

35 Similarmente, el tratamiento típico de una lesión de cartílago, dependiendo de la lesión y de la gravedad de los síntomas, consiste en reposo y otros tratamientos conservadores, cirugía artroscópica menor para limpiar y suavizar la superficie de la zona del cartílago dañada, y otros procedimientos quirúrgicos tales como la microfractura, la perforación y la abrasión. Todos estos tratamientos pueden aportar un alivio de los síntomas, pero los beneficios son, por lo común, solo temporales, especialmente si se mantiene el grado de actividad previo a la lesión de la persona.

40 El tejido óseo y otros tejidos tales como los cartílagos responden a las señales eléctricas de una manera fisiológicamente útil. Los dispositivos de estimulación bioeléctrica aplicados a las fracturas sin unión y a las uniones retrasadas se iniciaron en la década de los 60 y en la actualidad se aplican a huesos y cartílagos (Ciombor y Aaron, Foot Ankle Clin, 2005, (4): 579-93). En la actualidad, se ha establecido una aceptación comercial y general de su papel en la práctica clínica. Resultados no tan bien conocidos que se atribuyen a la estimulación bioeléctrica son los cambios de densidad ósea positivos (Tabrah, 1990) y la prevención de la osteoporosis (Chang, 2003). Un reciente informe ofreció evidencia añadida de que la estimulación con campos electromagnéticos pulsantes (PEMF –“pulsed electromagnetic field”–) acelera significativamente la cantidad de hueso formada durante la osteogénesis de distracción (Fredericks, 2003).

50 En el presente, el uso clínico de la electroterapia para la reparación de los huesos consiste en electrodos que se implantan directamente dentro del lugar de la reparación, o en un acoplamiento capacitivo o inductivo no invasivo. Se aplica corriente continua (CC –“DC” (“direct current”)–) a través de uno de los electrodos (cátodo) situado en el tejido pretendido, en el lugar de la reparación ósea, y el ánodo se emplaza en tejidos blandos. Corrientes CC de entre 5 μ A y 100 μ A son suficientes para estimular la osteogénesis. La técnica de acoplamiento capacitivo se sirve de electrodos cutáneos externos que se colocan en lados opuestos del lugar de la fractura. Se emplean, por lo común, ondas sinusoidales de entre 20 Hz y 200 Hz para inducir campos eléctricos de entre 1 mV/cm y 100 mV/cm en el lugar de la reparación.

60 La técnica de acoplamiento inductivo (PEMF) induce un campo eléctrico que varía con el tiempo en el lugar de la reparación, al aplicar un campo magnético variable en el tiempo por medio de una o dos bobinas eléctricas. El campo eléctrico inducido actúa como mecanismo desencadenante que modula el procedimiento normal de regulación molecular de la reparación ósea, con la intermediación de muchos factores de crecimiento. Bassett et al. fueron los primeros en informar de que una señal de PEMF podía acelerar la reparación ósea en un 150% en un perro. Los modelos experimentales de la reparación ósea muestran una proliferación y calcificación celulares mejoradas, y una resistencia mecánica incrementada con corrientes CC. Tales soluciones también tienen potencial

para lesiones de cartílago.

El tejido dañado tiene un potencial o eléctrico o tensión con respecto al tejido normal. Las señales eléctricas medidas en los lugares de las heridas, denominadas “tensión de herida” o “corriente de herida”, únicamente son CC (continuas) y cambian lentamente con el tiempo. Las tensiones de reparación de fracturas óseas y de nuevo crecimiento nervioso son, por lo común, más rápidas de lo habitual en las proximidades de un electrodo negativo, pero más lentas cerca de uno positivo, de tal manera que, en algunos casos, puede producirse la atrofia o la necrosis de los tejidos. Por esta razón, la mayoría de investigaciones recientes se han venido concentrando en señales más complejas, de frecuencias más altas, a menudo carentes de componente de CC neta.

Desgraciadamente, la mayor parte de dispositivos de electroterapia disponibles en la actualidad se basan en la implantación directa de electrodos o de juegos electrónicos completos, o en el acoplamiento inductivo a través de la piel utilizando bobinas que generan campos magnéticos variables con el tiempo, con lo que se inducen débiles corrientes parásitas en el seno de los tejidos corporales, lo que proporciona la señal a los tejidos de un modo ineficiente y, por tanto, además de voluminosas bobinas, requiere unos generadores de señales y juegos de baterías relativamente grandes. La necesidad de materiales quirúrgicos y biocompatibles, en uno de estos casos, y la excesiva complejidad de los circuitos y la potencia de entrada en el otro caso, han mantenido el precio de la mayoría de tales aparatos relativamente elevado y también han limitado la aplicación de tales dispositivos a personal muy preparado. Persiste, en consecuencia, la necesidad de un aparato versátil y de bajo coste que pueda ser utilizado para proporcionar estimulación bioeléctrica con el fin de modular de forma diferenciada el crecimiento del tejido osteocondral, al objeto de favorecer el desarrollo y la cicatrización adecuados.

En el documento US-B1-6.535.767 se divulga un sistema de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un sistema para modular el crecimiento o la reparación de hueso, cartílago u otro tejido conjuntivo, según se define en la reivindicación 1, mediante la administración de una señal eléctrica para el desarrollo de tejido óseo o cartilaginoso dañado.

La presente invención supera los inconvenientes de los dispositivos de la técnica anterior al hacer posible el aporte de señales bioeléctricas optimizadas de manera que se correspondan con propiedades seleccionadas de señales corporales naturales, con el resultado de una cicatrización acelerada y más permanente. Las señales descritas en esta memoria se adaptan a propiedades seleccionadas de señales naturales y, en consecuencia, los tejidos sometidos a electroestimulación de acuerdo con la presente invención experimentan un forzamiento fisiológico mínimo. Además, la presente invención no es invasiva y es barata, lo que la hace deseable para múltiples aplicaciones de uso personal e individual. Por otra parte, los presentes métodos proporcionan una estimulación eléctrica en la que las señales eléctricas reproducen estrechamente características seleccionadas de señales corporales naturales. El tejido estimulado es, por tanto, sometido a un forzamiento mínimo y el crecimiento y la reparación se ven en gran medida facilitados.

En contraste con los dispositivos del tipo de TENS [estimulador nervioso eléctrico transcutáneo –“Transcutaneous Electrical Nerve Stimulator”–] convencionales, que tienen como objetivo bloquear los impulsos del dolor en el sistema nervioso, el aparato utilizado con los presentes métodos funciona a un grado de estímulo que está por debajo del grado de umbral humano normal de sensación de dolor y, de esta forma, la mayoría de los usuarios no experimentan sensación alguna durante el tratamiento para reparar el hueso o favorecer su crecimiento.

La tecnología descrita en esta memoria se sirve de una cierta clase de formas de onda, algunas de las cuales son novedosas y otras de las que se sabe que tienen efectos biológicos positivos en los tejidos cuando se aplican a través de bobinas inductivas, pero no se ha demostrado hasta ahora que tengan efectos biológicos positivos a través de electrodos.

Aunque no se ha aprobado hasta el presente ningún dispositivo bioeléctrico comercial para la terapia de la osteoporosis, la presente invención proporciona un candidato prometedor. Como se demuestra en esta memoria, pueden aplicarse ventajosamente configuraciones de onda de campo electromagnético pulsante (PEMF –“pulsed electromagnetic field”–) únicas tanto en un ámbito macroscópico (es decir, fracturas comunes de huesos), como en ámbitos microscópicos (es decir, en el desarrollo de osteoblastos). Ciertas realizaciones de la invención maximizan la utilidad y aplicación de las formas de onda de PEMF deseadas: por ejemplo, la columna vertebral, la cadera y/o la muñeca son los lugares más comunes de fractura por osteoporosis, y para tales tipos de fractura los presentes inventores proporcionan almohadillas de electrodo sin contacto, simples y autoadhesivas, como vehículos de suministro de la electroterapia. El uso de semejantes almohadillas de electrodo tiene como resultado la mejora de la masa ósea en tales lugares anatómicos clave. En un ámbito microscópico, los presentes inventores han identificado formas de onda y frecuencias de PEMF específicas que optimizan el desarrollo de los osteoblastos. Como se describe con mayor detalle en los Ejemplos (véase el Ejemplo 1), los inventores demuestran que las señales de PEMF mejoran la mineralización de los osteoblastos y la producción de la matriz, y que la señal confiere, asimismo, propiedades estructurales. Los presentes inventores también demuestran que otras señales de PEMF mejoraron la

proliferación de células y los incrementos acompañantes de proteínas morfogénicas óseas (BMPs –“bone morphogenetic proteins”–). Si bien pueden utilizarse señales eléctricas tanto de trenes de impulsos como continuas en la presente invención, la administración de señales continuas en lugar de en trenes de impulsos proporcionó los efectos más pronunciados en la proliferación y en la mineralización.

Las señales eléctricas de la presente invención pueden ser utilizadas para favorecer la reparación y el crecimiento de tejidos estructurales tales como el hueso y el cartílago. Sin embargo, no es necesario que tales sistemas y métodos estén limitados a su uso con organismos intactos, puesto que células o cultivos de tejido aislados pueden también ser afectados por formas de onda electroterapéuticas (se ha observado que estímulos eléctricos apropiados modifican las velocidades de metabolismo celular, de secreción y de reproducción). Las señales eléctricas son generalmente aplicables a otros tejidos conjuntivos como la piel, los ligamentos, los tendones y otros similares. Las señales eléctricas descritas en esta memoria pueden ser utilizadas para estimular otros tejidos con el fin de acrecentar la reparación de los tejidos y favorecer el crecimiento de tejidos para propósitos de trasplante. Células cutáneas aisladas, por ejemplo, podrían ser tratadas con los dispositivos y formas de onda de la presente invención en el seno de un medio de crecimiento adecuado, a fin de aumentar la proliferación y diferenciación celulares en la preparación de material de injerto cutáneo autógeno, cultivado como tejido. De una manera similar, estas señales bioeléctricas pueden aplicarse directamente a tejido cutáneo dañado o enfermo para mejorar su cicatrización.

La aportación exógena de señales bioeléctricas y células progenitoras tales como células de estroma de médula ósea –BMSCs (“bone marrow stromal cells”)– a una fractura puede conducir a una cicatrización y reparación mejoradas de fracturas pertinaces. Estos dos factores (bioelectricidad y reclutamiento celular) son, de hecho, partes del proceso natural de cicatrización. Para estas aplicaciones, la estimulación eléctrica utilizando las formas de onda descritas en esta memoria puede ser aplicada inmediatamente tras la lesión con un sistema de electroterapia. El sistema de electroterapia puede ser ligero, compacto y portátil. Puede aplicarse tanto la estimulación eléctrica como una terapia basada en células universales en unos pocos días tras la lesión. Pueden añadirse células autólogas transcurrido un tiempo tras la lesión. Se divulgan también métodos para inducir la reparación o el desarrollo óseo que regenera tejidos naturales en vez de tejido de cicatriz.

De acuerdo con ello, es un propósito de la presente invención proporcionar un sistema para modular la proliferación y la diferenciación de tejido óseo, a fin de facilitar la reparación y el desarrollo óseos mediante la administración de señales eléctricas novedosas al tejido óseo.

Es otro propósito de la presente invención proporcionar sistemas de cultivo novedosos que comprendan el uso de PEMF para la ingeniería de tejido óseo.

Constituye otro propósito de la presente invención proporcionar sistemas de cultivo novedosos de células progenitoras en combinación con la estimulación eléctrica.

Es otro propósito de la presente invención proporcionar equipos para el crecimiento de tejido autólogo y alogénico para su trasplante a un receptor que lo necesita.

Se divulgan también métodos para estimular eléctricamente células progenitoras no comprometidas in vitro o in vivo para inducir su proliferación o diferenciación.

Se divulgan también métodos para modular el crecimiento de cartílago, de hueso o de otro tejido conjuntivo.

Se divulgan también métodos para modular la expresión y la liberación de proteínas morfogénicas óseas.

Estos y otros propósitos, características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto de forma evidente tras el estudio de la siguiente descripción detallada de las realizaciones divulgadas y de las reivindicaciones que se acompañan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una vista esquemática de una forma de onda que se utiliza en la estimulación de la cicatrización de fracturas óseas.

La Figura 2a proporciona una ilustración que muestra una forma de onda de señal eléctrica efectiva en un modo de impulsos basado en una forma de onda de bobina inductiva, y adaptada para su aplicación en la piel para favorecer la mineralización del hueso.

La Figura 2b proporciona una ilustración que muestra una forma de onda de señal eléctrica efectiva en un modo continuo para favorecer la mineralización del hueso.

La Figura 3a proporciona una ilustración que muestra una forma de onda de señal eléctrica efectiva en un modo de impulsos para favorecer la proliferación de células óseas.

La Figura 3b proporciona una ilustración que muestra una forma de onda de señal eléctrica efectiva en un modo continuo para favorecer la proliferación de células óseas.

La Figura 4 proporciona una ilustración que muestra una cámara de laboratorio experimental para aportar

corriente.

La Figura 5 proporciona un diagrama de barras que muestra los cambios de fosfatasa alcalina en el sobrenadante (izquierda) y en la membrana (derecha).

La Figura 6 proporciona un diagrama de barras que muestra los cambios en depósitos de osteocalcina y de calcio con la señal "B".

La figura 7 proporciona un diagrama de barras que muestra el incremento del número de células medido por DNA, como un porcentaje de control \pm desviación típica para formas de onda de señal de PEMF en presencia y en ausencia de L-NAME. L-NAME se presenta, solo, como un control experimental.

La Figura 8 proporciona esquemas de disposiciones para utilizar una combinación de estimulación mecánica y eléctrica para aplicaciones in vitro.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La siguiente descripción incluye el mejor modo contemplado en el momento presente para llevar a cabo la invención. Esta descripción se ha hecho con el propósito de ilustrar los principios generales de la invención y no debe tomarse en un sentido limitativo.

Ha de comprenderse que las presentes aplicaciones in vitro de la invención que se describen en esta memoria pueden también ser extrapoladas a aplicaciones, terapias y otras prácticas similares in vivo. Una persona con conocimientos ordinarios apreciará que la tecnología desarrollada utilizando preparaciones reducidas y modelos in vitro puede ser utilizada, en última instancia, para aplicaciones in vivo. Los valores e intervalos efectivos para la estimulación eléctrica in vivo pueden ser extrapolados a partir de curvas de dosis-respuesta deducidas de sistemas de ensayo de modelos in vitro o en animales.

La presente invención hace posible el aporte de señales bioeléctricas optimizadas de manera que se correspondan con características seleccionadas de señales corporales naturales, con el resultado de una cicatrización acelerada y más permanente. Las señales descritas en esta memoria se adaptan de forma única a propiedades seleccionadas de las señales naturales y, en consecuencia, los tejidos sometidos a la electroestimulación de acuerdo con la presente invención experimentan un forzamiento fisiológico mínimo. Además, la presente invención no es invasiva y es barata, lo que la hace deseable para múltiples aplicaciones de uso personal e individual.

Remodelación ósea

El hueso es uno de los tejidos más rígidos del cuerpo humano. Como componente principal del esqueleto humano, no solo soporta las estructuras musculares, sino que también protege órganos vitales de las cavidades craneal y torácica. El hueso está compuesto de material calcificado intercelular (la matriz extracelular del hueso) y diferentes tipos de células: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. La matriz extracelular está compuesta de componentes orgánico e inorgánico. El componente orgánico incluye células, colágenos, proteoglicanos, hialuronano y otras proteínas, fosfolípidos y factores de crecimiento. La rigidez del hueso viene del componente inorgánico mineralizado, que es predominantemente calcio y fósforo cristalizados en la forma de hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. LA combinación de colágeno e hidroxiapatita confiere la dureza ya la rigidez características del hueso.

Los osteoblastos se obtienen de células progenitoras de origen mesenquimal y que están situadas en las superficies próximas a la matriz ósea emergente y dispuestas lado con lado. La principal función de los osteoblastos es la elaboración y el desarrollo de la matriz ósea, y juegan también un papel en la mineralización de la matriz. Los osteoblastos se denominan osteocitos cuando están encastrados en las cavidades de la matriz ósea y adoptan una morfología ligeramente diferente y conservan el contacto con otros osteocitos. Los osteoclastos son células de múltiples núcleos, más grandes, que contienen receptores de calcitonina e integrina y tienen otros rasgos estructurales especializados. La función principal de los osteoclastos es reabsorber los componentes tanto inorgánicos como orgánicos de la matriz ósea calcificada.

