

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**

**UNIVERSIDAD ICESI**

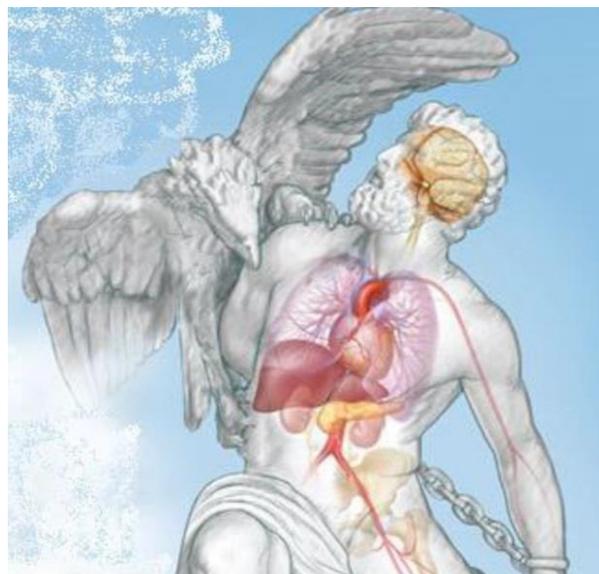
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE**

**FUNDACION VALLE DEL LILI**

**GOBERNACION DEL VALLE DEL CAUCA**

**INVESTIGACIÓN Y PRODUCCIÓN DE TEJIDOS, ORGANOS Y BIODISPOSITIVOS PARA USO EN  
MEDICINA REGENERATIVA,  
VALLE DEL CAUCA, OCCIDENTE**

Nombre MGA: INVESTIGACIÓN Y PRODUCCIÓN DE TEJIDOS, ORGANOS Y BIODISPOSITIVOS  
PARA USO EN MEDICINA REGENERATIVA, VALLE DEL CAUCA, OCCIDENTE



Propuesta presentada al Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del SGR

Octubre de 2014

## CONTENIDO

1. INTRODUCCION .....	3
2. ARTICULACIÓN CON PLANES Y PROGRAMAS DEPARTAMENTALES.....	5
3. DESCRIPCION DEL PROBLEMA, ALCANCE DEL PROYECTO Y PARTICIPANTES .....	7
3.1 DEFINICIÓN .....	7
3.2 JUSTIFICACION .....	7
3.3 CAUSAS DEL PROBLEMA .....	9
3.4 PRESENTACIÓN DE PARTICIPANTES.....	10
3.5 OBJETIVO GENERAL .....	13
3.6 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	13
4. RELACIÓN DE OBJETIVOS – PRODUCTOS - ACTIVIDADES .....	15
5. LINEAS DE INVESTIGACIÓN DEL PROYECTO.....	20
5.1. EL ENFOQUE DE INVESTIGACIÓN .....	20
5.2. INTRODUCCION A LA QUIMERIZACION.....	22
5.3 LINEA QUIMERIZACIÓN EN ORGANOS, TEJIDOS, CELULAS Y BIODIPOSITIVOS .....	27
5.3.1. PULMÓN: Inducción de quimerizacion en un biomodelo de trasplante pulmonar experimental, fase experimental preclínica.....	27
5.3.2 .PÁNCREAS: Quimerizacion de páncreas para la obtención de islotes pancreáticos para transplante en modelo animal. ....	77
5.3.3. BIODISPOSITIVO: Prototipo dispositivo de almacenamiento celular de islotes pancreáticos quimerizados .....	94
5.4. APLICACIÓN DE NANOMATERIALES PARA EL CÁNCER.....	99
5.5. LINEA CARDIOMIOCITOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN MODELO PRE-CLÍNICO CON ALOINJERTOS DE CÉLULAS MESENQUIMALES DIFERENCIADAS PARA PREVENIR LA INSUFICIENCIA CARDIACA CRÓNICA SECUNDARIA A UN INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN CERDOS.....	124
5.6. LINEA DESARROLLO DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS OSTEOINDUCTIVOS PARA APLICACIÓN ÓSEA .....	138
5.6. LINEA DESARROLLO DE CEMENTOS ACRÍLICOS MODIFICADOS CON CAPACIDAD DE ESTIMULAR REGENERACIÓN ÓSEA Y MEJORAR LA FIJACIÓN DE PRÓTESIS ORTOPÉDICAS .....	184
6. IMPACTO AMBIENTAL DEL PROYECTO .....	210
7. DECLARACIÓN DE PERTINENCIA SOCIAL.....	211
8. PRESUPUESTO.....	212
9. CRONOGRAMA .....	213

## 1. INTRODUCCION

Este proyecto aborda directamente lo que se conoce como **Medicina Regenerativa**, y en esencia combina ciencias de la salud, biotecnología, química, física, ingeniería biomédica, ingeniería de materiales, ingeniería química, ciencias naturales y nanotecnología avanzando en soluciones de salud a nivel pre-clínico con las que quiere tratar enfermedades que actualmente no poseen protocolos terapéuticos suficientemente efectivos y, donde los órganos y tejidos para trasplantes son escasos.

La forma en la que este proyecto propone fortalecer el área investigativa de la **Medicina Regenerativa** es aplicando los conocimientos adquiridos a lo largo de quince años de trabajos en investigaciones, realizadas por los distintos grupos de investigación vinculados, para avanzar en la propuesta de soluciones a problemas de salud asociadas a enfermedades crónicas no transmisibles. La vinculación de Clínicas especializadas en trasplantes y grupos de investigación en Medicina, Farmacología, Microbiología, Química, Física, Ingenierías Química, Electrónica y de Materiales con experiencia en desarrollos como: implantes de órganos quimerizados, desarrollo de biodispositivos, cultivos de células madre, tratamientos de tejidos, crecimientos celulares, y desarrollo de materiales, todos enfocados hacia aplicaciones biomédicas, son la base fundamental para realizar el proyecto.

La interacción entre los grupos de investigación ha permitido desarrollar tres líneas de trabajo: **Cultivos Celulares, Tejidos y Órganos**. En **Cultivos Celulares** interactúan los grupos de Ciencias Biomédicas, Ingenierías Química, Ingeniería de Materiales, Ciencias Básicas y el Grupo Clínico compuesto por especialistas en diferentes áreas de la salud; en **Tejidos** interactúan las áreas de Ingeniería, Odontología, Química y Ciencias Básicas; y en la línea de **Órganos** los grupos de Ciencias Biomédicas, Ciencias Básicas, Ingeniería Química, Ingeniería de Materiales, Grupo Clínico compuesto por especialistas en diferentes áreas de la salud y el Grupo Clínico de trasplantes.

En esta propuesta de proyecto, se pretende llevar las investigaciones realizadas a nivel de laboratorio en las tres líneas de trabajo por los diversos grupos de investigación involucrados, a nivel de pre-clínico. La siguiente fase, como continuación de este proyecto, contemplará las investigaciones a nivel clínico y a largo plazo se pretende, siguiendo el ciclo de vida clásico en el

desarrollo de la innovación de productos, aplicar los distintos resultados de estas investigaciones a la etapa de industrialización y comercialización.

Las aplicaciones biotecnológicas comprometidas con la solución de problemas de salud, se vislumbra como el mayor campo de crecimiento económico y de investigación en el futuro cercano. Se constituye así en un área de interés estratégico para el desarrollo social y económico de la región y del País.

Es importante anotar que la población mundial envejece todos los días de forma exponencial, en el año 2000 se calculaba en 200 millones la población mundial mayor de 60 años y se espera que ascienda a 2.000 millones para el año 2050, con este crecimiento se hace cada día más necesario regenerar, reparar y reemplazar órganos y tejidos para la supervivencia de estos millones de personas que día a día demandan no sólo servicios de salud sino calidad de vida. La **Medicina Regenerativa** es un camino fundamental para poder respuesta a esta realidad. Estos datos marcan las investigaciones que se proponen en este proyecto como imperativas para el mundo actual.

## 2. ARTICULACIÓN CON PLANES Y PROGRAMAS DEPARTAMENTALES

El actual *Plan de Desarrollo del Departamento del Valle del Cauca* para el periodo 2012-2015 denominado VALLECAUCANOS, HAGAMOSLO BIEN (Ordenanza 359 de 2012) indica que la visión del Valle del Cauca es: En el 2015, el Valle del Cauca será un departamento **líder, competitivo y sostenible** en el contexto regional y nacional.

El proyecto de "*Investigación y Producción de Tejidos, órganos y biodispositivos para uso de Medicina Regenerativa*" ha sido certificado por el Director del Departamento Administrativo de Planeación de la Gobernación del Valle del Cauca como un proyecto que contribuye al objetivo específico del eje económico del *Plan de Desarrollo del Valle del Cauca* denominado "DINAMIZAR LOS SECTORES PRODUCTIVOS EXISTENTES MEDIANTE LA INCORPORACION DE CIENCIA, TECNOLOGIA E INNOVACION, CONECTIVIDAD, ASOCIATIVIDAD Y FOMENTO AL EMPRENDIMIENTO CON EL PROPOSITO DE MEJORAR NIVELES DE PRODUCTIVIDAD Y COMPETITIVIDAD DEL DEPARTAMENTO".

Dentro de los ejes del *Plan de Desarrollo Departamental*, el proyecto se articula con el programa de "GESTION TRANSPARENTE E INTEGRACION DE SECTORES EN OFERTA Y ACCESO DE BIENES Y SERVICIOS". Dentro de este programa, están los subprogramas de "OFERTA Y ACCESO AL ASEGURAMIENTO Y PRESTACION DE SERVICIOS DE SALUD", y "OFERTA Y ACCESO DE BIENES Y SERVICIOS DE SALUD PUBLICA Y PROMOCION SOCIAL".

El *Plan Departamental de Salud* que hace parte del *Plan de Desarrollo del Departamento del Valle del Cauca* para el periodo 2012-2015, tiene como visión del *Plan Territorial de Salud* que para el año 2015 la población del Valle del Cauca haya mejorado de manera integral su situación de salud, a través del fortalecimiento de las capacidades sociales e institucionales y la movilización social e intersectorial de todos los agentes de cambio de la salud.

La Misión para llevar a cabo dicha visión del *Plan Territorial de Salud* es mediante la gestión departamental del lograr el aseguramiento, la prestación de servicios las emergencias y desastres, la salud pública, la salud territorial, y demás procesos intersectoriales determinantes de cambio de la salud de la población del Valle del Cauca; basada en intervenciones orientadas de

manera especial hacia la Atención Primaria en Salud-APS, con adherencia territorial y situacional a sus valores, principios y elementos esenciales.

Los propósitos del *Plan Territorial de Salud* son:

1. Mejorar el estado de salud de la población vallecaucana.
2. Evitar la progresión y los desenlaces adversos de la enfermedad.
3. Enfrentar los retos del envejecimiento poblacional, la transición demográfica y el cambio climático.
4. Disminuir las inequidades en salud de la población vallecaucana.

