

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 908**

51 Int. Cl.:

B02C 18/36 (2006.01)

B02C 19/20 (2006.01)

B02C 18/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2015 PCT/IB2015/059571**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2015 E 15828756 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3233289**

54 Título: **Dispositivo de disgregación de material biológico y método de fabricación correspondiente y método para la preparación de suspensiones celulares y microinjertos de tejido**

30 Prioridad:

15.12.2014 IT MI20142143

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

05.01.2021

73 Titular/es:

**HUMAN BRAIN WAVE S.R.L. (100.0%)
Corso Galileo Ferraris 63
10128 Torino, IT**

72 Inventor/es:

**GRAZIANO, ANTONIO y
D'AQUINO, RICCARDO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 800 908 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

Dispositivo de disgregación de material biológico y método de fabricación correspondiente y método para la preparación de suspensiones celulares y microinjertos de tejido

5 **Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general al sector técnico de los sistemas y de los dispositivos para disgregar y triturar material biológico con varios propósitos y aplicaciones, y más particularmente su objeto es un dispositivo de disgregación de material biológico para la preparación y acondicionamiento de suspensiones celulares y de microinjertos de tejido adecuados para usarse ventajosamente con varios propósitos en una pluralidad aplicaciones, por ejemplo como muestras para análisis directos en el laboratorio, sin la ayuda de reactivos químicos, o como parte de terapias específicas.

15 La invención se refiere también a un método correspondiente para la fabricación de un dispositivo de disgregación de material biológico y más particularmente una rejilla de disgregación respectiva caracterizada por una pluralidad de microorificios afilados a través de los cuales se hace pasar al material biológico con la finalidad de que se disgregue.

20 **Antecedentes de la invención y técnica anterior**

La disgregación de un tejido o material biológico, ya sea tejido humano, animal, vegetal, se conoce para diversos propósitos y como parte de diversas aplicaciones.

25 Por ejemplo, el material biológico puede disgregarse con la finalidad de llevar a cabo sobre el mismo exámenes médicos, tales como biopsias, o en general con la finalidad de obtener muestras y especímenes para examinarse y analizarse posteriormente en el laboratorio con la finalidad de obtener datos e información, con relación al mismo material, para usarse meramente con propósitos de investigación o para establecer un diagnóstico como parte de terapias médicas específicas.

30 En la técnica anterior, el material biológico también puede disgregarse con fines de aislamiento de las células presentes en el mismo material biológico, o de acondicionamiento de fragmentos o microinjertos de tejido, que van a usarse por ejemplo en terapias clínicas y regenerativas, entendiéndose que un microinjerto es un conjunto de células, en una matriz extracelular, de tamaño subclínico y por tanto no visible a simple vista, sino únicamente con la ayuda de un microscopio.

35 Para completar la información, la figura 5 ilustra esquemáticamente un material biológico típico, indicado en general como MB y constituido, por ejemplo, por un tejido biológico en su forma íntegra, es decir, antes de someterse a una operación de disgregación.

40 Tal como puede observarse en la figura 5, el tejido biológico o material MB, en su forma intacta y aún no disgregada, tiene normalmente una pluralidad de células, indicadas por CEL, cada una con su propio núcleo NU y citoplasma CT, que están colocadas en una matriz extracelular MAT, esquematizada con una pluralidad de líneas paralelas.

45 El material biológico MB comprende además, en la respectiva matriz extracelular MAT, otras sustancias y componentes, que están asociados con las células CEL y están constituidos, por ejemplo, por factores de crecimiento, proteínas extracelulares y componentes inorgánicos, indicados como FC en la figura 5.

50 En particular estas sustancias y factores FC son indicativos de la viabilidad de las células, es decir, de su capacidad de desarrollarse y reaccionar a las condiciones externas, y son esenciales también para permitir que las células CEL manifiesten completamente sus funciones y propiedades.

55 La técnica anterior ya ofrece algunos dispositivos y sistemas que puede usar un operario para disgregar material biológico con la finalidad de obtener muestras del mismo material biológico que va a usarse con diversos propósitos y como parte de diversas aplicaciones, tal como se especificó anteriormente, por ejemplo, con la finalidad de llevar a cabo una biopsia o un análisis de los componentes celulares.

60 Entre estos dispositivos conocidos puede hacerse mención en particular del triturador de material biológico, descrito por la patente US 5.731.199, que comprende un recipiente cilíndrico que define una cámara superior proporcionada para recibir el material biológico que va a triturarse; y un elemento de corte fijo colocado transversalmente en esta cámara y constituido por una placa perforada; y un rotor, montado rotatoriamente en la cámara, que tiene un elemento de trituración en forma de cuchilla helicoidal.

65 La placa perforada fija incluida en este triturador mecánico tiene una pluralidad de microorificios, con un perfil preferiblemente cuadrado o hexagonal, que tienen un diámetro o un tamaño que está comprendido entre 20 y 100 µm, donde los bordes de cada microorificio definen las cuchillas de trituración.

Al usar este triturador, el elemento de trituración, al rotar, actúa conjuntamente con el elemento de corte, es decir, la placa perforada, con la finalidad de alimentar y poner el material biológico, contenido en la cámara superior, en contacto con las cuchillas de los microorificios del elemento de corte y por tanto provocan la trituración del material biológico haciéndolo pasar a través de esos microorificios.

Sin embargo, este dispositivo triturador no está libre de límites y desventajas, que sería adecuado remediar, en particular con la finalidad de hacer que las muestras que se obtienen de la disgregación del material biológico original sean adecuadas para usarse ventajosamente en una gama más amplia de aplicaciones y situaciones, con respecto a lo que es posible ahora, tanto en el campo de los análisis de laboratorio como de las terapias.

De hecho, como fue posible observar experimentalmente, el disgregador mecánico conocido a partir de esta patente US 5.731.199, como también otros dispositivos similares, produce una muestra de material biológico disgregado en el que la célula o células están separadas de su nicho biológico o "hábitat", de forma que la célula o células presentes en la muestra biológica, producida de esta manera, pueden tener una forma, funciones y una viabilidad que se han modificado y alterado de alguna manera con respecto al material biológico original.

Para mayor claridad, la figura 6 muestra esquemáticamente una célula obtenida disgregando el material biológico original con un dispositivo de disgregación convencional, en otras palabras, según la técnica anterior.

Tal como puede observarse a partir de esta figura 6, la célula o células presentes en el material disgregado con un dispositivo de disgregación de tipo convencional, además de estar separadas y ya no asociadas con su nicho biológico que las rodeaba en el material biológico original, tienen una forma sustancialmente modificada con respecto a la inicial.

Como resultado, en la técnica anterior, por la mera razón de que eso puede ocurrir y que en cualquier caso existe un riesgo real de que la muestra se altere de alguna manera y experimente cambios durante la fase de disgregación con respecto al material biológico original, frecuentemente se hace uso de reactivos químicos o en general sustancias adicionales para preparar, a partir del material biológico triturado, los especímenes y las muestras que van a analizarse, o para acondicionar las suspensiones celulares y los microinjertos previstos por los diversos tratamientos y terapias clínicas.

Además, dado que la estructura, las funciones y la viabilidad de las células podrían haberse modificado y alterado durante la fase de disgregación llevada a cabo con las técnicas convencionales, siempre existe la incertidumbre de que la información y los datos obtenidos a partir de los análisis de las muestras, obtenidas de esta manera, no sean exactamente correspondientes a e indicativos del material biológico original y aún no disgregado.

Sumario de la invención

Por tanto el primer objetivo de la presente invención es proponer y fabricar un nuevo dispositivo de disgregación de material biológico que ofrece características mejoradas en comparación con los disgregadores conocidos y en particular permite la obtención de muestras biológicas, logrado a través de la disgregación de un material biológico original, en la cual las células mantienen su forma y su nicho y hábitat biológico y por tanto su viabilidad funcional con la que estaban asociadas en el material biológico original, de modo que se permite la obtención de datos más exactos a partir del análisis de las muestras obtenidos, así como también una aplicación mejorada y más ventajosa de estas muestras como parte del análisis de laboratorio, el diagnóstico y la terapia médica.

Un segundo objetivo de la presente invención, además relacionado con el primero, es también el de proponer y fabricar un nuevo dispositivo de disgregación de material biológico que es una innovación significativa con respecto al triturador mecánico conocido a partir de la patente US 5.731.199, mencionada previamente, y en particular, para este propósito, comprende una placa perforada fija con una pluralidad de microorificios, para la disgregación del material biológico, que tiene una configuración optimizada y además se fabrica por medio de un proceso de fabricación innovador, de modo que implica prestaciones considerablemente mayores que las que pueden obtenerse con el triturador mecánico propuesto por la patente US 5.731.199 y en particular permite que se acondicionen microinjertos de tejido y que se preparen suspensiones celulares, caracterizados por una alta viabilidad de las células respectivas, que pueden usarse en diversas aplicaciones médicas y no médicas.

Un tercer objetivo de la presente invención, nuevamente relacionado con los anteriores, es también el de proponer y fabricar un nuevo dispositivo de disgregación de material biológico que permite el acondicionamiento de microinjertos de tejido y la preparación de suspensiones celulares, útiles para diversos propósitos, por ejemplo, para pruebas de laboratorio y terapias clínicas, sin la ayuda de y sin tener que usar reactivos químicos para la preparación de las mismas suspensiones celulares y microinjertos.

Los objetos anteriormente mencionados pueden considerarse completamente logrados por el dispositivo de disgregación de material biológico para la preparación de suspensiones celulares y microinjertos de tejido, que tiene las características definidas por la reivindicación independiente 1 y por el método para la fabricación de un

dispositivo de disgregación de material biológico, que tiene las características definidas por la reivindicación independiente 10.

Se definen además realizaciones particulares de la presente invención por las reivindicaciones dependientes.

5 Existen numerosas ventajas, en parte ya implícitamente dadas a conocer previamente, con respecto a los dispositivos de disgregación y sistemas actualmente conocidos y en uso, que están asociadas con el dispositivo de disgregación de material biológico, para la preparación y acondicionamiento de suspensiones celulares y de microinjertos de tejido, según la presente invención, tal como se enumeran a continuación, meramente a modo de ejemplo:

10 - capacidad del dispositivo para preparar microinjertos y suspensiones celulares que mantienen intactas y sin alteraciones las características del material biológico original, aún no disgregado, y por tanto evitan el uso de reactivos químicos para preparar estas suspensiones celulares y microinjertos de tejido;

15 - el uso de los microinjertos de tejido y de las suspensiones celulares preparadas con el dispositivo de disgregación en tratamientos médicos, veterinarios y cosméticos nuevos e innovadores;

20 - la posibilidad de llevar a cabo análisis más exactos y fiables usando como muestras y especímenes que van a analizarse los microinjertos de tejido y las suspensiones celulares preparadas con el dispositivo de disgregación;

25 - la posibilidad de insertar el dispositivo de disgregación en una cadena de terapia, que implica el uso de material biológico disgregado que va a insertarse e implantarse en un paciente que está tratándose en un quirófano, donde la cadena de terapia se realiza completamente dentro del mismo quirófano, es decir, sin necesidad de tener que transferir fuera de este último, para disgregarlo, el material biológico tomado del paciente que está tratándose en el quirófano.

Breve descripción de los dibujos

30 Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán más claros y evidentes mediante la siguiente descripción de una de sus realizaciones preferidas, facilitada a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a los dibujos que se acompañan, en los que:

35 la figura 1 es una vista axonométrica de un dispositivo de disgregación de material biológico para la preparación de suspensiones celulares y el acondicionamiento de microinjertos de tejido según la presente invención;

la figura 2 es una vista axonométrica, en despiece ordenado, que muestra las partes del dispositivo de disgregación de material biológico de la figura 1;

40 la figura 2A es una vista en perspectiva, a escala ampliada, de un rotor con cuchilla y de una rejilla de disgregación del dispositivo de disgregación de las figuras 1 y 2;

45 la figura 2B, dividida en secciones (a), (b) y (c), es una vista que muestra en planta y a escala ampliada, con la ayuda de algunas imágenes fotográficas, un solo microorificio y un grupo de microorificios de la rejilla de disgregación de la figura 2A.