La remodelación ósea es el proceso fundamental y altamente integrado de reabsorción y formación de tejido óseo que tiene como resultado una masa esquelética equilibrada de forma precisa con la renovación de la matriz mineralizada. Este proceso de renovación se consigue sin comprometer la arquitectura anatómica global de los huesos. Este proceso continuo de renovación interna garantiza que el hueso conserve la capacidad de una verdadera regeneración y mantenimiento de la integridad ósea mediante la continua reparación de las microfracturas y alteraciones como resultado de las tensiones. La arquitectura y la composición del esqueleto de un adulto se encuentran en un equilibrio dinámico perpetuo. La remodelación también proporciona unos medios para la liberación del calcio en respuesta a las demandas homeostáticas. Las condiciones que influyen en la remodelación ósea incluyen estímulos mecánicos tales como la inmovilización o la descarga del peso, la corriente eléctrica o campos electromagnéticos tales como el campo eléctrico acoplado capacitivamente o el campo electromagnético pulsante, cambios hormonales o cambios en respuesta a ciertas enfermedades inflamatorias.

La remodelación ósea se produce a través de ciclos de actividad orquestados que incluyen etapas de activación, reabsorción, inversión, formación y quiescencia. La activación se caracteriza por la existencia de una delgada capa de células de revestimiento interior. Entonces células mononucleares circulantes de linaje hematopoyético comienzan a migrar al lugar de activación y se funden unas con otras para formar osteoclastos. La activación es

seguida por la reabsorción, en la que los osteoclastos activos excavan una superficie ósea. Esta etapa dura, por lo común, aproximadamente de 2 a 4 semanas. La inversión se produce a continuación de la reabsorción y continúa durante un periodo de 9 días; durante este tiempo, osteoblastos previos inactivos están presentes dentro de las depresiones de reabsorción. La siguiente etapa es la formación y lleva aproximadamente entre 3 y 4 meses. Durante esta etapa, los osteoblastos activos rellenan el lugar de excavación. La última fase de la remodelación ósea es la quiescencia, en la que no se produce ninguna actividad de remodelación hasta el comienzo del siguiente ciclo de remodelación. Idealmente, la cantidad de hueso de relleno debe ser igual a la cantidad absorbida, sin que haya pérdida de masa ósea.

10 *Formas de onda*

La presente invención proporciona señales eléctricas y formas de onda que hacen posibles acciones específicas en tejidos biológicos. Tales formas de onda son efectivas en aplicaciones tanto in vivo como in vitro. Se muestra en esta memoria que los tejidos osteocondrales responden de forma diferente a frecuencias y formas de onda marcadamente diferentes.

De particular interés son las señales que comprenden impulsos rectangulares o casi rectangulares alternantes que tienen polaridades opuestas y longitudes desiguales, por lo que forman cadenas de impulsos rectangulares asimétricos. Se ha teorizado con el hecho de que impulsos de longitudes específicas activen mecanismos bioquímicos celulares específicos, especialmente la unión del calcio o de otras especies cargadas, pequeñas y móviles, a receptores situados en la membrana celular, o su desunión (habitualmente más lenta). Las partes de semejante cadena que tienen polaridades opuestas pueden equilibrarse para arrojar una carga neta sustancialmente nula, y la puede bien ser continua o bien estar dividida en trenes de impulsos separados por intervalos de señal sustancialmente nula. Los estímulos administrados en el modo de trenes de impulsos tienen efectos similares a los de los administrados como cadenas continuas, pero sus efectos pueden diferir en el detalle debido a la capacidad (teórica) de las especies cargadas de desligarse de los receptores durante los periodos de carga nula, y los programas temporales de administración pueden también diferir.

La Figura 1 muestra una vista esquemática de una forma de onda de base 20 eficaz para estimular tejido óseo y cartilaginoso, en la que una línea 22 representa la forma de onda en el modo continuo y una línea 24 representa la misma forma de onda en una escala temporal más larga, en el modo de trenes de impulsos, las magnitudes 26 y 28 representan dos valores característicos diferentes de tensión o de corriente, y los intervalos 30, 32, 34 y 36 representan la regulación temporal entre transiciones específicas. Las magnitudes 26 y 28 se seleccionan habitualmente de tal manera que, cuando se promedian en un ciclo completo de la forma de onda, no hay componente de corriente continua (CC –“DC” (“direct current”)–) neta, aunque las magnitudes 26 y 28 pueden seleccionarse de manera que se tenga como resultado una componente de CC neta positiva o neta negativa si se desea. En aplicaciones reales, la forma de onda como la 20 se ve, por lo común, modificada por el hecho de que todas las tensiones y corrientes decaen exponencialmente hacia algún valor intermedio comprendido entre las magnitudes 26 y 28, con una constante de tiempos de decaimiento preferiblemente más larga que el intervalo 34. El resultado se ha representado por una línea 38. Las formas de onda descritas en esta memoria tienen, generalmente, dos componentes de señal, una componente más larga mostrada como el intervalo 30 y una componente más corta mostrada como el intervalo 32, una con respecto a la otra.

La variación en las longitudes de las componentes de señal corta y larga confiere efectos específicos en un tejido estimulado. Las longitudes de impulso de interés en esta invención pueden definirse como sigue, en orden de longitud creciente:

Longitud α : entre 5 y 75 μ s de duración, preferiblemente entre 10 y 50 μ s de duración, más preferiblemente entre 20 y 35 μ s de duración y, de la forma más preferida, aproximadamente 28 μ s de duración.

Longitud β : entre 20 y 100 μ s de duración, preferiblemente entre 40 y 80 μ s de duración, más preferiblemente entre 50 y 70 μ s de duración y, de la forma más preferida, aproximadamente 60 μ s de duración.

Longitud γ : entre 100 y 1.000 μ s de duración, preferiblemente entre 150 y 800 μ s de duración, más preferiblemente entre 180 y 500 μ s de duración y, de la forma más preferida, aproximadamente 200 μ s de duración.

Longitud δ : más de 1 milisegundo de duración, preferiblemente entre 5 y 100 ms de duración, más preferiblemente entre 10 y 20 ms de duración y, de la forma más preferida, aproximadamente 13 ms de duración.

En una primera realización, la señal eléctrica tiene una componente más corta de longitud α y una componente más larga de longitud β : tiene por tanto, con las longitudes de impulso más preferibles de cada tipo (28 μ s y 60 μ s, respectivamente), una frecuencia de aproximadamente 11,4 kHz. Se hace referencia en la presente memoria a las señales compuestas de impulsos alternativamente de longitud α y de longitud β como señales de «tipo A», y a sus formas de onda, como formas de onda de «tipo A». En la Figura 2a se ha mostrado un ejemplo de señal de «tipo A»

administrada como una cadena de impulsos continua. Señales como esta son de utilidad a la hora de favorecer la proliferación de una muestra de tejido o cultivo para una variedad de aplicaciones biológicas o terapéuticas.

5 En el modo de trenes de impulsos, las formas de onda de «tipo A» se convertirán en trenes de entre aproximadamente 0,5 y 500 ms, preferiblemente de aproximadamente 50 ms, de manera que los trenes de impulsos se repiten a entre 0,1 y 10 Hz o, preferiblemente, a aproximadamente 1 Hz. Un ejemplo de este tipo de forma de onda se ha mostrado en la Figura 2b.

10 En una segunda realización, la señal eléctrica tiene una componente más corta de longitud α , pero una componente más larga de longitud γ : tiene, por tanto, con las longitudes de impulso más preferibles de cada tipo (28 μ s y 200 μ s, respectivamente), una frecuencia de aproximadamente 4,4 kHz. Se hace referencia en esta memoria a las señales compuestas de impulsos alternativamente de longitud α y longitud γ como señales de «tipo B», y a sus formas de onda, como formas de onda de «tipo B». Tales formas de onda fueron anteriormente descritas en la Solicitud de Patente de los EE.UU. N° 10/875.801 (N° de publicación 2004/0267333). En la Figura 3a se ha mostrado un ejemplo de señal de «tipo B» administrada como una cadena de impulsos continua. Señales tales como esta son de utilidad en el alivio del dolor y en el favorecimiento de la cicatrización de los huesos, y también estimulan el desarrollo de estructuras similares a hueso esponjoso en cultivos de osteoblastos in vitro, con aplicaciones en el campo de los materiales de reparación quirúrgica e injerto de huesos.

20 En el modo de trenes de impulsos, las formas de onda de «tipo B» se convierten en impulsos de entre aproximadamente 1 y 50 ms, de preferencia aproximadamente 5 ms, con impulsos que se repiten a entre 5 y 100 Hz o, preferiblemente, a aproximadamente 15 Hz. Un ejemplo de este tipo de forma de onda se ha mostrado en la Figura 3b. Esta forma de onda es similar en forma y en amplitud a las corrientes efectivas suministradas por dispositivos electromagnéticos inductivos convencionales (bobina) que se utilizan comúnmente en productos de estimulación de huesos sin unión, por ejemplo, EBI MEDICA, INC.[®] (Parsippany, NJ) y ORTHOFIX, INC.[®] (McKinney, TX).

30 En una tercera realización, la señal eléctrica tiene una componente más corta de longitud β pero una componente más larga de longitud γ : tiene, por tanto, con las longitudes de impulso más preferibles de cada tipo (60 μ s y 200 μ s, respectivamente), una frecuencia de aproximadamente 3,8 kHz. Se hace referencia en esta memoria a las señales compuestas de impulsos alternativamente de longitud β y longitud γ como señales de «tipo C», y a sus formas de onda, como formas de onda de «tipo C». Señales como esta son de utilidad a la hora de favorecer la regeneración, la maduración y la calcificación.

35 En el modo de trenes de impulsos, las formas de onda de «tipo C» se convierten en trenes de entre aproximadamente 1 y 50 ms, de preferencia aproximadamente 5 ms, de manera que los trenes se repiten a entre 5 y 100 Hz o, preferiblemente, a aproximadamente 15, muy similarmente al «tipo B». Esta forma de onda es similar en forma y en amplitud a las corrientes efectivas suministradas por otros dispositivos electromagnéticos inductivos convencionales (bobina) que se utilizan habitualmente en productos de estimulación de huesos sin unión, por ejemplo, el PhysioStim Lite[®] de la ORTHOFIX, INC.[®] (McKinney, TX), que ha sido diseñado para favorecer la cicatrización de las fusiones de la columna vertebral.

45 En una cuarta realización, la señal eléctrica tiene una componente más corta de longitud γ y una componente más larga de longitud δ : tiene, por lo tanto, con las longitudes de impulso más preferibles de cada tipo (200 μ s y 13 μ s, respectivamente), una frecuencia de aproximadamente 75 Hz. Se hace referencia en esta memoria a las señales compuestas de impulsos alternativamente de longitud γ y longitud δ como señales de «tipo D», y a sus formas de onda, como formas de onda de «tipo D». Señales como esta son de utilidad especialmente para favorecer la cicatrización de los cartílagos y la calcificación de los huesos, y a la hora de tratar o invertir la osteoporosis o la osteoartritis. Aunque es, a grandes rasgos, similar a la señal aportada mediante electrodos por el BIO-1000[™] de la BIONICARE MEDICAL TECHNOLOGIES, INC.[®], tal como se muestra en la Figura 3 de la Patente de los EE.UU. N° 5.273.033, la señal de «tipo D» difiere sustancialmente en la forma de onda (es rectangular, en vez de exponencial) y en el hecho de que está, preferiblemente, equilibrada en su carga.

55 En el modo de trenes de impulsos, las formas de onda de «tipo D» se convierten en impulsos de al menos 100 ms, preferiblemente de aproximadamente 1 segundo, de manera que los impulsos se repiten a intervalos de un segundo o más.

60 La intensidad de la señal puede también variar; ciertamente, señales más potentes no proporcionan a menudo más beneficio que las que son más débiles, y, en ocasiones, proporcionan menos. Para una señal típica (tal como la señal de la Figura 1), un pico de eficiencia cae, por lo común, en algún lugar entre uno y diez microamperios por centímetro cuadrado (μ A/cm²), y un punto de corte, en aproximadamente cien veces este valor. Más allá de este punto, la señal puede ralentizar la cicatrización o puede, por sí misma, causar un daño adicional.

65 De particular relevancia para los presentes métodos son las señales eléctricas o formas de onda que discurren en el modo continuo en lugar de en el modo de trenes de impulsos. (Por ejemplo, las Figuras 2a o 3a). Las señales que

discurren de forma continua tienen efectos similares a los de las señales de trenes de impulsos, pero pueden requerir diferentes programas temporales de aporte para conseguir los mismos resultados.

5 Para las formas de onda que se utilizan con los métodos de la presente invención, densidades de corriente promedio típicas que se aplican se encuentran entre 0,1 y 1.000 microamperios por centímetro cuadrado, preferiblemente entre 0,3 y 300 microamperios por centímetro cuadrado, más preferiblemente, entre 1 y 100 microamperios por centímetro cuadrado, y, de la forma más preferida, aproximadamente 10 microamperios por centímetro cuadrado, de lo que resultan gradientes de tensión que oscilan entre 0,01 y 1.000 microamperios por centímetro, 0,03 y 300 microamperios por centímetro, 0,1 y 100 microamperios por centímetro, y entre 1 y 10 microamperios por centímetro, respectivamente, en tejidos corporales típicos. La señal de onda casi cuadrada individual es asíncrona con un segmento positivo largo y un segmento negativo corto, o viceversa. Las partes positiva y negativa están equilibradas para arrojar una carga neta nula, u, opcionalmente, pueden ser equilibradas encarga con un impulso igualador al final del impulso con el fin de proporcionar un equilibrio de carga neta nula a lo largo de toda la forma de onda en su conjunto. Estas formas de onda aportadas por electrodos cutáneos se sirven de formas de onda rectangulares o aproximadamente rectangulares continuas, en lugar de formas de onda sinusoidales o con un fuerte decaimiento exponencial. Otras formas de onda de utilidad en los métodos de la presente invención se divulgan en la de Solicitud de Patente de los EE.UU. publicada N° 10/875.801 (N° de publicación 2004/0267333).

20 Las señales eléctricas descritas anteriormente pueden ser administradas a células, tejidos biológicos o individuos que necesitan tratamiento en intervalos de tratamiento intermitentes o de forma continua a lo largo del día. Un intervalo de tratamiento se define en esta memoria como un intervalo de tiempo en el que se administra una forma de onda en un modo por impulsos o continuo. Los intervalos de tratamiento pueden ser de entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 4 horas de duración, entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 2,5 horas de duración, o de aproximadamente 1 hora de duración. Los intervalos de tratamiento pueden producirse entre aproximadamente 1 y 100 veces al día. La duración y la frecuencia de los intervalos de tratamiento pueden ser ajustadas para cada caso con el fin de obtener una cantidad efectiva de estimulación eléctrica para favorecer la proliferación celular, la diferenciación celular, y el crecimiento, el desarrollo o la reparación ósea. Los parámetros son ajustados para determinar los parámetros de tratamiento más efectivos.

30 Las señales no requieren, necesariamente, largas horas de duración en el intervalo de tratamiento, aunque puede utilizarse si se desea una administración las 24 horas. Por lo común, se requieren 30 minutos (repetidos varias veces en un día) para la efectividad biológica. La proliferación de células in vitro puede ser medida por medios convencionales tales como los cómputos de células o los incrementos de ácido nucleico o de la síntesis de proteínas. Pueden medirse también la regulación en sentido ascendente o la regulación en sentido descendente de proteínas de matriz (colágeno de los tipos I, III y IV), así como factores de crecimiento y citoquinas (tales como TGF-B, VEGF, SLPI, FN, MMPs) (síntesis de ARNm [ácido ribonucleico mensajero] y proteínas). Los efectos in vivo pueden ser determinados por la velocidad de cicatrización de una lesión o midiendo la densidad de la masa ósea. Otros métodos de diagnóstico de la proliferación, diferenciación y mineralización del tejido óseo serán inmediatamente evidentes para una persona con conocimientos ordinarios de la técnica.

40 En una realización, se utilizan señales de fomento de la proliferación y de fomento de la diferenciación de forma secuencial. Esta combinación de formas de onda se emplea para aumentar el número de células y, seguidamente, fomentar la diferenciación de las células. Como ejemplo de ello, el uso secuencial de señales de proliferación y de diferenciación puede ser empleado para favorecer la proliferación de osteoblastos y, a continuación, la diferenciación de los osteoblastos como osteocitos de producción de minerales, que favorecen la mineralización del hueso, o viceversa. Por ejemplo, puede utilizarse un paradigma de tratamiento en el que se administra una señal de tipo A de fomento de la proliferación primeramente a una proliferación celular in vitro o ex vivo durante horas, días o semanas y, a continuación, la señal de fomento de la proliferación es reemplazada por una señal de tipo B de fomento de la mineralización durante horas, días o semanas, hasta que se haya llevado a cabo la mineralización del hueso. El tejido producido puede ser entonces trasplantado en beneficio del paciente. Ambas señales pueden ser también aplicadas simultáneamente para favorecer tanto la proliferación como la diferenciación y la mineralización simultáneamente.

