

MÉTODO DE FABRICACIÓN DE UN DISPOSITIVO MÉDICO MEDIANTE IMPRESIÓN 3D Y ELECTROHILADO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de fabricación de un dispositivo médico mediante impresión 3D y electrohilado útil en la reparación ósea.

La invención tiene aplicación en la industria farmacéutica, en particular, en los procesos de reparación del tejido óseo.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los tratamientos convencionales empleados en pérdidas considerables de hueso no logran la regeneración del tejido, lo que ocasiona múltiples intervenciones quirúrgicas que resultan muchas veces en la reducción de la calidad de vida de los pacientes e incremento en los costos en los servicios de salud. Asimismo, los tratamientos no garantizan una reparación completa del tejido y los pacientes pueden quedar con secuelas importantes.

Dichos tratamientos empleados para la reparación de defectos óseos considerables se basan en el uso de autoinjertos, aloinjertos o cementos de metacrilato. Los autoinjertos son la principal alternativa; sin embargo, su uso se ve limitado debido a la baja cantidad de material disponible. Por otro lado, se usa el cemento de metacrilato, no obstante, este no cuenta con una arquitectura porosa y no tiene forma definida, por lo tanto, el ortopedista debe moldear el material durante el proceso quirúrgico y adaptarlo al tejido óseo faltante. Además, el metacrilato no tiene procesos de biodegradación y puede presentar deficiencias en el ámbito mecánico, por lo que no puede ser empleado en todos los tejidos óseos.

En vista de la complejidad que demanda los tratamientos para la reparación ósea, se ha explorado en los últimos años la aplicación de una tecnología de alta versatilidad que es la impresión tridimensional (3D) por fabricación aditiva. La impresión 3D proporciona una mayor flexibilidad en el control de la microarquitectura de estructuras tridimensionales (véase B. G. Compton, J.A. Lewis; 3D-Printing of Lightweight Cellular Composites, Adv. Mater. 26 (2014) 5930-5935). El gran interés por esta técnica radica en su versatilidad y fácil uso dado que permite la construcción de objetos tridimensionales mediante la deposición capa por capa de

un material siguiendo un patrón de impresión el cual es configurado previamente en un archivo Gcode (véase T.D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K.T.Q.Q. Nguyen, D. Hui, Additive manufacturing (3D printing); A review of materials, methods, applications and challenges, Compos. Part B Eng. 143 (2018) 172-196). Esto permite fabricar estructuras de forma personalizada, macro/micro porosas y con propiedades mecánicas ajustadas ya sea a partir de polímeros, cerámicos, metales o materiales compuestos (véase por ejemplo S.C. Ligon et al.; Polymers for 3D Printing and Customized Additive manufacturing, Chem. Rev. 117 (2017) 10212-10290). Debido a las características morfológicas y estructurales que se obtienen por la impresión 3D, se han diseñado y desarrollado implantes médicos, herramientas, instrumentos y dispositivos, con altos estándares de calidad en un menor tiempo y costos (véase por ejemplo Y.W.D. Tay et al.; 3D printing trends in building and construction industry: a review, Virtual Phys. Prototyp. 12(2017) 261-276).

Asimismo, tenemos también el método de electrohilado que permite obtener fibras de diámetros micro y/o submicrométrico. Dicha característica le brinda elevada tracción, área superficial y porosidad, entre otras, a membranas bidimensionales. Las fibras obtenidas por electrohilado pueden ser poliméricas o de combinaciones de materiales orgánicos e inorgánicos, los cuales presentan un enorme potencial para mejorar significativamente los procesos tales como filtración, liberación, aplicabilidad en textiles, entre otros; así como para el desarrollo de nuevas aplicaciones en la ingeniería de los tejidos (véase por ejemplo S. Ramakrishna et al.; An introduction to electrospinning and nanofibers. (2005) 1-382).

En este sentido, el estado de la técnica muestra diversos desarrollos al respecto. Por ejemplo, la publicación estadounidense US2016067375A1 divulga métodos para la creación de andamios de ingeniería tisular de inspiración biológica en 3D con excelentes propiedades mecánicas interfaciales y biocompatibilidad, y productos creados con dichos métodos. Donde se puede emplear una combinación de nanomateriales, métodos de nano/microfabricación e impresión 3D para crear estructuras que promuevan la reconstrucción y/o producción de tejidos. La publicación europea EP3003224A1 divulga materiales sintéticos de injerto óseo o andamios de ingeniería tisular con propiedades estructurales y biológicas deseadas (por ejemplo, macroporosidades bien controladas, microambiente biológico espacialmente definido, buenas características de manipulación, capacidad de auto anclaje y propiedades de memoria de forma) y métodos para su aplicación *in vivo*.

Así también, la publicación europea EP3316807A1 divulga un anclaje óseo que tiene una superficie de pilar óseo adaptada para la fijación congruente a un hueso y métodos para la producción de dicho anclaje óseo. Donde los métodos de fabricación comprenden generalmente la cartografía de la forma del hueso al que se va a aplicar el anclaje óseo, realizada comúnmente mediante una técnica de imagen. Los métodos de fabricación incluyen además cualquier proceso adecuado utilizado para fabricar un objeto tridimensional, dicho proceso incluye generalmente métodos de fabricación aditivos o sustractivos. La publicación europea EP3829663A1 divulga un andamio de ingeniería tisular implantable quirúrgicamente e impreso en tres dimensiones para promover la regeneración ósea, vascular y/o cartilaginosa en regiones osteocondrales y un método para fabricar el andamio de ingeniería tisular implantable quirúrgicamente impreso en 3D. Por otra parte, la publicación estadounidense US11168412B2 divulga un método de electrohilado modificado para fabricar andamios nanofibrosos uniformemente modelados y porosos que pueden utilizarse en diversas aplicaciones, útil en la regeneración ósea guiada.