50 La figura 2C, dividida en secciones (a), (b) y (c), muestra respectivamente, en la sección (a), un diagrama enfocado a ilustrar las diversas fases de un proceso de fabricación, por moldeo, de los microorificios de la rejilla de disgregación incluida en un dispositivo de disgregación de material biológico no según la invención; en la sección (b) un punzón cónico usado en el proceso de fabricación, por moldeo, esquematizado en la sección (a); y, en la sección (c), una imagen fotográfica de la rejilla de disgregación obtenida con este proceso de fabricación, por moldeo;

55 la figura 2D, dividida en secciones (a), (b) y (c), muestra respectivamente, en la sección (a), un diagrama enfocado a ilustrar las diversas fases de una realización de un proceso de fabricación, por moldeo, de los microorificios de la rejilla de disgregación incluida en el dispositivo de disgregación de material biológico de la invención; en la sección (b) un punzón poligonal usado en el proceso de fabricación, por moldeo, esquematizado en la sección (a); y, en la sección (c), una imagen fotográfica de una rejilla de disgregación obtenida con este proceso de fabricación, mediante moldeo;

60 la figura 2E, dividida en secciones (a), (b) y (c), muestra respectivamente, en la sección (a), un diagrama enfocado a ilustrar las diversas fases de un método no según la invención, incluyendo una fase de perforación por medio de una fuente láser, del proceso de fabricación, por moldeo, de los microorificios de la rejilla de disgregación de un dispositivo de disgregación de material biológico no según la invención; y en las secciones (b) y (c) una primera y segunda imagen fotográfica que muestran la rejilla de disgregación y los microorificios respectivos, hechos por medio de la fuente láser, obtenidos mediante el proceso de fabricación, esquematizado en la sección (a), según esta

tercera realización;

la figura 3A, dividida en secciones (a), (b) y (c), es una vista ortogonal que muestra en una vista en planta y lateral el dispositivo de disgregación de material biológico de las figuras 1 y 2;

5 la figura 3B, dividida en secciones (a), (b) y (c) muestra en una escala alargada y en sección, respectivamente a lo largo de las líneas I-I, II-II y III-III de la sección (a) de la figura 3A, el dispositivo de disgregación de material biológico de la invención;

10 la figura 3C, dividida en secciones (a) y (b), muestra en una vista en planta y en sección algunas variantes de mejora del dispositivo de disgregación de la invención que comprenden un elemento magnético que tiene la función de controlar la presión aplicada por el rotor con cuchilla sobre la rejilla de disgregación con la finalidad de disgregar el material biológico;

15 la figura 3D, dividida en secciones (a), (b), (c) y (d), muestra en una forma gráfica tridimensional, en una vista longitudinal y en sección en las zonas de los extremos, un adaptador adecuado para acoplarse con el dispositivo de disgregación de la invención con la finalidad de conectarlo a un instrumento endoscópico en el suministro habitual de instrumental de un quirófano;

20 las figuras 4A-4F son diagramas de bloque que ilustran algunos posibles ejemplos de aplicación del dispositivo de disgregación de material biológico de la invención y de las respectivas suspensiones celulares y microinjertos de tejido obtenidos utilizando este dispositivo de disgregación;

la figura 5 es un diagrama que ilustra la estructura típica de un tejido biológico antes de disgregarse;

25 la figura 5A es un diagrama que ilustra una suspensión celular obtenida con el dispositivo de disgregación de la invención de las figuras 1 y 2;

30 la figura 6 ilustra esquemáticamente una sola célula aislada obtenida con un dispositivo de disgregación convencional según la técnica anterior;

las figuras 7A-7F son ejemplos de cortes de análisis de suspensiones celulares y microinjertos de tejido obtenidos usando el dispositivo de disgregación de material biológico de la invención; y

35 la figura 8 es un diagrama cualitativo que muestra el porcentaje de células viables en una suspensión celular, obtenida con el dispositivo de disgregación de la invención, en función de las dimensiones de los microorificios de una rejilla de disgregación incluida en el mismo dispositivo.

40 **Descripción de algunas realizaciones preferidas del dispositivo de disgregación de material biológico según la invención**

Con referencia a los dibujos y en particular a las figuras 1-3, un dispositivo de disgregación de material biológico MB, tal como por ejemplo el tejido biológico ilustrado esquemáticamente en la figura 5, fabricado según la presente invención, se indica generalmente por 10.

45 Tal como se explica adicionalmente a continuación en el presente documento, el dispositivo de disgregación 10 es particularmente adecuado y ventajoso para preparar suspensiones celulares y acondicionar microinjertos de tejido, entendiéndose un microinjerto de tejido, acorde con lo que ya se ha explicado anteriormente, que es una suspensión celular o un conjunto de células, en una matriz extracelular, de tamaño subclínico y por tanto no visible a simple vista sino únicamente con ayuda de un microscopio.

En detalle, el dispositivo de disgregación 10 de material biológico MB se compone de las siguientes partes:

55 - un cuerpo externo hueco, indicado por 11, con una forma básicamente cilíndrica, que define una cámara interna 12;

60 - una placa o rejilla de disgregación fija 13, que tiene una pluralidad de microorificios 13a cada uno dotado de bordes afilado, que está albergada transversalmente en la cámara interna 12 definida por el cuerpo externo 11, con la finalidad de definir a su vez una cámara de carga y recepción superior, indicada por 12a, adecuada para recibir y para cargarse con el material biológico que va a disgregarse MB, y una cámara de recogida inferior, indicada por 12b, adecuada para recoger el material biológico, una vez disgregado, indicado por MB';

65 - un rotor con cuchilla 14, que rota en la cámara interna 12 y adecuado para actuar conjuntamente, al rotar, con la rejilla de disgregación fija 13, con la finalidad de alimentar y poner el material biológico MB, contenido en la cámara de carga superior 12a, en contacto con los microorificios 13a, con bordes afilados, formados en la rejilla de disgregación 13, y provocar por tanto la disgregación del material biológico MB haciéndolo pasar a través de estos

microorificios 13a; y

- una cubierta 15 para cubrir la cámara de carga superior 12a.

5 El rotor con cuchilla 14, rotatorio, incluido en el dispositivo de disgregación 10, a su vez está constituido por:

- un eje 14a, orientado en dirección vertical, que tiene una porción superior que se extiende en un orificio 15a formado en la cubierta 15 y sobresale por encima de esta última,

10 - una cuchilla de distribución o álabe 14b, asociada con un extremo inferior del eje vertical 14a y que presenta una forma helicoidal curva, y

- una rasqueta inferior 14c, también asociada con el extremo inferior del eje vertical 14a;

15 donde la rejilla de disgregación perforada fija 13 está intercalada entre la cuchilla helicoidal 14b y la rasqueta inferior 14c asociada con el extremo inferior del eje 14a, mediante lo cual el rotor con cuchilla 14 está adaptado para actuar conjuntamente, rotando, a través de su cuchilla helicoidal 14b y su rasqueta inferior 14c, respectivamente junto con una cara superior, de la rejilla de disgregación 13, girada hacia la cámara de carga superior 12a, con la finalidad de poner el material biológico MB que va a disgregarse en contacto con los microorificios 13a de la rejilla de disgregación 13, y con una cara inferior, de la rejilla de disgregación 13, girada hacia la cámara de recogida inferior 12b, con la finalidad de raspar el material biológico disgregado MB' que sale de los microorificios 13a de la rejilla de disgregación 13 y descargarlo en la cámara de recogida inferior 12b tal como se describe adicionalmente a continuación.

25 El cuerpo externo cilíndrico 11, incluido en el dispositivo de disgregación 10 de la invención, está a su vez asociado con un cuerpo interno secundario 16, que define la cámara de carga superior 12a y está constituido por una porción superior 11a que define un emplazamiento 11' que alberga este cuerpo interno secundario 16 y una porción inferior 11b que define la cámara de recogida inferior 12b, en donde la rejilla de disgregación perforada 13 está intercalada entre este cuerpo interno secundario 16, albergado en el respectivo emplazamiento 11' definido por la porción superior 11a del cuerpo externo 11, y la porción inferior 11b, que define la cámara de recogida inferior 12b, del cuerpo externo 11.

35 Además, el cuerpo externo 11 del dispositivo de disgregación 10 define un orificio pasante 11c que se extiende en dirección vertical en la pared cilíndrica externa del mismo cuerpo externo 11, entre un borde superior de la porción superior 11a y la base de la cámara de recogida inferior 12b, correspondiente a la porción inferior 11b, con la finalidad de atravesar estas dos porciones 11a y 11b del cuerpo externo 11.

40 Por tanto, este orificio pasante vertical 11c es adecuado para poner en comunicación el exterior del dispositivo de disgregación 10 con la cámara de recogida inferior 12b, con la finalidad de permitir la extracción desde la misma cámara de recogida inferior 12b del material biológico disgregado MB', tal como se describe en mayor detalle a continuación en el presente documento.

45 El cuerpo interno secundario 16, asociado con el cuerpo externo 11, a su vez tiene una porción 16a que define un orificio 16b que alberga de manera rotatoria el eje 14 del rotor con cuchilla 14, y además está unido a la porción superior 11a del cuerpo externo 11 con la finalidad de que no rote y por tanto evitar cualquier rotación de la rejilla de disgregación perforada 13, intercalada entre el mismo cuerpo interno secundario 16 y la porción inferior 11b, definiendo la cámara de recogida inferior 12b, del cuerpo externo 11, cuando el rotor con cuchilla 14 rota en la cámara interna 12 para provocar la disgregación del material biológico MB, tal como se ilustra más claramente a continuación en el presente documento cuando se describa el funcionamiento del dispositivo de disgregación 10.

50 El cuerpo externo 11, la cubierta 15, el cuerpo interno secundario 16 y el eje 14a del rotor con cuchilla 14 son de material plástico biocompatible, mientras que la rejilla de disgregación perforada 13 y la cuchilla de distribución 14b del rotor con cuchilla 14 son de acero inoxidable, del tipo que es adecuado para la fabricación de instrumentos para usos quirúrgicos.

55 Tal como puede observarse a partir de los dibujos todas las diversas partes componentes del dispositivo de disgregación 10 se ensamblan a presión sin la ayuda de agentes de unión y/o herramientas, y por tanto pueden desmontarse.

60 Dada la gran importancia, en la esfera de la presente invención, tal como quedará claro adicionalmente en la descripción, de los microorificios 13a, que son característicos y están formados en la rejilla de disgregación 13, en particular con relación a su configuración y dimensiones específicas, estos microorificios 13a se describirán ahora de manera detallada, también con respecto al respectivo proceso de fabricación.

65 **Los microorificios de la rejilla de disgregación del dispositivo de disgregación de la invención y el proceso de fabricación relacionado**

Según una característica de la presente invención, los microorificios 13a de la rejilla o placa de disgregación perforada 13 tienen un tamaño o diámetro, indicado por D en la figura 2B, que está comprendido entre 70 y 80 μm , y más preferiblemente tienen un tamaño o diámetro D de aproximadamente 75 μm .

5 Gracias a esta característica, tal como ha resultado a partir de pruebas y experimentos exhaustivos, es posible, por medio del dispositivo 10 de la invención, acondicionar microinjertos de tejido y preparar suspensiones celulares, útiles para diversos propósitos y aplicaciones, por ejemplo como especímenes y muestras, simplemente para
10 analizarse con fines de investigación o útiles en el diagnóstico y la terapia de ciertas patologías, que mantienen íntegras y sin alteraciones las funciones y la viabilidad celular del material biológico original MB, evitando de esta manera el uso de reactivos químicos para la preparación de estos microinjertos de tejido y suspensiones celulares, como en su lugar es necesario a menudo en la técnica anterior.

15 Según una característica adicional de la presente invención, también adecuada para permitir prestaciones considerables y ventajosas del dispositivo de disgregación 10 de la invención, tal como se ilustró anteriormente, los microorificios 13a de la placa o rejilla de disgregación 13 se forman por medio de un proceso de formación y moldeado especial, por medio de un molde S del tipo troquel-punzón, de una lámina o una hoja de metal, en particular constituida por una tira de acero inoxidable AISI 316L.

20 La figura 2C muestra esquemáticamente, en la respectiva sección (a), las diversas etapas de un proceso de fabricación y formación por moldeado de los microorificios 13a de la rejilla de disgregación 13 incluida en el dispositivo de disgregación 10 no según la invención.

25 En detalle, el proceso de fabricación por moldeado de los microorificios 13a, según este proceso, comprende las siguientes etapas 01-05 ilustradas en la figura 2C - sección (a) con la ayuda de flechas:

01 colocar la tira u hoja N del acero inoxidable AISI 316L entre el punzón, indicado por P, y el troquel, indicado por M, del molde S;

30 02 hacer descender el punzón P desde un punto muerto superior y consecuentemente formar la tira u hoja N de acero inoxidable AISI 316L;

03 detener el punzón P, al final de su carrera descendente, contra el troquel M, con formación final y fractura consecuente del material de la hoja de metal N en el centro del punzón P;

35 04 hacer regresar el punzón P al respectivo punto muerto superior;

05 extraer, del troquel M, la hoja N formada y perforada.

40 El punzón P usado en esta primera realización del proceso de fabricación y formación de los microorificios 13a tiene una configuración cónica y puntiaguda, tal como se muestra claramente en la figura 2C - sección (b).

45 Además, para completar la información, la figura 2C - sección (c) muestra una imagen fotográfica de una porción de la rejilla de disgregación 13, obtenida con el proceso de fabricación por moldeado esquematizado en la sección (a) de la misma figura 2C, donde esta imagen fotográfica resalta claramente la configuración de los microorificios 13a y en particular cómo cada uno de ellos tiene un orificio con un borde afilado B, como efecto del rasgado o de la rotura, provocados por el proceso de fabricación por moldeado, del material de la tira original N.

50 Se señala más particularmente que el orificio que se crea a través del rasgado o la rotura del material de la tira N, en la parte superior del área arrastrada respectiva, por la acción del punzón cónico P en actuación conjunta con el troquel M, no es regular sino que tiene un borde afilado e irregular, debido al efecto de la rotura del material de la tira N.

55 En la práctica, al dimensionar de una manera adecuada el troquel M y el punzón P, es posible, en esta primera realización ilustrada en la figura 2C del proceso para fabricar la rejilla 13, obtener los orificios de los microorificios 13a a través del efecto de la rotura del material que constituye la tira N, en donde el orificio de cada microorificio 13a tiene una forma irregular y un borde afilado, tal como se muestra en la imagen fotográfica de la figura 2C - sección (c).