55 Las señales eléctricas pueden ser aportadas por electrodos cutáneos o mediante conexión electroquímica. Se dispone en el mercado de electrodos cutáneos en tamaños tales como 3,8 cm x 30,5 cm (1 ½ x 12 pulgadas), 5,1 cm x 8,9 cm (2 x 3 ½ pulgadas) y 5,1 cm x 5,1 cm (2 x 2 pulgadas), que pueden ser de utilidad para la aplicación a la columna vertebral, las caderas y los brazos, respectivamente. Estos electrodos reutilizables resultan ventajosos debido a que no contienen látex y no han presentado una irritación cutánea significativa. Los electrodos reutilizables pueden ser empleados múltiples veces, con lo que también se reducen los costes para el paciente. Semejantes electrodos pueden incluir los electrodos #214 (0,5 cm x 33 cm -1/5" x 13"-), #220 (5,1 cm x 5,1 cm -2" x 2"-) y #230 (5,1 cm x 1,52 cm -2" x 3/5"-) (KOALATY PRODUCTS®, de Tampa, FL), o los electrodos #T2020 (5,1 cm x 5,1 cm -2" x 2"-) y #T2030 (5,1 cm x 8,9 cm -2" x 3,5"-) (VERMED, INC®, de Bellows Falls, VT).

65 Existen múltiples ventajas en utilizar electrodos cutáneos en lugar de bobinas electromagnéticas. En primer lugar, los electrodos cutáneos son más eficientes. Con electrodos, únicamente se ha de generar la señal que será

realmente enviada al interior del cuerpo. Con una bobina, debido a un pobre acoplamiento electromagnético con los tejidos, la señal en juego ha de ser un gran número de veces más fuerte que la que se desea dentro de los tejidos. Esto hace que los circuitos de generación requeridos para los electrodos sean, potencialmente, mucho más simples que para las bobinas, al tiempo que requieren mucha menos potencia para funcionar. En segundo lugar, los electrodos cutáneos son más respetuosos con el usuario. Los electrodos cutáneos conllevan, a lo sumo, un pequeño porcentaje del peso y del volumen ocupado por las bobinas que se necesitan para suministrar magnitudes de señal equivalentes. Similarmente, debido a una mayor eficiencia en el acoplamiento, los generadores de señal destinados a excitar los electrodos pueden hacerse mucho más pequeños y ligeros que los de las bobinas. Tras un corto tiempo, una persona que los lleva apenas nota que están ahí. En tercer lugar, los electrodos cutáneos son más económicos. A diferencia de las bobinas, que cuestan entre cientos y miles de dólares cada una, los electrodos son artículos "de usar y tirar" que cuestan, por lo común, menos de un dólar. También, debido a una mayor eficiencia y simplicidad, los generadores de señal y las baterías para excitarlos pueden ser pequeños y baratos de fabricar, en comparación con los de las bobinas. En cuarto lugar, los electrodos cutáneos permiten una construcción de las baterías más simple y una vida útil de las baterías más larga, lo que facilita la comodidad y disposición del paciente para utilizar el dispositivo. Por último, los electrodos cutáneos son más versátiles que las bobinas electromagnéticas. Las bobinas se han de construir de manera que se correspondan con las características geométricas de las partes del cuerpo a las que serán aplicadas, y cada una de ellas ha de ser lo bastante grande para rodear o encerrar la parte que se ha de tratar. Esto significa que, para «cubrir» todo el cuerpo, deben existir un gran número de tamaños y formas diferentes de bobina, algunos de ellos bastante grandes. Con electrodos, por el contrario, la distribución de la corriente viene determinada únicamente por el emplazamiento del electrodo y es fácilmente predecible a todo lo largo y ancho del volumen comprendido entremedias, de tal modo que el cuerpo puede ser «cubierto» con tan solo unos pocos tipos de electrodos más una lista de emplazamientos bien escogidos.

Sistemas de estimulación

También se contemplan por la presente invención sistemas biológicos que incluyen células y estimuladores para aportar señales eléctricas a las células. Tales células pueden incluir, células precursoras tales como células madre, progenitoras no comprometidas, células progenitoras comprometidas, progenitoras multipotentes, progenitoras pluripotentes o células en otras etapas de diferenciación, si bien no están limitadas por estas. Tales células pueden ser células embrionarias, fetales o adultas y pueden ser recogidas o aisladas a partir de fuentes autólogas o alogénicas. En una realización se utilizan células proliferativas, si bien pueden utilizarse también células no proliferativas en los métodos que se describen en esta memoria. Tales células pueden ser combinadas in vitro, por ejemplo, en cultivo de tejido, o in vivo, para ingeniería de tejidos o aplicaciones de reparación de tejido. Células madre trasplantadas pueden ser selectivamente atraídas a los lugares de lesión o de enfermedad y, a continuación, eléctricamente estimuladas para proporcionar una cicatrización mejorada.

La estimulación de cultivos de células de acuerdo con el método y el propósito de la presente invención también requiere unos medios prácticos para suministrar formas de onda uniformes a muchas cubetas de cultivo sin perturbar el proceso de incubación ni provocar contaminación. Se proporcionan en la presente memoria dispositivos para estimular eléctricamente cultivos durante la incubación, que, preferiblemente, contienen seis cubetas de cultivo de tejido conectadas como un sistema de múltiples cubetas, mediante el uso de sistemas de electrodos anodizados y acoplados capacitivamente, especialmente diseñados para la administración de señales. Mediante el uso de una fijación de cable plano, las fugas en la junta de obturación de la incubadora son minimizadas, a la vez que se mantiene el entorno de CO₂ controlado para los cultivos. Una disposición típica se ha mostrado, de forma parcialmente esquemática, en la Figura 4.

En la disposición mostrada, por ejemplo, en la Figura 4, seis cubetas 110a a 110f de cultivo de tejido se encuentran interconectadas y cada una de ellas incluye electrodos 140 en los extremos de la cámara, formados por dos segmentos de alambre rectos de 15 mm y uno de 7,5 mm, unidos por unos dobleces en horquilla y conectados por un doblez en ángulo recto a la parte central 142 del puente 112. En la Figura 4 se han mostrado siete de tales puentes. Los electrodos 140 se han dimensionado para ajustarse en las paredes de extremo de una cámara de portamuestras Lab-Tek II, la cual mide internamente 18 por 48 milímetros, con una profundidad de llenado típica de 3 mm. La capacidad de semejante electrodo es aproximadamente 0,56 microfaradios. Los puentes 112a y 112g difieren por cuanto tienen espirales 144 de cubeta de extremo que contienen, cada una de ellas, aproximadamente 15 cm de alambre. La capacidad resultante entre el alambre de puente 112a o 112g y el electrodo de plata correspondiente 104 es aproximadamente 2,3 microfaradios.

Los puentes 112a, 112b, y así sucesivamente, formados de metal macizo relativamente inerte, conectan eléctricamente las cámaras 110a, 110b, y así sucesivamente, en serie entre las cubetas de extremo 106a y 106b. Si bien se han mostrado en esta memoria seis cámaras 110a a 110f y siete puentes 112a a 112g, es posible utilizar cualesquiera otros números convenientes "n" de cámaras y "n + 1" de puentes. Además, pueden utilizarse con una misma fuente 100 de señal una pluralidad de tales grupos conectados en serie, compuestos, cada uno de ellos, de "n" cámaras, "n + 1" puentes y dos cubetas de extremo, utilizando unos medios de distribución de señal, tales como una red de resistencias, para dividir la energía de la señal entre los grupos, como es bien conocido en la técnica de la transmisión de señales eléctricas.

La impedancia eléctrica total de la disposición mostrada, con doce extremos de electrodo de cámara, dos electrodos espirales 106 de cubeta de extremo y seis cámaras, tal y como se ha descrito, es principalmente capacitiva en un valor de 0,045 microfaradios, más una componente resistiva de aproximadamente 10.000 ohmios. Una resistencia en serie (no mostrada), conectada entre la fuente 100 de señal y la cubeta de extremo 106a, puede tanto regular la corriente aplicada en una magnitud deseada, como también “secar” la parte capacitiva de la reactancia en serie. Por ejemplo, con una resistencia de 1 megaohmio, la respuesta en frecuencia es uniforme dentro de +/- 3 dB de 5 Hz a 3 MHz.

Si se desea, la distribución de la energía de la señal dentro de una cámara puede ser medida con sondas según se muestra en la cámara ampliada 110b. Unas sondas 120, hechas de cualquier metal razonablemente inerte pero, preferiblemente, del 99,9% de plata pura, como los electrodos 104a y 104b, aisladas excepto por sus puntas, y de manera que estas puntas se han ajustado separadas una de otra en una distancia conocida y fija, son sumergidas en un medio 122 y trasladadas en una sucesión de posiciones, preferiblemente describiendo una parrilla rectangular. La tensión diferencial en cada posición es leída por un amplificador diferencial 124, tal como un Analog Devices AD522, y enviada a un osciloscopio u otro dispositivo, generalmente indicado por la referencia 126, para su presentación visual o registro. Los resultados son cómodamente representados como un conjunto ordenado de números que representan la relación entre la intensidad de señal en cada punto y el promedio total, como se muestra en la parte inferior de la Figura 4, de nuevo, para la cámara ampliada 110b. Pueden utilizarse, alternativamente, otros medios tales como la codificación de color o el grafismo tridimensional.

Los resultados son cómodamente representados como un conjunto ordenado de números que representan la relación entre la intensidad de señal en cada punto y el promedio total, según se muestra en la parte inferior de la Figura 4, de nuevo, para la cámara ampliada 110b. Pueden utilizarse, alternativamente, otros medios tales como la codificación de color o el grafismo tridimensional.

Tal como se muestra por la parrilla de la Figura 4, la distribución de señal con electrodos situados en los extremos delgados de una cámara rectangular es, por lo común, bastante uniforme, salvo en las pequeñas regiones inmediatamente adyacentes a los propios electrodos. La uniformidad también mejora con el tiempo, ya sea en el medio o en solución plenamente salina, a medida que el óxido del corte o la grieta se cierra. Las anteriores lecturas promedio de la parte inferior izquierda de la Figura 4, por ejemplo, pueden ser el resultado de óxido cerrado de forma incompleta en el extremo cortado del alambre.

Para la comodidad del manejo, una evaporación mínima del medio y la facilidad a la hora de mantener la esterilidad, todas las cámaras, puentes y paredes de extremo de un grupo pueden ser cómodamente ensambladas sobre una placa de vidrio rígida u otro soporte susceptible de esterilizarse, y una o más de estas placas, una vez ensambladas, pueden ser entonces encerradas en un recipiente externo tal como una caja de plástico rígido.

La presente invención también proporciona dispositivos de estimulación novedosos para aportar señales eléctricas, al objeto de favorecer el crecimiento o la reparación ósea. Específicamente, se proporcionan sistemas de electrodos pasivos novedosos para aportar señales eléctricas. Estos sistemas de electrodos acoplan señales eléctricas variables en el tiempo para aplicaciones in vitro o in vivo, y reemplazan la tecnología de puentes electrolíticos convencionales para el aporte de señales del tipo de PEMF mediante inducción en favor de un acoplamiento capacitivo. Los sistemas de electrodos pueden estar hechos de materiales tales como metales anodizados, como el niobio, el tántalo, el titanio, el zirconio, el molibdeno, el tungsteno y el vanadio, si bien no están limitados por estos. El aluminio y los aceros inoxidables comparten esta propiedad, pero un grado mucho menor, puesto que son atacados lentamente por soluciones que contienen el ion cloruro. En frecuencias utilizables, típicamente comprendidas entre aproximadamente 5 Hz y 3 MHz, y, con un refinamiento de los circuitos, entre aproximadamente 1 Hz y más de aproximadamente 30 MHz, el paso de corriente CC es despreciable.

El niobio es uno de diversos metales que son autopasivantes, por lo que forman capas de óxido superficiales delgadas pero muy duraderas al exponerse al oxígeno y a la humedad. Este proceso puede ser controlado mediante anodización. La autopasivación hace, por lo general, que una unión fiable mediante otros métodos resulte difícil, si bien el presente diseño se sirve únicamente de acoplamiento capacitivo para inducir una corriente en el electrodo y, por tanto, elude la dificultad de formar conexiones eléctricas con otros metales. Este sistema de electrodos proporciona una electrolisis despreciable y no presenta citotoxicidad fisiológicamente significativa, y es también de utilidad para aplicaciones in vivo.

Los alambres que se utilizan con el sistema de electrodos de la presente invención son «autoprotectores», de manera que forman capas superficiales fuertemente adherentes, delgadas, pero muy duraderas, de óxidos no reactivos cuando se exponen a la humedad o al oxígeno. El óxido así formado tiene una constante dieléctrica elevada, y el espesor del óxido es sustancialmente uniforme y puede ser estrechamente controlado. El revestimiento de óxido protector permite que el metal actúe como un condensador de acoplo para introducir señales eléctricas de corriente alterna (de carga neta nula, o ZNC –“zero net charge”–) a medios de cultivo con una distribución uniforme y una electrolisis despreciable.

Un estimulador u otra fuente de señal, generalmente designada por la referencia 100, está conectada a través de alambres, contactos de clip o mediante cualesquiera otros medios adecuados 102, a un par de electrodos de metal relativamente inerte 104a y 104b, que son sumergidos en un fluido eléctricamente conductor contenido en las cubetas de extremo 106a y 106b. Estos proporcionan un punto de entrada de la señal al conjunto de cámaras de cultivo 110a, 110b, y así sucesivamente, al que se ha de aplicar. Se prefiere plata fina (99,9% de pureza) para los electrodos 104a y 104b, y solución salina (solución de cloruro de sodio) para el fluido de las cubetas de extremo 106a y 106b puesto que, en uso, se forma una delgada capa de cloruro de plata en la interfaz y ello facilita, a través de una reacción electroquímica reversible, el paso de corriente eléctrica. Sin embargo, pueden utilizarse también otros metales y fluidos.

Los puentes 112a, 112b, y así sucesivamente, pueden estar hechos de cualquier metal relativamente inerte siempre y cuando no sea citotóxico. Metales que se utilizan típicamente como electrodos inertes para fluidos biológicos son la plata, el oro, el platino y los demás metales del grupo del platino. Desgraciadamente, estos son muy caros, pueden permitir o incluso catalizar algunas reacciones electroquímicas en sus superficies (especialmente si están presentes impurezas en pequeña cantidad), y los productos de tales reacciones pueden ser citotóxicos.

Por esta razón, se prefiere en esta invención el grupo de los metales denominados «autoprotectores», que, al contacto con agua o con soluciones acuosas, forman capas de óxido superficiales delgadas, continuas, altamente insolubles y biológicamente inertes, aislando por sellado la superficie del metal de todo contacto adicional con el fluido. Este óxido constituye el único contacto entre el sistema de aporte de señal eléctrica y el medio de cultivo. Tales metales incluyen niobio, tántalo, titanio, zirconio, molibdeno, tungsteno y vanadio. El aluminio y los aceros inoxidable comparten esta propiedad pero en mucho menor grado, puesto que son atacados lentamente por soluciones que contienen el ion cloruro (como es el caso de casi todos los fluidos biológicos).

La formación de óxido sobre uno de estos metales puede verse mejorada, y el espesor de óxido, incrementado de una manera estrechamente controlable, por medio de la anodización. Un espesor de óxido uniforme confiere una capacidad por unidad de área uniforme de la superficie metálica, lo que, a su vez, produce una intensidad de señal relativamente uniforme sobre la superficie, casi con independencia de su forma en el seno del fluido. Las pequeñas grietas en el óxido causadas por corte o formación, se cierran rápidamente por reacción adicional con el fluido.

Se prefiere especialmente el niobio para esta aplicación puesto que, gracias a los colores vívidos y estables que se crean por la interferencia de la luz en el óxido superficial (Nb_2O_5) producido por la anodización, este es popular en joyería y, por tanto, se encuentra disponible a un coste razonable en formas convenientes y en una variedad de colores de catálogo. Rio Grande Jeweller's Supply, por ejemplo, almacenan alambre de niobio redondo de calibre 20 y 22 previamente anodizado en los colores «púrpura», «rosa», «azul oscuro», «turquesa», «verde» y «oro», de manera que cada color representa un espesor de óxido diferente. El alambre es fácilmente trabajado y conformado en cualquier forma de electrodo que se desee. Dado el índice de refracción del Nb_2O_5 ($n_D = 2,30$) y su constante dieléctrica ($\epsilon_R = 41 \epsilon_0$), el espesor de óxido puede ser medido fácilmente a partir del espectro de reflexión de la luz, y puede calcularse la capacidad resultante por unidad de área o unidad de longitud del alambre. El alambre «púrpura» tiene el óxido más delgado, medido en 48 nm a partir de la reflectancia en el pico de 420 nm, y, por tanto, para un alambre «púrpura» de calibre 22 (0,644 cm de diámetro; número de catálogo de Rio Grande 638-240), la capacidad fue calculada en 0,154 microfaradios por centímetro de longitud del alambre. La medición directa arrojó inicialmente lecturas mucho más grandes debido a las grietas en el óxido, pero, después de 24 horas en solución salina, la capacidad medida se había estabilizado en 0,158 microfaradios por centímetro, cerca del valor predicho.