Sin embargo, el estado de la técnica no proporciona la combinación de la impresión 3D y el electrohilado para la fabricación de un dispositivo médico aplicado en la reparación ósea puede resultar de gran aplicabilidad a nivel clínico. Para el desarrollo de este tipo de dispositivos se debe evaluar los materiales a emplear, tales como polímeros sintéticos biodegradables dado que sus productos de degradación no afectan la integridad del paciente. Entre los polímeros más empleados se encuentran el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona, poliglicólidos (PLG), copolímeros de poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) y los polialquilcianoacrilatos, dado que es biocompatible, sus características fisicoquímicas le confieren una unión entre capas y las piezas mantienen su forma a temperatura corporal. Además, este material se ha aplicado en las investigaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos por medio de la fabricación de estructuras tridimensionales, conocidas como andamios, que estabilizan la zona a tratar mientras se lleva a cabo el proceso natural de reparación del tejido.

Debido a lo expuesto anteriormente, la presente invención proporciona un método de fabricación de un dispositivo para proporcionar reparación ósea en la aplicación clínica mediante los métodos de impresión 3D y electrohilado, empleando biomateriales aprobados por las autoridades sanitarias referentes, tales como la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas

en inglés). El método de la invención permite elaborar un dispositivo que tiene una estructura tridimensional con arquitectura macroporosa que garantiza el tránsito de células, nutrientes y factores asociados a los procesos de reparación ósea, favoreciendo la formación de hueso nuevo en el defecto óseo crítico. Adicionalmente, posee un recubrimiento bioactivo que limita la invasión de tejido adyacente y contribuye a los procesos de diferenciación celular.

La invención permite establecer el proceso de diseño y modelado de los dispositivos a partir de diversas imágenes diagnósticas, combinar dos técnicas tales como la impresión 3D (también llamada fabricación aditiva) y el electrohilado en la fabricación de andamios, parametrizar los factores involucrados en el proceso de fabricación ya sea en la impresión 3D como en el electrohilado, introducir un canal al interior del dispositivo que permita el tránsito de médula ósea en el tejido afectado y generar un recubrimiento polimérico activado químicamente que induzca la reparación ósea

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el modelo en CAD del andamio para los primeros estudios *in vitro*.

La Figura 2 muestra las probetas de compresión de acuerdo con la norma ASTM D695

La Figura 3 muestra comparación de los módulos de Young obtenidos con los diferentes patrones de relleno de las diferentes estructuras de las probetas de compresión.

La Figura 4 muestra una comparación entre las densidades de relleno y 60%, 50%, 40%, 30% y 20%.

La Figura 5 muestra el diseño, modelado e incorporación del canal medular en la estructura tridimensional.

La Figura 6 muestra la evaluación de la capacidad volumétrica del andamio de PLA 3D con medio de cultivo.

La Figura 7 muestra las imágenes obtenidas por el microscopio de fluorescencia del ensayo de viabilidad ("live/dead") de las CEM-GW sembradas en los andamios de PLA 3D.

La Figura 8 muestra las imágenes del microscopio de fluorescencia correspondientes al ensayo de viabilidad (“live/dead”) realizado en los andamios recubiertos.

La Figura 9 muestra una evaluación de viabilidad celular de andamios PLA 3D y electrohilados en GENbag con bolsa de CO₂.

La Figura 10 muestra andamios 3D, electrohilados y control luego de 4 horas en GENbag a temperatura ambiente y con generador de CO₂.

La Figura 11 muestra el ensayo de viabilidad (“live/dead”) de las células sembradas en 3D Quyne y en el control luego de ser sometidas a temperatura ambiente y atmósfera de CO₂ variable durante 4 horas.

La Figura 12 muestra el diseño y modelado del dispositivo 3D adaptado para una lesión ósea crítica en fémur de conejo.

La Figura 13 muestra una simulación de impresión del dispositivo diseñado para un defecto óseo crítico en fémur de biomodelo lagomorfo.

La Figura 14 muestra el diseño en CAD, programación en Slic3r y contenedor impreso empleado en la siembra celular de andamios de PLA 3D.

La Figura 15 muestra el dispositivo “3D Quyne” preparado para los ensayos en biomodelos.

La Figura 16 muestra el ensayo de cultivo celular en andamios 3D con contenedor de PLA.

La Figura 17 muestra imágenes de la viabilidad (“live/dead”) de (A) CEM-GW cultivadas en el dispositivo 3D Quyne y (B) CEM-GW control sembradas en placa de cultivo sometidas a atmósfera de CO₂ variable y temperatura ambiente por 4 horas.

La Figura 18 muestra el biomodelo membrana electrohilada.

La Figura 19 muestra el Control positivo: Conejo con autoinjerto.