60 El tamaño promedio o el diámetro promedio de los microorificios 13a generados de esta manera por la rotura del material de la tira N puede variar desde un mínimo de 50 micrómetros hasta un máximo de 200 micrómetros.

65 La figura 2D, a su vez, muestra esquemáticamente, en la respectiva sección (a), las diversas etapas de una segunda realización del proceso de fabricación y formación mediante moldeado de los microorificios 13a de la rejilla de disgregación 13 incluida en el dispositivo de disgregación 10 de material biológico de la invención.

El proceso de fabricación por moldeado de los microorificios 13a, según esta realización, difiere de el del proceso no según la invención, descrito anteriormente con referencia a la figura 2C, en que el punzón P tiene una configuración poligonal, tal como se muestra claramente en la figura 2D - sección (b), en vez de cónica.

5 En detalle, el proceso de fabricación mediante moldeado de los microorificios 13a, según esta realización, comprende las siguientes etapas 01 - 05 ilustradas en la figura 2D - sección (a) con la ayuda de flechas:

01 colocar la tira u hoja N del acero inoxidable AISI 316L entre el punzón, indicado por P, y el troquel, indicado por M, del molde S;

10 02 hacer descender inicialmente el punzón P desde un punto muerto superior con formación y deformación consecuentes de la tira u hoja N de acero inoxidable AISI 316L;

15 03 detener el punzón P, al final de su carrera descendente, contra el troquel M, con formación final y fractura del material de la hoja N en el centro del punzón P;

04 hacer regresar el punzón P al punto muerto superior;

20 05 extraer, del troquel M, la hoja N formada y perforada.

Además, para completar la información, la figura 2D - sección (c) muestra una imagen fotográfica de una porción de la rejilla de disgregación 13, obtenida con el proceso de fabricación por moldeado esquematizado en la sección (a) de la misma figura 2D y según la realización, en donde esta imagen fotográfica resalta claramente la configuración de los microorificios 13a y en particular cómo el orificio, definido por cada uno de ellos, tiene un borde afilado B, como efecto del rasgado o de la rotura, provocada por el proceso de fabricación por moldeado, del material de la tira original N.

30 En la práctica, al dimensionar de una manera apropiada el troquel M y el punzón P es posible, en esta segunda realización ilustrada en la figura 2C del proceso para fabricar la rejilla 13 y de manera similar a la primera realización ilustrada en la figura 2C, obtener los orificios de los microorificios 13a a través del efecto de la rotura del material que constituye la tira N, en donde el orificio de cada microorificio 13a tiene una forma y borde irregular, afilado, tal como se muestra en la imagen fotográfica de la figura 2D - sección (c).

35 Además, se señala que el uso del punzón P, con configuración poligonal, en esta realización del proceso de fabricación de los microorificios 13a, permite ventajosamente la formación de los microorificios 13a, mostrando cada uno un borde afilado caracterizado por varias puntas afiladas, lo que a su vez corresponde en número al de los lados de la configuración poligonal del punzón P.

40 A este respecto también se señala, tal como se ha determinado mediante numerosas pruebas experimentales y exhaustivas, que se obtuvieron excelentes resultados con un dispositivo de disgregación 10 que tiene una rejilla de disgregación 13 caracterizada por microorificios 13a que muestra cada uno una configuración hexagonal, con seis puntas afiladas, a su vez obtenidas usando un punzón hexagonal en este proceso de moldeado ilustrado en la figura 2D.

45 Para resumir, los microorificios 13a de la rejilla de disgregación 13 que constituyen, junto con el cuchilla de distribución 14b, la estructura de funcionamiento del dispositivo de disgregación 10, se obtienen con un proceso de moldeado de tipo troquel-punzón que provoca la rotura del material de una lámina de acero inoxidable, de modo que a través del efecto de esta rotura cada microorificio 13a tiene un borde irregular que tiene características afiladas, que definen en particular una pluralidad de microcuchillas.

50 Por ejemplo, ventajosamente, tal como ya se especificó anteriormente, los microorificios 13a pueden tener una forma hexagonal tal como se muestra en la figura 2B, obtenida en particular usando un punzón hexagonal en el proceso de fabricación ilustrado en la figura 2D.

55 Naturalmente otras formas y configuraciones son posibles, por ejemplo cuadrada o en general poligonal, donde las microcuchillas de cada microorificio 13a corresponden a los lados del polígono respectivo.

60 En particular, para una mayor claridad, la figura 2B muestra en detalle, con la ayuda de algunas imágenes fotográficas obtenidas de un prototipo del dispositivo de disgregación 10 de la invención, tanto un solo orificio 13a como un grupo de orificios 13a que se forman en la rejilla de disgregación 13, en donde las microcuchillas que están asociadas con los lados de cada orificio hexagonal 13a se indican por 13a'.

65 Finalmente, la figura 2E muestra esquemáticamente, en la respectiva sección (a), las diversas fases de un proceso de fabricación y formación por moldeado de los microorificios 13a de la rejilla de disgregación 13 incluida en el dispositivo de disgregación 10 de material biológico no según la invención.

El proceso de fabricación por moldeado de los microorificios 13a, según este proceso no según la invención, difiere de el del primer proceso no según la invención y de el de la realización según la invención, descrita previamente con referencia a las figuras 2C y 2D, en que el punzón P, usado en el proceso, tiene en la punta una configuración redondeada y no puntiaguda, de forma que el punzón P está configurado de forma tal que únicamente déforme y arrastre el material de la tira N, pero sin provocar el rasgado y la fractura de la misma, y además en que el orificio del microorificio 13a se obtiene, en vez de por rasgado y fractura del material de la tira N, por medio de una fuente láser (amplificación de luz mediante emisión estimulada de radiación).

En detalle, el proceso de fabricación de los microorificios 13a, según este proceso no según la invención, comprende las siguientes etapas 01-05 ilustradas en la figura 2E - sección (a) con la ayuda de flechas:

01 colocar la tira o lámina N del material de acero inoxidable AISI 316L entre el punzón P y el troquel M, del molde S;

02 fase inicial del descenso del punzón P desde un punto muerto superior y consecuente formación del material de la tira u lámina N de acero inoxidable AISI 316L;

03 detener el punzón P, al final de su carrera descendente, contra el troquel M, con la formación y el arrastre de la tira N, sin provocar, sin embargo, el rasgado y la fractura del material que constituye esta tira N;

04 hacer regresar el punzón P al punto muerto superior y retirarlo de la zona de la tira N;

05 realizar el taladrado, o perforación del material de la tira N que forma la punta de la zona arrastrada, por medio de una fuente láser, en particular del tipo que tiene una cabeza multifocal.

Para completar la información, la figura 2E - secciones (b) y (c) muestran dos imágenes fotográficas de una porción de la rejilla de disgregación 13 que se obtiene con el proceso de fabricación, esquematizado en la sección (a) de la misma figura 2E, según ese proceso y usando una fuente de luz láser, donde estas imágenes fotográficas resaltan y muestran en detalle las aberturas o los orificios formados por medio de la fuente de luz láser.

Se señala que el orificio que se crea y obtiene de esta manera con el láser, en el interior y en la región central de la zona arrastrada por medio del punzón P, es particularmente preciso, y que esta técnica láser permite que el orificio se haga con las dimensiones requeridas, en particular en el intervalo de 50-70 μm (micrómetros) con una tolerancia de $\pm 5 \mu\text{m}$ (micrómetros).

Además, el corte, hecho de esta manera mediante el láser, a su vez calibrado adecuadamente para el tipo de corte requerido con la finalidad de formar el orificio, tiene bordes particularmente afilados.

Nuevamente, con el láser pueden obtenerse figuras de corte particularmente complejas, tales como por ejemplo un corte romboide, tal como el usado preferiblemente, ovalado, en cruz o simplemente un orificio redondo.

Funcionamiento del dispositivo de disgregación 10 de la invención

Tal como se especificó previamente, el dispositivo de disgregación 10 de la invención se diseñó específicamente para triturar y disgregar finamente un material biológico con la finalidad de obtener a partir del mismo una suspensión celular o un microinjerto de tejido y puede hacerse funcionar de la siguiente manera.

Inicialmente, después de haber abierto y extraído completamente la cubierta 15 del cuerpo cilíndrico externo 11, se introduce en la cámara de carga superior 12a una cantidad preestablecida de disolución fisiológica que por tanto se acumulará en la base de esta cámara de carga 12a.

Esta disolución fisiológica tiene la función de llevar a cabo una acción de lubricación durante el proceso completo de disgregación del material biológico y, también y sobre todo, la de funcionar como un medio para recuperar el material biológico disgregado obtenido al final del proceso de disgregación.

Entonces la muestra, es decir, el material biológico MB que va a disgregarse, se carga en la cámara de carga superior 12a, a su vez en dimensiones tales como para permitir que la cuchilla de distribución 14b pase por encima de este material biológico MB en la fase inicial del proceso de disgregación.

Entonces, después de haber cerrado nuevamente el dispositivo de disgregación 10 con la cubierta superior 15, se garantiza que el dispositivo de disgregación 10 esté en una posición vertical y estable de forma que no pueda rotar durante la fase de disgregación posterior.

En este punto la pieza, que sobresale desde la cubierta 15, del eje 14a del rotor con cuchilla 14 se acopla con medios de motor apropiados, por ejemplo, constituidos por un motor eléctrico, dotado para impulsar la rotación del rotor con cuchilla 14.

En particular, en esta fase, puede ser útil y ventajoso usar un adaptador adecuado, descrito a continuación en el presente documento de una forma más precisa y detallada, para acoplar la parte que sobresale del eje 14a con el motor eléctrico.

5 Posteriormente, se acciona el motor con la finalidad de impulsar la rotación del rotor 14, tal como se indica mediante flechas f1 en la figura 3B, durante un tiempo prefijado, es decir, hasta la conclusión del ciclo de disgregación.

10 En detalle, durante esta fase de disgregación, la cuchilla de distribución 14b del rotor con cuchilla 14, al rotar, distribuye y pone el material biológico MB cargado en la cámara de carga superior 12a en contacto con los microorificios 13a formados en la rejilla de disgregación 13, forzándolo a pasar a través de los mismos, de modo que el material biológico MB, que pasa a través de estos microorificios 13a y al actuar conjuntamente con las respectivas microcuchillas, se disgrega apropiadamente.

15 Además la rasqueta 14c, que rota integralmente con la cuchilla de distribución 14b, fomenta el desprendimiento del material biológico disgregado MB', después que haya pasado a través de los microorificios 13a, desde la superficie inferior de la rejilla de disgregación 13, y su recogida en la base de la cámara de recogida 12b, tal como se esquematiza con líneas punteadas y discontinuas y se indica mediante flechas f2 en la figura 3B.

20 En esta fase, meramente a modo de ejemplo y por tanto sin querer restringir de ninguna manera el rango de uso y aplicación del dispositivo de disgregación 10 de la invención, el rotor con cuchilla 14 puede hacerse rotar a una velocidad de aproximadamente 80 rpm, aplicando adicionalmente sobre el mismo un par de torsión apropiado, por ejemplo, de 25 Nw*cm, con la finalidad de superar las resistencias mecánicas habituales que se oponen a esta rotación, y por tanto provocar el paso del material biológico a través de la rejilla 14 y su consecuente disgregación.

25 Finalmente, al final de la fase de disgregación, después de haber desconectado el motor eléctrico del eje 14a del rotor con cuchilla 14, se inserta una jeringa del tipo sin aguja, dentro del orificio 11c que se extiende verticalmente en la pared del cuerpo cilíndrico externo 11, y la suspensión celular o el material biológico disgregado MB', obtenido de esta manera, se aspira de la cámara de recogida inferior 12b, tal como se indica esquemáticamente mediante flechas f3 en la figura 3B.

Técnica de trituración/disgregación del material biológico en la base del dispositivo de la invención

35 Queda claro por tanto a partir de lo que se ha descrito hasta ahora, con relación tanto a la estructura como al funcionamiento del dispositivo de disgregación 10, que la presente invención implica también una técnica nueva e innovadora de trituración/disgregación de un material biológico MB.

40 En particular, basándose en esta técnica innovadora, debido a la rotación del rotor con cuchilla 14, el material biológico MB se conduce inicialmente y se pone en contacto con la rejilla de disgregación 13 mediante la cuchilla de distribución 14b que pasa por encima del material biológico MB dentro de la cámara de carga 12a.

Por tanto, en esta fase inicial la disolución fisiológica, ya contenida en la cámara de carga 12a, se enriquece con células.

45 Adicionalmente el rotor con cuchilla 14, mientras rota, lleva a cabo la doble función de hacer rotar el material biológico y de mover la disolución fisiológica con la finalidad de mezclarla.

50 Nuevamente la cuchilla de distribución 14b del rotor con cuchilla 14, que está conformada adecuadamente a lo largo de un perfil helicoidal, garantiza que, durante la fase de disgregación del material biológico MB, la disolución fisiológica, contenida en la cámara de carga 12a, lava continuamente la superficie de la rejilla de disgregación 13.