Los puentes 112a, 112b, y así sucesivamente, funcionan, de este modo, eléctricamente en gran medida como lo hacen los puentes de sal convencionales, salvo que no hay posibilidad de que fluya fluido o iones a través de ellos, con lo que se evita la posibilidad de contaminación cruzada entre cámaras o entre una cámara y una cubeta de extremo. Se evitan, además, los problemas de evaporación y de posible agrietamiento que se encuentran con los puentes de sal convencionales, así como la incomodidad de trabajar con agar u otros agentes gelificantes. Como son eléctricamente capacitivos, los puentes bloquean la corriente continua y, por tanto, la señal que llega a las cámaras está equilibrada en carga entre fases, de manera que se ha eliminado de ella toda componente de corriente alterna.

Todos los extremos de puente que hacen contacto con el medio de crecimiento tienen, preferiblemente, las mismas dimensiones aproximadas y contienen, a grandes rasgos, la misma longitud de alambre, de tal manera que todos tienen, a grandes rasgos, la misma capacidad, y se han colocado apoyados en los extremos delgados de las cámaras de cultivo, las cuales son, a su vez, preferiblemente rectangulares, tal como se muestra en la cámara ampliada 110b de la Figura 4. Puede, si se desea, darse a los extremos de los puentes que entran en contacto con el fluido de las cubetas de extremo (por ejemplo, los extremos de la izquierda de los puentes 112a y 112g de la Figura 4), una forma diferente para mejorar el contacto, reducir la capacidad y/o ajustar mejor el tamaño y la forma de las cubetas de extremo si estos difieren de los de las cámaras de cultivo. Por ejemplo, cuando se utilizan cubetas de extremo redondas, los extremos de los puentes sumergidos en ellas pueden ser formados, de forma conveniente, como espirales 144, tal y como se muestra en la Figura 4.

En suma, por lo tanto, los sistemas biológicos según se contemplan en la presente invención comprenden los siguientes elementos: estimuladores eléctricos, electrodos de metal anodizados y células. Señales de PEMF adecuadas para su uso en tales sistemas incluyen formas de onda según se ilustran, por ejemplo, en las Figuras 2 y 3. Las aplicaciones prácticas de tales señales incluyen el incremento de la proliferación, la diferenciación o la mineralización del tejido óseo, el aumento de la expresión de BMP o el aumento de la producción de óxido nítrico.

Ingeniería de tejidos

Los métodos de la presente invención pueden también ser utilizados en aplicaciones de ingeniería de tejidos. Pueden cultivarse células utilizando los métodos y sistemas de cultivo de la presente invención en combinación con férulas biológicamente compatibles para generar tejidos funcionales in vitro o ex vivo, o trasplantados para formar tejidos funcionales in vivo. Células madre trasplantadas o huéspedes pueden también ser selectivamente trasplantadas o atraídas al lugar de una lesión o enfermedad y, a continuación, estimularse con las señales eléctricas que se describen en esta memoria con el fin de proporcionar una cicatrización o recuperación mejorada. Pueden formarse férulas de tejido a partir de polímeros naturales biocompatibles, polímeros sintéticos o combinaciones de los mismos, para obtener una matriz de células abiertas no tejidas que tienen una arquitectura sustancialmente abierta que proporciona un espacio suficiente para la infiltración de células en el seno del cultivo o in vivo, al tiempo que conserva la suficiente resistencia mecánica para soportar las fuerzas contractivas, compresivas o de tracción ejercidas por las células que crecen dentro de la férula durante la integración de la férula en un lugar de objetivo o pretendido, dentro de un huésped. Las férulas de tejido pueden ser estructuras rígidas destinadas a generar estructuras macizas tridimensionales con una forma definida, o, alternativamente, las férulas pueden consistir en matrices semimacizas para la generación de tejidos flexibles.

Los métodos y sistemas de cultivo de la presente invención incluyen el uso de férulas hechas de polímeros únicamente, de copolímeros o de mezclas de los mismos. Los polímeros pueden ser biodegradables o bioestables, o consistir en combinaciones de estos. Tal y como se utilizan en esta memoria, los materiales «biodegradables» son los que contienen enlaces que pueden ser rotos bajo condiciones fisiológicas, incluyendo la escisión enzimática o hidrolítica de los enlaces químicos.

Polímeros naturales adecuados incluyen polisacáridos tales como alginato, celulosa, dextrano, pulano, ácido polihialurónico, quitina, poli(3-hidroxialcanoato), poli(3-hidroxi octanoato) y poli(ácido 3-hidroxigraso), si bien no están limitados por estos. También se han contemplado dentro de la invención derivados químicos de dichos polímeros naturales que incluyen sustituciones y/o adiciones de grupos químicos tales como alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones así como otras modificaciones familiares para los expertos de la técnica. Los polímeros naturales pueden ser seleccionados de entre proteínas tales como el colágeno, la zeína, la caseína, la gelatina, el gluten y la albúmina de suero. Polímeros sintéticos adecuados incluyen polifosfacenos, poli(alcoholes de vinilo), poliamidas, amidas de poliéster, poli(aminoácidos), polianhidridos, policarbonatos, poliacrilatos, polialquilenos, glicoles de polialquileno, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, poliortoésteres, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poliésteres, poliácidos, poliglicólidos, polisiloxanos, policaprolactonas, polihidroxitbutiratos, poliuretanos, polímeros en bloques de estireno isobutil estireno, y copolímeros y combinaciones de los mismos, si bien no están limitados por estos.

Se prefieren polímeros sintéticos biodegradables y estos incluyen poli α -hidroxiácidos tales como el ácido poli L-láctico (PLA –“poly L-lactic acid”–), el ácido poliglicólico (PGA –“polyglycolic acid”–) y copolímeros de los mismos (esto es, ácido poli D,L-láctico coglicólico (PLGA –“poly D,L-lactic coglycolic acid”–)), y ácido hialurónico, si bien no están limitados por estos. Los poli α -hidroxiácidos han sido aprobados por la FDA para el uso clínico en humanos. Ha de apreciarse que ciertos polímeros, incluyendo los polisacáridos y el ácido hialurónico, son solubles en agua. Cuando se usan polímeros solubles en agua, es importante hacer que estos polímeros sean parcialmente insolubles en agua por modificación química, por ejemplo, mediante el uso de un enlace transversal, o ramificado.

Una de las ventajas de una matriz polimérica biodegradable es que pueden incorporarse directamente dentro de la matriz compuestos angiogénicos y otros compuestos bioactivos, de tal manera que sean liberados lentamente a medida que la matriz se degrada in vivo. Conforme la estructura del polímero celular se vasculariza, y se degrada la estructura, las células se diferenciarán de acuerdo con sus características intrínsecas. Factores que incluyen los nutrientes, factores de crecimiento, inductores de la diferenciación o de la reversión de la diferenciación (es decir, que hacen que células diferenciadas pierdan características de diferenciación y adquieran características tales como la proliferación y una función más general), productos de secreción, inmunomoduladores, inhibidores de la inflamación, factores de regresión, compuestos biológicamente activos que mejoran o permiten el crecimiento interior de la red linfática o de las fibras nerviosas, ácido hialurónico y medicamentos, los cuales son conocidos por los expertos de la técnica y se encuentran comercialmente disponibles con instrucciones en cuanto a lo que constituye una cantidad efectiva, en suministradores como la Collaborative Reserch, la Sigma Chemical Co.; factores de crecimiento vascular tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF –“vascular endothelial growth factor”–), el EGF y el HB-EGF podrían ser incorporados dentro de la matriz o proporcionados conjuntamente con la matriz. De forma similar, polímeros que contienen péptidos tales como el péptido de fijación RGD (Arg-Gli-ASP) pueden ser sintetizados para su uso en la formación de matrices.

Equipos

- Se proporcionan también equipos en la presente invención que combinan estimuladores eléctricos con férulas biológicamente compatibles para dar soporte al crecimiento y a la integración de células hasta formar un tejido unificado. Pueden proporcionarse junto con el equipo recipientes con electrodos incorporados, y los electrodos pueden estar hechos de un material autopasivante u otros materiales convencionales para electrodo. Estos equipos pueden, opcionalmente, incluir reactivos tales como medios de crecimiento, así como factores de crecimiento para favorecer la integración de las células dentro de las férulas. Las férulas incluidas en el equipo pueden haberse diseñado de manera que tengan moléculas de fomento del crecimiento y de adhesión fijadas a su superficie. Tales equipos son, opcionalmente, empaquetados junto con instrucciones sobre su adecuado uso y optimización.
- Pueden proporcionarse células junto con el equipo, de una forma preservada con un material protector, hasta el momento en que las células sean combinadas con otros elementos del equipo para producir un tejido apropiado. En una realización, se proporcionan células que son conservadas criogénicamente en nitrógeno líquido o desecadas en presencia de un compuesto tal como la trehalosa. Las células pueden ser células progenitoras no diferenciadas, incluyendo células madre; células madre pluripotentes, células madre multipotentes o progenitoras comprometidas. Alternativamente, pueden también utilizarse células terminalmente diferenciadas con estos equipos. Tales equipos pueden haberse diseñado para producir tejido de sustitución para uso en cualquier sistema orgánico tal como hueso, cartílago, músculo, riñón, hígado, sistema nervioso, pulmón, corazón, sistema vascular, etc., aunque no están limitados por estos.
- Es posible también recoger células de un paciente que necesita un tratamiento, a fin de crear por ingeniería tejido de sustitución a partir del propio tejido del paciente. El uso del propio tejido del paciente proporciona un modo de producir tejido de trasplante en el que se reducen las complicaciones asociadas con el rechazo del tejido.
- Además de la estimulación puramente eléctrica, puede encontrarse beneficiosa para algunos propósitos una combinación de estimulación eléctrica y mecánica in vitro. La estimulación mecánica puede consistir en carga de tracción, carga de compresión o carga de cizalla. En las Figuras 8a a 8e se han mostrado disposiciones típicas en sección transversal.
- En cada caso de carga, la disposición del ensayo se construye alrededor de una cubeta o cámara de cultivo 200 que sea familiar en la técnica, que contiene un medio 202 y una capa de células 204 fijada, por lo común, a una lámina o membrana de fondo 206 que puede o no formar parte del fondo mecánico rígido 208 de la cubeta de cultivo, Unos electrodos 210, de cualquier metal utilizable según se ha descrito: entre otros, pero, preferiblemente, de un metal autoprotector y, más preferiblemente, de niobio anodizado, se colocan dentro de la cámara 200 de una manera tal, que crean una distribución de corriente relativamente uniforme a todo lo largo y ancho del medio 202.
- Para la carga de tracción, la membrana 206 forma un fondo adicional o «falso» dentro de una cubeta o cámara de cultivo 200, según se muestra en la Figura 8a. La membrana 206 puede estar hecha de cualquier material flexible y elástico adecuado al que las células se fijen por sí mismas, tal como caucho de silicona que haya sido atacado superficialmente con plasma. Un tubo 212 conecta un espacio 214 comprendido entre la membrana 206 y el fondo de cámara rígido 208 con una bomba externa u otra fuente de presión o de vacío estacionaria o fluctuante 216. El funcionamiento intermitente de la fuente de presión o de vacío 216 provoca que la membrana 206 se flexione hacia arriba ya hacia abajo, creando una tensión intermitente en la membrana y, por tanto, en la capa de células 204 a ella fijada. Alternativamente, la fuente 216 puede aplicar una escasa presión o ninguna en absoluto en absoluto a través de la membrana 206 durante un periodo prolongado, lo que permite que las células 204 colonicen la membrana en su estado no elongado, para aplicar entonces una presión diferente en virtud de la cual se estira la membrana 206, por ejemplo, en un punto del crecimiento del cultivo en que las células 204 acaban de llegar a su confluencia y han establecido un contacto de unión con intersticios.
- Para una carga de compresión, la cubeta o cámara de cultivo 200 es, en lugar de ello, herméticamente cerrada con una cubierta 220 y conectada directamente a una fuente de presión 216, tal y como se muestra en la Figura 8b. La fuente 216 crea una presión hidrostática estacionaria o fluctuante en el medio 202, que es, por tanto, aplicada directamente a la capa de células 204.
- Como medios alternativos para la carga de compresión, se suprimen el tubo 212 y la fuente de presión 216, y la cubierta 220 de cámara adopta la forma de un pistón móvil por medio del cual puede aplicarse presión estacionaria o fluctuante directamente al medio 202 y, de esta forma, a las células 204, tal y como se muestra en la Figura 8c.
- Para la carga de cizalla, la cubeta de cultivo 200 se conecta a la fuente de presión 216, en lugar de por lo anterior, por medio de dos tubos 212a y 212b a través de los cuales se hace circular el medio 202, tal y como se muestra en la Figura 8d. Este flujo puede, bien ser constante en un único sentido, bien intermitente, o bien oscilante. Cada tubo está, preferiblemente, equipado con unos deflectores 220 con el fin de conseguir un flujo más uniforme, tal y como se ha indicado generalmente por la flecha 222. Los deflectores 220 pueden haberse hecho independientes de los electrodos 210, tal como se muestra, o bien, alternativamente, los electrodos pueden haberse perforado o hecho de

otra manera discontinuos para que formen, por sí mismos, deflectores. El movimiento del medio 202 y su rozamiento con la capa de células 204 generan la carga de cizalla deseada.

5 Como medios alternativos para proporcionar una carga de cizalla, los tubos 212a y 212b y la fuente de presión 216 son reemplazados por un hélice móvil 230 que mantiene el medio 202 en movimiento con respecto a la capa de células 204, tal y como se ha indicado generalmente por la flecha 232. La hélice 230 puede adoptar cualquiera de diversas formas, si bien puede, ventajosamente, ser de forma cilíndrica según se muestra en la Figura 8e, en la que el fondo rígido 208 de la cámara 200 se aproxima a la misma forma que, y mantiene un espacio de separación relativamente uniforme con, la superficie de la hélice. El medio 202 se hace, con ello, barrer de forma continua y a 10 una velocidad estacionaria por encima de las células 204, simplemente al mantener la hélice 230 en rotación a una velocidad constante. Alternativamente, el cambio de la velocidad de la hélice 230 modificará la velocidad del flujo y, por tanto, la intensidad de la carga de cizalla. No se han mostrado los electrodos 210 puesto que pueden adoptar una variedad de posiciones en esta disposición. Preferiblemente, sin embargo, el suelo de células rígido 208 y la hélice 230 están, en cuanto a ellos, hechos de metales adecuados para electrodos, más preferiblemente, de metales 15 autoprotectores y, de la forma más preferida, de niobio anodizado, y desempeñan en sí mismos la función de electrodos.

Modulación diferencial del crecimiento del hueso

20 Las formas de onda de la presente invención según se han descrito anteriormente son también de utilidad en métodos para favorecer para favorecer el crecimiento y la reparación de tejido óseo in vivo. Como se ha descrito en lo anterior, la estimulación con formas de onda del tipo A favorece la proliferación de células. Las formas de onda del tipo A también tienen como resultado un incremento de las proteínas morfogénicas óseas a fin de favorecer la diferenciación. En una realización, un incremento de la producción de BMP-2 y de BMP-7 se lleva a cabo utilizando 25 señales eléctricas del tipo A o, en un menor grado, del tipo B. Este efecto es altamente apreciado y proporciona un método para mejorar la generación de tejido suficiente para una cicatrización del tejido apropiada in vivo, o para crear injertos de tejido. Esta señal es también valiosa para proporcionar la masa de células suficiente para su infiltración dentro de una férula de polímero para propósitos de ingeniería de tejidos. En otra realización, según se ha demostrado por ensayos in vitro, la estimulación in vivo proporciona una proliferación y diferenciación de osteoblastos adecuadas para incrementar el número de osteoblastos para mineralización. Tal incremento del 30 número de células proporciona un método para llenar los intersticios u orificios a la hora de desarrollar o regenerar el hueso por medio de estimulación eléctrica. Las células generadas a través de la proliferación inducida por formas de onda del tipo A pueden ser utilizadas de inmediato, o conservadas utilizando métodos de conservación de células convencionales hasta que se presente una necesidad futura.