Dentro de las líneas de política del *Plan Territorial de Salud* se definen la promoción de la salud y la calidad de vida, la prevención de los riesgos, la recuperación y superación de los daños en la salud, la vigilancia en salud y gestión del conocimiento, y la gestión integral para el desarrollo operativo y funcional del *Plan Departamental de Salud Pública*. Estas líneas de política tienen unos ejes programáticos que están integrados por el aseguramiento, la prestación y desarrollo de Servicios de Salud, la salud pública, la promoción social, la prevención, vigilancia y control de riesgos profesionales, las emergencias y desastres y la gestión territorial.

Los proyectos que ejecutan dichos programas son "Universalización del Aseguramiento de la Población Vallecaucana al Sistema General de Seguridad Social en Salud", "Desarrollo de la Prestación de Servicios de Salud a la población Vallecaucana, en el contexto del Sistema Obligatorio de Garantía de Calidad", "Reorganización y Modernización de la red pública para la prestación de servicios de salud", "Intervenciones colectivas en salud pública para la niñez, adolescencia y Juventud, con enfoque diferencial", "Intervenciones colectivas en salud pública a adultos jóvenes y población mayor con enfoque diferencial", y por último el proyecto de "Vigilancia de Eventos en Salud Pública con enfoque diferencial".

### **3. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA, ALCANCE DEL PROYECTO Y PARTICIPANTES**

#### **3.1 DEFINICIÓN**

En la sociedad humana en general y en particular en la colombiana es notable el envejecimiento de la población con las naturales consecuencias asociadas al incremento de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) generándose entonces pérdida de calidad de vida para estas personas con altos costos sociales en cuanto a afectaciones en la familia, incapacitaciones laborales, soporte de limitaciones de todo tipo, además del incremento en el riesgo de muerte. Y si además se contempla el escenario de la situación de conflicto armado que vive el país y las carencias de órganos y tejidos para resolver problemas que requieren de trasplantes, los costos sociales y económicos que soporta la nación por estas situaciones, tienden a crecer de una forma no sustentable incluso en el mediano plazo. Hoy el Sistema de Salud soporta esfuerzos económicos muy altos para atender pacientes con ECNT sin soluciones visibles en un plazo aceptable. Esto conmina la investigación en soluciones a esta problemática con relaciones costo/beneficio viables y que resulten propias a la realidad colombiana.

Todo lo anterior señala como **problema central a abordar**: los altos costos sociales y económicos incurridos por el Sistema de Salud y la Sociedad en general para atender enfermedades crónicas no transmisibles, los altos niveles de morbilidad, y la mala calidad de vida entre la población en Colombia, debido al envejecimiento acelerado de la población y los efectos físicos traumáticos de la situación social del país, aunado a las carencias de trasplantes de tejidos y órganos.

#### **3.2 JUSTIFICACION**

En Colombia y en el mundo, la población con necesidad de reemplazo de órganos y tejidos es cada vez mayor, ya sea producto de enfermedades crónicas tales como las enfermedades cardiovasculares y cerebrales, Diabetes Mellitus y la Insuficiencia renal crónica, el cáncer y la violencia.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV), que incluyen los infartos, enfermedad cerebrovascular, coronaria e hipertensión, provocan más de 17 millones de muertes al año, cifra que para el 2030 se prevé que aumente a 23.4 millones.

Actualmente la Diabetes DM afecta aproximadamente el 8% de la población colombiana, y se espera que en el 2025 sea el 16%. Un tercio de ellos padecerán daño renal terminal, y más de la mitad de los pacientes con insuficiencia renal terminal son diabéticos. Una solución a muchos de sus problemas es el trasplante renal como estrategia para evitar el deterioro de los demás sistemas.

En Colombia por ejemplo, el manejo de IRC ha comprometido en los últimos años aproximadamente el 2% del gasto en salud del país y el 4% del gasto en Seguridad Social en Salud y al parecer el problema sigue avanzando.

Estas enfermedades constituyen la principal causa de muerte con una tasa de 121.1 por cada 100 mil habitantes. Según la Fundación Colombiana del Corazón en Colombia murieron por ECV en el 2001 cerca de 50.623 personas: 25.850 hombres y 24.773 mujeres. Una de las principales consecuencias de la ECV es la Falla cardíaca. Su incidencia se acerca a 10 por 10 mil personas mayores de 65 años. En Colombia, la mortalidad durante la hospitalización fue de 16% y durante el seguimiento a tres meses de 31%; a los seis meses fue de 37,6% y 45,2% al año.

La falla cardíaca avanzada y la descompensación aguda de la falla cardíaca se consideran como el síndrome cardiovascular más costoso en el campo de la medicina. En 2002, según la Asociación Americana del Corazón (AHA, por su sigla en Inglés), 970.000 pacientes fueron dados de alta con diagnóstico de falla cardíaca, con una mortalidad anual calculada en 18,7% y un costo económico de 27,9 billones de dólares, lo cual equivale a 10% de los recursos económicos destinados a ECV.

El 75% de este gasto se invierte en pacientes hospitalizados. Los costos directos e indirectos generados a partir de la falla cardíaca en EE.UU estimado para 2007 fueron de 33,2 billones de dólares. Por otro lado, representa 2% a 3% de los ingresos hospitalarios.

A pesar del desarrollo científico en los últimos años, muchas enfermedades, como la diabetes no tienen cura. En los últimos años las investigaciones se han centrado en buscar una solución que ayude a controlar la diabetes más grave, la del tipo 1, enfocándose en el trasplante del páncreas, que se puede realizar de dos maneras: como órgano entero o a través de la obtención de los islotes pancreáticos a partir del órgano, donde se encuentran las células beta que son las que sintetizan la insulina. La principal ventaja de los trasplantes de islotes pancreáticos para los enfermos diabéticos es mejoría de su calidad de vida. Pero el problema que se plantea es la dificultad de su

obtención, puesto que se requieren de dos a tres donantes de páncreas para realizar un trasplante de islotes pancreáticos exitoso. La investigación con células madre embrionarias para conseguir islotes pancreáticos representa, por tanto, un objetivo de gran interés en el tratamiento de la Diabetes Mellitus. Las células madre embrionarias no sólo poseen una alta capacidad de diferenciación, sino que su expansión mediante proliferación es también muy alta, de ahí que los científicos consideren que este tipo de material puede representar una fuente ilimitada de células y tejidos para el trasplante.

En cuanto al trauma, Colombia en la actualidad presenta una de las tasas más altas en el mundo, aun siendo un país oficialmente no en guerra y conlleva a pérdidas e incapacidades parciales o totales de funcionalidad de órganos. Algunos de los órganos afectados por esta condición son la laringe y tráquea, cuyo daño se ocasiona por ruptura, estenosis o por las complicaciones del trauma que llevan a los pacientes a intubaciones orotraqueales prolongadas y en algunas ocasiones por enfermedades que afectan la viabilidad y funcionalidad de este órgano no vital.

La creación de bancos de tejidos (piel, huesos) producidos artificialmente por técnicas de bioingeniería y con el apoyo de tecnología recombinante, con células humanas y el proceso de quimerización en matrices artificiales haría posible satisfacer de manera inmediata los requerimientos de pacientes con lesiones o pérdidas graves, abriendo la frontera de la Medicina Regenerativa.

### **3.3 CAUSAS DEL PROBLEMA**

#### **CAUSAS DIRECTAS:**

- a. Altos costos de inmunosupresión para los pacientes receptores de trasplantes.
- b. Altos costos generados por el tratamiento de pacientes con enfermedades cardíacas.
- c. Altos costos de tratamientos para pacientes que sufren distintos tipos de cáncer.
- d. Altos costos de tratamientos para pacientes en necesidad de trasplantes óseos o con necesidad de soluciones para regeneración de huesos que también hayan sido generados por trauma.
- e. Incremento en incidencia de pacientes que sufren lesiones óseas y fracturas por degeneración de los huesos.

**CAUSAS INDIRECTAS:**

- a. Envejecimiento de la población colombiana.
- b. Incremento de las enfermedades crónicas no transmisibles.
- c. Insuficiente disponibilidad de órganos y tejidos para trasplantes
- d. Incremento en traumas físicos generados por violencia.
- e. Poca investigación científica en Colombia relacionada con la solución a las ECNT.

**EFFECTOS DIRECTOS:**

- a. Pérdida de competitividad del país.
- b. Pérdida de calidad de vida de pacientes, familiares y sociedad en general.
- c. Insostenibilidad del Sistema de Salud.
- d. Imposibilidad de respuesta adecuada a incapacidades físicas de la población en general.

**EFFECTOS INDIRECTOS:**

- a. Pérdida de credibilidad del Sistema de Salud por incapacidad de atención adecuada a pacientes.
- b. Incremento del deterioro del tejido social.
- c. Afectación del desarrollo social y económico.

***3.4 PRESENTACIÓN DE PARTICIPANTES***

En este proyecto participan la Universidad del Valle, la Universidad Autónoma de Occidente, la Universidad ICESI y la Fundación Valle del Lili, en el desarrollo de las líneas de investigación a desarrollar, todos ellos en calidad de cooperantes. A continuación se presenta un breve resumen de cada una de las organizaciones que participan en el proyecto, luego en la presentación de cada línea se muestra con más detalle sus trayectorias investigativas que hace pertinente su participación en esta investigación.

### **UNIVERSIDAD DEL VALLE (UV) ([www.univalle.edu.co](http://www.univalle.edu.co))**

La Universidad del Valle coordinaría el proyecto. Es una institución pública, la tercera en el país, después de la Universidad Nacional y de la Universidad de Antioquia, y la primera del suroccidente colombiano. La Universidad del Valle mediante sus distintos grupos y laboratorios de investigación ha aportado a los conocimientos y desarrollos de la región del Valle del Cauca y del país. Los grupos asociados al proyecto de Investigación y Producción de Tejidos, Órganos y Biodispositivos para uso en *Medicina Regenerativa* cuentan con la experiencia y trayectoria de participar y desarrollar proyectos multidisciplinarios que le han permitido poder llegar a competir en el área de conocimientos y en los diferentes mercados.

### **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE (UAO) ([www.uao.edu.co](http://www.uao.edu.co))**

La Universidad Autónoma de Occidente es una institución de educación superior de carácter privado, cuya misión es la de integrar, con perspectiva internacional, las funciones sustantivas de docencia, investigación y proyección social para contribuir a la formación de personas con visión humanística, creativas y emprendedoras, a la generación de conocimiento y a la solución de problemas del entorno regional, nacional e internacional. La Dirección de Investigaciones y Desarrollo Tecnológico (DIDT) es la unidad ejecutiva del Sistema de Investigaciones de la Universidad Autónoma de Occidente (UAO).

La DIDT formula y propone a la Dirección de la Universidad las políticas en los campos de Ciencia, Tecnología e Innovación (CTI) y para ejecutarlas, traza estrategias de apoyo y fomento enmarcadas en los estándares de calidad determinados por el SNCTI y en análisis prospectivos a niveles nacional e internacional, sobre los diferentes sectores en los cuales la UAO ha focalizado sus desarrollos en investigación. En la actualidad, existen 29 grupos de investigación en las distintas áreas del conocimiento, dirigidos por los docentes investigadores que se agrupan en las facultades de la Universidad.