55 Esta distribución continua de la disolución fisiológica en contacto con la rejilla de distribución perforada 13 a su vez es tal que limpia continuamente los respectivos orificios 13a y por tanto permite el paso libre de las células a su través, de modo que se evita el sobrecalentamiento y/o quemado de los tejidos y de las células u otras desventajas que podrían alterar las características del material biológico original MB, durante el deslizamiento de la cuchilla de distribución 14b sobre la rejilla de disgregación 13.

60 Finalmente, el deslizamiento y la ligera presión ejercida por la cuchilla de distribución 14b, mientras rota sobre el material biológico MB que va a triturarse, significa que las células o los conglomerados de células, que tienen un diámetro máximo inferior a 75 micrómetros, se fuerzan a pasar a través de los orificios 13a, apropiadamente calibrados, de la rejilla de disgregación 13, de modo que desde el lado opuesto de la rejilla perforada 13 únicamente salen las células o conglomerados de células, incluidos en el material biológico MB, que tienen un diámetro máximo inferior a 75 micrómetros.

65 Se subraya y se confirma en particular nuevamente que este tamaño exacto y preciso de 75 μ m de los orificios pasantes 13a formados en la rejilla de disgregación 13 es de importancia fundamental para obtener, al final del

proceso de disgregación, una suspensión celular que ha conservado intactas las características, funciones y viabilidad del material biológico original, no disgregado.

5 Para una mayor claridad, la figura 5A muestra esquemáticamente una suspensión celular obtenida a través de la disgregación de un material biológico original MB, tal como se muestra en la figura 5, usando el dispositivo de disgregación 10 de la invención.

10 Tal como puede observarse a partir de esta figura 5A, en la suspensión celular obtenida de esta manera el material biológico disgregado, indicado como MB', conserva intactas sus funciones y características, y en particular las células CEL mantienen su forma original, tal como que los fragmentos de la matriz extracelular MAT y de los factores de crecimiento FC, indicativos de la viabilidad de la células CEL, no presentan alteraciones ni modificaciones en detrimento de la viabilidad y de la capacidad para desarrollar y reaccionar a las condiciones externas, representadas con flechas en la figura 5A, de las mismas células CEL.

15 De esta manera cada célula individual CEL conserva intactos todos aquellos factores orgánicos e inorgánicos que implican y que constituyen su nicho biológico y que por tanto determinan la función y las capacidades del mismo, tal como el del desarrollo en particular.

20 En su lugar, de manera muy distinta, tal como se subrayó y esquematizó previamente en la figura 6, en las suspensiones celulares que se obtienen a través de disgregación usando las técnicas conocidas y disponibles actualmente, las células tienen una forma modificada con respecto a la que tenían en el material biológico original, aún sin disgregar.

25 Además, debido a la disgregación llevada a cabo con técnicas convencionales, la matriz extracelular también está sujeta a alteraciones y modificaciones de modo que, en la suspensión celular final obtenida mediante disgregación del material biológico original, se encuentra que las células individuales están libres de los factores orgánicos e inorgánicos que las implican en su nicho biológico y que determinan la función y las capacidades del mismo.

30 **Ejemplos de la aplicación del dispositivo de disgregación de la invención**

Tal como se anticipó, el dispositivo de disgregación 10 de la invención es particularmente adecuado y ventajoso para la preparación de suspensiones celulares y de microinjertos de tejido que van a usarse con diversos propósitos y en múltiples aplicaciones, ambos normalmente médicos y no, por ejemplo, para el simple análisis en el laboratorio de muestras o con fines diagnósticos o terapéuticos o con fines cosméticos u otros, tal como se determinó mediante amplias y exhaustivas pruebas y experimentos.

40 Por tanto, a continuación en el presente documento, con referencia a los diagramas de bloques de las figuras 4a-4D, van a ilustrarse algunos ejemplos preferidos y específicos de uso y aplicación, en diversas áreas y con diversos propósitos, del dispositivo de disgregación 10 de la invención y de las respectivas suspensiones celulares y microinjertos de tejido que se obtienen, con este dispositivo, a partir de la disgregación del material biológico.

EJEMPLO 1 (úlceras, pérdidas de sustancia, dehiscencias, heridas difíciles)

45 En este primer ejemplo 1, correspondiente al diagrama de bloques de la figura 4A, se toma inicialmente una cantidad suficiente de dermis para el tratamiento a partir de una zona no lesionada del cuerpo humano y entonces se lleva a cabo su disgregación por medio del dispositivo de disgregación 10, propuesto con la invención.

Entonces, una vez que se ha obtenido la suspensión, ésta se impregna con biomaterial de colágeno.

50 En este punto se prepara el sitio de injerto, es decir con la sangría de la lesión o de la herida que va a tratarse.

Entonces el complejo biológico obtenido previamente se injerta en el lugar, constituido por la suspensión celular y el biomaterial, y entonces se lleva a cabo una medicación común.

55 Posteriormente se llevan a cabo una serie de comprobaciones periódicas.

También es posible llevar a cabo tratamientos adicionales en caso de lesiones muy extensas.

EJEMPLO 2 (aplicaciones estéticas)

60 En este ejemplo 2, correspondiente al diagrama de bloques de la figura 4B, se toma inicialmente una cantidad suficiente de dermis de una zona no lesionada del cuerpo humano para llevar a cabo el tratamiento.

Esta cantidad de dermis se disgrega entonces por medio del dispositivo propuesto.

65 Una vez que la suspensión celular se ha obtenido, se inyecta debajo de la lesión que va a tratarse o del defecto que

va a eliminarse, que pueden ser arrugas, psoriasis, esclerodermia, vitíligo, úlceras, cicatrices queloides, heridas causadas por *S. minus*, etc., con una aguja de tamaño adecuado.

Se llevan a cabo las comprobaciones de rutina habituales.

5

Es posible llevar a cabo tratamientos adicionales en caso de lesiones muy extensas.

EJEMPLO 3 (aplicaciones ortopédicas, odontológicas, maxilofaciales)

10 Con referencia al diagrama de bloques de la figura 4C, también según este ejemplo 3, se toma inicialmente una cantidad suficiente de material biológico (hueso, periostio o pulpa dental) sin sobrecalentarlo y sin extraer sangre, y luego se fragmenta y se procesa por medio del dispositivo de disgregación 10 propuesto, con el fin de obtener y preparar la respectiva suspensión celular.

15 Entonces se proporciona una fase de impregnación del biomaterial, es decir, de la suspensión celular, en la prótesis/placa que va a aplicarse, con el fin de obtener el complejo biológico.

20 Posteriormente se acondiciona el sitio receptor (defecto óseo de diversa naturaleza, fracturas, sitio aceptor de prótesis tales como prótesis de cadera, rodilla, implantes dentales, etc.), es decir, se lleva a cabo un acceso quirúrgico y, después de haberlo acondicionado, el complejo biológico ya preparado se injerta en el sitio receptor.

EJEMPLO 4 (aplicación en la regeneración de defectos periodontales)

25 En este ejemplo 4, correspondiente al diagrama de bloques de la figura 4D, después de haber tomado inicialmente una cantidad suficiente de material biológico (hueso, periostio o pulpa dental) sin extraer sangre y sin sobrecalentarlo, se fragmenta y se procesa por medio del dispositivo de disgregación 10 propuesto.

30 Se lleva a cabo la impregnación del material biológico obtenido para la disgregación, preparando así el complejo biológico.

Entonces se acondiciona el sitio receptor.

35 En particular en esta fase se realiza un acceso quirúrgico en la zona del sitio con colgajos de incisión adecuados para la terapia de regeneración periodontal y también se lleva a cabo el desbridamiento, es decir, la eliminación de defectos intraóseos mediante técnicas convencionales.

Posteriormente, después de haber acondicionado el sitio de recepción, el complejo biológico obtenido se injerta.

40 Finalmente se lleva a cabo la sutura del sitio a manera de contención y el paciente se deriva para comprobaciones sucesivas.

EJEMPLO 5 (aplicaciones veterinarias)

45 En este ejemplo de aplicación 5, en el campo veterinario, correspondiente al diagrama de bloques de la figura 4E, el material biológico, después de haberse tomado inicialmente en cantidad suficiente de una zona sana del cuerpo del animal (hueso, periostio, piel, músculo) sin extraer sangre y sin sobrecalentarlo, se fragmenta y se procesa por medio del dispositivo de disgregación 10 propuesto.

50 Se lleva a cabo entonces la impregnación del material biológico obtenido para la disgregación, preparando así el complejo biológico.

Entonces se acondiciona el sitio de recepción.

55 En particular, en esta fase, se lleva a cabo un acceso quirúrgico en la zona del sitio con colgajos de incisión adecuados para la terapia de regeneración y también se lleva a cabo un desbridamiento con técnicas convencionales.

60 Posteriormente, después de haber acondicionado el sitio de recepción, se injerta el complejo biológico preparado previamente.

Finalmente, se lleva a cabo la sutura a manera de contención y el paciente se deriva para comprobaciones sucesivas.

EJEMPLO 6 (aplicación en la regeneración de defectos musculares y del miocardio)

65

En este ejemplo 6, correspondiente al diagrama de bloques de la figura 4F, se toma inicialmente una cantidad

suficiente de músculo esquelético o del miocardio sin extraer sangre y con acceso mínimamente invasivo, y luego se fragmenta y se procesa por medio del dispositivo de disgregación 10 propuesto.

5 Se lleva a cabo la impregnación del material biológico obtenido para la disgregación, para preparar el complejo biológico.

Entonces se acondiciona el sitio de recepción.

10 Más particularmente, en esta fase se lleva a cabo una intervención quirúrgica en la zona del sitio con un acceso mínimamente invasivo y el complejo biológico que se había preparado se injerta entonces.

Entonces se deriva al paciente para comprobaciones posteriores.

15 Pruebas y resultados experimentales

El dispositivo de disgregación 10 y los productos relacionados, es decir, suspensiones celulares y las muestras obtenidas con este dispositivo para la disgregación de un material biológico original, se sometieron a numerosas pruebas y comprobaciones experimentales en profundidad encaminadas a recoger datos útiles y a confirmar las características innovadoras y las ventajas de la presente invención.

20 Para ser exhaustivo, las imágenes de las figuras 7A-7F muestran algunos ejemplos de cortes y muestras que se han analizado y examinado como parte de estas pruebas y por tanto pueden interpretarse y entenderse claramente por expertos, en donde estas muestras, el sujeto de estudio y análisis, se obtuvieron de un tejido disgregado por medio del dispositivo de disgregación 10 de la invención de material biológico.

25 En detalle, los análisis de laboratorio llevados a cabo sobre estas muestras han mostrado que las primeras colonias aparecieron después de aproximadamente 15-20 días y un mes después de haberse sembrado.

30 Estas dos colonias se desprendieron entonces de la placa y volvieron a sembrarse, se fotografiaron y se analizaron por citofluorometría.

Ahora, tal como puede observarse a partir de las imágenes de las figuras 7A-7F, las muestras analizadas, derivadas del tejido original disgregado, tienen claramente dos poblaciones diferentes de células, es decir una primera población con una forma alargada y una segunda población con una forma romboidal, más grande.

35 En este sentido, se señala que, con la finalidad de poder fotografiar estas dos poblaciones de células, se tiñeron los respectivos núcleos de azul con un colorante orgánico fluorescente (DAPI), mientras que para el análisis citofluorométrico se usó el panel de anticuerpos que se usa normalmente para caracterizar células mesenquimatosas, más un anticuerpo anti-CD11B.

40 Para resumir, estos análisis dieron los siguientes resultados:

- Viabilidad:	92%
- Células CD90+:	52%
- Células CD105+:	82%
- Células CD11b+:	45%
- Células CD11b-dim:	43%
- Células CD73+:	82%
- Células CD146+:	36%
- Células CD146-dim:	49%
- Células CD31+:	2%
- Células CD80+:	3%
- Células CD45+, CD14+, CD34, CD133:	0%

45 Además, de estas pruebas resultó que las células que se encuentra que pertenecen a la línea celular mesenquimatosas, tal como se esperaba, son negativas para los marcadores del linaje hematopoyético.

Además se encontró que la viabilidad de las células era excelente.

Más particularmente, el diagrama cualitativo de la figura 8, que resume y condensa las numerosas pruebas llevadas

a cabo para determinar las características y las ventajas de la presente invención, muestran claramente que, en la suspensión celular obtenida por medio del dispositivo de disgregación 10 de la invención, el porcentaje de células aisladas viables y de los respectivos factores de crecimiento alcanza su valor máximo y óptimo cuando los orificios 13a de la rejilla de disgregación 13 tienen un tamaño o diámetro de alrededor de 75 micrómetros.

5 En su lugar, para valores del tamaño de los orificios 13a por debajo de 75 micrómetros, este porcentaje de las células aisladas viables es sustancialmente más bajo que el valor máximo, tal como se muestra por la porción A con línea continua del diagrama de la figura 8.

10 La porción B, con líneas punteadas y discontinuas, del diagrama de la figura 8 a su vez debe referirse a la presencia, en la suspensión celular obtenida por medio de un dispositivo de disgregación 10 de la invención, así como de células aisladas también de conglomerados celulares.