35 La estimulación con formas de onda del tipo B favorece la proliferación en un pequeño grado y tiene diferentes efectos que las formas de onda de tipo A. Acciones favorecidas por las formas de onda del tipo B incluyen la mineralización, la producción de proteína extracelular y la organización de la matriz, si bien no están limitadas por estas. Las acciones de las formas de onda del tipo B son también valiosas y proporcionan métodos para mejorar la etapa de mineralización y la osificación de nuevo tejido celular. En una realización, el desarrollo o la regeneración de 40 tejido óseo son estimulados con formas de onda del tipo B para mejorar la velocidad de mineralización. Se ha propuesto que las formas de onda del tipo B puedan actuar a través de caminos de calcio / calmodulina y, también, mediante la estimulación de receptores acoplados a proteína G o mecanorreceptores existentes en células óseas. (Bowler, Front Biosci, 1998, 3:d769-780; Baribault et al., Mol Cell Biol, 2006, 26(2):709-717.) Así, pues, se proporcionan también métodos para modular la actividad de acciones intermediadas por calcio / calmodulina así 45 como por receptores acoplados a proteína G y mecanorreceptores utilizando la estimulación eléctrica. La modulación de estos caminos celulares y receptores es apreciada para favorecer el crecimiento y la reparación de tejido óseo in vitro o in vivo.

50 La estimulación con formas de onda del tipo C favorece la regeneración, la maduración y la calcificación óseas. Estas formas de onda son también apreciadas y proporcionan métodos para mejorar la etapa de mineralización y la osificación de nuevo tejido óseo.

55 La estimulación utilizando formas de onda del tipo D favorece el desarrollo y la cicatrización del cartílago y la calcificación del hueso, y es de utilidad para tratar o revertir la osteoporosis y la osteoartritis. Aplicaciones de estas formas de onda incluyen aplicaciones in vivo, tales como la reparación de cartílago dañado, el aumento de la densidad ósea en pacientes con osteoporosis, así como aplicaciones in vitro relacionadas con la ingeniería de tejidos de cartílago, por ejemplo.

60 Se proporcionan también métodos para un uso combinado o secuencial de las formas de onda descritas en esta memoria para el desarrollo de un régimen de tratamiento destinado a obtener resultados biológicos específicos a la hora de desarrollar o regenerar tejido osteocondral.

65 En una realización, pueden tratarse las fracturas en pacientes con una enfermedad ósea con señales para cicatrizar la fractura y, a continuación, reforzar el hueso. Como ejemplo no limitativo de esta realización, un paciente de osteoporosis con una fractura puede ser tratado, en primer lugar, por estimulación con una señal del tipo A para

favorecer la proliferación y la liberación de factores de crecimiento y, seguidamente, con un una forma de onda del tipo B para favorecer un aumento de la densidad ósea en el lugar de la reparación, a fin de incrementar la densidad de masa ósea y prevenir una nueva fractura.

5 En otra realización, puede emplearse la combinación de dos o más tipos de las formas de onda que se han descrito en esta memoria al objeto de favorecer la proliferación, diferenciación y mineralización secuenciales de tejidos osteocondrales. Como ejemplo no limitativo de esta realización, puede hacerse crecer un cultivo de osteoblastos bajo la influencia de una señal del tipo A al unirse con una matriz polimérica o antes de su unión con ella. Una vez
10 inseminada la matriz polimérica, se administran entonces señales del tipo B a la pieza construida de matriz de células para favorecer la mineralización de una pieza construida de utilidad como injerto de hueso.

En una tercera realización, pueden administrarse dos o más señales simultáneamente para favorecer la proliferación, diferenciación y mineralización concomitantes de tejido osteocondral in vivo o in vitro. Pueden aplicarse
15 también diferentes señales de forma secuencial al tejido osteocondral con el fin de obtener un mayor efecto que con el aporte de solo una de las señales. El procedimiento secuencial puede ser repetido según se requiera para producir tejido adicional (tal como hueso) mediante la realización cíclica del procedimiento de dos etapas las veces suficientes para obtener el efecto biológico deseado. Como ejemplo no limitativo específico, pueden aplicarse señales del tipo A en primer lugar para producir más células óseas por proliferación, y, a continuación, pueden aplicarse señales del tipo B para inducir que un mayor número de células óseas produzcan más tejido óseo (de
20 matriz, mineral y de organización), y, seguidamente, repetir si es necesario. La cantidad de hueso producido utilizando la repetición de un protocolo de estimulación secuencial será mayor que la producida por alguna de las señales por sí sola, o en combinación.

Estimulación de células progenitoras

25 Los métodos y las formas de onda descritas en esta memoria pueden ser aplicados a células precursoras no diferenciadas al objeto de favorecer la proliferación y/o la diferenciación en linajes comprometidos. Tales células progenitoras pueden incluir células madre, progenitoras no comprometidas, células progenitoras comprometidas, progenitoras multipotentes, progenitoras pluripotentes o células en otras etapas de diferenciación, si bien no están limitadas por estas. También se incluyen específicamente los osteoblastos y los condroblastos. En una realización,
30 células madre adultas multipotentes (células madre mesenquimales y células madre de médula ósea) son estimuladas con señales del tipo A in vitro para favorecer la proliferación y la diferenciación de las células madre adultas multipotentes en caminos específicos tales como hueso, tejidos conjuntivos, grasa, etc. La administración en combinación o secuencial de ambas señales también se ha contemplado para la estimulación de células progenitoras, como se ha descrito anteriormente.

35 Alternativamente, las formas de onda y los métodos que se describen en la presente memoria pueden ser también aplicados a células madre adultas multipotentes (células madre mesenquimales o células madre de médula ósea) in vivo para estimular células con señales del tipo A, al objeto de favorecer la proliferación y la diferenciación de las células madre adultas multipotentes en caminos específicos tales como hueso, tejidos conjuntivos, grasa, etc. Se ha
40 contemplado también la administración en combinación o secuencial de ambas señales.

La estimulación eléctrica de células progenitoras puede también acompañarse de factores de proliferación y diferenciación de los que se sabe que favorecen la proliferación o la diferenciación de las células progenitoras. Factores de proliferación incluyen cualquier compuesto que tenga efectos mitogénicos en las células. Tales factores
45 de proliferación pueden incluir bFGF, EGF, factor de estimulación de colonias de granulocitos, IGF-I y otros factores similares, si bien no están limitados por estos.

Los factores de diferenciación incluyen cualquier compuesto que realice acciones diferenciadas en las células. Tales factores de diferenciación pueden incluir ácido retinoico, BMP-2, BMP-7 y otros factores similares, si bien no están
50 limitados por estos.

Las formas de onda eléctricas descritas en esta memoria proporcionan una modulación diferencial y en combinación sobre el crecimiento y el desarrollo de tejido osteocondral in vitro o in vivo. El hecho de incrementar la proliferación de células con señales del tipo A antes de la mineralización aumenta el número de células óseas y, por tanto,
55 proporciona un incremento en la subsiguiente mineralización llevada a cabo por la estimulación con señales del tipo B. Las formas de onda de la presente invención también favorecen la proliferación y la mineralización de células progenitoras mediante la liberación de óxido nítrico y proteínas morfogénicas óseas.

Acoplamiento capacitivo

60 La estimulación de preparaciones in vitro o in vivo resulta a menudo difícil con metales autopasivantes debido a que es difícil obtener conexiones eléctricas entre los metales. La presente invención proporciona métodos para obtener los beneficios de utilizar electrodos de metales autopasivantes sin los problemas asociados con la obtención de conexiones eléctricas sólidas. El acoplamiento capacitivo de estos electrodos proporciona un método para inducir corriente continua a través del electrodo de metal autopasivante, eludiendo la necesidad de cualquier conexión
65 eléctrica. En este método, electrodos hechos de metales autopasivantes tales como el niobio, tántalo, titanio,

zirconio, molibdeno, aluminio y aceros inoxidables, son esterilizados y colocados en estrecha proximidad con una población de células que se han de estimular. Se colocan alambres de circuito en una estrecha proximidad con los electrodos de metal, en el seno de un medio conductor tal como una solución salina, y se transmiten señales eléctricas a través de los cables de circuito de un modo tal, que se acopla corriente capacitivamente desde el alambre, a través de la solución salina y la capa de óxido, hasta el electrodo de metal autopasivante, a fin de estimular con ello la población de células. En una realización, se utiliza la estimulación con acoplamiento capacitivo para aplicaciones in vitro tales como el cultivo celular, si bien no están limitadas por esta. Puede estimularse un solo plato de cultivo utilizando este método, o bien pueden vincularse entre sí varios platos o cubetas de cultivo para una estimulación eléctrica uniforme.

En otra realización, se utilizan estimulaciones con acoplamiento capacitivo para aplicaciones in vivo en las que un electrodo de metal anodizado y estéril es implantado dentro de un paciente que necesita tratamiento, y se colocan los alambres de circuito fuera del paciente, en contacto con la piel, para inducir una corriente en el electrodo de metal implantado durante un lapso de tiempo eficaz para favorecer la reparación o el crecimiento de un tejido. Por ejemplo, el extremo exterior del electrodo puede formar una bobina plana justo por debajo de la piel, y puede acoplarse la señal en ella utilizando un electrodo de contacto cutáneo convencional, colocado sobre la piel, directamente por encima de esta bobina. Las partes del electrodo acoplado capacitivamente de las que no se desea un estrecho acoplamiento capacitivo con los tejidos pueden cubrirse con cualquier material aislante adecuado para utilizar en circuitos implantados, como es bien conocido en la técnica, con lo que se minimiza la pérdida de señal y la estimulación no deseada de tejidos que no se están tratando. En un ejemplo específico tal como la reparación de huesos, un electrodo de metal anodizado estéril, hecho de un metal autopasivante, es implantado dentro de un paciente que necesita tratamiento, y es estimulado. Una vez transcurrido un lapso de tiempo suficiente para la reparación del hueso, puede extraerse el electrodo del paciente.

Aumento de la expresión de BMP

La presente invención incluye, de manera adicional, métodos y aparatos que utilizan formas de onda del tipo A y del tipo B para favorecer la expresión y la liberación de proteínas morfogénicas óseas (BMPs –“bone morphogenic proteins”–) a partir de células estimuladas. Las señales eléctricas descritas en esta memoria pueden ser utilizadas para provocar la liberación de BMPs en grados suficientes para inducir un beneficio en los tejidos expuestos a las señales. Pueden producirse beneficios en tejidos no directamente expuestos a las señales.

Las BMPs son polipéptidos implicados en la osteoinducción. Son miembros de la superfamilia de factor de crecimiento beta de transformación, con la excepción de la BMP-1. Se han identificado y estudiado hasta la fecha al menos 20 BMPs, pero solo las BMPs 2, 4 y 7 han sido capaces de estimular in vitro todo el proceso de diferenciación de células madre en células osteoblásticas maduras. La investigación actual está tratando de desarrollar métodos para suministrar BMPs para la regeneración de tejido ortopédico. (Seeherman, Cytokine Growth Factor Rev., junio de 2005; 16(3):329-45.) Se proporcionan métodos en esta memoria para inducir la liberación de BMPs in vivo o in vitro para la regeneración de tejido ortopédico a través de la estimulación eléctrica, en lugar de por medio del suministro de BMPs exógenas en métodos de aporte técnicamente exigentes y costosos.

En una realización, se utilizan formas de onda del tipo A y, en un menor grado, del tipo B para inducir la expresión y la liberación de BMPs endógenas. La liberación de BMPs endógenas favorece el crecimiento y la diferenciación de los tejidos de objetivo, o pretendidos. La colocación de electrodos de estimulación proporciona una vía a la expresión de BMP de objetivo hacia zonas localizadas de una preparación in vitro, o in vivo, en un paciente que necesita una expresión de BMP incrementada. En una realización, BMP-2 o BMP-7, o combinaciones de estas, son liberadas de forma endógena para llevar a cabo la diferenciación y el crecimiento de tejido de objetivo. En una realización específica, la liberación de una de BMP-2 y BMP-7 o de ambas favorece la diferenciación, la mineralización, la producción de proteínas y la organización de matriz en el tejido del hueso o del cartílago.

Estimulación de células de hueso, cartílago u otro tejido conjuntivo mediante óxido nítrico

Los métodos y las señales eléctricas descritos en esta memoria pueden también ser utilizados para favorecer la reparación y el crecimiento de hueso, cartílago u otros tejidos conjuntivos. En una realización, una forma de onda del tipo B aumenta el crecimiento de células a través de la liberación de óxido nítrico (NO). Las formas de onda pueden provocar la liberación de óxido nítrico en grados suficientes para inducir un beneficio en los tejidos expuestos a las señales. Puede producirse el beneficio en tejidos no directamente expuestos a las señales. El crecimiento de células de hueso, cartílago u otro tejido conjuntivo puede verse incrementado adicionalmente mediante la administración conjunta de un donante de NO en combinación con la estimulación eléctrica. Donantes de NO incluyen nitrosulfuro de sodio (SNP), SIN-1, SNAP, DEA/NO y SPER/NO, si bien no están limitados por estos. El crecimiento de células de hueso, cartílago y otro tejido conjuntivo puede ser reducido mediante la administración conjunta de un inhibidor de sintasa de NO en combinación con la estimulación eléctrica. Tales inhibidores de sintasa de NO incluyen N(G)-nitro-1-arginina metil éster (L-NAME), NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), y 7-nitroindazola (7-NI), si bien no están limitados por estos. Utilizando estos métodos, el crecimiento de células de hueso, cartílago u otro tejido conjuntivo puede ser modulado dependiendo de las necesidades específicas.

Aplicación de los aparatos y métodos de la presente invención

Mediante el uso de los aparatos de la presente invención y de los métodos según se ha descrito en la presente memoria, estos aparatos y métodos son efectivos para favorecer el crecimiento, la diferenciación, el desarrollo y la mineralización de tejido osteocondral.

5 Se cree que el aparato opera directamente en el lugar del tratamiento potenciando la liberación de factores químicos, tales como las citoquinas, que están implicados en las respuestas celulares a diversas condiciones fisiológicas. Esto tiene como resultado un flujo sanguíneo incrementado e inhibe la inflamación adicional en el lugar del tratamiento, por lo que mejora los procedimientos de cicatrización intrínsecos del cuerpo.

10 La presente invención es de especial utilidad a la hora de acelerar la cicatrización de fracturas óseas simples o complejas (múltiples o fragmentadas), incluyendo huesos serrados o rotos durante la cirugía, aunque sin limitarse a estos. La presente invención puede ser utilizada para favorecer la soldadura de las vértebras tras una cirugía de soldadura de la columna vertebral.

15 La presente invención puede ser utilizada para tratar fracturas sin unión, para tratar, prevenir o revertir la osteoporosis, para tratar, prevenir o revertir la osteopenia, para tratar, prevenir o revertir la osteonecrosis, para retardar o revertir la formación de hueso entrelazado (callos, espuelas óseas), para retardar o revertir la pérdida de calcio óseo en un descanso en cama prolongado, o para retardar o revertir la pérdida de calcio óseo en microgravedad. Además, la presente invención puede ser utilizada para aumentar la circulación sanguínea local, aumentar el flujo de sangre a zonas de lesión traumática, aumentar el flujo de sangre a zonas de úlceras de piel crónicas, y para modular la coagulación de la sangre.

20 Una de las áreas en las que puede también utilizarse la presente invención es para acelerar la cicatrización de cartílago dañado o rasgado. También, la presente invención puede ser utilizada para acelerar la cicatrización (epitelialización) de heridas o úlceras en la piel.

25 La presente invención puede ser utilizada, de manera adicional, para acelerar el crecimiento de células o tejidos cultivados, modular la diferenciación de las células, modular la progresión del ciclo celular, modular la expresión de factores de crecimiento de transformación, modular la expresión de proteínas morfogénicas óseas, modular la expresión de factores de crecimiento de cartílago, modular la expresión de factores de crecimiento semejantes a la insulina, modular la expresión de factores de crecimiento de fibroblastos, modular la expresión de factores de necrosis tumoral, modular la expresión de interleuquinas y modular la expresión de citoquinas.

30 Los aparatos de la presente invención y los métodos divulgados se ilustran adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

35 Efecto de la configuración de la señal de PEMF en la mineralización y en la morfología en un cultivo de osteoblastos primarios

40 El objetivo de este estudio fue comparar dos configuraciones de forma de onda de PEMF aportadas con acoplamiento capacitivo mediante la evaluación de las variaciones bioquímicas y morfológicas en un cultivo de células óseas primarias.

Métodos

45 Cultivo de células de osteoblastos: los osteoblastos humanos primarios (CAMBREX[®], de Walkersville, MD) se expandieron hasta una confluencia del 75%, y se dispusieron como un revestimiento fino con una densidad de 50.000 células/ml directamente dentro de las cámaras LAB-TEK[™] (NALGE NUNC INTERNATIONAL[™], de Rochester, NY) descritas anteriormente. Se daba soporte inicialmente a los cultivos con medios de osteoblastos básicos, sin factores de diferenciación. Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 70% dentro de las cámaras, los medios fueron complementados con hidrocortisona-21-hemisuccinato (concentración final de 200 mM), β-glicerofosfato (concentración final de 10 mM) y ácido ascórbico. Los osteoblastos fueron incubados en aire humidificado a 37°C, con el 5% de CO₂ y el 95% de aire, durante 21 días. Se cambiaron los medios cada dos días en el curso del experimento, aportando a cada cámara un suplemento de 4 ml.