### **UNIVERSIDAD ICESI (ICESI) ([www.icesi.edu.co](http://www.icesi.edu.co))**

La Universidad ICESI fue creada en 1.979, hoy en día es reconocida en Colombia por su alto nivel académico y excelencia educativa y por formar profesionales éticos y comprometidos con la sociedad. Actualmente, la ICESI ofrece 19 programas de pregrado, 13 de maestría y 9 especializaciones médico-quirúrgicas, todos aprobados por el Ministerio de Educación

Nacional. Por otro lado, el grupo de profesores de ICESI se caracteriza por su avanzada formación académica, su habilidad para la docencia y por su experiencia profesional. El 69% de los profesores de tiempo completo tienen título de doctorado, el 31% tiene título de Maestría, y 6% de especialista y/o es profesional.

**FUNDACION VALLE DE LILI (FVL) (<http://www.valledellili.org>)**

El compromiso de la Fundación Valle del Lili es satisfacer las necesidades de salud de alta complejidad de nuestros Usuarios, mediante la utilización de los más avanzados recursos médicos, en una Institución hospitalaria con orientación académica. El servicio se fundamenta en la competitividad, la labor en equipo, la excelencia, la humanización y dignificación de la persona; para lo cual nos orientamos hacia el mejoramiento continuo de nuestra organización, de su gente y de los recursos tecnológicos. Nuestra labor se enmarca dentro de los más altos estándares de la ética y redunda en beneficio de la comunidad, de nuestros Colaboradores y del crecimiento y desarrollo de la Institución.

La Fundación Valle del Lili trabaja para lograr ser la primera institución prestadora de servicios de salud de alta complejidad y tecnología del país, acompañada de los programas de servicio social, investigación y docencia, mediante un modelo de administración y atención al usuario con cultura de servicio, seguridad, innovación, eficiencia, rentabilidad y enfoque de responsabilidad social.

**Tabla 1: Entidades participantes, siglas y su participación en las líneas de investigación.**

<b>Entidad o Grupo</b>	<b>Siglas</b>
Universidad del Valle -Farmacología Univalle	FAR
Fundación Valle del Lili	FVL
Universidad del Valle -FIQ Bionanomateriales (Fisico-Química)	FIQ
Universidad Icesi	UIC
Universidad del Valle - Materiales Compuestos	MCO
Universidad del Valle - SimerQO	SQO
Universidad del Valle - Teblami	TBM
Universidad Autónoma	UAO
Universidad del Valle - Recubrimientos Duros	RED
Universidad del Valle - Biomateriales en odontología	BMO

Líneas de investigación	Participantes									
	FAR	FVL	FIQ	UIC	MCO	SQO	TBM	UAO	RED	BMO
Quimerización en órganos, tejidos, células y uso de dispositivos	■	■							■	
Aplicación de nanomateriales para el cáncer	■		■							
Cardiomiocitos para la implementación de un modelo pre-clínico con aloinjertos de células mesenquimales diferenciadas para prevenir la insuficiencia cardíaca crónica secundaria a un infarto agudo de miocardio en cerdos	■							■		
Desarrollo de andamios poliméricos osteoinductivos para aplicación ósea	■	■	■	■	■	■	■			
Desarrollo de cementos acrílicos modificados con capacidad de estimular regeneración ósea y mejorar la fijación de prótesis ortopédicas	■				■	■	■			■

### 3.5 OBJETIVO GENERAL

Aplicar la investigación para incrementar la oferta y suplir una deficiencia existente en implementación de medicina regenerativa para el remplazo, regeneración y reparación de tejidos y órganos necesaria para tratar pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica o que hayan sufrido pérdidas traumáticas.

INDICADOR ASOCIADO AL OBJETIVO GENERAL: Procedimientos experimentales de investigación en laboratorios in-vitro con cultivos celulares y experimentos in-vivo en modelos animales para poder formular modelos pre-clínicos viables: 412

### 3.6 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Implementar el proceso de quimerización de órganos y biodispositivos en modelo animal para evitar el rechazo post trasplante y disminuir la terapia de inmunosupresión.
2. Determinar a nivel preclínico el efecto de terapia fotodinámica TiO<sub>2</sub>-modificado y luz UV para tratamiento del cáncer en modelo animal murino.
3. Desarrollar un implante de células derivadas de células madre diferenciadas in vitro, que permita disminuir la pérdida de la función cardíaca secundaria a un infarto de miocardio.
4. Desarrollar andamios poliméricos osteoinductivos con el fin de promover la regeneración ósea en sitios de difícil cicatrización
5. Desarrollar cementos óseos acrílicos, funcionalizados con co-monómeros y refuerzos

bioactivos, que puedan promover la regeneración ósea e incrementar la fijación de prótesis ortopédicas.

#### **4. RELACIÓN DE OBJETIVOS – PRODUCTOS - ACTIVIDADES**

**Objetivo 1.** Implementar el proceso de quimerización de órganos y biodispositivos en modelo animal para evitar el rechazo post trasplante y disminuir la terapia de inmunosupresión.

Productos (experimentos) a desarrollar: 72

Actividades principales:

1. Quimerización de pulmón en modelo animal
2. Quimerización de islotes pancreáticos
3. Implantación y quimerización de biodispositivo de almacenamiento de islotes

**Objetivo 2.** Determinar a nivel preclínico el efecto de terapia fotodinámica TiO<sub>2</sub>-modificado y luz UV para tratamiento del cáncer en modelo animal murino.

Productos (experimentos) a desarrollar: 120

Actividades principales:

1. Estudio de los fenómenos que gobiernan el mecanismo de acción de los nanocompuestos en la célula cancerígena y la célula normal.
2. Precisión del efecto del nanocompuesto sobre los organelos de la célula.
3. Determinación de la distribución del nanocompuesto en el exterior y en el interior de la célula y su mecanismo de transporte.
4. Definición del mecanismo de muerte celular de las líneas células en la terapia fotodinámica con TiO<sub>2</sub>-modificado.
5. Determinación de la toxicidad del nanocompuesto en modelo animal.
6. Obtención del prototipo de fotobioreactor con control de temperatura y tiempo.
7. Determinación del efecto del tratamiento fotodinámico sobre tumores cancerígenos en modelo animal murino.

**Objetivo 3.** Desarrollar un implante de células derivadas de células madre diferenciadas in vitro, que permita disminuir la pérdida de la función cardiaca secundaria a un infarto de miocardio.

Productos (experimentos) a desarrollar: 20

Actividades principales:

1. Estandarización de la técnica quirúrgica para inducir el infarto de miocardio por ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda en cerdos.
2. Obtención, expansión y diferenciación in vitro de células madre mesenquimales de la médula ósea del cerdo.
3. Estandarización de la técnica quirúrgica para implantar el tratamiento celular en el corazón infartado.
4. Control periódico de los animales (pruebas bioquímicas y fisiológicas) para analizar el comportamiento del corazón en respuesta al implante.

**Objetivo 4.** Desarrollar andamios poliméricos osteoinductivos con el fin de promover la regeneración ósea en sitios de difícil cicatrización

Productos (experimentos) a desarrollar: 100

Actividades principales:

1. Fabricación de andamios poliméricos fibrosos y porosos, mediante técnicas de electrospinning y/o lixiviación.
2. Bioactivación de los andamios mediante su cultivo con osteoblastos.
3. Descripción de la capacidad osteoinductora de los andamios poliméricos mediante ensayos in vitro e in vivo.
4. Descripción la biointegración de un bloque polimérico bioactivado ( Prueba de uso)

**Objetivo 5.** Desarrollar cementos óseos acrílicos, funcionalizados con co-monómeros y refuerzos bioactivos, que puedan promover la regeneración ósea e incrementar la fijación de prótesis ortopédicas.

Productos (experimentos) a desarrollar: 100

Actividades principales:

1. Formulación de cementos óseos con baja exotermia variando su composición típica con la incorporación de monómeros funcionalizados y refuerzos bioactivos.
2. Estudio de la influencia de la modificación de los monómeros y la incorporación de las cargas bioactivas, en las propiedades de los cementos óseos, a partir de la caracterización térmica y mecánica en especímenes normalizados.

3. Evaluación del comportamiento bioactivo de los cementos óseos desarrollados, mediante estudios de crecimiento celular e histomorfométricos, llevados a cabo a partir de evaluaciones en condiciones in vitro e in vivo.
4. Determinación del nivel de unión del cemento óseo a partir de evaluaciones mecánicas de pull out en prótesis previamente fijadas en modelos animales.

En concreto, por cada objetivo específico se desarrollarán los siguientes experimentos que se comprometen en el proyecto como productos entregables y que en forma precisa darán lugar a procedimientos documentados, controlados, con trazabilidad y estandarizados, resultado de la aplicación de las metodologías propuestas para cada línea de investigación, además de su divulgación en revistas indexadas y eventos científicos nacionales e internacionales.

#### **Línea de investigación en quimerización:**

**Pulmón:** 20 experimentos in-vitro, 10 experimentos in-vivo subcutáneos quimerizados con y sin inmunosupresión y 12 experimentos in-vivo trasplante de órgano completo quimerizado y no quimerizado. A partir de lo cual se obtendrán como resultados:

- Un procedimiento documentado, controlado, con trazabilidad y estandarizado metodológicamente en animales en el cual estaríamos demostrando su seguridad en humanos.
- Un biomodelo porcino quimerizado con la capacidad de determinar los tiempos máximos y mínimos de quimerización y su respuesta a la terapia inmunosupresora que nos darán una luz de la eficacia del procedimiento y del futuro del injerto
- Dos metodologías de seguimiento en biopsia para evaluar la quimerización con pruebas de patología molecular y genética molecular.

**Islotes:** En la investigación asociada a la quimerización de islotes pancreáticos se obtendrán 15 modelos porcinos trasplantados con islotes de páncreas quimerizados implantados en la mucosa gástrica con sus paraclínicos para determinar funcionalidad y reacción inmunológica a los implantes.

**Biodispositivos:** En cuanto a biodispositivos se desarrollarán 15 prototipos terminados con su respectiva caracterización mecánica, tribológica y de corrosión y valoración de biocompatibilidad.

En esta línea los resultados serán publicados mediante 2 artículos en revistas indexadas, 1 ponencia en congreso internacional, 1 ponencia en congreso nacional, 1 ponencia en un seminario de investigación y 1 patente en trámite.

#### **Línea de investigación en nanomateriales:**

Se llevarán a cabo 120 experimentos en ratones para determinación de toxicidad y aplicación de tratamiento con nanocompuestos y radiación ultravioleta, a partir de los cuales se obtendrán los siguientes resultados:

- La identificación del mecanismo de acción del TiO<sub>2</sub>-modificado interactuando con luz ultravioleta.
- Un fotoreactor LED para terapia fotodinámica en versión prototipo.
- Divulgación de los resultados mediante 2 artículos en revistas indexadas, 1 ponencia en congreso internacional, 1 ponencia en congreso nacional, 1 ponencia en seminario de investigación y 1 patente en trámite.