15 Por tanto, esas pruebas, así como otras no facilitadas en el presente documento por motivos de brevedad, han demostrado claramente que el dispositivo de disgregación 10, propuesto por la presente invención, permite preparar y obtener muestras de tejido biológico y más generalmente de material biológico, obtenido a través de disgregación de un tejido que es de un material biológico original, donde ventajosamente las muestras obtenidas y en particular las células respectivas conservan intactas y sin alteraciones las características, las funciones y la viabilidad celular del tejido y del material biológico original y por tanto no se alteran por la fase de disgregación a la que se han sometido, con la ventaja adicional de que las muestras obtenidas, al estar intactas y conservar su viabilidad celular original, son adecuadas para analizarse directamente sin recurrir a la ayuda de reactivos químicos.

20 En este sentido, se apreciará sin duda que el dispositivo de disgregación 10 de la presente invención constituye una mejora significativa y una innovación importante con respecto a la técnica anterior, en particular constituida por el dispositivo de trituración descrito en la patente US 5.731.199, tanto en el método de fabricación de las partes que son esenciales para el funcionamiento del dispositivo de disgregación como con respecto a su uso y sus posibles aplicaciones, y en particular permite una considerable expansión del campo de aplicación del dispositivo de disgregación con respecto a lo permitido por el dispositivo conocido de la patente US 5.731.199.

30 Variantes y mejoras

Sin perjuicio de los conceptos básicos de la presente invención, también queda claro que pueden hacerse cambios y mejoras adicionales en el dispositivo de disgregación de material biológico, descrito hasta ahora, para la preparación de suspensiones celulares y microinjertos de tejido, sin apartarse de ese modo del alcance de la misma invención.

35 Por ejemplo, las cuchillas del rotor con cuchilla 14 pueden ser más de una, es decir, pueden ser cuatro o seis colocadas simétricamente alrededor del área de la punta del eje 14a.

40 Nuevamente, según una mejora correspondiente a las realizaciones mostradas en la figura 3c, el dispositivo de disgregación 10 de la invención puede estar asociado con un elemento magnético que tiene la función de controlar apropiadamente la presión con la que el rotor con cuchilla 14 y la rejilla de disgregación 13 actúan conjuntamente entre sí con la finalidad de disgregar el material biológico.

45 En detalle, en una primera realización indicada por 10-1 y mostrada en la sección (a) de la figura 3C, el dispositivo de disgregación 10 está dotado de un elemento magnético, indicado por MAG y constituido en particular por un imán permanente de neodimio, que está adherido a la base de la bandeja o de la cámara de recogida inferior 12b del dispositivo de disgregación 10.

50 En su lugar, en una segunda realización indicada por 10-2 y mostrada en la sección (b) de la figura 3C, el dispositivo de disgregación 10 se proporciona en combinación con una base de soporte adicional BA y el elemento magnético MAG está unido a la base de un emplazamiento S que está formado en esta base de soporte adicional BA y tiene la función de recibir y albergar de manera estable el dispositivo de disgregación 10 durante el uso.

55 Este imán MAG lleva a cabo la acción, en ambas realizaciones 10-1 y 10-2, de atraer la cuchilla helicoidal 14b del rotor con cuchilla 14 con una carga preestablecida, con el fin de controlar la presión aplicada por el mismo rotor con cuchilla 14b sobre la rejilla de disgregación 13 y de evitar en particular un valor excesivo de esta presión.

60 Con este propósito, las dos partes que actúan conjuntamente en el dispositivo de disgregación 19 en contacto y en una razón de presión entre sí para disgregar el material biológico, es decir, la cuchilla helicoidal 14b del rotor con cuchilla 14 y la rejilla de disgregación 13, están constituidas por aceros que presentan diferentes fases alotrópicas, austenítica o martensítica, de modo que la rejilla de disgregación 13, hecha por ejemplo de acero inoxidable 316L, por tanto acero austenítico, es amagnético y por tanto insensible al campo magnético generado por el imán MAG, mientras que en su lugar la cuchilla helicoidal 14b, hecha con acero martensítico, es sensible al campo magnético generado por el imán MAG y por tanto se empuja con una presión o fuerza controlada contra la rejilla de disgregación 13.

65

Obviamente el imán permanente MAG se dimensiona y selecciona en cuanto a fuerza y capacidad de atracción de manera tal que la presión aplicada por la cuchilla helicoidal 14b contra la rejilla de disgregación 13 es adecuada para obtener una disgregación correcta del material biológico.

5 Por tanto, para resumir, estas variantes 10-1 y 10-2 del dispositivo de disgregación de la invención tienen la ventaja de mantener bajo control de manera efectiva la presión aplicada por la cuchilla helicoidal o el rotor 14b contra la rejilla de disgregación 13, con la finalidad de obtener una disgregación óptima del material biológico y por tanto prevenir y remediar algunas desventajas que pueden producirse en los dispositivos de disgregación conocidos, tales como por ejemplo los descritos por la patente US 5.731.199, que carece de este control.

10 Uso del dispositivo de disgregación de material biológico de la invención en el quirófano, con el dispositivo de disgregación conectado por medio de un adaptador a un instrumento endoscópico incluido en el suministro de instrumentos del quirófano

15 Finalmente, según un aspecto adicional de la presente invención, el dispositivo de disgregación 10 de material biológico, ilustrado previamente, puede conectarse ventajosamente, con la ayuda de un adaptador adecuado, a un instrumento endoscópico o motor eléctrico, estéril, ya presente en el quirófano, con la finalidad de permitir el uso del dispositivo de disgregación 10 de la invención directamente en el quirófano.

20 La figura 3D muestra este adaptador, indicado en general por 20, que permite de hecho la conexión del dispositivo de disgregación 10 de la invención a un motor quirúrgico común o manipulador, incluido en el suministro de dispositivos e instrumental estéril habitualmente presente en el quirófano.

25 En detalle, el adaptador 20 tiene una configuración alargada con un primer extremo 20a apropiado para conectar el adaptador 20, por un lado, al eje 14a, que sobresale del dispositivo de disgregación, y en un segundo extremo opuesto 20b, apropiadamente moldeado, apto para conectar el adaptador 20, por el otro lado, al instrumento endoscópico, ya presente en el quirófano.

30 Durante el uso efectivo este adaptador 20 está conectado, en el quirófano, en un lado al eje sobresaliente 14a del dispositivo de disgregación 10 y en otro lado al instrumento endoscópico.

35 El instrumento endoscópico se acciona entonces con la finalidad de hacerlo rotar a una velocidad adecuada, en particular 80 rpm, y aplicar un par de torsión apropiado, por ejemplo, de 25 Nw*cm, tal como se indicó ya previamente, al rotor con cuchilla 14 del dispositivo de disgregación 10 y en consecuencia provocar la disgregación del material biológico, ya tomado del paciente que está tratándose en el quirófano y previamente introducido en el dispositivo de disgregación 10.

40 De esta manera, es decir, sin transferir al exterior del quirófano el material biológico tomado del paciente, es posible preparar el material biológico disgregado, por ejemplo, en forma de un microinjerto de tejido, para insertarlo nuevamente en el cuerpo del paciente que está tratándose en el quirófano.

45 Por tanto, el dispositivo de disgregación 10 de la invención, gracias al adaptador 20 descrito previamente, permite prestaciones y resultados innovadores que van más allá de los permitidos por la técnica anterior, por ejemplo, por el dispositivo triturador de material biológico descrito por la patente US 5.731.199 ya mencionada previamente en numerosas ocasiones, con la finalidad de constituir una alternativa válida para los sistemas en uso conocidos actualmente.

50 En particular el dispositivo de disgregación 10 de la invención, usado en combinación con este adaptador 20 que permite la conexión del mismo con un instrumento endoscópico estéril, ya presente en el quirófano, ya no está configurado como un simple dispositivo de disgregación de material biológico, tal como el descrito por la patente US 5.731.199, sino que se convierte y puede compararse, al menos funcionalmente, con un instrumento quirúrgico que puede usarse directamente en el quirófano, es decir, como un microbisturí estéril y de un solo uso, constituido por una pluralidad de microcuchillas, por ejemplo 600, suponiendo que la rejilla de disgregación 13 del dispositivo 10 tiene 100 microorificios o poros hexagonales, es decir 100 microorificios definiendo cada uno 6 microcuchillas, por tanto un total de hecho de 600 microcuchillas, donde este microbisturí puede usarse para cortar y disgregar los tejidos en unos pocos minutos con la finalidad de obtener, directamente en el quirófano y sin procesos adicionales, los fragmentos de tejido de dimensiones calibradas que se requieren para los pacientes que están tratándose en el quirófano.

60 En consecuencia, al menos dentro de la esfera de este uso innovador, el dispositivo de disgregación 10 de la invención puede definirse también como microbisturí para microcirugía mínimamente invasiva.

65 En este sentido se subraya que, hasta la fecha, la técnica anterior no permitía estas prestaciones y resultados en el quirófano, que se obtienen en su lugar de la conexión del dispositivo de disgregación 10, tal como se mencionó, por medio del adaptador 20 con un instrumento endoscópico común ya presente en el quirófano.

De hecho, en la técnica anterior, por tanto también incluyendo el dispositivo triturador descrito por la patente US 5.731.199, era necesario, con la finalidad de obtener los microfragmentos de tejido que van a usarse en el quirófano para el tratamiento de los pacientes, transferir los tejidos, una vez tomados del paciente, fuera del quirófano a un laboratorio equipado con una máquina especial que tiene la función de activar o hacer rotar el dispositivo, con la finalidad de obtener los microfragmentos de tejido, que van a llevarse entonces al quirófano para injertarse en el paciente.

Esta transferencia fuera del quirófano y las operaciones asociadas con la misma conllevaban sin embargo manipulaciones que no estaban permitidas por la ley en la esfera de la terapia médica.

En su lugar, tal como se describió previamente, al conectar el dispositivo 10 de la invención por medio del adaptador 20 del dispositivo de disgregación 10 de la invención con un manipulador quirúrgico estéril, incluido en el suministro de instrumentos y dispositivos, ya presente en el quirófano, es posible ponerlo a disposición y usar el dispositivo 10 directamente en el quirófano, conservando la esterilidad y la eficiencia del sistema y al mismo tiempo observando la ley.

Por tanto, de esta manera, el dispositivo de disgregación de la invención se convierte también en parte esencial de un procedimiento quirúrgico e instrumento clínico innovador, para la regeneración de tejidos en el quirófano, adecuado para observar las condiciones de esterilidad, procedimiento que en su lugar no era posible llevar a cabo antes con los instrumentos ofrecidos por la técnica anterior, en particular con el dispositivo descrito por la patente US 5.731.199.

Además, adicionalmente a las ventajas y las prestaciones mencionadas anteriormente, ya en sí mismo importante, relacionado con el uso del dispositivo 10 de la invención directamente en el quirófano, debe considerarse que el mismo dispositivo 10 se caracteriza, tal como se ilustró previamente de manera extensa, por una tecnología y un proceso innovador para la formación de los microorificios 13a de la rejilla de disgregación 10 respectiva.

En consecuencia, tal como se subrayó previamente, el dispositivo de disgregación 10 está configurado de hecho y puede compararse legítimamente con una fresa quirúrgica o microbisturí dotado de una pluralidad de microcuchillas, por ejemplo, en un número de 600, con la finalidad de cortar y fragmentar el tejido del paciente que va a tratarse en el quirófano.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de disgregación (10) para disgregar material biológico, en particular para la preparación de suspensiones celulares o microinjertos de tejido o microfragmentos de tejido, que comprende:

- un cuerpo externo hueco (11), que define una cámara interna (12);

- una placa perforada o rejilla de disgregación (13), fija, que tiene una pluralidad de microorificios (13a) dotados de bordes afilados, estando dicha rejilla de disgregación albergada transversalmente en dicha cámara interna (12) con la finalidad de definir una cámara de carga superior (12a) apropiada para cargarse con el material biológico que va a disgregarse (MB) y una cámara de recogida inferior (12b) apropiada para recoger el material biológico, una vez disgregado (MB'); y

- un rotor con cuchilla (14), que rota en dicha cámara interna (12), siendo dicho rotor con cuchilla (14) apropiado para actuar conjuntamente, al rotar, con dicha rejilla de disgregación (13) fija, con la finalidad de alimentar y poner el material biológico (MB), contenido en la cámara de carga superior (12a), en contacto y de actuar conjuntamente con los microorificios (13a), con bordes afilados, de dicha rejilla de disgregación (13), y provocar por tanto la disgregación del material biológico (MB) mientras pasa a través de dichos microorificios (13a);

caracterizado porque los microorificios (13a) de dicha rejilla de disgregación perforada (13) tienen dimensiones o un diámetro (D) de entre 70 y 80 μm , y más preferiblemente tienen dimensiones o un diámetro (D) de aproximadamente 75 μm ,

porque los microorificios (13a) de dicha rejilla de disgregación (13) están formados por medio de un proceso de fabricación por moldeado de tipo troquel-punzón (M, P), usando un punzón de moldeado (P) del tipo con forma piramidal basado en polígono,

porque dicho punzón de moldeado (P) y el troquel correspondiente (M) están configurados de una forma tal que cada uno de dichos microorificios (13a) está obtenido a través de rotura y rasgado del material de una lámina de metal (N) y tiene un borde afilado irregular (B), a través del efecto de esta rotura o rasgado, definiendo una pluralidad de puntas afiladas, y

porque dicho cuerpo externo (11) define un orificio pasante (11c), sustancialmente vertical, que se extiende entre un borde superior de dicho cuerpo externo (11) y la base de dicha cámara de recogida (12b), en el que dicho orificio pasante (11c) tiene la función de permitir la extracción del material biológico disgregado (MB'), acumulado en dicha cámara de recogida (12b), mediante lo cual dicho dispositivo de disgregación (10) es apropiado para preparar suspensiones celulares y acondicionar microinjertos de tejido que conservan intactas las características y la viabilidad celular del material biológico original, no disgregado, evitando de ese modo el uso de reactivos químicos en la preparación de estas suspensiones celulares y en el acondicionamiento de estos microinjertos de tejido.