50 Estimulación eléctrica: los cultivos fueron estimulados durante 30 minutos o durante 2 horas dos veces al día. Se aplicaron selectivamente dos regímenes de señales eléctricas a las células, uno una forma de onda continua indicada como «Señal A» (duración de señal positiva / negativa de 60/28, en μs), y el otro, una forma de onda continua indicada como «Señal B» (duración de señal positiva / negativa de 200/28, en μs). Se midió la intensidad en tandas de muestreo como 2,4 mV/cm (de pico a pico). Se dispusieron como revestimiento fino osteoblastos no estimulados (NC) en idénticas densidades (como controles), de una manera similar. Se midió lo siguiente utilizando los procedimientos de la parte de Métodos detallados: fosfatasa, alcalina, calcio, osteocalcina e histología. Cada uno de los siguientes gráficos tiene por clave la señal «A», la señal «B», una duración de 30 minutos tiene la clave «1»,

una duración de 2 horas, la clave «2», y NC (sin confluencia) se asocia a la ausencia de corriente (es decir, A1 será la señal A - 30 minutos; B2 será la B - 2 horas).

El dispositivo eléctrico que se utiliza en esta memoria hace posible la aplicación de estimulación eléctrica de forma de onda continua a múltiples explantes simultáneamente. Para cada experimento, se colocaron 6 pares de explantes dentro de cubetas individuales, en 4 ml de medio de cultivo. Se cultivaron especímenes de control en condiciones similares, de manera que la única diferencia era la ausencia de señal suministrada. La presente configuración de ensayo consistía en seis cubetas de cultivo para ensayo (17 mm x 42 mm) conectadas en serie a través de una sección bobinada de alambre de niobio.

Se establecieron células de osteoblasto humano en cubetas de portamuestras LAB-TEK™ II (NALGE NUNC INTERNATIONAL™, de Rochester, NY), cada una de ellas con un área superficial de aproximadamente 10 cm². Se aplicaron señales a varias cámaras simultáneamente al haberse conectado en serie por medio de alambres de niobio que actuaban como una capacidad acoplada. Este estímulo era, bien un tren de 9 ms de impulsos rectangulares bipolares de 200/28 μs que se repetían cada 15 segundos, suministrando 9 mV/cm (similaramente a la señal de cicatrización ósea clínica estándar), designado como Señal B, o bien un tren de 48 ms de impulsos esencialmente unipolares de 60/28 μs que aportaban 4 mV/cm, designado como Señal A. Los impulsos recibían un estímulo de 30 min o uno de dos horas dos veces al día. Se tomaron muestras de los medios y se analizaron en momentos temporales de 7, 14 y 21 días en lo que respecta a la fosfatasa alcalina, la osteocalcina, el calcio en matriz y la histología. Se confirmó mineralización acompañando la morfología con el ensayo de la mancha de Von Kossa. Todos los ensayos bioquímicos se llevaron a cabo mediante técnicas de ensayo convencionales.

Resultados

Se estableció la producción de PGE₂ utilizando equipos ELISA disponibles en el mercado (R&D SYSTEMS™, de Minneapolis, MN; INVITROGEN, INC.™, de Carlsbad, CA). Los resultados se expresaron como pg/mg de tejido por cada 24 horas (μM/g/24 horas).

Fosfatasa alcalina (AP –“alkaline phosphatase”–): en los instantes temporales indicados en el diseño de estudio, se fragmentaron células (PE de mamífero, Genotech, de St. Louis, MO) y se recogió el sobrenadante. Se midió la fosfatasa alcalina mediante el clivaje, o división, de para-nitrofenil fosfato (PNPP –“para-nitrophenyl phosphate”–) en nitrofenilo (PNP) en condiciones básicas, en presencia de magnesio. El PNP de producto final es colorimétrico con un pico de absorción a 405 nanómetros. Las condiciones básicas se consiguieron utilizando 0,5 M de solución amortiguadora de carbonato con un pH de 10,3. Los medios de cultivo se ensayaron directamente en cuanto a su actividad de ALP. Se extrajo la ALP de la capa de células con una solución de triton X-100, y se midió una parte alícuota en cuanto a su actividad de ALP. Se midió la fosfatasa alcalina tanto en el sobrenadante como en la membrana a continuación de la extracción de la solución amortiguadora de fragmentación (Figura 5). Como cabía esperar de otros estudios (Lohman, 2003), la expresión de la fosfatasa alcalina presentaba un pico cerca de los 7 días en la membrana. En las células cultivadas bajo el estímulo «B», sin embargo, los medios de cultivo seguían mostrando un aumento de AP medible.

Osteocalcina: la osteocalcina (5.800 daltons) es un producto específico del osteoblasto. Se libera directamente a la circulación una pequeña cantidad de osteocalcina; esta es depositada, fundamentalmente, en el seno de la matriz ósea. Los estudios han demostrado que la osteocalcina circula tanto en forma de proteína intacta (1-49) como en fragmentos N terminales. El mayor fragmento N terminal es el péptido (1-43). Se seleccionó un equipo ELISA Mid-Tact Osteocalcin por su alta especificidad. El ensayo es altamente sensible (0,5 ng/ml) y requirió unidamente una muestra de 25 microlitros. Estándares cursados simultáneamente con los grupos experimentales de los presentes inventores ofrecieron una fuerte correlación con los valores esperados proporcionados por los fabricantes de la BTI (BTI, de Stoughton, MA). La deposición de osteocalcina, medida subsiguientemente al enfriamiento de los cultivos y determinada a partir del componente de matriz, era más pronunciada seguidamente al estímulo «B» y era más alta a los 21 días (Figura 6).

Contenido de ADN: se extrajo la capa de células con 0,1 N de hidróxido sódico y se ensayó la parte alícuota con respecto a su contenido de ADN utilizando un equipo de ensayo CyQuant (INVITROGEN, INC.™, de Carlsbad, CA). Para las muestras de células extraídas para averiguar su contenido ALP con triton X-100, la parte extraída se ajustó al 0,1 N de hidróxido sódico utilizando hidróxido sódico 1 N. Las curvas estándar contienen solución amortiguadora de correspondencia. Para muestras que también requerían averiguar el contenido de proteínas, se midió una parte alícuota en cuanto a su contenido de proteínas utilizando un método de unión con pigmentos (Bradford).

Calcio: se determinó el calcio por la metodología de Schwarzenbach con o-cresoltaleína complexona, que forma un complejo de color violeta. Añadiendo 2 ml de ácido acético 0,5 M durante la noche, el calcio se disolvió y el contenido fue cuantificado con respecto a los estándares por ensayo colorimétrico a 552 nm (CORE LABORATORY SUPPLIES™, de Canton, MI).

Se estableció también la distribución del calcio en el cultivo por histología. Las células se fijaron en glutaraldehído al 2%, se lavaron con solución amortiguadora de cacodilato, se lavaron con PBS y, a continuación, se hidrataron para

su manchado según se indica. Cada periodo de tiempo se hizo cursar en tándem; la morfología representativa se ha presentado para los 21 días, comparando la señal «A» con la señal «B», y comparando ambas señales con el control (Figura 6). Para la señal B, la observación más sorprendente se produjo en la distribución del calcio, con un aparente alineamiento preferente que se interpreta, por parte de los presentes inventores, como hueso "pseudoesponjoso". Para la señal A, aparentemente hubo cualitativamente más proliferación celular y menos producción de matriz que para la señal B (si bien la señal A claramente presentaba más matriz que con los controles).

El análisis osteométrico fue desarrollado y modificado a partir de la metodología de Croucher. En este sistema de cámaras bidimensional, se estudió el área trabecular media en relación con el área total de la parrilla muestreada. Utilizando un mínimo de 20 campos obtenidos de dos cámaras en cada intensidad, el estudio examinó la formación de hueso, la anchura de osteoide y el número de células. Se desarrollaron parrillas aleatorias específicas para la comparación directa y para la eliminación del sesgo. Adicionalmente, los cultivos de osteoblastos contenidos tanto en la cámara estimulada como en la de control fueron manchados directamente por el método de Von Kossa (Mallory, 1961) con el fin de examinar la histología y caracterizar la distribución de calcio dentro de los cultivos.

Conclusión

La fosfatasa alcalina, que creció hasta un pico cerca de un tiempo entre 10 y 14 días y, seguidamente, disminuyó, se vio incrementada en el sobrenadante estimulado por la Señal B. La deposición de osteocalcina, medida subsiguientemente al enfriamiento de los cultivos y determinada a partir del componente de matriz, era más pronunciada a continuación de la Señal B únicamente, y aumento hasta su magnitud más alta a los 21 días. El calcio de matriz medido en mg/dl, y el calcio de matriz en función del área de la placa de cultivo de tejido eran los mayores con la Señal B únicamente. La distribución mineral, según se apreciaba por la histología y por el ensayo de manchado de Von Kossa, validaba los datos bioquímicos obtenidos del análisis. El estímulo B confería una mayor cantidad de mineral y, lo que es más, sugería una configuración reticulada en dos dimensiones que puede ofrecer una dinámica de tensiones análoga a la que cabría esperar en un conjunto geoméricamente ordenado trabecular en 3 dimensiones. La proliferación celular parecía cualitativamente más alta con la Señal A con respecto al control, en tanto que unas mineralización y configuración significativamente incrementadas se hicieron evidentes a los 21 días con la Señal B.

El hecho de que las dos configuraciones de señal produjeran efectos muy diferentes es fácilmente explicable por un análisis de relación entre señal y ruido (SNR –"signal to noise ratio"–), que mostrada que la susceptibilidad de detección de la señal B era 10 veces más elevada que la de la señal A, suponiendo un objetivo de Ca/CaM. Este estudio demuestra por primera vez que el PEMF tiene el potencial de llevar a cabo un cambio estructural resonante con la morfología de los tejidos. La configuración geométrica aparente a los 21 días de cultivo reproducía exactamente el reticulado trabecular en consonancia con el hueso esponjoso y contrastaba acusadamente con la orientación aleatoria de las células tanto en el control como en los cultivos expuestos a la señal A en todos los instantes temporales evaluados. Tales resultados sugieren que las configuraciones de señal preferidas son capaces de producir jerarquías estructurales que estaban previamente limitadas a las observaciones en los tejidos.

EJEMPLO 2

Uso de un puente de «sal» de niobio para la estimulación de PEMF in vitro

Introducción

Se desarrolló un sistema de electrodos pasivos utilizando alambre de niobio anodizado, a fin de acoplar señales eléctricas variables en el tiempo en cámaras de cultivo. La intención del diseño era reducir la complejidad y mejorar la reproducibilidad reemplazando la tecnología de puente de electrolito convencional por el aporte de señales del tipo de PEMF, tales como las inducidas en el tejido por el estimulador del crecimiento óseo por trenes de impulsos repetitivos EBI, de forma capacitiva en lugar de inductiva, in vitro para estudios celulares y de tejidos. El alambre de niobio anodizado se encuentra fácilmente disponible y requiere únicamente de simples herramientas manuales para formar el puente de electrodos. A las frecuencias utilizables, por lo común comprendidas entre 5 Hz y 3 MHz, el paso de corriente CC es despreciable.

Antecedentes

Se han venido introduciendo, por lo común, campos eléctricos acoplados capacitivamente en medios de cultivo con puentes de sal de electrolito convencionales, los cuales han limitado la respuesta en frecuencia y son difíciles de utilizar sin riesgo de contaminación para tiempos de exposición prolongados. El niobio (columbio) es uno de los varios metales que son autopasivantes, por lo que forman capas de óxido superficial delgadas pero muy duraderas cuando se exponen al oxígeno o a la humedad. Otros de ellos son el tántalo, el titanio y, en mucha menor medida, los aceros inoxidable. El proceso puede ser acelerado y controlado por anodización. Un problema de la autopasivación es que dificulta una conexión fiable con otros metales. El presente diseño evita esta dificultad.

Materiales y métodos

El óxido de niobio, Nb₂O₅, es duro, transparente, eléctricamente aislante e inerte al agua, a los reactivos comunes y a los fluidos biológicos en un amplio intervalo de pH. La anodización del niobio forma Nb₂O₅ con un espesor

uniforme, que muestra un abanico de vívidos colores en su interferencia con la luz que son estimados en joyería, puesto que no ha de añadirse ningún pigmento, y ofrece capacidades estables y reproducibles. El niobio de joyería se vende en colores normalizados, cada uno de los cuales representa un espesor de óxido diferente. Puesto que la constante dieléctrica del Nb₂O₅ es inusualmente alta ($\epsilon_R = 41 \epsilon_0$) y las capas son delgadas (entre 48 y 70 nm), sus capacidades son sorprendentemente grandes. El niobio «púrpura» tiene la capa de óxido más delgada y las más elevadas medidas de capacidad: 0,158 $\mu\text{F}/\text{cm}$ para alambre de calibre 22 (Rio Grande #638-240), cerca del valor calculado para el óxido 48 nm (reflectancia de pico a 420 nm). En agua o en soluciones salinas, los extremos del alambre cortado y las pequeñas fisuras formadas al ser doblado se cierran rápidamente con óxido, sin que se necesite una nueva anodización.

El puente de niobio:

En esta aplicación, el óxido de niobio constituye el único contacto eléctrico con el medio, y las señales del tipo de PEMF pasan a través de este de forma capacitiva. Para magnitudes de señal por debajo de unos pocos miliamperios, lo que hay es una electrólisis o cambio en el pH despreciable para provocar señales espurias. Pueden unirse múltiples cámaras en serie, cada una de las cuales recibe idénticas señales. Cada puente de niobio se dobla formando un electrodo en forma de lámina en cada extremo, con una capacidad típica de 0,56 μF . La colocación de puentes de electrodos en los extremos de una cámara rectangular crea una distribución de corriente y gradientes de tensión casi uniformes a lo largo y ancho del medio. Los gradientes se midieron en una disposición típica de cambiador de cultivos, electrodos y señal del tipo de PEMF según se ha mostrado anteriormente en la Figura 4 y descrito en el texto que la acompaña, mostrando una variación media de $\pm 3\%$, fundamentalmente cerca de los electrodos o donde el medio varía significativamente de profundidad. Una cámara, o varias unidas en serie, es alimentada con energía a través de puentes de extremo de niobio especiales, cada uno con su extremo exterior acoplado capacitivamente, a través de solución salina, a un electrodo de tira de plata que constituye un terminal de conexión. Esto elimina toda necesidad de conectar el niobio a sí mismo o a cualquier otro metal. La corriente es controlada por una resistencia limitadora en serie, R_{lim} . La banda de paso resultante (± 3 dB de la nominal) varía algo con R_{lim} , pero en una disposición de ensayo varió entre 5 Hz y 3 MHz, la frecuencia más alta probada. Las señales del tipo de PEMF pueden, por lo tanto, ser aportadas sin distorsiones in vitro a través de acoplamiento capacitivo.

Experimentación:

La utilidad del puente de electrodos de niobio se puso a prueba en cultivos de osteoblasto y condrocito utilizando una forma de onda del tipo B según se ha descrito previamente. Con esta señal aplicada a un medio de osteoblastos OGMTM (CAMBREX[®], de Walkersville, MD), sin células presentes el pH medido tras 24 horas fue 8,29, comparado con 8,27 en controles no alimentados energéticamente, lo que sugería una electrólisis despreciable. La ausencia de una citotoxicidad fisiológicamente significativa se demostró por la robusta proliferación de osteoblastos, la diferenciación y el desarrollo de una estructura similar al hueso esponjoso a los 21 días en OGMTM, utilizando formas de onda tanto del tipo A como del tipo B. Después de una exposición de 30 minutos y de 2 horas, durante 21 días, a la forma de onda, el cultivo, las células y la matriz fueron analizados con rayos X de energías dispersas (EDX – “energy-dispersive X-ray”–). No se pudo detectar nada de niobio. En otros estudios, se aplicó una señal de tipo B a células de cartílago humano (HCC –“human cartilage cells”–) en un medio de cultivo que contenía el 1% de suero de ternero fetal, durante 96 horas. La señal del tipo B provocó un incremento del 154% en el número de células según se midió por el contenido de ADN de la capa de células, de nuevo sin mostrar una citotoxicidad significativa. En una comparación directa entre la señal acoplada capacitivamente y una señal en todo lo demás idéntica, pero acoplada electromagnéticamente, cada una de ellas aportada durante 30 minutos diariamente durante cuatro días, los incrementos medidos del número de osteoblastos por ADN difirieron significativamente de los controles (157% para el niobio, 164% para el acoplamiento EM), pero no entre sí.