La Figura 20 muestra las radiografías de los biomodelos con andamio de PLA 3D recubierto.

La Figura 21 muestra las radiografías del biomodelo control negativo.

La Figura 22 muestra la radiografía Biomodelo con dispositivo 3D Quyne.

La Figura 23 muestra la radiografía Biomodelo con dispositivo 3D Quyne funcionalizado.

La Figura 24 muestra la representación gráfica del funcionamiento del canal medular, vascularización y porosidad del dispositivo 3D Quyne.

La Figura 25 muestra la visualización del dispositivo 3D Quyne extraído del tejido óseo y la visualización de posibles calcificaciones y células dentro de los poros del dispositivo.

La Figura 26 muestra la visualización de calcificaciones, células y vasos sanguíneos encontrados en el dispositivo 3D Quyne una vez finalizado el ensayo *in vivo*.

La Figura 27 muestra la simulación de implante del dispositivo 3D Quyne en fémur.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de fabricación de un dispositivo médico elaborado con un polímero biodegradable seleccionado del grupo que consiste en ácido poliláctico (PLA), policaprolactona, poliglicólidos (PLG), copolímeros de poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) y polialquilcianoacrilatos, junto con hidroxiapatita (HA), donde el dispositivo está orientado a la reparación de fracturas o lesiones óseas considerables.

Los polímeros biodegradables son partículas que muestran una menor toxicidad sistémica y son más biocompatibles con los tejidos, ya que suelen degradarse en oligómeros y monómeros, que luego se metabolizan y eliminan del organismo por las vías normales. El ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona, los poliglicólidos (PLG), los copolímeros de poli(láctido-co-glicólido) (PLGA) y los polialquilcianoacrilatos son polímeros que han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), así como por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para su aplicación farmacéutica.

Por ejemplo, el PLA es un polímero biodegradable de base biológica representativo y muy usado que puede producirse a partir de recursos renovables, incluidos el almidón de maíz y patatas, el azúcar de la remolacha y la caña de azúcar, entre otros. Dado que es un material bioabsorbible, se puede emplear en procedimientos

quirúrgicos ya sea en forma de andamios, dispositivos de fijación como tornillos, clavos, arandelas, entre otros, para así favorecer la recuperación de fracturas torácicas, de mano, pierna, dedo y dedo del pie. Asimismo, también puede ser usado en procedimientos de reconstrucción del ligamento; fijaciones de tejidos blandos y duros; alineación de fragmentos óseos y osteocondrales; reparación de meniscos; y la fijación del cartílago hialino. Dentro de las características llamativas del PLA, están sus propiedades mecánicas similares al tejido óseo trabecular y su proceso de degradación, el cual inicia con la hidrólisis de la cadena polimérica y termina con la obtención de CO_2 y H_2O , los cuales se incorporan al ciclo de Krebs.

Por otro lado, la hidroxiapatita (HA) es un compuesto isomorfo que se presenta normalmente en fosfato de calcio. Este material presenta una estructura hexagonal, con una red cristalina compuesta por un conjunto compacto de grupos fosfatos (PO_4). Existen diversas formas de obtención de hidroxiapatita; sin embargo, los métodos de síntesis química muestran un mayor rendimiento. Dicho proceso comprende la síntesis a partir de diferentes compuestos de partida, tales como óxido de calcio (CaO), hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), ácido fosfórico (H_3PO_4), trifosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), entre otros. Este compuesto posee una relación molar Ca/P que varía de 1,50 a 1,67, su fórmula molecular es $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ y habitualmente es empleado en procesos de regeneración ósea debido a su excelente bioactividad, biocompatibilidad y contribución en la diferenciación celular.

El método de fabricación del dispositivo que comprende una etapa de diseño que parte de imágenes diagnósticas tales como radiografías 3D y tomografías axiales, las cuales se visualizan en un programa de formato DICOM para imágenes diagnósticas. El programa de formato DICOM permite observar el tejido óseo comprometido y se delimita el área de interés, lo cual facilita la limpieza de la imagen y el modelado en el programa de diseño asistido por computadora (CAD, por sus siglas en inglés). En el CAD también se establecen las dimensiones del implante, se diseña el canal al interior del dispositivo y se modelan los bordes externos del mismo de acuerdo con la zona de la lesión. Allí se configura el diámetro del canal interior el cual corresponde a la mitad del grosor del tejido óseo comprometido.

Una vez finalizada la etapa de diseño, se procede con la etapa de impresión 3D, donde se importa el modelo al software de laminado para impresión 3D de formato Slic3r. En el software de laminado para impresión 3D se corroboran las dimensiones del dispositivo y se establecen los parámetros de impresión, tales

como la temperatura de la boquilla que varía entre aproximadamente 200 °C y aproximadamente 215 °C, la temperatura de la plataforma de impresión que varía entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 70 °C, la altura de la capa que varía entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 0,2 mm, el espesor de la pared o ancho del recorrido de impresión varía entre aproximadamente 0,2 mm y aproximadamente 0,4 mm y la velocidad de impresión que es de aproximadamente 70 mm/s. En cuanto a la arquitectura interna del dispositivo, esta se realiza por medio de un patrón de relleno giroide y una densidad de impresión de aproximadamente el 40% o una distancia entre líneas que varía entre 0,8 mm y 1,1 mm. La arquitectura interna le confiere al dispositivo una estructura tridimensional macroporosa interconectada y tamaños de poro que varían entre aproximadamente 200 micrómetros y aproximadamente 800 micrómetros, dichos macroporos permiten la difusión y transporte de nutrientes a través de la arquitectura interna del dispositivo. Posteriormente se imprime el dispositivo en una máquina de modelado por deposición fundida (FDM, por sus siglas en inglés) capa por capa en PLA, policaprolactona, PLG, PLGA o polialquiloacrilatos.