2. Dispositivo de disgregación (10) de material biológico según la reivindicación 1, en el que dicho rotor con cuchilla (14) está constituido por:

- un eje (14a), dispuesto en dirección vertical,

- una cuchilla de distribución (14b), asociada con un extremo inferior de dicho eje vertical (14a) y que presenta una forma helicoidal curva, y

- una rasqueta inferior (14c), también asociada con el extremo inferior de dicho eje vertical (14a);

donde la rejilla de disgregación (13), fija, está intercalada entre dicha cuchilla de distribución helicoidal (14b) y dicha rasqueta inferior (14c), ambas asociadas con el extremo inferior de dicho eje vertical (14a), mediante lo cual dicho rotor con cuchilla (14) es adecuado para actuar conjuntamente, al rotar, a través de su cuchilla de distribución helicoidal (14b) y su rasqueta inferior (14c), respectivamente con una cara superior de dicha rejilla de disgregación (13), girada hacia dicha cámara de carga superior (12a), con la finalidad de distribuir y poner el material biológico (MB) que va a disgregarse en contacto con los microorificios (13a) de la rejilla de disgregación (13), y con una cara inferior de dicha rejilla de disgregación (13), girada hacia dicha cámara de recogida (12b), con la finalidad de raspar el material biológico disgregado (MB') que sale de los microorificios (13a) de dicha rejilla de disgregación (13) y descargarlo (f2) en dicha cámara de recogida (12b).

3. Dispositivo de disgregación (10) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho cuerpo externo (11) está asociado con un cuerpo interno secundario (16), que define dicha cámara de carga superior (12a), y está constituido por una porción superior (11a) que define un emplazamiento (11') que alberga dicho cuerpo interno secundario (16) y una porción inferior (11b) que define dicha cámara de recogida inferior (12b),

en el que dicha rejilla de disgregación (13) está intercalada entre dicho cuerpo interno secundario (16), albergado en

dicho emplazamiento (11') definido por la porción superior (11a) de dicho cuerpo externo (11), y la porción inferior (11b), que define dicha cámara de recogida inferior (12b), de dicho cuerpo externo (11), y

5 en el que dicho cuerpo interno secundario (16) forma un emplazamiento de soporte para soportar de manera rotatoria dicho rotor con cuchilla (14), y en particular el eje respectivo (14a), y está acoplado a la porción superior (11a) de dicho cuerpo externo (11) con la finalidad de que no rote y por tanto evitar cualquier rotación de la rejilla de disgregación (13), intercalada entre dicho cuerpo interno secundario (16) y la porción inferior (11b) de dicho cuerpo externo (11), cuando dicho rotor con cuchilla (14) rota en dicha cámara interna (12) con la finalidad de provocar la disgregación del material biológico (MB).

10 4. Dispositivo de disgregación (10) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada microorificio (13a) de dicha rejilla de disgregación (13) pasa por encima de una pluralidad de cuchillas, y presenta, en particular, una forma hexagonal, con seis cuchillas asociadas cada una con un lado respectivo del hexágono.

15 5. Dispositivo de disgregación (10) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una cubierta (15), retirable, para cubrir dicha cámara de carga superior (12a), en el que dicho rotor con cuchilla (14) se extiende a través de un orificio (15a) formado en dicha cubierta (15), mediante lo cual dicho rotor con cuchilla sobresale parcialmente en un extremo superior respectivo de dicha cubierta (15) con la finalidad de permitir el acoplamiento de dicho rotor con cuchilla (14) con un medio de motor adecuado apropiado para controlar su rotación en dicha cámara interna (12).

20 6. Dispositivo de disgregación (10) según la reivindicación 2, en el que dicha rasqueta (14c) está formada por una pluralidad de cuchillas, en forma de una espiga, en particular dos, opuestas entre sí, que se extienden radialmente desde el extremo inferior del eje (14a) de dicho rotor con cuchilla (14).

25 7. Dispositivo de disgregación (10, 10-1; 10-2) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el dispositivo de disgregación (10) comprende un elemento magnético (MAG), constituido en particular por un imán permanente, apropiado para atraer con una carga preestablecida la cuchilla helicoidal (14b) del rotor con cuchilla (14), de una forma tal que controla, al usar el dispositivo de disgregación (10), la presión aplicada por el mismo rotor con cuchilla (14b) sobre la rejilla de disgregación (13).

30 8. Dispositivo de disgregación (10, 10-1; 10-2) según la reivindicación 7, en el que el elemento magnético (MAG) está unido a la base de la bandeja o de la cámara de recogida inferior (12b) del dispositivo de disgregación (10).

35 9. Dispositivo de disgregación (10, 10-1; 10-2) según la reivindicación 8, en el que el elemento magnético (MAG) está unido a la base de un emplazamiento (S) formado en una base de soporte adicional (BA) y que tiene la función de recibir y albergar durante el uso el dispositivo de disgregación (10).

40 10. Método para la fabricación de un dispositivo de disgregación (10) para disgregar material biológico, del tipo que incluye al menos una placa perforada o rejilla de disgregación (13) que tiene una pluralidad de microorificios afilados (13a) a través de los cuales se hace pasar al material biológico con la finalidad de disgregarlo;

45 en el que el método comprende una etapa de moldeado con la finalidad de moldear, por medio de un molde (S) de tipo troquel-punzón, una hoja o tira de metal (N), original, en particular de acero inoxidable 316L, con la finalidad de formar en dicha hoja de metal (N) los microorificios (13a) de la rejilla de disgregación (13);

50 en el que el troquel (M) y el punzón (P) del molde (S) están configurados de una forma tal que se arrastra y se rasga, durante dicha fase de moldeado, la hoja de metal (N), con la finalidad de obtener a través del rasgado y la rotura de dicha hoja de metal (N) los microorificios (13a) de dicha rejilla de disgregación (13);

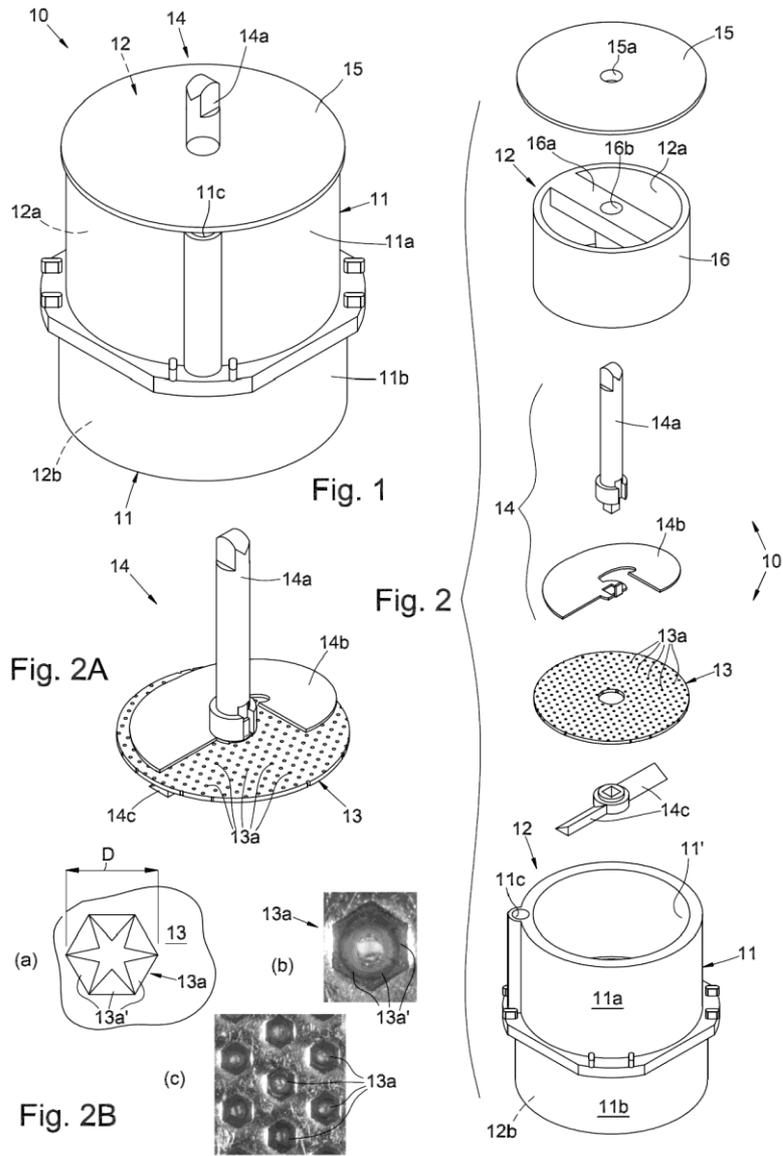
55 en el que el punzón (P) del molde (S) tiene una configuración con forma piramidal basada en polígono, por ejemplo con seis lados, de modo que los microorificios (13a) de dicha rejilla de disgregación (13), obtenidos a través del rasgado y la rotura de la tira de metal original (N), tienen cada uno un borde afilado irregular con varias puntas, por ejemplo seis, correspondientes en número al de los lados del punzón poligonal; y

en el que los microorificios (13a) de la rejilla de disgregación (13), obtenidos a través del rasgado de la tira de metal original (N), tienen dimensiones o un diámetro (D) comprendido entre 70 y 80 μm , y más preferiblemente tienen dimensiones o un diámetro (D) de aproximadamente 75 μm .

60 11. Combinación de un dispositivo de disgregación (10) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de microfragmentos de tejido y un adaptador (20) apropiado para conectar el mismo dispositivo (10) a un manipulador quirúrgico habitual incluido en el suministro de instrumentos y dispositivos, estéril, normalmente presente en el quirófano.

65 12. Combinación según la reivindicación 11, en el que el adaptador (20) tiene una forma alargada con un extremo (20a) apropiado para conectarse a un eje saliente (14a) de dicho rotor con cuchilla (14) y un extremo opuesto (20b)

apropiado para conectarse al manipulador quirúrgico.



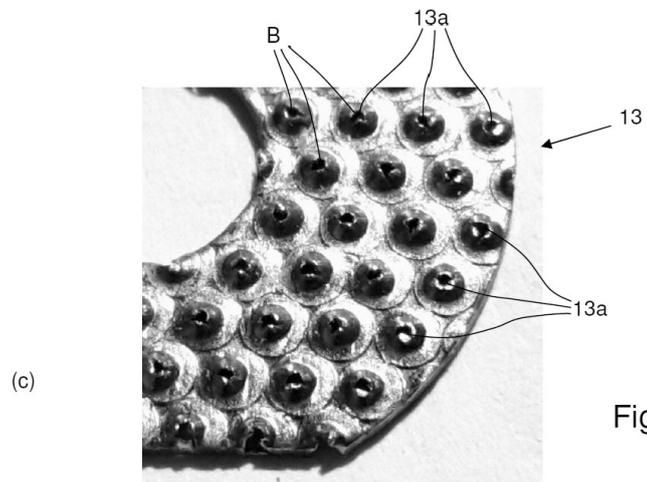
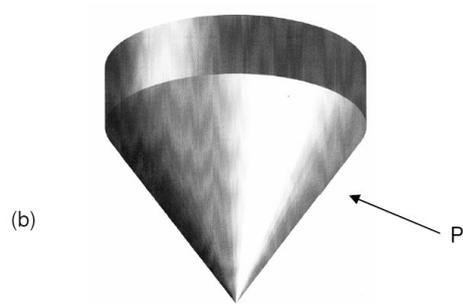
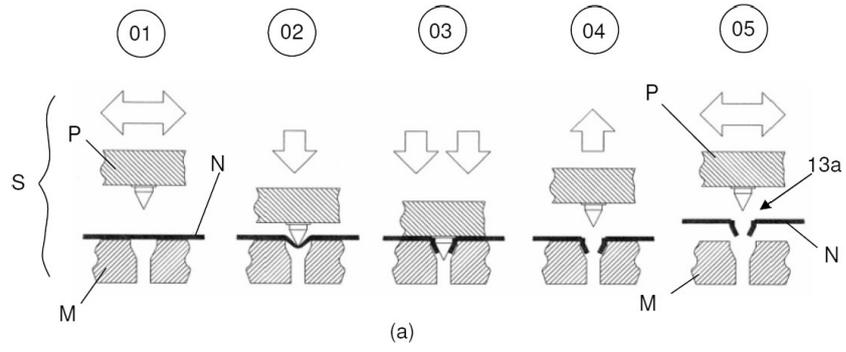