Conclusiones

Se ha desarrollado un novedoso puente de electrodos de niobio para aplicar señales del tipo de PEMF capacitivamente acopladas a células / tejidos de un cultivo. La banda de paso del puente de niobio es entre 5 Hz y 3 MHz, de tal manera que señales del tipo de PEMF como las utilizadas clínicamente para la reparación de huesos y heridas pasan sin distorsión. A diferencia de las configuraciones de puente de electrolito convencionales, el puente de niobio proporciona una densidad de corriente uniforme dentro del plato de cultivo. Su aplicación para exposiciones de PEMF prolongadas no muestra electrólisis ni una citotoxicidad fisiológicamente significativa.

EJEMPLO 3

Estimulación de células de cartílago utilizando una señal de PEMF acoplada capacitivamente

Introducción

Se está poniendo a prueba en el momento presente una señal de PEMF similar a la utilizada clínicamente para la reparación de huesos, en cuanto a su capacidad para reducir el dolor en las articulaciones de pacientes artríticos. Es de interés si esta señal de alivio del dolor puede también mejorar el problema subyacente del cartílago deteriorado.

Antecedentes

En comparación con las terapias farmacéuticas y la biología, las terapias basadas en PEMF ofrecen un tratamiento que es fácil de utilizar, no invasivo, no implica ningún agente extraño con posibles efectos secundarios y no requiere

tiempos de limpieza o eliminación. Aspectos de la terapia con PEMF incluyen la identificación de las células sensibles, la elucidación de un lugar en el que se produce la transducción física en una célula, y la determinación del mecanismo biológico de actuación que produce el resultado de una respuesta celular. El propósito de este estudio era determinar si una señal de PEMF específica que se estaba probando en el presente para el alivio del dolor (MEDRELIEF[®], Healthonics, Inc., GA), podría estimular células del cartílago in vitro, y si podría desvelarse un mecanismo biológico de actuación.

Métodos

Se colocaron células normales de cartílago humano (HCC; CAMBEX[®], de Walkersville, MD) en un fino revestimiento dentro de cámaras celulares rectangulares, en una única capa. La aplicación de PEMF se hizo capacitivamente acoplada a través de un sistema de puentes de electrodos de niobio que permitió que fluyera una corriente variable en el tiempo uniformemente a través de las cámaras. Una señal del tipo B de tren de impulsos según se ha descrito en esta memoria está compuesta de un tren de 10 ms de impulsos rectangulares asimétricos, de 200/28 microsegundos de anchura, repetido a 15 Hz. La señal de PEMF fue aplicada durante 30 minutos por tratamiento. Se averiguó el crecimiento celular mediante el contenido de ADN de la capa de células. Se averiguó el contenido de óxido nítrico (NO) de los medios de cultivo por medio de la reacción de Griess, utilizando un equipo de ensayo de la INVITROGEN, INC.[®] (de Carlsbad, CA). Los resultados se expresan en micromoles de NO por número de células, según se ha determinado por el contenido de ADN de la capa de células.

Resultados

Una señal de PEMF aplicada a 400 microamperios, de pico a pico, a células HCC cultivadas en medios de cultivo que contienen el 1% de suero de ternero fetal, cada 12 horas a lo largo de un periodo de 96 horas, dieron como resultado un aumento del crecimiento celular del $153 \pm 22\%$, $p < 0,001$. Eran de interés los medios de cultivo acondicionados recogidos 24 horas después del primer tratamiento con PEMF, que muestran un aumento del NO del $196 \pm 14\%$, $p < 0,001$, que descendió a niveles insignificantes a las 96 horas. Bajo condiciones similares, cuando se añadió SNP (un nitrosulfuro de sodio, donante de NO) hasta una concentración final de 3 microgramos /ml, se produjo también un incremento de NO a las 24 ($174 \pm 26\%$, $p < 0,001$), en comparación con los controles no tratados. En un experimento subsiguiente, la concentración de suero fue reducida al 0,1%, el PEMF se aplicó a 40 microamperios una vez cada 24 horas, y se tomaron medidas transcurridas 72 horas. El tratamiento con PEMF aumento el contenido de NO en los medios de cultivo acondicionados hasta el $154 \pm 30\%$, $p < 0,01$. Como se ha mostrado en la Figura 7, el tratamiento con PEMF aumentó el número de células y esta respuesta celular fue atenuada por L-NAME (un inhibidor de sintasa de óxido nítrico).

Conclusión

Estos resultados sugieren que una señal de PEMF que está siendo puesta a prueba en el momento presente para reducir el dolor de articulación debido a la artritis, puede también proporcionar beneficios para el cartílago. Los datos indican que las células de cartílago humano pueden responder a esta señal con un crecimiento celular incrementado. Por otra parte, un posible mecanismo biológico de actuación para el crecimiento celular de cartílago estimulado con PEMF es a través de la liberación de NO. Una similar respuesta de las células de cartílago a un donante de NO da soporte a esta hipótesis. Aunque no son concluyentes, los datos sugieren que el crecimiento celular incrementado que sigue al tratamiento con PEMF, bien se da por la intermediación del NO, o bien ese NO es una etapa necesaria en el mecanismo para que el PEMF produzca un crecimiento celular incrementado.

EJEMPLO 4

Estimulación por PEMF de la producción de BMP en un cultivo de osteoblastos primarios: dependencia de la configuración de las señales y de la duración de la exposición

Introducción

Como añadido a la cirugía en la soldadura de la columna vertebral, o para el tratamiento de faltas de unión pertinaces en huesos largos, el PEMF ha demostrado ser efectivo como terapia sin cirugía. El trabajo piloto ha demostrado que los osteoblastos responden de forma diferente tanto a la configuración de la señal como a su duración. Una diferencia clave ha incluido una proclividad a la deposición de una matriz en lugar de a la proliferación de las células. Basándose en una eficacia demostrada del BMP en la soldadura de la columna vertebral y en faltas de unión, así como en esfuerzos que demuestran que la BMP-2 y la BMP-4 son estimuladas por PEMF (Bodamyali, 1998), el estudio de los presentes inventores se ha centrado en una mejor comprensión acerca de si las respuestas celulares anteriores pueden ser correlacionadas con la regulación de BMP.

Objetivo

Este estudio comparó dos configuraciones de forma de onda de PEMF aportadas con acoplamiento capacitivo, correlacionando las variaciones bioquímicas y morfológicas en un cultivo de células óseas primarias con la regulación de BMP.

Metodología

Se establecieron células de osteoblasto humano normales dentro de cámaras de cultivo individuales de 10 cm². Se aplicaron señales a varias cámaras simultáneamente mediante su conexión en serie a través de alambres de niobio

que actuaban como una capacidad acoplada. Los estímulos consistían en una cadena continua, bien de impulsos rectangulares, bipolares, de 60/128 microsegundos, designada como «señal A», o bien de impulsos rectangulares, bipolares, de 200/28 microsegundos, designada como «señal B», que aplicaba campos eléctricos de pico a pico de 1,2 mV/cm (en A) o de 2,4 mV/cm (en B) de manera uniforme a los cultivos. Los cultivos fueron expuestos durante 30 minutos (1) o 2 horas (2), dos veces al día, de lo que se obtuvieron los grupos A1, A2, B1 y B2 para su comparación. Partes alicuotas previamente utilizadas para determinaciones de proteínas de membrana fueron analizadas por lo que respecta a la proteína BMP mediante un ensayo de ELISA, y matrices previamente utilizadas para la determinación del calcio y la interpretación de la morfología se utilizaron para aislar ARN [ácido ribonucleico] que fue subsiguientemente analizado por una reacción en cadena de transcriptasa inversa-polimerasa (RT-PCR) en dos etapas utilizando cebadores secuenciales conocidos y disponibles para BMP-2 y BMP-7 (ARN 18s). Tanto la señal que estimulaba la proliferación como la que estimulaba la deposición de matriz fueron analizadas en cuanto a la regulación de BMP y la traducción proteínica. Se utilizaron muestras de los instantes temporales de 7, 14 y 21 días para garantizar comparaciones idénticas para el ensayo.

Resultados

Los resultados principales de este experimento fueron seis: 1) la proteína BMP y el ARNm [ácido ribonucleico mensajero] para la BMP se elevaron en respuesta a ambos estímulos, en particular para el de la señal «A»; 2) el estímulo de 30 minutos aportado dos veces al día ofrecía un incremento de casi 40 veces más en la expresión de BMP a los 21 días, en comparación con el tratamiento de dos horas, de tal manera que la mayor parte de la ganancia se consiguió durante el periodo entre 14 y 21 días; 3) el estímulo de 30 minutos para la señal «A» proporcionó un incremento de 15 veces más en la expresión de BMP-7, de nuevo casi enteramente apreciado entre los análisis del día 14 y del día 21; 4) se observaron tan solo incrementos moderados en la BMP-2 o en la BMP-7 con respecto a la señal «B»; 5) este estudio proporciona la primera evidencia de que la expresión de la BMP-7 se ve favorecida por la estimulación con PEMF; y 6) si bien la constatación de la proliferación fue cualitativa, la naturaleza mitogénica de la deposición de BMP está en conformidad con los trabajos anteriormente publicados. El trabajo que evalúa el PEMF en una línea de células transformadas durante cortos periodos de tiempo sugiere que ni la BMP-3 ni la BMP-6 son estimuladas (Yajima, 1996). Los presentes inventores no evaluaron su modelo con respecto a estos factores de crecimiento.

Conclusiones

Dado el cuerpo de trabajos que han mostrado que la BMP-2 tiene propiedades morfogénicas y mitogénicas, la proliferación de las células en respuesta a la señal «A» no es algo sorprendente. El hecho de que las dos configuraciones de señal produjeran efectos muy diferentes es potencialmente explicable por un análisis de SNR, que sugiere que la dosis de la señal «B» puede ser 10 veces más alta que la de la señal «A» con la suposición de un camino de transducción de Ca/CaM. Quizás más inesperadas fueron las cantidades de BMP-2 y BMP-7 normalizadas, a pesar de la exagerada deposición de matriz alcanzada por la señal «B». La formación de hueso es acusadamente dependiente de un equilibrio entre el factor de crecimiento y la microtopografía de la superficie –de hecho, la presencia de una superficie suave anula la respuesta celular a la BMP-2 y acentúa la mineralización distrófica. Dado el alto grado de organización de la matriz y la deposición que se observa en respuesta a la señal «B», la transducción de la BMP en, y de, sí misma parece insuficiente para una formación productiva de hueso y puede tener lugar por un mecanismo con un objetivo independiente.

EJEMPLO 5

Estudio de caso: tratamiento de la osteoporosis con estimulación por PEMF

Un individuo con osteoporosis (mujer, 50 años de edad, T = -3,092 al comienzo) utilizó la estimulación eléctrica haciendo uso de la señal B (200/30) durante 4-5 días de una semana, entre 3 y 5 horas cada día. La paciente siguió con las mismas medicaciones, suplementos y actividad durante un periodo de un año. El seguimiento de la densidad ósea por escaneo a los 6 meses y a los 12 meses reveló un incremento de la densidad de masa ósea del 16% y del 29%.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un sistema para modular el desarrollo o la reparación de hueso, cartílago u otro tejido conjuntivo, de tal manera que el sistema comprende:
- 5 medios de generación de señal eléctrica, configurados para generar una primera señal eléctrica que tiene una primera configuración repetitiva de un cierto número de trenes de impulsos, de tal manera que cada uno de los trenes de impulsos comprende una pluralidad de impulsos positivos individuales de una primera magnitud de tensión L_1 y de una primera duración T_1 , estando los impulsos positivos individuales separados por un
- 10 cierto número de impulsos negativos de una segunda duración T_2 y de una segunda magnitud de tensión L_2 , de modo que cada uno de los trenes de impulsos es de una tercera duración T_3 y están separados unos de otros al menos por un impulso de igualación de un cuarto periodo T_4 a la segunda magnitud de tensión L_2 , un cierto número de electrodos, acoplables eléctricamente a los medios de generación de señal eléctrica con el fin de acoplar operativamente al menos la primera señal eléctrica al tejido, **caracterizado por que**
- 15 la primera duración T_1 es igual a 13 ms, la segunda duración T_2 es igual a 200 ms y la tercera duración es igual a 1 s.
- 2.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los medios de generación de señal eléctrica se han configurado para generar la primera señal eléctrica de manera que incluye una duración adicional entre los trenes de impulsos de una tercera magnitud de tensión L_3 , estando la tercera magnitud de tensión L_3 comprendida entre la primera magnitud de tensión L_1 y la segunda magnitud de tensión L_2 , y de una señal sustancialmente nula.
- 20 3.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los trenes de impulsos se repiten a una frecuencia de al menos 1 Hz.
- 25 4.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los medios de generación de señal eléctrica se han configurado, adicionalmente, para generar una segunda señal eléctrica que tiene una primera configuración repetitiva de un cierto número de trenes de impulsos, de tal manera que cada uno de los trenes de impulsos comprende una pluralidad de impulsos positivos individuales de una primera magnitud de tensión L_1 y de una
- 30 primera duración T_1 , estando los impulsos positivos individuales separados por un cierto número de impulsos negativos de una segunda duración T_2 y de una segunda magnitud de tensión L_2 , de modo que cada uno de los trenes de impulsos es de una tercera duración T_3 y están separados unos de otros al menos por un impulso de igualación de un cuarto periodo T_4 a la segunda magnitud de tensión L_2 , de modo que la primera duración T_1 , la segunda duración T_2 y la tercera duración T_3 se han seleccionado del grupo de ternas consistentes en:
- 35 A) la primera duración T_1 está comprendida entre 20 μ s y 100 μ s, la segunda duración T_2 está comprendida entre 5 μ s y 75 μ s, y la tercera duración T_3 está comprendida entre 0,5 ms y 500 ms;
- 40 B) la primera duración T_1 está comprendida entre 100 μ s y 1.000 μ s, la segunda duración T_2 está comprendida entre 5 μ s y 75 μ s, y la tercera duración T_3 está comprendida entre 1,0 ms y 50 ms; y
- 45 C) la primera duración T_1 está comprendida entre 100 μ s y 1.000 μ s, la segunda duración T_2 está comprendida entre 20 μ s y 100 μ s, y la tercera duración T_3 está comprendida entre 1,0 ms y 50 ms.
- 5.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual los medios de generación de señal eléctrica se han configurado para generar la primera y la segunda señales eléctricas consecutivamente una con respecto a la otra.
- 6.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual los medios de generación de señal eléctrica se han configurado para generar la primera y la segunda señales eléctricas de forma concurrente una con respecto a la otra.
- 50 7.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, de tal manera que el sistema se ha configurado, adicionalmente, para proporcionar una carga mecánica en combinación con la generación de la primera señal.
- 8.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los electrodos se han configurado para proporcionar un acoplamiento capacitivo con el tejido.
- 55 9.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
- 60 medios para retener una pluralidad de células, de tal manera que las células se han seleccionado de entre células madre, progenitoras no comprometidas, células progenitoras comprometidas, progenitoras multipotentes, progenitoras pluripotentes o células en otras etapas de diferenciación.
- 10.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 9, en el cual el número de electrodos incluye un electrodo de puente de un metal anodizado.
- 65 11.- El electrodo de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual el metal anodizado es niobio, tántalo, titanio,

zirconio, molibdeno, tungsteno, vanadio, aluminio o aceros inoxidables.

12.- El sistema de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende adicionalmente:

5 medios para la carga mecánica de las células.

13.- Un equipo para preparar un tejido adecuado para su trasplante, que comprende:

10 un sistema de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
 una férula biodegradable o bioestable.

14.- El equipo de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual la férula está hecha de un material seleccionado de entre polímeros naturales o sintéticos.

15 15.- El equipo de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el cual la férula está en asociación con moléculas de potenciación del crecimiento o de potenciación de la adhesión.