Después de la obtención del dispositivo mediante la impresión 3D, se realiza el recubrimiento del dispositivo con una membrana polimérica que comprende ácido poliláctico (PLA) e hidroxiapatita. Dicho recubrimiento se obtiene mediante electrohilado empleando entre aproximadamente 7% y aproximadamente 20% de PLA, entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% de HA y 2,2,2 trifluoroetanol como solvente. La solución se somete a aproximadamente 37 °C y una agitación que varía entre aproximadamente 400 rpm y aproximadamente 600 rpm durante al menos 5 horas. El recubrimiento se obtiene electrohilando entre aproximadamente 0,2 mL y aproximadamente 0,5 mL de solución polimérica directamente sobre el dispositivo 3D, el cual se rota manualmente utilizando un voltaje que varía entre aproximadamente 10 kV y aproximadamente 18 kV, una distancia entre aproximadamente 10 cm y aproximadamente 18 cm y una velocidad de inyección entre aproximadamente 0,6 mL/h y aproximadamente 3 mL/h. En una modalidad preferida el recubrimiento se obtiene electrohilando aproximadamente 0,3 de solución polimérica directamente sobre el dispositivo 3D, el cual se rota manualmente utilizando un voltaje de aproximadamente 15 kV, una distancia de aproximadamente 15 cm y una velocidad de inyección de aproximadamente 2 mL/h. La membrana polimérica tiene como función promover los procesos de diferenciación ósea y a su vez impedir la invasión de tejidos adyacentes al sitio de

la lesión con el fin de reducir el riesgo de retrasos en los procesos de reparación ósea en este tipo de lesiones.

Posteriormente, se lleva el dispositivo recubierto a un horno de secado por convección, el cual se encuentra a aproximadamente 37°C. En el horno de secado permanece durante aproximadamente 48 horas, que es el tiempo que garantiza la eliminación de solvente residual de la membrana polimérica. Por último, el dispositivo se somete a esterilización por radiación gamma con un rango varía entre aproximadamente 20 kGy y aproximadamente 25 kGy.

En otra modalidad de la invención se proporciona un dispositivo obtenido por el método anteriormente descrito que comprende ácido poliláctico (PLA), policaprolactona, PLG, PLGA o polialquilcianoacrilatos y que es recubierto mediante una membrana polimérica que comprende entre aproximadamente 7% y aproximadamente 20% de PLA y entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5% de HA.

El dispositivo de la invención se puede funcionalizar con factores de crecimiento tales como VEGF, FGF, PDGF, BMP2, BMP4, BMP7, entre otros. Además, el dispositivo puede usarse como andamio (scaffold) para generar un constructo tisular mediante el cultivo de células de origen mesodérmico.

El método de fabricación del dispositivo de acuerdo con la invención y el dispositivo propiamente dicho que permiten proporcionar un dispositivo médico personalizado diseñado a partir de imágenes diagnósticas, proporcionando un modelo acorde al defecto óseo a tratar y evitando el moldeado de materiales tales como metacrilatos o tejido óseo autólogo. Cuando el dispositivo de acuerdo con la invención es implantado en el defecto óseo, el canal del dispositivo permite asegurar el tránsito de componentes sanguíneos desde la médula ósea al tejido, esto promueve la vascularización, reclutamiento y migración celular. Dicho canal del dispositivo puede modificarse en el software de diseño de acuerdo con el área de interés, ya sea para lesiones de la diáfisis o de la epífisis. Adicionalmente, la arquitectura interna macroporosa imita el tejido óseo trabecular natural y facilita el transporte de nutrientes, migración celular y vascularización al interior del tejido óseo neoformado. En cuanto al recubrimiento, su composición química le otorga propiedades osteoinductoras y osteoconductoras que benefician la reparación y formación ósea.

EJEMPLO 1. *Diseño, desarrollo y evaluación in vitro del dispositivo denominado 3D Quyne.*

Diseño y desarrollo

El dispositivo 3D Quyne se desarrolló desde la impresión 3D, dado que esta técnica permite fabricar, modelar y construir estructuras en masa o personalizadas con tamaños y forma de poro controlados, mediante la fundición del material polimérico.

Para los ensayos *in vitro* se diseñó un andamio cilíndrico desarrollado en software especializado CAD teniendo un diámetro de 10 mm y 5 mm de alto (véase la Figura 1). Posteriormente, el archivo es exportado en el formato de Lenguaje triangular estándar (STL, por sus siglas en inglés) para proseguir con la configuración en el programa de corte, donde se establecen las variables (porcentaje de relleno, patrón de relleno, temperatura, velocidad de impresión, entre otros) que previamente fueron parametrizadas para la impresión 3D con filamento de PLA. Con el fin de encontrar el relleno que presente mejor resistencia mecánica a la compresión, se realizó un análisis comparativo de diferentes patrones (lineal, concéntrico, cúbico, giroide, octeto, rejilla y triangular). Para ello se fabricaron probetas de compresión con un relleno al 100% y con las dimensiones acordes a la norma ASTM D695 (Véase Figura 2). En dicho ensayo se logró determinar los valores de módulo de Young de las diferentes estructuras de las probetas de compresión (véase Figura 3).