#### **Línea de investigación en cardiomiocitos:**

A partir de 20 experimentos en cerdo se desarrollará un protocolo estandarizado de implante de células derivadas de células madre diferenciadas in-vitro, que permita disminuir la pérdida de función cardíaca secundaria a un infarto de miocardio, para ser probado en humano. Los resultados serán divulgados mediante 2 artículos publicados en revistas indexadas, 1 ponencia en congreso internacional, 1 ponencia en congreso nacional y 1 ponencia en seminario de investigación.

#### **Línea de investigación en andamios óseos:**

Se desarrollarán modelos experimentales a partir de cultivos celulares e implantación en huesos craneales de Ratas y mandíbulas de Conejo (Pruebas de Uso), soportados por 100 experimentos que permitirán verificar: Biocompatibilidad de los materiales y capacidad de los andamios bioactivados para estimular la neo formación ósea en sitios de difícil o imposible cicatrización espontánea por regeneración ósea. Los resultados serán divulgados mediante 2 artículos publicados en revistas indexadas, 1 ponencia en congreso internacional 1 ponencia en congreso nacional, 1 ponencia en

seminario de investigación y 1 patente en trámite.

**Línea de investigación en cementos:**

Se realizarán 100 experimentos representados como cultivos celulares e implantaciones en Biomodelos animales (Cerdos), se espera que estos estudios permitan corroborar la capacidad de la nueva formulación de mejorar las interfaces entre el tejido óseo, el material cementante y la endoprotesis, y así lograr un producto con mejores cualidades de Biocompatibilidad y biomecánicas. Los resultados serán divulgados mediante 2 artículos publicados en revistas indexadas, 1 ponencia en congreso internacional, 1 ponencia en congreso nacional, 1 ponencia en seminario de investigación y 1 patente en trámite.

## **5. LINEAS DE INVESTIGACIÓN DEL PROYECTO**

### **5.1. EL ENFOQUE DE INVESTIGACIÓN**

La medicina regenerativa comprende estrategias que contribuyen a mejorar los procesos por los que los órganos y los tejidos son capaces de renovarse y restituir su integridad después de sufrir algún daño o enfermedad (1,2)

Las investigaciones en medicina regenerativa involucran dos aspectos básicos:

- a. Las fuentes celulares, endógenas o exógenas, responsables de mediar el proceso de regeneración (ej.: células madre)
- b. Los vehículos —sustancias bioactivas, biomateriales —utilizados para reclutar, estimular o controlar las células de interés.(3)

Sabemos que la medicina regenerativa es un área novedosa, muy atractiva para la innovación y definitivamente es un área multidisciplinaria donde trabajamos médicos, ingenieros, biomédicos, biólogos y genetistas entre otros, lo que ha permitido que las investigaciones no se restrinjan en nuestros grupos de investigación asociados.

Nuestros proyectos están ligados entre si a través de la terapia celular, la cual se desarrollara en el Laboratorio In Vitro, localizado en la Universidad del Valle, así tenemos proyectos definidos dentro del contexto de medicina regenerativa como son quimerización, biodispositivos, cementos, andamios, cardiomicitos y cáncer que buscan solucionar daños producidos por enfermedades específicas y que impactan en la comunidad.

Nosotros trabajamos dos áreas claramente, una donde nos dedicamos a la investigación básica y otra a la investigación traslacional, nuestras líneas de trabajo buscan aplicar terapia celular en biomodelos animales, desarrollaremos una fase preclínica, con aprobación y seguimiento de los comités de ética animal de la Universidad del Valle y de la Universidad ICESI, para enfermedades que se pueden llevar a la practica clínica como Diabetes Mellitus tipo I (enfermedad autoinmune y que tiene un mecanismo patológico diferente a la Diabetes Mellitus tipo II), patologías pulmonares que producen la perdida de la funcionalidad pulmonar y que requieren un trasplante de pulmón como por ejemplo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis pulmonar, fracturas por degeneración o traumas donde es posible regenerar hueso o cartílago a través del uso de nuevos

materiales aplicando la terapia celular, enfermedad cardiovascular y cáncer patologías cada vez mas prevalentes en la población que envejece.

Nosotros hemos tomado resultados de investigaciones mundiales, analizamos los puntos donde se encuentra la investigación por ejemplo en trasplantes de órganos solidos, específicamente pulmón, no se cuenta con estrategias que permitan mejorar los resultados de rechazo o perdida del injerto y donde una iniciativa como quimerizar y acelerar el proceso de tolerancia del órgano, mejorarlo antes de ser trasplantado, hacerlo mas similar genéticamente al receptor puede ser la respuesta al desafío que nos enfrentamos. Nosotros trataremos de identificar los mecanismos de reparación del tejido a trasplantar, mecanismos desconocidos de quimerización e investigaremos el papel del proceso en el funcionamiento de las células madre.

Es de anotar que la investigación básica necesita una gran inversión de recursos económicos y de esfuerzo humano para responder las preguntas a los problemas que hemos planteado en este proyecto, nosotros contamos además con estudiantes de pregrado, de postgrado, especialidades medicas, fellows médicos, maestros y doctores en formación en diversas disciplinas que participarían dentro de estos proyectos como parte de su formación integral.

Nuestro proyecto tiene un aspecto traslacional a mediano y largo plazo donde podremos llevar estos desarrollos a una aplicabilidad clínica. Nuestra infraestructura nos permite contar con interlocutores clínicos en las diferentes áreas y que hacen parte de la Clínica Fundación Valle del Lili, la cual es un hospital universitario, reconocido a nivel latinoamericano como el 4 centro de importancia. Por ello es necesario mencionar que la terapia celular para enfermedades cardiovasculares tratadas en este proyecto tendrá la colaboración del grupo de cardiología, es un reto importante, porque a pesar de conocer que el corazón tiene un proceso endógeno de reparación mínimo, esta terapia celular experimental busca la reparación de una forma sencilla, fácil y precoz. Otro punto relevante es que evaluaremos un novedoso nanomaterial que facilitaría el tratamiento del cáncer en una línea celular epitelial con terapia fotodinámica, este cuenta con el soporte clínico para hacer la traslación y se considera una nueva frontera en el tratamiento del cáncer.

Todos los proyectos serán desarrollados en fase preclínica, donde cada uno de ellos busca responder preguntas científicas relevantes, queremos demostrar que estos desarrollos son seguros en humanos y tener prototipos que nos permitan hacer una medicina traslacional.

Este proyecto muestra que la colaboración entre grupos es absolutamente imprescindible porque este campo es multidisciplinar, el haber conseguido que universidades públicas, universidades

privadas y un centro hospitalario de alto nivel como la Fundación Valle del Lili se integren para la investigación es uno de los logros a mostrar en la construcción y diseño de esta iniciativa de investigación.

Sabemos que para alcanzar el verdadero potencial de estas tecnologías es necesario que se fortalezca el diálogo entre los grupos de investigación enfocados en terapia celular y aquellos con énfasis en los biomateriales, es muy importante la interacción con grupos internacionales para intercambio de información, trabajo y visitas de campo, lo cual está contemplado en esta iniciativa.

Esta mayor comunicación interinstitucional nos ha llevado a la propuesta de los estudios que presentamos en este proyecto, que son ejemplo de la sinergia de ambas tecnologías (terapia celular y biomateriales) a nivel preclínico en esta primera fase, pero con una visión de aplicabilidad clínica (medicina traslacional), que hace este proyecto sostenible en el tiempo y enfocados a un futuro en tener un Centro de Desarrollo Biomédico con participación de las universidades, instituciones privadas e inversión extranjera, que permita que estos productos sean accesibles a la comunidad; así como implementar la Unidad de Terapias Avanzadas integrada dentro de la Fundación Valle del Lili que sea para el servicio de la comunidad logrando una medicina traslacional de alto impacto.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Poss K.D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nature Reviews Genetics*, 11, 710-722, 2010.
2. Brockes J.P., Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science*, 310, 1919-1923, 2005.
3. Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation research*, 7, 15-31, 2004.

## **5.2. INTRODUCCION A LA QUIMERIZACION**

**La inducción de tolerancia a los órganos y tejidos trasplantados podría hacer este procedimiento más seguro y más uniformemente exitoso.**

Hasta ahora, ha habido tres maneras de superar el sistema inmunitario con respecto a los trasplantes: a) Emparejamiento. b) Supresión inmune inespecífico. c) Inducción de tolerancia al

trasplante.

La opción (a) es claramente la forma más sencilla de éxito, con muy pequeña supresión inmune necesaria y aceptación del órgano-injertos con resultados excelentes a largo plazo. Sin embargo, el emparejamiento sólo es aplicable a los órganos que pueden ser trasplantados sin dañar al donante, como los riñones o en la médula ósea. Algunos centros ahora también realizan trasplante parcial del hígado o pulmón especialmente en los niños.

El segundo método (b) para superar la barrera inmunológica para el trasplante, **usando supresores inmunes inespecíficos**, ha sido en gran parte responsable por el enorme éxito que se ha presentado en el campo de trasplantes en las últimas de las tres décadas. Tales drogas incluyen esteroides, antimetabolitos, inhibidores de la calcineurina y una variedad de anticuerpos monoclonales. Estas drogas, aunque inespecíficas, tienen selectividad para el compartimiento de células T del sistema inmunológico, y por esa razón son particularmente útiles para suprimir la respuesta inmunológica a los trasplantes. Tales drogas se titulan generalmente, de manera que el paciente no rechace el trasplante, pero sin que esté tan inmunosuprimido, que sea excesivamente susceptible a las infecciones. **Pero las infecciones y neoplasias malignas son complicaciones importantes de estos medicamentos (además de ser especialmente tóxicas).** Además, aún con el más específico de los medicamentos inmunosupresores, hay una inexorable pérdida de injertos, alrededor del 7% anual, debido al rechazo crónico. Por lo tanto, aunque estos fármacos han hecho una importante contribución al campo de los trasplantes, no representan probablemente la solución final.

Actualmente el último objetivo de la inmunología de los trasplantes continúa siendo el tercer enfoque (c), para inducir la tolerancia al trasplante, y definida como la **ausencia específica de una respuesta inmunológica a un antígeno**. Entendemos por específico, que el rechazo al trasplante esté ausente, pero que las respuestas inmunes al resto de los antígenos, incluyendo las bacterias y virus, permanezcan intactas.

Este enfoque es el menos deletéreo para el paciente, implicando la inducción de tolerancia por sustracción a través del establecimiento de la "Quimerización mixta".

Los principales puntos a tener en cuenta del anterior enfoque son: a. la tolerancia debe ser debida a una **alteración del hospedero, no a una adaptación antigénica de las células injertadas**, pues los injertos recién trasplantados en la vida adulta no tienen oportunidad de adaptarse, y los descendientes de las células inyectadas en fetos o animales recién nacidos pueden demostrarse que retienen su poder antigénico.

b. El estado de tolerancia es específico en el sentido que se discrimina entre un individuo y otro; un animal hecho tolerante a los injertos de un individuo no aceptará los injertos de un segundo individuo **no relacionado con el primero**; Pero no discriminará entre **un tejido y otro** del mismo donante.