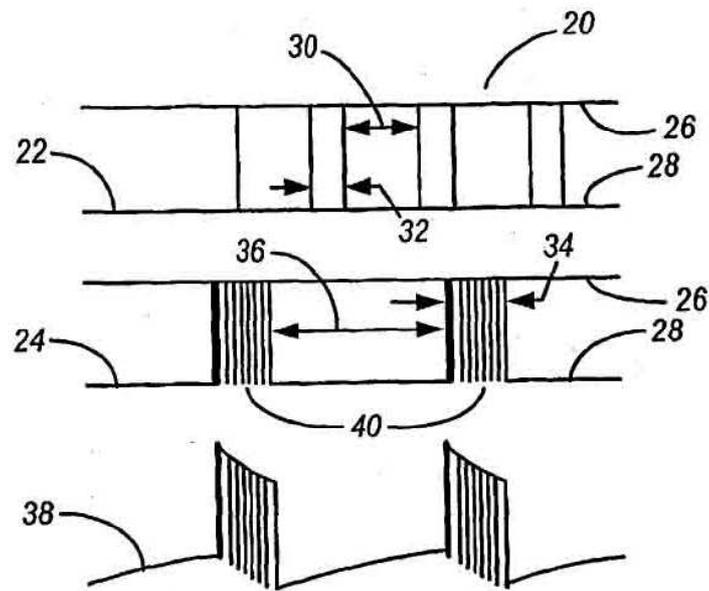
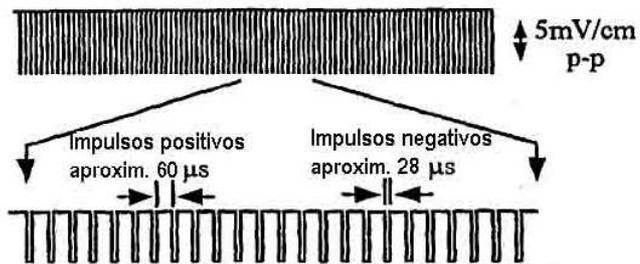


Figura 1

2A Señal "A": modo continuo



2B Modo de trenes de impulsos

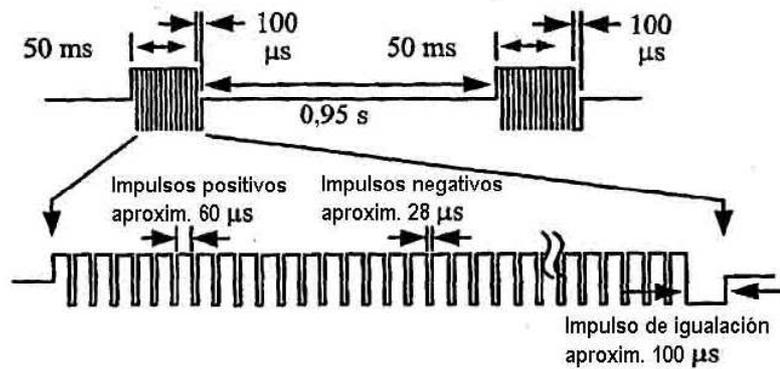
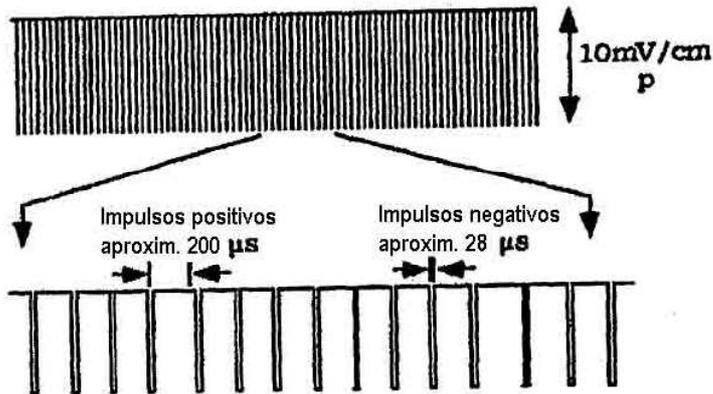


Figura 2

3A

Señal "B": modo continuo



3B

Modo de trenes de impulsos

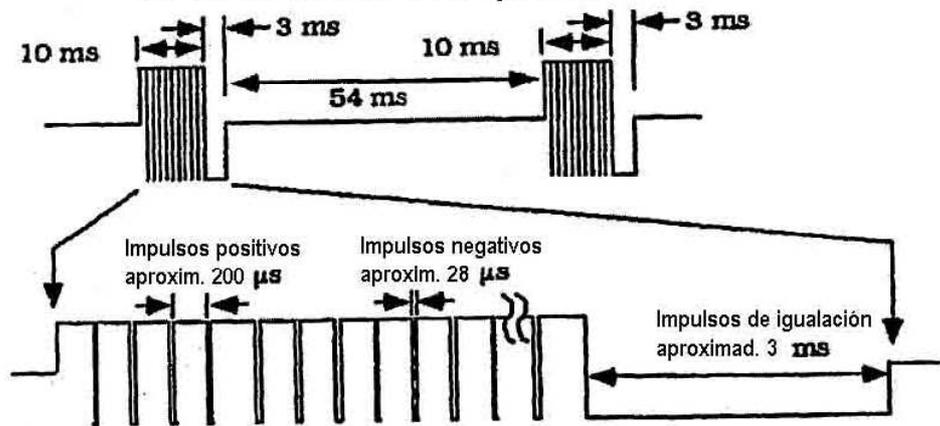


Figura 3

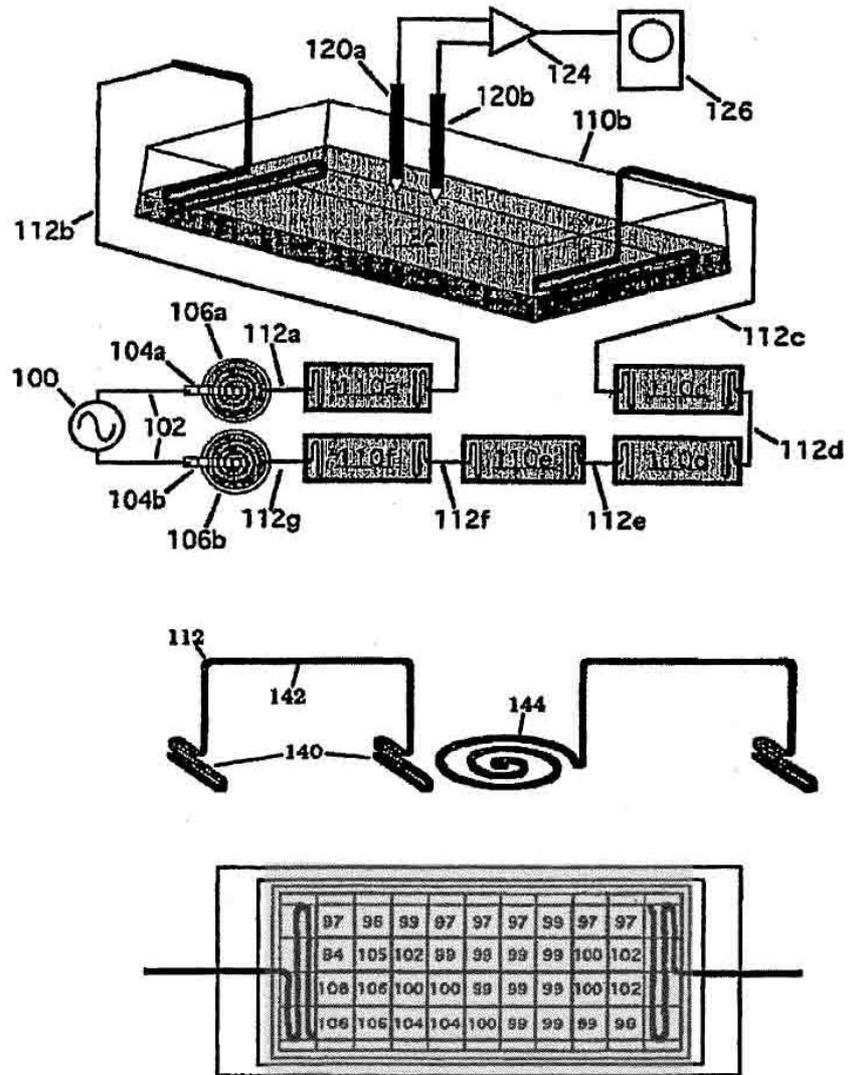


Figura 4

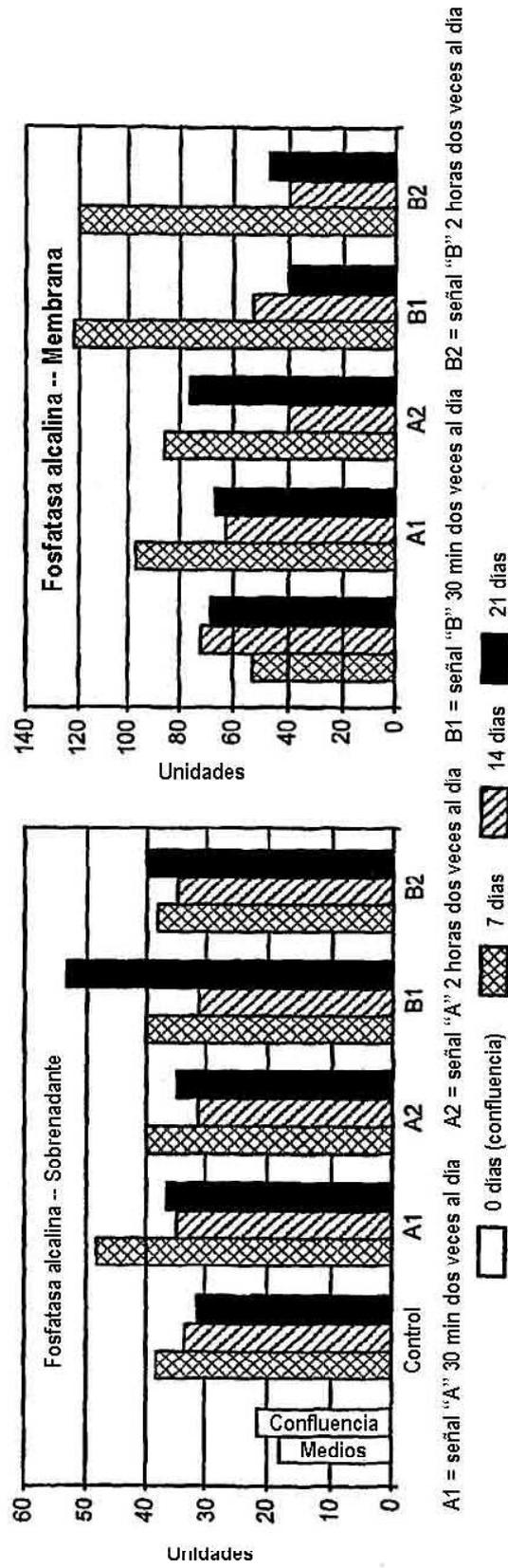


Figura 5

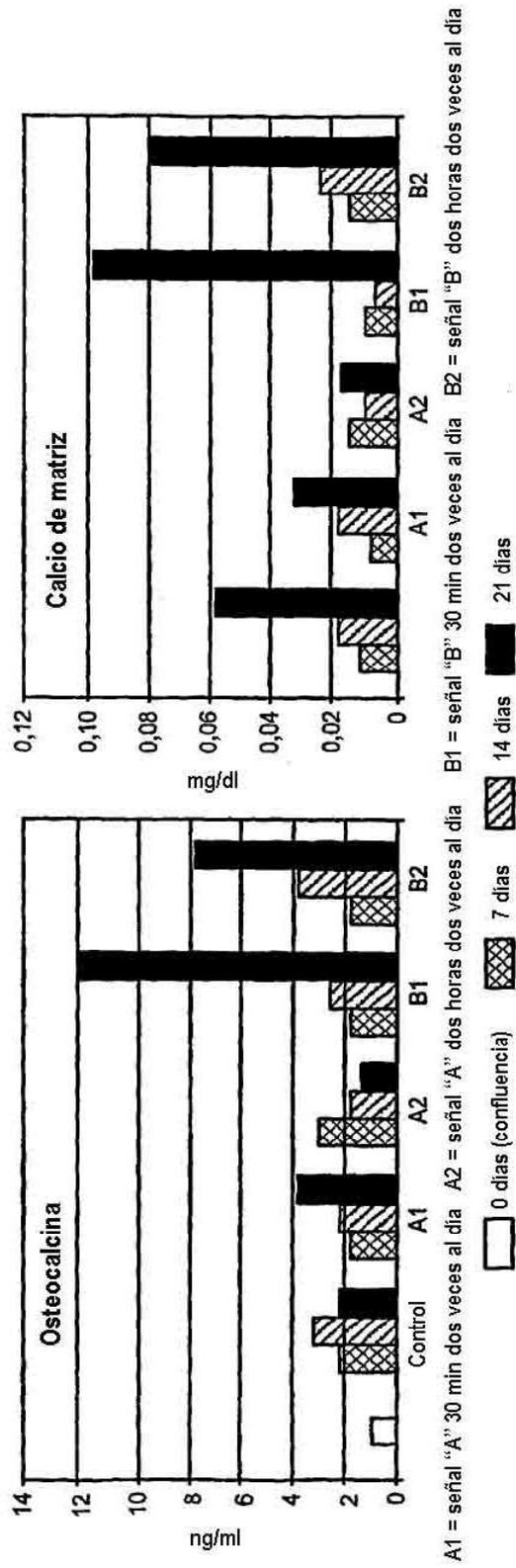


Figura 6

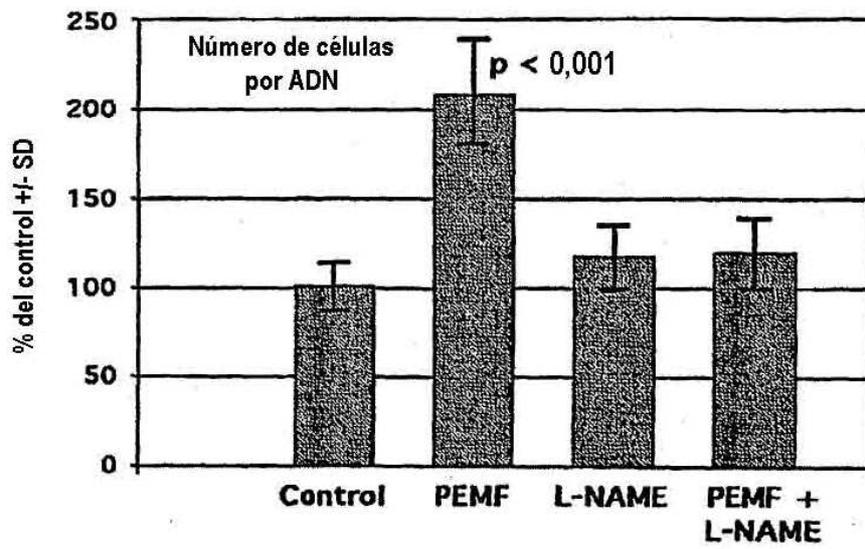


Figura 7

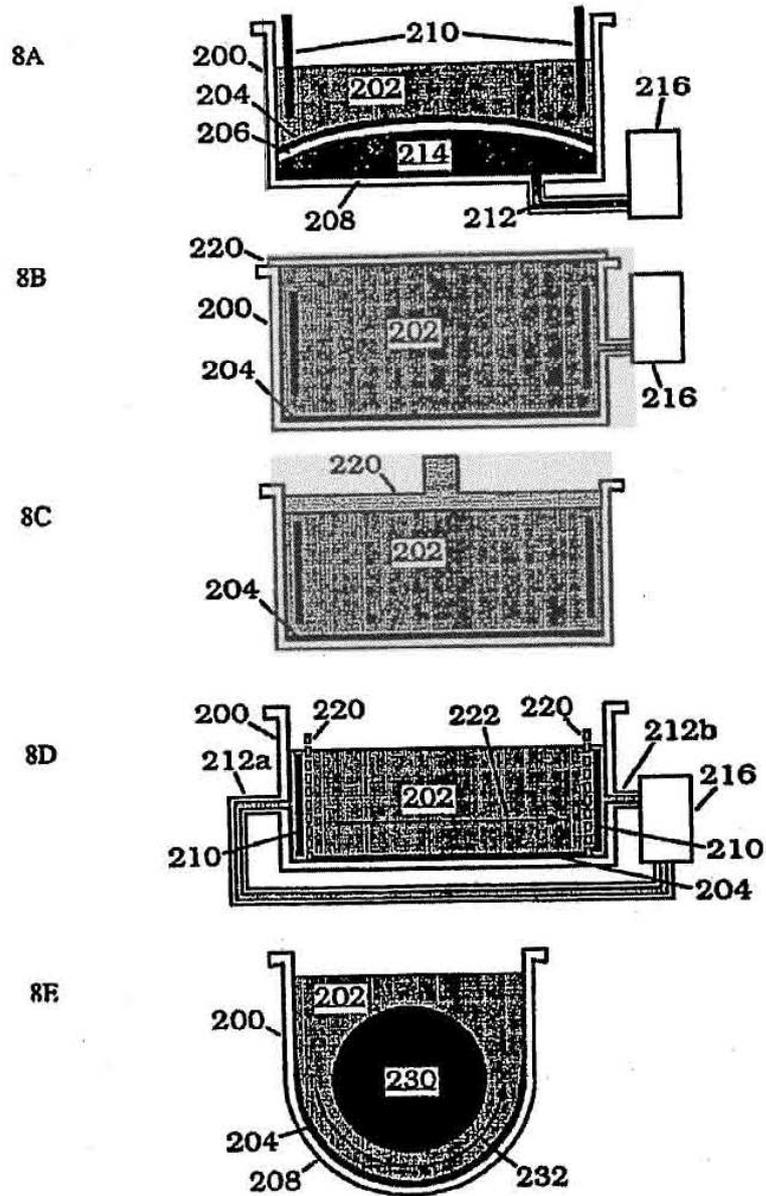


Figura 8