De acuerdo con lo observado en la Figura 3, las probetas con relleno giroide muestran un mayor módulo de Young en comparación con los patrones de relleno reportados en dispositivos impresos 3D. Al elegir el patrón giroide se prosigue con la evaluación *in vitro* de la estructura tridimensional. Para ello se realizaron pruebas de impresión variando la densidad de relleno del dispositivo. En ensayos de laboratorio, se encontró que una densidad de relleno del 40% es la óptima, puesto que se obtienen tamaños de poro entre 200 μm y 800 μm e interconexión de los mismos al interior de la estructura, lo cual permite el tránsito de células, factores de crecimiento y demás componentes celulares implicados en la vascularización y procesos de osteogénesis. A continuación, se describen los parámetros establecidos para la fabricación de dispositivos impresos en PLA orientados a la reparación de defectos óseos críticos.

Tabla 1. Parámetros de impresión

Relleno: 40%	Temperatura de plataforma: 70°C
Patrón de relleno: Giroide	Posición del hueso: vertical
Material: Ácido poliláctico (PLA)	Ventilación: 10%
Velocidad de impresión: 50%	Soporte: 0
Temperatura de boquilla: 205°C	Escala: 1:1

En la Figura 4 se presenta una comparación entre 40% y 60% de densidad de relleno desde el software Cura.

Al definir los parámetros estructurales que componen el dispositivo, se advirtió la ausencia de un canal que permita el tránsito de componentes de médula ósea, razón por la cual se incorporó un canal en el centro del dispositivo con un diámetro correspondiente a la mitad de la estructura. Por lo tanto, se imprimieron estructuras de 10 mm de alto, 10 mm de diámetro y un canal de 5 mm de diámetro en el centro del dispositivo, tal y como se muestra en la Figura 5.

Ensayos *in vitro* del dispositivo impreso en 3D

Luego de la impresión, se llevaron las estructuras impresas a una evaluación *in vitro* bajo condiciones controladas con el fin de determinar las propiedades y comportamiento tanto del material (PLA) como de las células estromales mesenquimales de gelatina de Wharton (CEM-GW) sembradas en estas matrices. Dada la naturaleza hidrofóbica del polímero, se estimó el volumen de medio de cultivo que puede mantenerse contenida al interior de un andamio de 2 cm de alto, 1 cm de diámetro y canal medular de 5 mm de diámetro. Se depositó medio de cultivo incrementado su cantidad paulatinamente a través del canal. Al alcanzar un volumen de 500 µL se presentó un desborde de más de la mitad del medio hacia el fondo de la placa, reduciendo la humectación del andamio y por ende afectando directamente la viabilidad celular en la estructura. En vista de lo anterior, se estableció que 500 µL es el volumen máximo que se puede adicionar a una estructura con estas características. El ensayo descrito anteriormente se puede observar en la Figura 6.

Teniendo en cuenta lo anterior, se prosiguió con un ensayo piloto en el que se realizó la evaluación de adhesión y viabilidad celular de las CEM-GW. Dichas

células fueron seleccionadas debido a sus características de inmunomodulación y capacidad de diferenciación a diferentes tejidos, entre ellos al tejido óseo.

Retomando el ensayo, el cálculo de densidad celular se realizó a partir de resultados previos de los inventores. Allí se emplean $2,5 \times 10^4$ células en un andamio con un volumen de 23.562 mm^3 (10 mm de diámetro y 0,075 mm de alto). Dado lo anterior se procede a calcular el volumen de los andamios a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen de cilindro} = \pi r^2 h$$

De acuerdo con las dimensiones de los andamios de este ensayo (1 cm de alto, 1 cm de diámetro y un canal de 5 mm de diámetro), se obtuvo un volumen de 3141.59 mm^3 . A este valor se debe restar el volumen del canal interior, el cual tiene un valor de 785.39 mm^3 . Por lo tanto, el volumen de trabajo es igual a 2356.2 mm^3 . Este valor es empleado para calcular la cantidad de células que debe llevar este andamio por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Células en andamio 3D (1 cm alto)} = 2356.2 \text{ mm}^3 \times (2,5 \times 10^4 \text{ células} / 23.562 \text{ mm}^3)$$

$$\text{Células en andamio 3D (1 cm alto)} = 2.500.000 \text{ CEM-GW}$$

Para este ensayo piloto se emplearon andamios previamente esterilizados por radiación Gamma. Ya que los andamios empleados son de menor altura, para el cultivo celular, se preparó una suspensión celular de $200 \mu\text{L}$ con 2×10^6 CEM-GW y se depositó en el canal interno del andamio. Al cabo de 6 horas post cultivo, se adicionan lentamente 1 mL de medio de cultivo suplementado, cuidando evitar el desprendimiento de las células contenidas en la matriz polimérica. Al cabo de 24 horas en incubadora y con medio de cultivo suplementado, se realizó la evaluación de viabilidad celular a través del kit vivo/muerto ("live/dead"). Este kit tiene dos reactivos (calceína y homodímero de etidio) que muestran las células vivas de color verde (calceína) y las células muertas de color rojo (homodímero de etidio) al observarlas con un microscopio de fluorescencia. En la Figura 7 se presentan las imágenes colectadas por el microscopio de fluorescencia correspondientes a la tinción vivo/muerto ("live/dead") en el ensayo descrito anteriormente.