**Hasta la fecha no ha sido posible evitar el retorno de los anticuerpos naturales que parecen ser la posible causa de la pérdida de los órganos trasplantados y son objeto de una intensa investigación.**

Ahora es claro que **tolerancia no es simplemente la ausencia de una respuesta**, sino que puede incluir una respuesta infra-regulatoria activa y puede ser inducida por una variedad de mecanismos. Uno de ellos es inducción del fenómeno de **Quimerización** (adquisición de información genética expresable a las células del órgano - tejido trasplantado), **mediante co-cultivo simultáneo con células madre del receptor**, que permita el reconocimiento como propio del órgano por parte del paciente trasplantado.

En el Laboratorio In Vitro de Cultivos Celulares, de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, en asocio con el equipo de Trasplantes de Órganos se tiene experiencia de Quimerización de órgano trasplantado, con retirada temprana de todas las medicinas supresoras inmune, y sin evidencia de rechazo agudo o crónico, enfermedad injerto contra huésped, ni la repetición de la malignidad original, en una paciente con trasplante de tráquea, después de cuatro años de seguimiento.

Este método constituye una forma alternativa de tolerancia que difiere de la inducción de tolerancia por sustracción a través del establecimiento de la "Quimerización mixta" del receptor.

EL método usado es cultivo del órgano en el Laboratorio de Cultivos Celulares In Vitro, en la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, en un sistema de perfusión pulsátil, cerrado, conectado con el sistema arterial, primero lavado por recirculación a 4° C durante un periodo de tiempo de 8 horas, al final de cual el sistema es drenado, medio fresco agregado, agregando además 200 ml de filtrado la médula ósea del paciente recipiente, aumento de la temperatura a 30° C y continuación de la perfusión durante 8 horas. (Ver detalles en cap. 5, Metodología).

**En resumen, nuestro proyecto busca la Quimerización de un órgano de 200 - 500 gr. a ser trasplantado, para que sea aceptado y acepte un individuo de 70 Kgr., en vez de quimerizar a ese individuo para tolerar un órgano de 200 – 500 gr.**

## BIBLIOGRAFIA

1. Sachs D. Mixed chimerism as an Approach to Transplantation Tolerance. *Clinical Immunology* 2000; 95:1,563-568
2. Starzl T. E. Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101, suppl. 2, 14607– 14
3. Macchiarini P, Jungebluth P, Tetsuhiko G, et al. Clinical Transplantation of a Tissue-Engineered Airway. *Lancet.* 2008; 372:2023-30
4. Nikolic B, Onoe T, Takeuchi Y. Requirements for Achievement of Allotolerance Versus Reversal of Autoimmunity via Nonmyeloablative Mixed Chimerism Induction in NOD Mice. *Transplantation*: 2010;89: 1: 23-32
5. Dyer P. Immunology and principles of transplantation. *Surgery.* 2008; 26:5,175-82
6. Stevens AM. Maternal microchimerism - Allogenic target of autoimmune disease or Normal Biology? *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2005; 5:325-338
7. Koopmans M, Kremer Hovinga ICL, Baelde HJ, et al. Chimerism occurs in thyroid, lung, skin and lymph nodes of women with sons. *Journal of Reproductive Immunology* 2008; 78:68-75
8. Muramatsu K, Kuriyama R, Taguchi T. Intra-graft Chimerism Following Composite Tissue Allograft. *Journal of Surgical Research* 2009; 157:129-135
9. Matthews J. B, Ramos E, and Bluestone J. A. Clinical Trials of Transplant Tolerance: Slow but Steady Progress. *American Journal of Transplantation* 2003; 3: 794–803
10. Mengel M, Jonigk D, Marwedel M, et al. Tubular Chimerism Occurs Regularly in Renal Allografts and Is Not Correlated to Outcome *Journal of the American Society of Nephrology* 2004 15 978-986
11. Nadazdin O, Abrahamian G, Boskovic S, et al. Stem Cell Mobilization and Collection for Induction of Mixed Chimerism and Renal Allograft Tolerance in Cynomolgus Monkeys. *Journal of Surgical Research* 2010; *Journal of Surgical Research* 2011; 168:294-300.
12. Rodríguez AM. Seguimiento y evaluación molecular de quimerismo en pacientes trasplantados con precursores hematopoyéticos alogénicos. Instituto de Biología. Medellín: Universidad de Antioquia, 2008:71
13. Watzinger F, Lion T, Steward C. The RSD code: proposal for a nomenclature of allelic configurations in STR-PCR-based chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2006; 20:1448-1452
14. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Berndel C, Leo R, Daxberger H. Sequential monitoring of chimerisms and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell

transplantation BHSCT using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001; 15:293-302

15. Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, Colomer D, Rovira M, Martínez C. Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse respectively, after allogeneic transplantation of CD34+ selected cell from peripheral blood. *Leukemia* 2003;17:613-620

16. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation?. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35:107-119

17. Muramatsu K, Kuriyama R, You-Xin S, Hashimoto T, Matsunaga T, Taguchi T. Chimerism studies as an approach for the induction of tolerance to extremity allografts. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 2008; 61:1009-1015

18. Kolopp-Sarda M-N., Malcus C., Kohler C. Immunologie de la transplantation: rejets et infections en transplantation d'organes solides. *Revue Francophone des laboratoires*. 2008; 403: 23-30

19. Biedermann BC, Sahner S, Gregor M, et al. Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease. *Lancet*. 2002 15;359(9323):2078-83

### **5.3 LINEA QUIMERIZACIÓN EN ORGANOS, TEJIDOS, CELULAS Y BIODIPOSITIVOS**

#### **5.3.1. PULMÓN: Inducción de quimerización en un biomodelo de trasplante pulmonar experimental, fase experimental preclínica.**

##### **GRUPOS DE INVESTIGACIÓN PARTICIPANTES:**

- Grupo de Investigación Clínica de la Fundación Valle del Lili, Línea de Investigación Biomédica en Tórax. COL0011302

**Responsable:**

**Liliana Fernández Trujillo, MD**

Especialista en Medicina interna, Subespecialista en Neumología, Neumología intervencionista  
Directora de la línea de investigación biomédica en Tórax

Jefe del servicio de neumología y neumología intervencionista de la Fundación Valle del Lili

- Grupo de investigación de Farmacología-Univalle, Universidad del Valle. Laboratorio in vitro. COL0004881

**Responsable:**

**Oscar Gutiérrez, MD, Msc**

Director del grupo de investigación y profesor de Farmacología- Universidad del Valle.

##### **INTRODUCCIÓN**

La migración de las células receptoras al injerto en el trasplante de órganos sólidos se ha demostrado en el corazón, el hígado, y el riñón (Lagaaij EL et al 2001, Kleeberger W et al 2002, Quaini F et al 2002). Se ha postulado que este quimerismo en células epiteliales y endoteliales derivado de receptores podrían participar en el proceso de reparación de injerto en el pulmón y aloinjertos hepáticos (Kleeberger W et al 2002 y 2003). En aloinjertos de pulmón el epitelio bronquial parece ser un objetivo de la respuesta aloimmune y un epitelio intacto es capaz de proteger los aloinjertos de rechazo crónico, es decir del síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS).

Por lo tanto la integridad del epitelio de las vías respiratorias es importante para la preservación del injerto (Ikonen TS et al 2000, Qu N et al 2005). Histológicamente el BOS se manifiesta como la lesión de células epiteliales, inflamación, fibrosis, y finalmente, como la obliteración de las vías respiratorias pequeñas (Stewart S et al 2007). Clínicamente es el factor más importante que limita la

supervivencia del injerto a largo plazo después trasplante de pulmón (Stewart S et al 2007).

El desarrollo del quimerismo también puede estar influido por la medicación antirrechazo (Monaco AP 2003, Toungouz M et al 2003). Después del trasplante, las células derivadas del donante han sido detectadas en otros tejidos del receptor, como la linfa, en los ganglios linfáticos, el timo, el bazo y el hígado (Starzl TE et al 1993 y Bonilla WV et al 2006).

## **ANTECEDENTES**

El grupo de investigación en ciencias clínicas de la Fundación Valle del Lili fue creado en el año 1997 con el objeto de consolidarnos como grupo de investigación en ciencias aplicadas en el área de la medicina clínica, buscamos lograr dar respuesta a la problemática en salud de nuestra comunidad y aportar al desarrollo de la región. Con un desempeño activo y regular de la investigación biomédica, la educación continuada y la divulgación en internet, podemos proyectarnos con la producción científica propia.

Hoy en día, la investigación clínica en Colombia es reconocida a nivel internacional con mejores calificativos, en cuanto a la seriedad, calidad, honestidad y cumplimiento del rigor metodológico exigido para tal fin. Nuestro grupo no ha sido la excepción. Como institución de salud, de alta calidad y tecnología, somos los únicos abanderados a nivel local en investigación biomédica aplicada, actualmente desde la fase de laboratorio, preclínica y clínica.

La investigación básica integrada a la investigación clínica, conocida como medicina traslacional es fortaleza en nuestro centro, nos permite ofrecer la mejor medicina desde el punto de vista técnico y científico. Nosotros como hospital universitario y en convenio con la **Universidad ICESI** nos hemos consolidado para trabajar juntas por el bienestar y la salud de las personas y por mantener una posición de liderazgo gracias a los avances constantes en lo académico, social, humanístico y en la investigación científica. Esta alianza permite a ambas instituciones establecer una sinergia en todas sus actividades, a través de la coordinación para el trabajo investigativo y la conservación de la excelencia en su desempeño. Nosotros contamos con acreditación en excelencia y según el Rankin de Hospitales y Clínicas más importantes del año 2013 de la Revista América Economía, la Fundación Valle del Lili ocupa el 1° puesto a nivel Nacional y 4° a nivel Latinoamericano, somos la fuente de producción de conocimiento especializado y buscamos la transferencia rápida de la investigación a la comunidad.

En aras de promover la investigación científica en todas las especialidades médicas de la institución, se busca fortalecer nuevas líneas o temáticas para lograr aumentar en número de productos y consolidar al grupo de investigación. Por ello se creó la línea de Investigación Biomédica en Tórax en el año 2013 la cual tiene como misión consolidar, potenciar y desarrollar las actividades de investigación biomédica como una de las prestaciones básicas y que tiene como finalidad última mejorar la salud de la población enfocándonos en el trasplante pulmonar.

Nuestra investigación y desarrollos integrados buscan proporcionar conocimiento, un espíritu crítico y favorecer a tomar decisiones basadas en la evidencia científica, esta integralidad hace un sistema de salud más eficiente, utiliza los recursos de forma racional y mejora la gestión de recursos. Se debe tener en cuenta que no existe una investigación de calidad sin una práctica clínica de calidad, competitiva, con colaboración interinstitucional, con coordinación y cooperación nacional e internacional.

La inversión a largo plazo en Medicina Regenerativa aplicada al trasplante de pulmón permitirá combinar ciencias de la salud y biotecnología, que solucionaran problemas importantes como la preservación del injerto, el rechazo hiperagudo, el rechazo agudo, el rechazo crónico y los efectos secundarios de la inmunosupresión permitiendo disfrutar de una mejor calidad de vida y reduciendo los costos del mantenimiento del trasplante pulmonar creando innovación costo- efectiva.