Fig. 2C

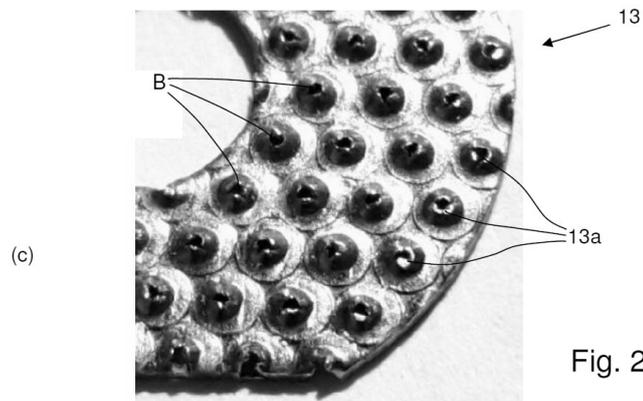
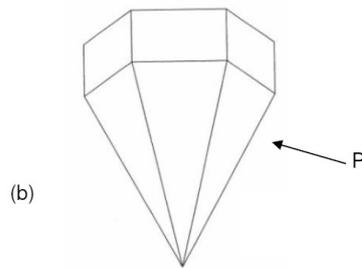
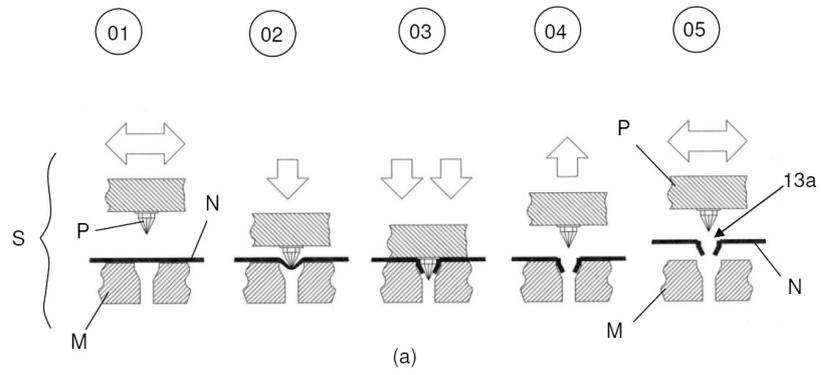
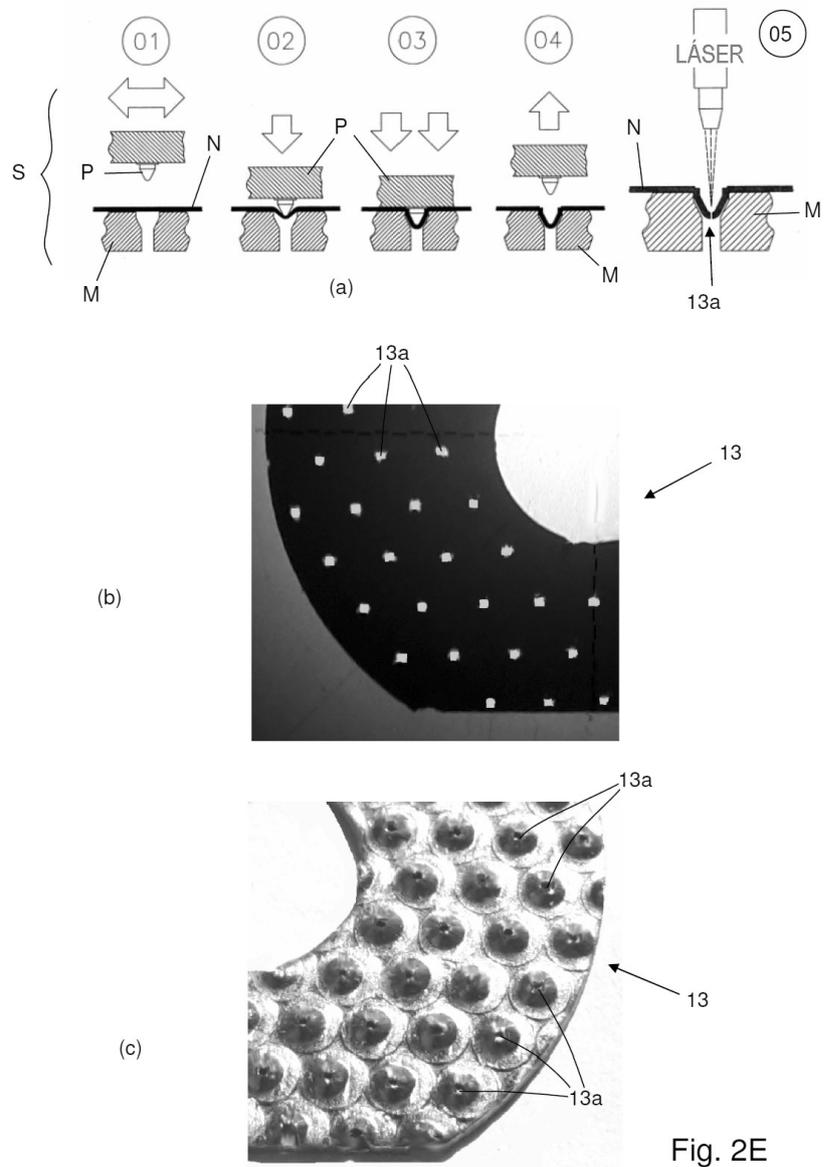


Fig. 2D



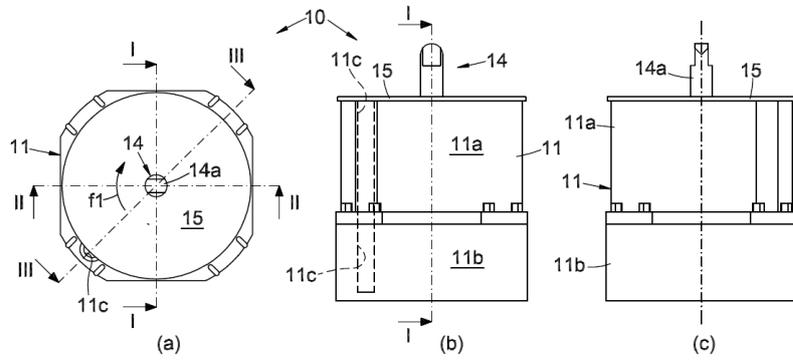


Fig. 3A

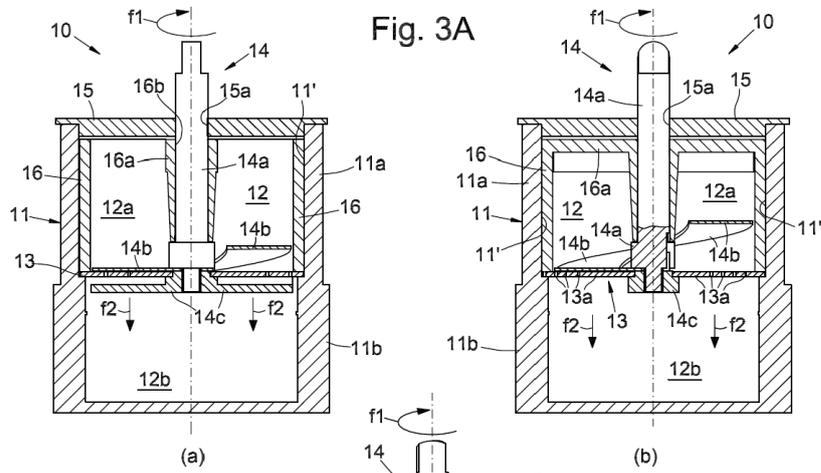
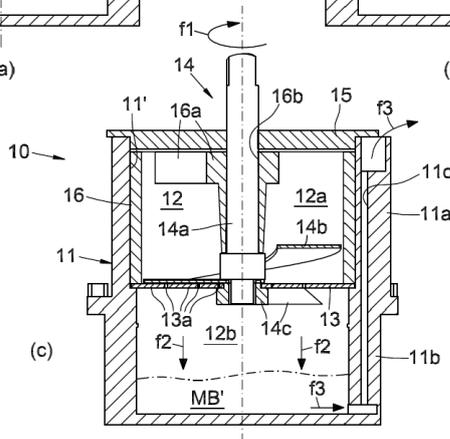