Una de las apreciaciones de este ensayo está orientada a la dificultad del enfoque de las células sobre el andamio. Debido a la arquitectura interior no es posible mostrar un plano completamente nítido de ambas cosas. En cuanto al ensayo de viabilidad ("live/dead"), se encontró poca adhesión celular sobre la matriz polimérica tridimensional, siendo atribuido a un desborde de la suspensión celular hacia la

placa de cultivo durante la incubación previa a la adición de medio de cultivo. A pesar de esto, se lograron adherir algunas células, las cuales mostraron estar mayoritariamente vivas (95% aproximadamente). Adicionalmente, con este ensayo se logró estipular los pasos críticos para el proceso de siembra celular en estas estructuras, lo que permite optimizar y mejorar el proceso de evaluación de viabilidad en estos materiales.

Electrohilado

Con el fin de mejorar la adhesión celular sobre la matriz polimérica y evitar la invasión del tejido muscular adyacente al hueso cuando se implanta en modelo animal y posteriormente en humano, se incorporó un recubrimiento compuesto de PLA/HA. Dicho recubrimiento se genera electrohilando 300 μ L de solución polimérica directamente sobre los andamios 3D ubicados en el colector estático, lo cual genera que las fibras envuelvan los andamios impresos. La concentración de la solución de PLA/HA tiene una concentración del 10% p/v de PLA y de 1% p/v de HA. Los parámetros empleados para el recubrimiento por electrohilado son un voltaje de 15 Kv, una distancia entre la punta de la aguja y el colector de 15 cm con una velocidad de flujo de 1 ml/h. Esta membrana externa está orientada a imitar la composición y funciones del periostio, así como contener el medio y las células al interior del andamio, lo cual garantiza la interacción célula-andamio y permite reducir la probabilidad de un desborde de la suspensión celular. El dispositivo obtenido de esta combinación entre impresión 3D y electrohilado se denominó “3D Quyne”.

Ensayo *in vitro* del dispositivo “3D Quyne”

Luego de realizar el recubrimiento a los andamios 3D se procedió a la evaluación *in vitro* en donde se realizó el mismo procedimiento de siembra descrito anteriormente. En resumen, se depositó una suspensión celular de 200 μ L con 2×10^6 CEM-GW sobre el canal interno del andamio. Al cabo de 24 horas en incubadora y con medio de cultivo suplementado, se realizó la evaluación de viabilidad celular a través del kit vivo/muerto (“live/dead”). Las imágenes obtenidas de este ensayo se muestran en la Figura 8.

De acuerdo con las imágenes de la Figura 8, se evidencia una tasa de viabilidad superior al 75% y mayor cantidad de células adheridas al interior de 3D Quyne en comparación con el andamio sin recubrir (véase Figura 7). De acuerdo con esto, se puede indicar que el recubrimiento con la membrana electrohilada, retuvo la

suspensión celular al interior del dispositivo, posibilitando la adhesión de las células al polímero.

Cuantificación de factores de crecimiento

Otro ensayo realizado a nivel *in vitro* consistió en la cuantificación de factores de crecimiento secretados por las CEM-GW sembradas en dichas matrices poliméricas a través de Luminex. Para ello se evaluó una membrana de PLA electrohilada y un andamio de PLA 3D. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores de crecimiento cuantificados sobre los andamios poliméricos.

Andamio	Agrecan (pg/mL)	FGFb (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)
PLA electrohilado	2919,326	277,267	1467,871	18428,469
PLA 3D	3472,321	7012,277	6643,605	31784,728

Con los valores obtenidos luego del ensayo Luminex, se encontraron mayores concentraciones de los factores en el andamio tridimensional en comparación con la membrana electrohilada. Estos factores están implicados en los procesos de reparación ósea, por lo tanto, la estructura tridimensional contribuye de manera positiva a la secreción de dichos compuestos por parte de las células contenidas en su interior, lo cual puede acelerar los procesos de reparación ósea.

Los resultados obtenidos aportaron las bases para realizar un escalamiento a nivel *in vivo*, sin embargo, esto conlleva evaluar nuevas variables, entre ellas el traslado del dispositivo con células desde el laboratorio hasta el bioterio. Es por lo que se realizó un estudio en donde se estimó la supervivencia celular en los andamios luego de someterlos a temperatura ambiente y atmósfera de CO₂ variable durante 4 horas. Para ello se dispuso la placa de cultivo dentro de una GENbag la cual se selló con un generador de CO₂ en su interior. En la Figura 9 se muestra la disposición de la placa de cultivo en la GENbag con el generador de CO₂.