Presentamos un proyecto de investigación de alta calidad a desarrollar en 3 años en fase de laboratorio y preclínica que es de interés para la comunidad y que estimula la transferencia rápida de la investigación básica hacia la aplicación clínica, trabajando de manera multi y transdisciplinariamente (Core programs); así es como mostramos, como un antecedente importante para este proyecto, la primera experiencia experimental desde la fase de laboratorio a implementación en humanos en el **trasplante de laringe y tráquea** experimental realizados por la línea de investigación de Cabeza y Cuello de la Fundación Valle del Lili y el grupo de investigación de Farmacología de la Universidad del Valle, laboratorio in vitro.

#### **TRASPLANTE DE LARINGE Y TRAQUEA CON CELULAS MADRES. UN APORTE A LA INGENIERIA TISULAR.**

Reconstruir la laringe o la tráquea cuando se pierde totalmente o en su mayor parte no es fácil. En algunas ocasiones no es posible y se debe recurrir al uso de prótesis. También se han intentado

injertos autólogos. Ningún método ha probado ser completamente útil, ni se puede utilizar en todo tipo de pacientes. Lo más grave de la situación es que en algunos pacientes la pérdida de la tráquea es incompatible con la vida.

Trasplantar la laringe o la tráquea se ha propuesto como una alternativa. La ventaja del trasplante es que es un órgano similar, se puede revascularizar y sobre todo que permite la reconstrucción total del órgano, sea la laringe o la tráquea. Sin embargo un trasplante tiene la desventaja del fenómeno del rechazo y por lo tanto se debe usar inmunosupresión con las consecuencias de sus efectos adversos.

Por lo tanto se ha propuesto por varios investigadores trasplantar la tráquea con ingeniería tisular. Machiarini realizó trasplantes de segmentos de tráquea, haciendo una descelularización y con la implantación de células madre para regenerar el órgano (Di Rienzo G, Go T, Macchiarini P. 2002)

La ingeniería tisular ha dado grandes avances desde que se concibió como una forma de reproducir órganos a partir de células o de tejidos cultivados en laboratorio hasta la utilización de células primitivas como fuente de células especializadas.

Con la ingeniería tisular se ha ampliado la posibilidad de generar células o de crear tejidos y órganos, especialmente si se utilizan células muy primitivas como las células mesenquimales. Estas se pueden obtener de la médula ósea, son células madre que se pueden señalar para que se conviertan en células especializadas.

### **Trasplantes de laringe y tráquea**

Aparecen en la literatura médica como una opción en la década de los años sesenta. En 1998 se reporta el primer trasplante de laringe exitoso en humanos en Cleveland (Strome M, Jeanine S. 2001). Este trasplante incluyó un segmento traqueal. Segmentos de tráquea han sido trasplantados sin revascularización por otros grupos utilizando diferentes métodos de preservación.

En 2001 el Grupo de la Universidad de Antioquia (Colombia) realizó un trasplante de laringe y tráquea, consistiendo en el segundo conocido en el mundo. En 2002 el mismo grupo realizó el primer trasplante completo de tráquea con revascularización arterial y venosa. En 2010 este grupo reportó una serie de 15 trasplantes de laringe y tráquea, que seguían dependiendo de la

inmunosupresión y en algunos casos con rechazo.

### **Trasplantes de tráquea con ingeniería tisular**

En la reconstrucción de la tráquea se puede usar la ingeniería tisular a partir de la regeneración del órgano por diferentes métodos. Uno de los más promisorios es con células madres. Machiarini utilizó células hematopoyéticas primitivas obtenidas en sangre periférica para regenerar un segmento traqueal después de un proceso de decelularización (Hollander A, Macchiarini P, Gordijn B, Birchall M. 2009) Los requisitos para hacer un órgano con este método son un andamio, que se llama matrix o constructo y la repoblación con células propias convertidas desde células primitivas hasta condrocitos mediante señales de inducción.

Diferentes matrices se han utilizado en este tipo de ingeniería por diferentes autores según el órgano se vaya a construir. Se hacen sintéticas y naturales. De las naturales la tráquea es una de las opciones. De hecho, antes del uso de las células madre, la tráquea se ha utilizado tratándola con formaldehído para disminuir su carga antigénica y permitir una regeneración casi espontánea. Con el advenimiento de las células madre el tratamiento de la tráquea como matrix natural ha cambiado.

La tráquea se puede descelularizar por métodos enzimáticos y sobre su andamio cultivar células para que se conviertan en condrocitos y dar una matrix sobre las cuales cultivar epitelio. Esto es un paso enorme en la construcción de una tráquea por ingeniería tisular. El problema en este tipo de órganos es la falta de vascularización, los investigadores creen que con imbibición se puede regenerar la revascularización del órgano, sin embargo no se ha podido demostrar claramente.

### **Trasplante de tráquea con ingeniería tisular y revascularización**

El Programa de Trasplante de Laringe y Tráquea de la Universidad de Antioquia se continuó en fundación Valle del Lili. Conocedores del método de revascularización de la vía aérea y después de los reportes del grupo de Machiarini se inició un programa combinado de trasplante de laringe y tráquea con imbibición de células madres autólogas para regenerar el órgano y crear tolerancia.

Inicialmente se hicieron pruebas con células madres más primitivas, obtenidas de cresta iliaca de cerdos. Estas células son mesenquimales y tienen una gran capacidad de modular respuestas

inmunes y de diferenciarse en células especializadas según diferentes estímulos. El estímulo a utilizar aquí sería la isquemia en frío y caliente que genera una respuesta de rechazo y sufrimiento del órgano, y sin llegar al punto de apoptosis. Se elaboró un protocolo que fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación animal de la Universidad ICESI.

Se hicieron dos trasplantes completos de laringe y tráquea con donante y receptor, tiempos de isquemia respetados, revascularización, y no se dio inmunosupresión. Los cerdos receptores fueron observados durante una semana y no presentaron signos aparentes de rechazo. En esta fase nos interesaba saber si las células madres se conservarían vivas alrededor del epitelio.

Lo observado en esta fase es que las células madre mesenquimales se conservaron vivas en el espacio submucoso de laringe y tráquea. Es de esperarse que con la presencia de estas células en este espacio que son blanco de la respuesta inmunológica se pueda modular la respuesta inmune o regenerar como en los cultivos realizados en la ingeniería tisular de Machiarini.

## **SOBRE EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA VALLE DEL LILI: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

### **Presentaciones año 2014:**

- Congreso ATS San Diego, Estados Unidos, mayo 2014
- 1. Endobronchial interventions used in the management of malignant central airway obstruction: Initial experience at a reference center in South América (Reconocimiento)
- 2. Choriocarcinoma (CCM) metastatic to the lung in postmenopausal woman presenting as endobronchial lesions, severe hemoptysis and respiratory failure: Case report
- 3. Malignant primary pulmonary hemangiopericytoma/solitary fibrous tumor (HPC/SFT) with extensive endobronchial involvement: A case report
- 4. Chronic granulomatous infection secondary to Histoplasma capsulatum in a patient with silicosis and progressive massive fibrosis: Case report
- 5. Pregnancy and tuberculosis: results from tuberculosis cohorts in a university hospital reference in Latin America

6. Characterization of patients with severe acute asthma, managed in the intensive care unit in a university hospital reference in Latin America

- 9 congreso ALAT Medellín, Colombia Julio 2014 y publicado en la Revista Archivos de Bronconeumología, órgano oficial de la sociedad española de neumología y cirugía de tórax (SEPAR), la asociación latinoamericana de tórax (ALAT) y asociación iberoamericana de cirugía de tórax (AIACT)

1. Biomodelo pulmonar porcino en la investigación traslacional

2. Nuevas opciones terapéuticas en nanotecnología experimental

3. Estudio del ciclo celular del gen p16INK4 con morfoproteómica en cáncer de células escamosas de pulmón

4. Implementación en neumología de la citología en base líquida

5. Experiencia en el manejo de embolia pulmonar con trombolisis en un hospital universitario en Cali, Colombia

6. Traqueopatía osteocondroplástica en un paciente con diagnóstico reciente de infección por VIH

7. Caracterización de etiología de neumonía viral con prueba de detección genómica en Cali, Colombia

8. Caracterización de los pacientes con asma aguda severa manejados en la unidad de cuidado intensivo en un hospital universitario de referencia en Latinoamérica

9. Manejo médico vs manejo quirúrgico de pacientes con fracturas costales múltiples

10. Tumor primario de tráquea: reporte de un caso

11. Efectos de la rehabilitación pulmonar en pacientes con cirugía toracopulmonar

- 6th Latin American conference on lung cancer, August 2014, Lima, Peru, IASLC. Publicado en la revista Journal of thoracic oncology

1. There is correlation between infection with the human papillomavirus (HPV) and squamous cell carcinomas of primary lung?
2. Choriocarcinoma (CCM) metastatic to the lung in postmenopausal woman presenting as endobronchial lesions, severe hemoptysis and respiratory failure: Case report
3. Endobronchial interventions used in the management of malignant central airway obstruction: Initial experience at a reference center in South América
4. Malignant primary pulmonary hemangiopericytoma/solitary fibrous tumor (HPC/SFT) with extensive endobronchial involvement: A case report
5. Endobronchial resection of mucoepidermoid carcinoma of the trachea in pregnant woman: case report

• Revista colombiana de neumología y cirugía de tórax de Colombia, artículos:

1. Resección endoscópica de tumor carcinoide bronquial. Reporte de caso. Revista colombiana de neumología Vol. 25 N.4
2. Metástasis endobronquiales secundarias a malignidad Extra torácica. Tratamiento con broncoscopia intervencionista. Reporte de casos. Revista Colombiana de Neumología. Vol. 25N.4

#### **Presentaciones año 2013:**

• Congreso colombiano de neumología y cirugía de tórax

1. Metástasis Endobronquiales, Manejo con Broncoscopia Intervencionista. Reporte de Casos  
Resección Endoscópica de Tumor Carcinoide Bronquial. Reporte de Caso
2. Patología Intervencionista, Aplicabilidad en el Ultrasonido Endobronquial mas Aspiración con Aguja Fina (EBUS-TBNA), Reporte de Caso
3. Carcinoma Mucoepidermoide (CME) Traqueal en una Mujer Embarazada, Resección Endobronquial. Reporte de Caso

4. Calidad de Vida Relacionada con Salud (CVRS) en Pacientes con Fibrosis Pulmonar (FP) que Asisten a un Programa de Rehabilitación Pulmonar: Estándar de Educación en Rehabilitación Pulmonar.

5. Un caso de neumonía tras la suspensión de esteroides

- Congreso American Thoracic Society ATS Philadelphia Mayo 2013

1. Tuberculosis in a University Medical Center in Cali, Colombia in 2011: A Descriptive Study. Abstract 41341

2. Characterization of Patients with Multi-Drug Resistant Tuberculosis with Surgical Management in a Fourth Level Institution in Cali, Colombia. Abstract 42813

- Congreso European Respiratory Society Barcelona Septiembre 2013

1. Strongyloides hyperinfection diagnosed by bronchoalveolar lavage in a University Medical Center in South America. Cases report

- Congreso International Association for the Study of Lung Cancer, Australia October 2013

1. Choriocarcinoma (CCM) metastatic to the lung in postmenopausal woman presenting as endobronchial lesions, severe hemoptysis and respiratory failure: Case report

2. Malignant primary pulmonary hemangiopericytoma/solitary fibrous tumor (HPC/SFT) with extensive endobronchial involvement: A case report

3. Endobronchial interventions used in the management of malignant central airway obstruction: Initial experience at a reference center in South America

#### **Artículos publicados:**

1. Fernández L, González A, Sua L, Badiel M. Resección endoscópica de tumor carcinoide bronquial: Reporte de caso. Revista Colombiana de Neumología Vol. 25 No. 4, 2013.