Fig. 3B



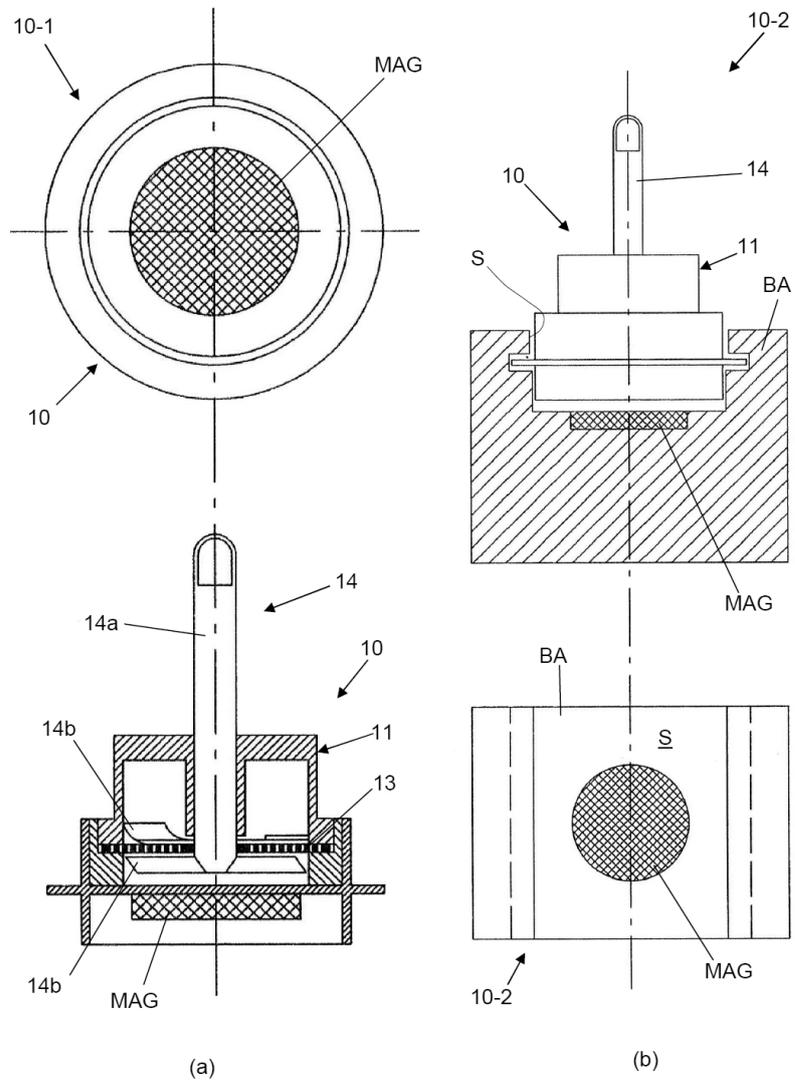


Fig. 3C

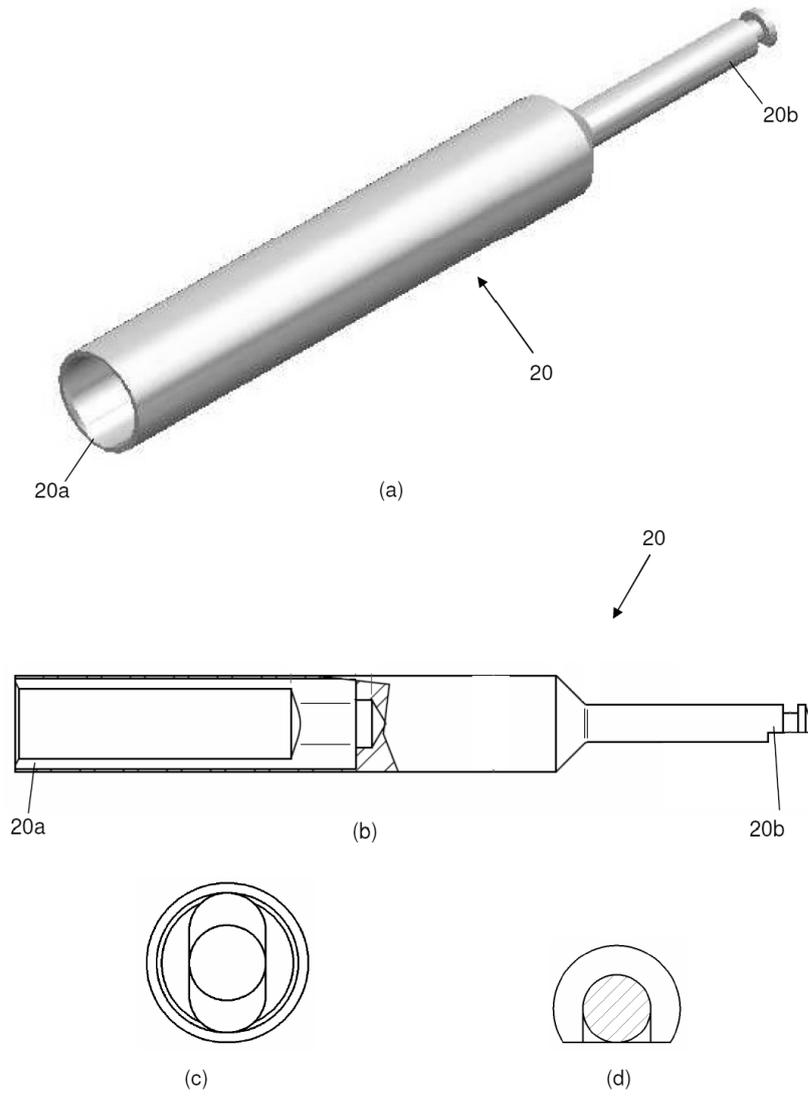


Fig. 3D

EJEMPLO 1

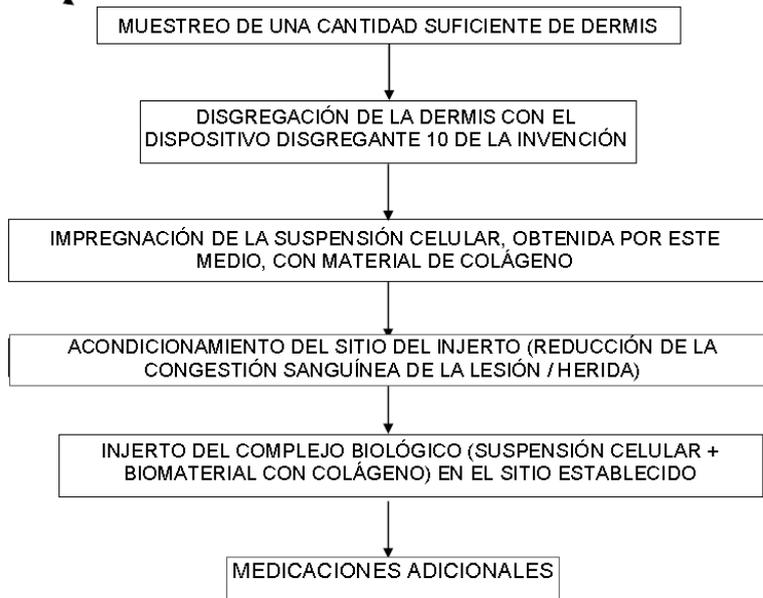


Fig. 4A

EJEMPLO 2

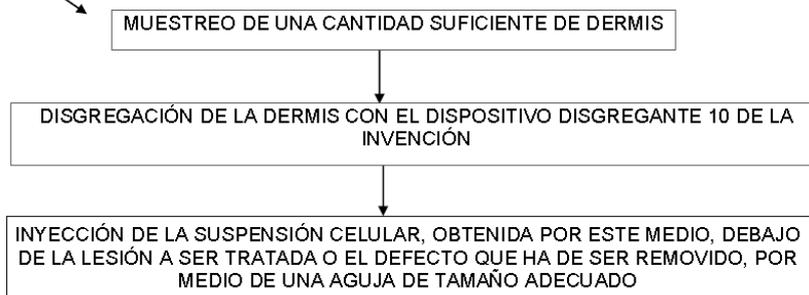


Fig. 4B

EJEMPLO 3

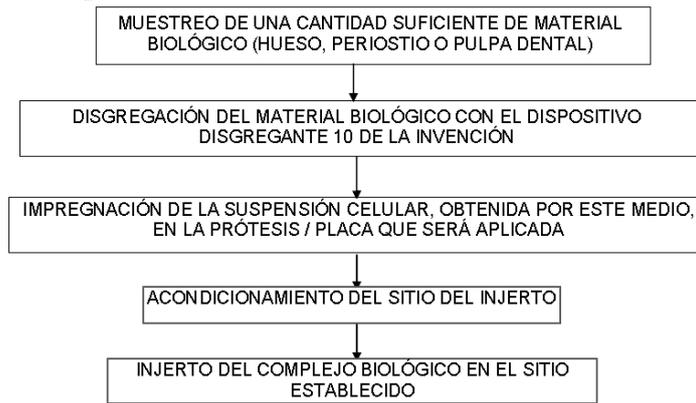


Fig. 4C

EJEMPLO 4

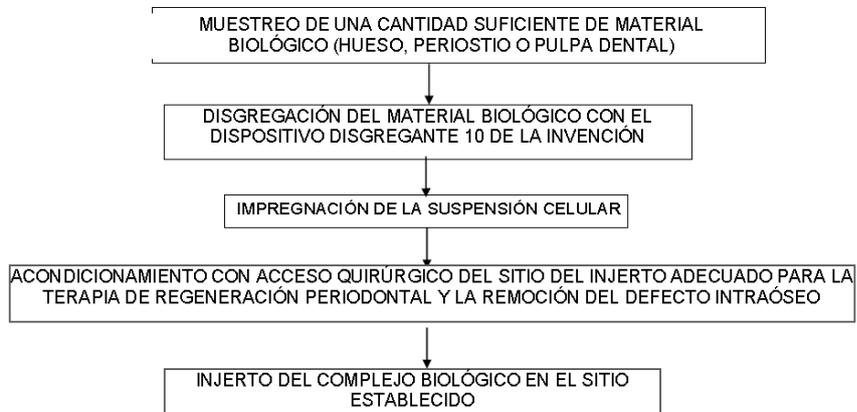


Fig. 4D

EJEMPLO 5

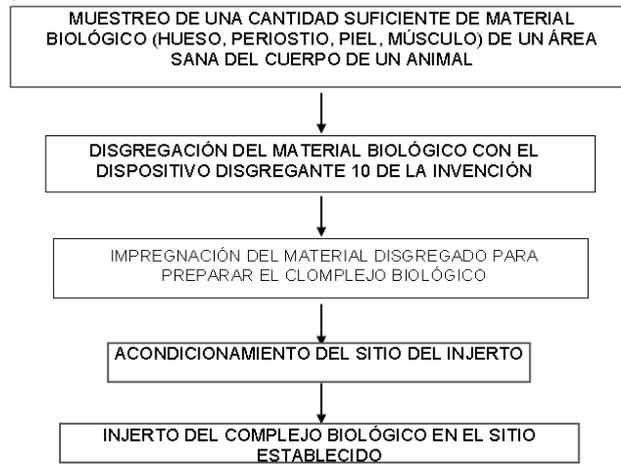


FIG. 4E

EJEMPLO 6

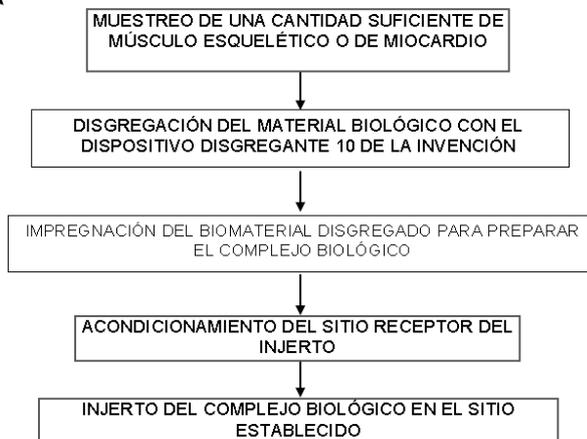


FIG. 4F

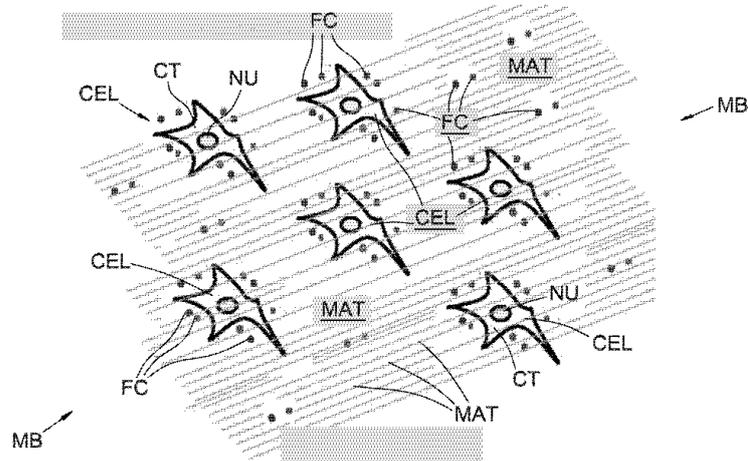


Fig. 5

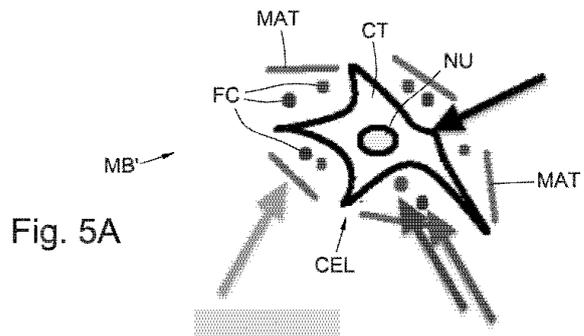
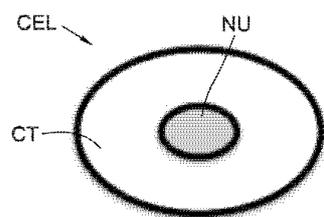


Fig. 5A



TÉCNICA ANTERIOR

Fig. 6

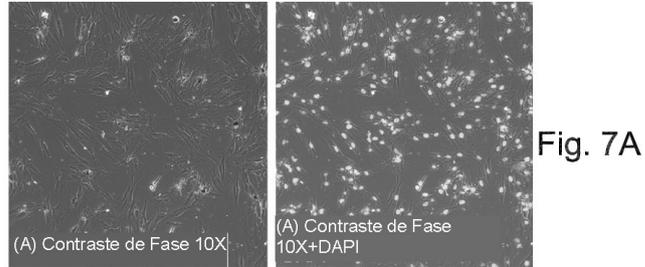


Fig. 7B

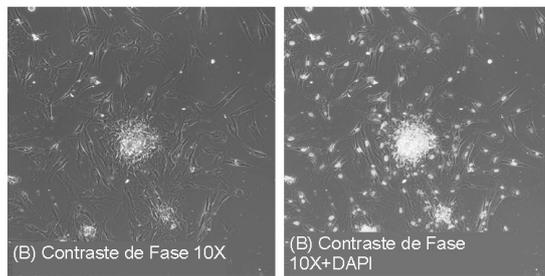


Fig. 7C

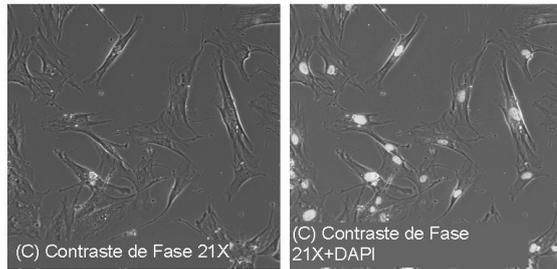
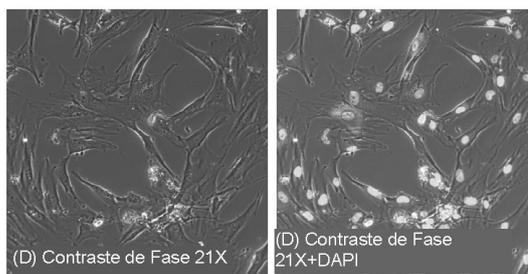


Fig. 7D



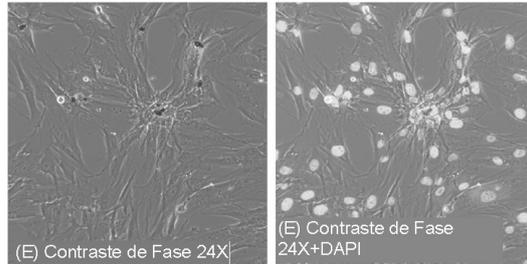
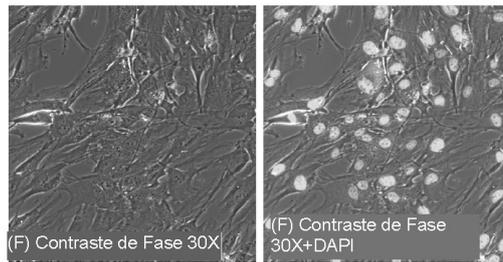


Fig. 7E

Fig. 7F



PORCENTAJE DE CÉLULAS
AISLADAS VIABLES EN LA
SUSPENSIÓN CELULAR

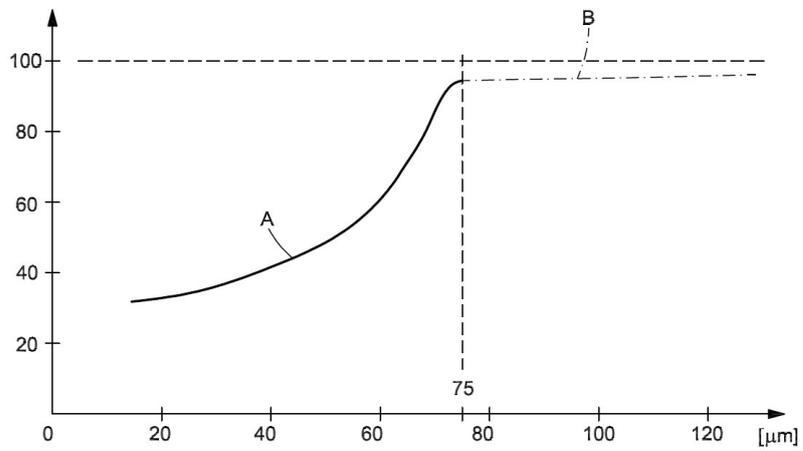


Fig. 8

DIMENSIONES / DIÁMETRO D DE
LOS MICROORIFICIOS 13a DE LA
REJILLA DE DISGREGACIÓN 13