El tiempo al que fueron sometidos los andamios es mayor al tiempo de viaje estimado, sin embargo, también se tuvo en cuenta el tiempo antes de ser implantados en los biomodelos, razón por la que se contempló un periodo de tiempo prolongado con estas condiciones. Al culminar el tiempo de evaluación, los

andamios presentaron cambios en cuanto a la coloración del medio de cultivo, tal y como se puede observar en la Figura 10.

El medio de cultivo DMEM cuenta con un compuesto que permite dilucidar los cambios de pH que pueden darse durante el cultivo celular. En el caso de un aumento de alcalinidad, el medio de cultivo tiende a tornarse de color rosa intenso, mientras que un aumento de acidez hace que el medio se torne amarillo. De acuerdo con lo observado, la acidez del medio se incrementa luego de estar bajo las condiciones evaluadas, atribuido a un aumento de ácido carbónico en el medio.

Para observar los cambios en la viabilidad celular bajo estas condiciones (CO_2 y temperatura), se realizó la tinción con el kit vivo/muerto (“live/dead”) con el que se pueden notar las células vivas (color verde) y las células muertas (color rojo) en los andamios. Las imágenes obtenidas luego de la tinción se muestran en la Figura 11.

La baja nitidez de estas imágenes es generada por la membrana que cubre la estructura tridimensional, la cual restringe el paso de luz. Por otra parte, a pesar del cambio de pH en el medio de cultivo, se observó una zona verde borrosa al interior del andamio que corresponde a las células vivas, con la que se determinó un porcentaje de viabilidad celular superior al 70%. Durante el ensayo se evidenció que el medio de cultivo permanece al interior del andamio, por lo tanto, se aseguró la presencia de las células al interior del constructo y se incrementó la probabilidad de adhesión celular. En cuanto a las células del control en placa de cultivo adherente, se observa un porcentaje de viabilidad superior al 95%. De acuerdo con estos resultados, se demostró la viabilidad de emplear los andamios de PLA 3D recubiertos para la siembra de CEM-GW a temperatura ambiente y con atmósfera de CO_2 inestable durante 4 horas.

EJEMPLO 2. *Estudios y evaluación preclínica del dispositivo denominado 3D Quyne.*

La evaluación a nivel *in vivo* de 3D Quyne se realizó en biomodelos lagomorfos con una edad entre los 3 y 4 meses y un peso entre 2 Kg a 3 Kg aproximadamente. Los biomodelos de estas características tienen un fémur de 1 cm de diámetro y una longitud media de 8 cm, en donde 6 cm corresponden a la diáfisis. De acuerdo con lo reportado en la literatura, una lesión ósea crítica corresponde al doble del diámetro del tejido óseo comprometido. Este tipo de lesiones no tienen reparación natural, por lo que suele implantarse injertos que rellenen este espacio. En ese

sentido, 3D Quyne se diseñó y modeló para un defecto óseo crítico en conejo correspondiente a 2 cm de largo y 1 cm de diámetro (véase Figura 12).

Luego, el archivo se exporta en formato STL y se importa en un programa Slic3r para configurar la impresión. En el software se verifican las dimensiones del dispositivo y se hace la simulación de impresión, tal y como se muestra en la Figura 13. Luego de esto, se lleva a cabo el proceso de impresión empleando los parámetros establecidos previamente.

Posteriormente, el dispositivo es llevado al laboratorio en donde se realiza el recubrimiento con el electrohilado, tal y como se ha descrito en los ensayos *in vitro*. El dispositivo obtenido se deja en un horno de calentamiento por convección a 37°C para eliminar trazas de solvente y luego se realiza la esterilización por radiación Gamma.

Por otra parte, se diseñó y fabricó un contenedor que permitiera disponer el dispositivo 3D Quyne de 2 cm de alto. El proceso de fabricación del contenedor se muestra en la Figura 14.

El contenedor tiene tres espacios cada uno de 3 cm de alto, 2 cm de ancho y 1,5 cm de profundo. Se imprimió con doble pared para evitar el traspaso de medio de cultivo entre pozos y hacia el exterior. Los soportes se fabricaron en PLA, dada la facilidad de impresión y esterilización del material en autoclave. Para evaluar la viabilidad de uso del contenedor se realizó una prueba con dos andamios de 2 cm de alto y se observó el comportamiento del material bajo condiciones de cultivo tradicional dando resultados favorables.

Previo a la siembra celular sobre 3D Quyne, se llevó a cabo la esterilización de los soportes a través de una autoclave a 120°C. Por otra parte, los andamios se irradiaron con rayos gamma. Luego de ambos procesos se depositaron los dispositivos en los contenedores y se ubicaron en cajas de Petri tal y como se muestra en la Figura 15. Cabe resaltar que este proceso se realizó dentro de cabina para evitar una posible contaminación.

La funcionalización celular del dispositivo se realizó con un total de 8×10^6 CEM-GW, las cuales fueron sembradas en dos pasos, cada uno con una suspensión celular de 250 μ L que contenía 4×10^6 CEM-GW y con 12 horas de diferencia. Esta variación en la metodología de cultivo celular se realizó con el fin de garantizar una densidad celular uniforme a través del dispositivo. Al cabo de 12 horas de la última

siembra, se adiciono medio de cultivo suficiente para cubrir los andamios completamente, tal y como se muestra en la Figura 16.

Al igual que los ensayos anteriores, se realizó la prueba de viabilidad celular con el kit vivo/muerto (“live/dead”), luego de someter los andamios a 4 horas en temperatura ambiente y bajo atmósfera de CO₂ variable. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 17.