2. Fernández L, Sua L, Velásquez M, Martínez W, Sanabria F, Badiel M. Metástasis endobronquiales secundarias a malignidad extra torácica. Tratamiento con broncoscopia intervencionista: Reporte de casos. Revista Colombiana de Neumología Vol. 25 No. 4, 2013.

3. Vélez JD, Fernández L, Cadavid D, Herrera S, Vallejo S. Fusariosis diseminada con hemoptisis masiva en un paciente con leucemia linfoblastica aguda. *Revista Infection*, 2012; Vol 16 No. 3S.
4. Majid A, Fernandez-Bussy S, Kent Michael, Folch E, Fernández L, Cheng George, Gangadharan S. External Fixation of Proximal Tracheal Airway Stent: A Modified Technique. *Ann Thorac Sur* 2012; 93:e167-9.
5. Majid A, Fernández L, Fernandez-Bussy S, Herth F, Ernst A, Tracheobronchomlacia. *Arch Bronconeumol* 2010; 46:196-202.
6. Díaz JC, Fernández L. Hiperpotasemia inducida por trimetropin-sulfametoxazol en un paciente con insuficiencia suprarrenal primaria. *Revista Infection*, 2010; Vol. 14 No. 3.
7. Fernández L. Generalidades sobre el diagnostico de la hipertensión arterial pulmonar. Guías para el diagnostico y tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. Documento de Consenso *Revista Colombiana de Neumología* 2010.
8. Fernández L. Tratamiento con prostanoides. Guías para el diagnostico y tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. Documento de Consenso *Revista Colombiana de Neumología* 2010.
9. Cañas C., Tobón G., Granados M., Fernández L., Diffuse alveolar hemorrhage in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Pathol* 2007; 27:320–323.
10. Estudio de contaminación por *Cándida Spp.* en las manos del personal de salud de las unidades de cuidados intensivos de dos hospitales de Medellín, 1995. Publicado en la *Revista de la Sociedad Colombiana de Cirugía* 1997.
11. Estudio de Trauma Precordial presentado en el Congreso de la Sociedad Colombiana de Cirugía en Cartagena 2003.
12. Estudio de Trauma de Precordial presentado en el Congreso de la Sociedad Colombiana de Cirugía en Bogotá 2004.
13. Trauma Cardíaco, capítulo del libro: Trauma: Abordaje inicial en los servicios de urgencias.

Editor: Laureano Quintero; publicado por la Fundación Salamandra, Cali 2004.

14. Trauma Vascular Periférico, capítulo del libro: Trauma: Abordaje inicial en los servicios de urgencias. Editor: Laureano Quintero; publicado por la Fundación Salamandra, Cali 2004.

15. Líquidos en Trauma, capítulo del libro: Trauma: Abordaje inicial en los servicios de urgencias. Editor: Laureano Quintero; publicado por la Fundación Salamandra, Cali 2004.

16. Estudio de Trauma de Tráquea presentado en el congreso de la Sociedad Colombiana de Cirugía en Cartagena 2005.

17. Vásquez S., Velásquez M., Miranda L., Ramírez J., Corona F., Alcántara F., Flórez G., Méndez M.: Fístula traumática toracobiliar. *Cirujano General* 2006; 28:5456.

18. Velásquez M. Revisión de tema: Atrofia, metaplasia y cáncer gástrico: ¿dónde está la evidencia? Publicado en la *Revista Colombiana de Cirugía* 2007; 22(1):39.

19. Velásquez M. Artículo original: Ganglios normales del mediastino: Un estudio anatómico. *Revista colombiana de cirugía* 2009; 24:83-89.

20. Velásquez M. Presentación de casos: Cierre asistido con succión en heridas complejas de la pared del tórax. *Revista colombiana de cirugía* 2009; 24:195-198.

21. Velásquez M. Presentación de caso: Lobectomía pulmonar en manguito, reporte de un caso y revisión de la literatura. *Revista colombiana de cirugía* 2010; 25:76-96.

22. González A., Velásquez M.: Abdomen agudo un enfoque práctico. Editorial de la Universidad del Valle 2010.

23. Cujíño I., Velásquez M.: Una alternativa para la intubación selectiva en cirugía de tórax. *Revista Mexicana de Anestesiología* 2011; 34: 45-50.

24. Zarama V., Velasquez M.: Mainstem bronchus transection after blunt chest trauma. *J Emer Med* 2012.

25. Sua L. Silva N. *Revista Colombia Médica*, caso clínico publicado: Report of the first case of myxoid liposarcoma in Colombia: a rare tumor. Volumen 41, número 3, 2010 (julio- septiembre), pp. 271-4.

26. Sua L. Maestro M. Vidaurreta M et al. *Revista de Senología y Patología mamaria*. Revisión:

Hibridación In Situ Fluorescente (FISH), Hibridación In Situ Cromogénica (CISH) e Hibridación In Situ Cromogénica con Plata (SISH): su uso para la detección de la amplificación del gen Her2 en cáncer de mama. Órgano de expresión de la Sociedad Española de Senología y Patología Mamaria. 2010; 23 (4), pp. 168-172.

27. Sua L, Maestro M, Vidaurreta M et al. Actualidad y futuro en las técnicas de cuantificación de células tumorales circulantes: importancia en tumores sólidos epiteliales. Rev. Lab Clin. 2011. doi:10.1016/j.labcli.2010.11.007. Revista de Laboratorio clínico. El órgano de expresión científica de la Asociación Española de Biopatología Médica (AEBM), la Asociación Española de Farmacéuticos Analistas (AEFA) y la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC).

28. Sua L, Maestro M, Vidaurreta M. et al. Comparación entre diferentes técnicas de estudio del ganglio centinela después de neoadyuvancia en cáncer de mama. Revista Medicina, 2011; Vol. 33 N.1 (92): 30-37.

29. Sua L, Maestro M, Vidaurreta M. et al. Células tumorales circulantes en la práctica oncológica: importancia en tumores sólidos epiteliales. Revista Medicina, 2011; Vol. 33 N.2 (93):101-114.

30. Sua L, Maestro M, Vidaurreta M, et al. Nota Técnica: Detección inmunomagnética de células tumorales circulantes en cáncer de mama metastásico: nuevas tecnologías. Rev. Colomb Cancerol 2011; 15(2):50-55.

31. Cuenca A, Sua LF, Campo E, et al. In situ mantle cell lymphoma: Clinical Implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. Haematologica, 2012, 97 (2): 2-10.

32. Sua L, Maestro M, Vidaurreta M, et al. Rapid detection of sentinel lymph node metastases in Different Techniques and comparison in low-grade breast carcinomas. Colombia Médica. Vol. 43 No. 1, 2012. (Enero-Marzo).

33. Martínez D, Valera A, Sua L, et al. Plasmablastic Transformation of Low Grade B-Cell Lymphomas: Report on Six Cases. The American Journal of Surgical Pathology. Am J Surg Pathol 2013; 37:272–281?

34. Bustamane J, Sua L, Bravo L et al. Solitary intracranial tuberculoma mimicking a malignant tumor in a patient without tubercular lesions or a history of disease: a case report. Bosn J Basic Med Sci 2013; 13 (2): 1-5.

**DESARROLLO ACTUAL DE INVESTIGACIÓN REALIZADA EN EL LABORATORIO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD ICESI, ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PORCINAS EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA DE LABORATORIO DE LA FUNDACIÓN VALLE DEL LILI Y DESARROLLO DEL PROTOTIPO DE QUIMERIZACIÓN EN LA UNIVERSIDAD DEL VALLE GRUPO DE FARMACOLOGÍA Y LABORATORIO IN VITRO.**

*Inducción de quimerización en un modelo de trasplante pulmonar experimental y su efecto en la respuesta a la lesión isquemia/reperfusión (disfunción primaria) del injerto. Aprobado por el comité de ética animal universidad ICESI, proyecto piloto actualmente en curso.*

**Resumen ejecutivo:** En los últimos 40 años, el trasplante de pulmón ha avanzado de un procedimiento experimental realizado en sólo unos pocos pacientes, a un tratamiento eficaz que ha mejorado la calidad de vida y la supervivencia de innumerables pacientes con enfermedad pulmonar avanzada terminal como: enfisema, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, sarcoidosis e hipertensión pulmonar. Sin embargo, a pesar de los avances significativos en el campo de trasplante de pulmón, aún queda mucho por aprender en cuanto a la selección apropiada de los candidatos, la prevención de disfunción precoz del injerto y el manejo a largo plazo, teniendo sobrevividas del injerto en las mejores manos a 5 años. Actualmente la criopreservación y el uso de medicamentos inmunosupresores continúan siendo los manejos estándar del trasplante pulmonar. El objetivo de este estudio es comprobar si el procedimiento de quimerización del pulmón disminuye la respuesta de la lesión isquemia- perfusión/disfunción primaria del injerto, el rechazo hiperagudo, las alteraciones en la anastomosis y la infección en modelos biológicos experimentales. En total se utilizan 12 cerdos procedentes de diferentes camadas de la especie común (Landrace Large White), se realizan en total 3 experimentos, en cada uno se quimeriza un caso y se trasplanta un control sin quimerizar. Los biomodelos son procedentes de diferentes camadas, los donantes son hembras y los receptores son machos, esto con el fin de comprobar la quimerización con el estudio por hibridación in situ fluorescente del cromosoma Y en el epitelio pulmonar.

Modelo biológico 1 = donante del pulmón izquierdo (2hembras)

Modelo biológico 2= receptor de pulmón izquierdo el cual se someterá a quimerización (macho)

Modelo biológico 3= receptor del pulmón izquierdo el cual se maneja de manera estándar del trasplante pulmonar (macho)

Las medidas de mantenimiento y cuidado de los cerdos son las óptimas y las estandarizadas por el bioterio de la universidad ICESI; los animales no son expuestos a sufrimiento innecesario.