Las imágenes obtenidas en este ensayo muestran una viabilidad celular superior al 85% tanto en el dispositivo como en la placa control luego de estar sometidos a estas condiciones. También se encontraron algunas células muertas en las zonas externas del andamio, mientras que las células vivas se ubican al interior del dispositivo. Del mismo modo que los ensayos previos, la visualización de las células al interior del andamio se ve restringida por la arquitectura y el recubrimiento.

La siembra de CEM-GW se realizó tres días previos a la cirugía. Para evaluar la viabilidad de las células en el dispositivo se realizaron dos controles, el primero se transportó al bioterio y posteriormente regresó al instituto luego de la cirugía y el segundo control permaneció en la incubadora del laboratorio del IDCBS.

En total se realizaron 6 osteotomías, en el orden descrito a continuación:

1. Biomodelo con membrana electrohilada de PLA/COL/HA.
2. Biomodelo con membrana electrohilada de PLA/COL/HA.
3. Control positivo: Biomodelo con autoinjerto.
4. Biomodelo con dispositivo 3D Quyne funcionalizado.
5. Biomodelo con dispositivo 3D Quyne funcionalizado.
6. Control negativo: Biomodelo sin nada.

A las 24 horas postcirugía se realiza la toma de dos radiografías a cada biomodelo, una del anteroposterior y otra de la zona anterolateral. Estas imágenes permitieron observar la integridad de las placas y los tornillos usados como fijadores (véase Figuras 18, 19, 20 y 21).

De acuerdo con las radiografías, existen diferencias entre cada tratamiento, siendo el dispositivo “3D Quyne” funcionalizado aquel que muestra mejores resultados en cuanto a la estabilidad del tejido óseo comprometido, puesto que el dispositivo ayuda a soportar la fuerza ejercida por la extremidad cuando era apoyada, contribuyendo a mantener la integridad de la placa de fijación. En el caso de los otros tratamientos, la placa de fijación debe sostener por sí sola el tejido y soportar

la fuerza que pueda ejercer la extremidad, lo cual aumenta el riesgo de fallo de la misma y genera complicaciones en los biomodelos.

Al cabo de 15 días se sacrificaron los biomodelos debido al fallo de la placa de fijación en 5 de los 6 biomodelos. Debido a esto se realizó un nuevo ensayo preclínico, pero esta vez con cuatro biomodelos y una placa de fijación de acero inoxidable. En estos biomodelos se implantó el dispositivo 3D Quyne con y sin CEM-GW. Este estudio sirvió para evaluar la biocompatibilidad y la contribución del dispositivo en la reparación de defectos óseos críticos.

Tanto la preparación previa a la cirugía como el proceso quirúrgico se realizó igual que el descrito anteriormente. Las radiografías obtenidas en dicho estudio se muestran en la Figura 22 y 23.

El seguimiento radiográfico realizado en los biomodelos muestra un comportamiento similar en ambos tratamientos. Se encuentra formación ósea en todos los dispositivos, por lo tanto, el dispositivo 3D Quyne con y sin CEM-GW promueve la reparación de lesiones óseas críticas. Adicionalmente, se observa un recubrimiento del dispositivo compuesto por tejido óseo, lo cual facilita la comunicación de los extremos comprometidos y ayuda al proceso de osificación.

Uno de los factores que influye notablemente en la reparación ósea está asociado a la vascularización del tejido. La arquitectura del dispositivo 3D Quyne, promueve los procesos de neovascularización a través del mismo. Además, el canal interno tiene la conformación exacta para comunicar los extremos óseos y permitir el tránsito de médula ósea y demás componentes celulares implicados en la reparación a través del dispositivo (véase Figura 24). Esto genera una aceleración en el proceso de reparación, puesto que la formación de vasos sanguíneos es un paso fundamental en la reparación.

En el análisis histológico de las muestras óseas obtenidas del primer ensayo preclínico, se visualizan calcificaciones, vasos sanguíneos, osteoblastos y material polimérico. La Figura 25 muestra el dispositivo extraído del sitio de la lesión y una visualización en el microscopio de las láminas histológicas.

Asimismo, en la Figura 26 se pueden apreciar posibles formaciones de vasos sanguíneos que contienen glóbulos rojos y blancos dentro del dispositivo 3D Quyne. Igualmente, sobre la matriz polimérica se visualizan células posiblemente de tipo hematopoyético. El diseño de este dispositivo es un buen soporte para la

proliferación de células diferenciadas y el desarrollo de nuevo tejido óseo. Por esta razón, a partir de estos resultados se plantea ejecutar más ensayos.

Otra de las ventajas ofrecidas por el dispositivo 3D Quyne radica en la posibilidad de modificar su forma y dimensiones para adecuarse a diferentes lesiones óseas. Como ejemplo de ello, se muestra el diseño y modelado del dispositivo adaptado a una fractura conminuta de fémur (véase Figura 27). Allí el dispositivo puede implantarse sin generar traumatismos adicionales al tejido puesto que sus características le permiten tener una tasa de degradación acorde al recambio óseo. Adicionalmente, guiará, promoverá el proceso de reparación óseo y contribuirá al soporte mecánico de la extremidad.