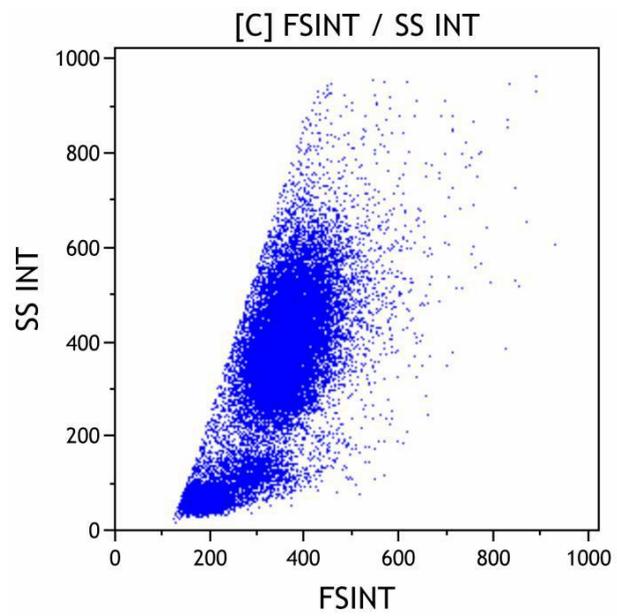
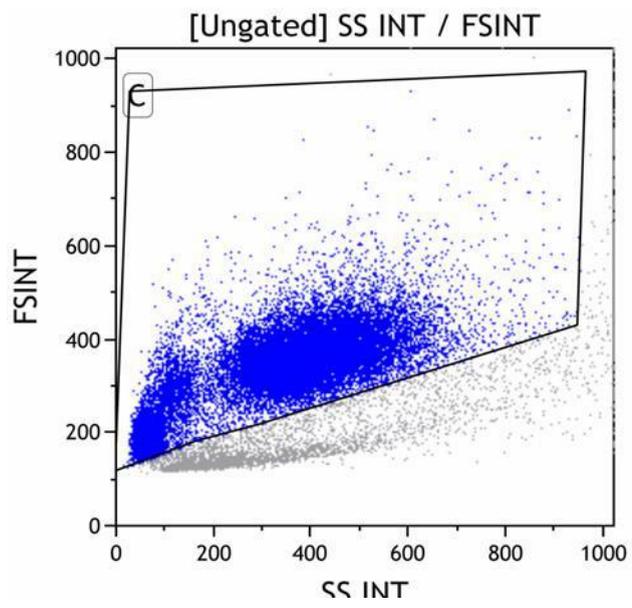
#### **FASE UNO:**

Escribimos y estandarizamos los protocolos metodológicos de: anestesiología, hematología, neumología, cirugía de tórax, cirugía cardiovascular, del procedimiento de quimerización, anatomía patológica, patología molecular y genética molecular, cuidado post-trasplante y seguimiento en el bioterio por medicina veterinaria.

#### **FASE DOS:**

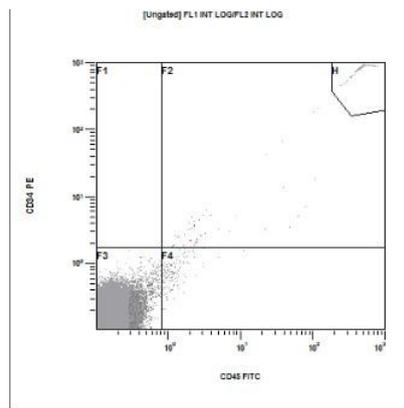
El tiempo de duración de cada experimento básico es de 6 horas, actualmente hemos desarrollado 3 biomodelos porcinos de la especie Landrace Large White, con un peso de 40kg, se inicia el experimento con un ayuno de 18 horas, el medicamento básico de sedación es Ketamina a 10 mg/kg, contamos con el soporte del veterinario del bioterio de la universidad ICESI.

a. **Extracción de Medula ósea para la obtención de Stem Cell:** se realizó la extracción del contenido medular en diferentes áreas óseas del biomodelo en posición decúbito prono, como resultado demostramos que en la cresta iliaca es donde se logra extraer 50 cc del contenido medular necesario para el cultivo de quimerización. Participación del Dr. Diego Medina (Hemato-oncólogo de la FVL).



Citometría de flujo de medula ósea porcina con 28.327 eventos cuantificados, encontramos un total de 10 stem cell porcinas por microlitro de medula ósea en los biomodelos en general.

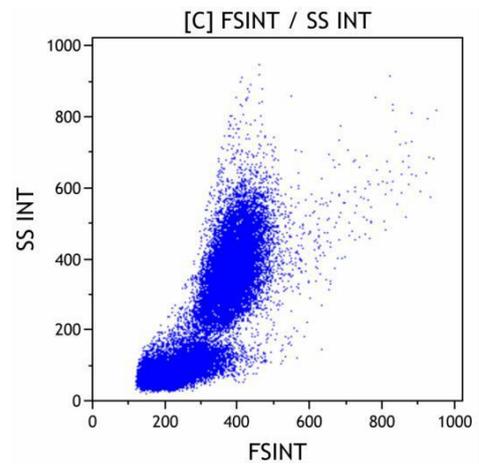
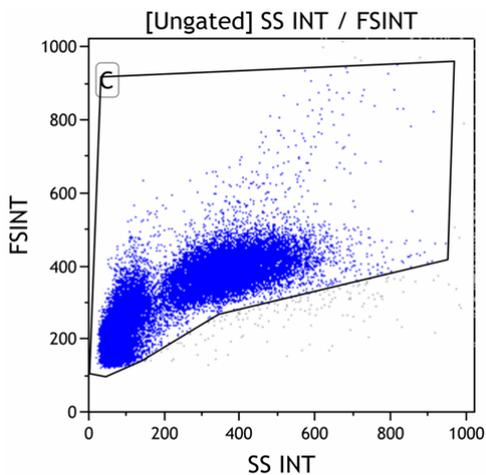
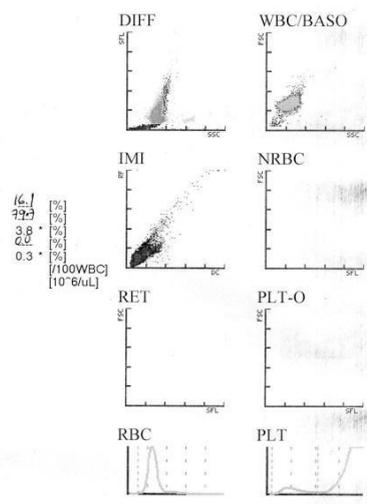
Navios Panel Report: 591		FUNDACION VALLE DE LILI	
7/11/2013	12:10 PM	Runtime Results	
Sample ID1:	STEM CELL MARRANO	Name:	
Panel Name:	STEM CELLS	Patient ID:	
Panel Complete: Y	Match: Y	Navios SN:	AU06210
LMD FileNames(s):		Navios v 1.1:	
C:\Bectman Coulter User Data\Users\FVL\LMD\STEM CELL MARRANO STEM CELL MARRANO STEM CELL MARRANO 000027...			
Collection Date:		User ID:	FVL
Analysis Date / Time:	11Jul2013 12:10 PM	Tube ID:	NoRead
Sex:	ID#:	Hematology Date / Time:	
Physician:		Hematology Instrument:	
Sample Type:		WBC:	LY%:
Dilution Factor:		RBC:	MO%:
Harvest Volume:		PLT:	NE%:
Body Weight:			EO%:
			BA%:
<b>Description:</b>	<b>Region</b>	<b>Result</b>	<b>Cells/uL</b>
RECuento CEL CD34+ VIABL	STEM CELL	78.261%	10.0
%VIABILIDAD	eq	96.644%	
			<b>Opt Stat 1</b>
			<b>Opt Stat 2</b>



b. **Accesos venosos para el mantenimiento del biomodelo durante el procedimiento quirúrgico:** se canalizo la oreja izquierda con la extracción de sangre periférica para su evaluación en el laboratorio. Se observó un incremento en el número de leucocitos, plaquetas de mayor tamaño y un predominio de la línea linfoide T. El estudio de citometría de flujo permitió obtener 38.965 eventos, sin presencia de células CD34 en sangre periférica.

Morfo. Cont.

WBC	18.29 *	[10 <sup>3</sup> /uL]
RBC	6.61 +	[10 <sup>6</sup> /uL]
HGB	11.5	[g/dL]
HCT	41.9	[%]
MCV	63.4	[fL]
MCH	17.4	[pg]
MCHC	27.4	[g/dL]
PLT	195 *	[10 <sup>3</sup> /uL]
RDW-SD	36.3	[fL]
RDW-CV	18.3	[%]
MPV	---	[fL]
NEUT	---	[10 <sup>3</sup> /uL]
LYMPH	---	[10 <sup>3</sup> /uL]
MONO	0.70	[10 <sup>3</sup> /uL]
EO	---	[10 <sup>3</sup> /uL]
BASO	0.05 *	[10 <sup>3</sup> /uL]
NRBC	---	[10 <sup>3</sup> /uL]
RET	---	[%]
IRF	---	[%]

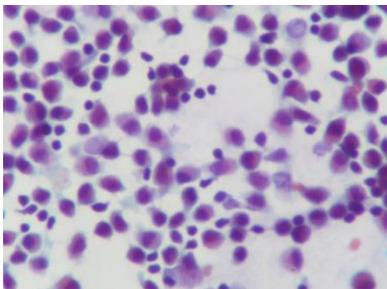


### Citometría de flujo en sangre periférica

c. **Intubación orotraqueal:** se requiere una posición decúbito prono, se utilizó el tubo orotraqueal 7.5 mm, el biomodelo se deja en la maquina anestésica con ventilación controlada por volumen, la medicación anestésica utilizada fue propofol 4 mg/kg, fentanilo 3µg/kg y atracuronio 0.6 mg/kg. Participación de anestesiología Dra. Indira Cujíño (FVL).

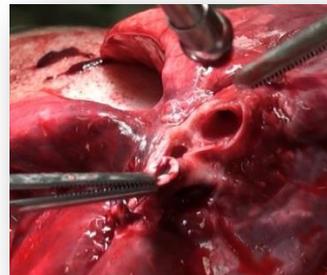


d. **Fibrobroncoscopia:** se realizó evaluación y reconocimiento anatomico de la via aerea del cerdo, tomando muestras de lavado broncoalveolar para su estudio morfológico y evaluación de las posteriores variantes a tener en cuenta en la toma de las biopsias transbronquiales de los modelos trasplantados. Participacion de neumología intervencionista Dra. Liliana Fernández (FVL).



Citología del lavado broncoalveolar (BAL) del bronquio derecho con la coloración papanicolaou, conteo diferencial: macrófagos 90%, linfocitos 5%, neutrófilos 2% y células epiteliales 3%.

e. **Procedimiento quirúrgico:** se realizó toracotomía izquierda con resección del cuarto y quinto arco costal. Reconocimiento y disección de arteria pulmonar, vena pulmonar y bronquio principal izquierdo y neumonectomía izquierda. Participación del Dr. Mauricio Velazquez (cirugía de trasplante pulmonar) y la Dra. Marta Giraldo (cirugía cardiovascular) (FVL).



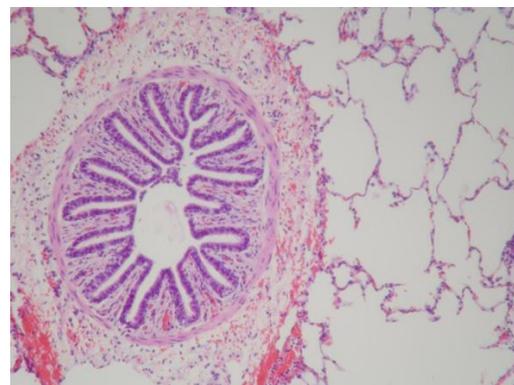
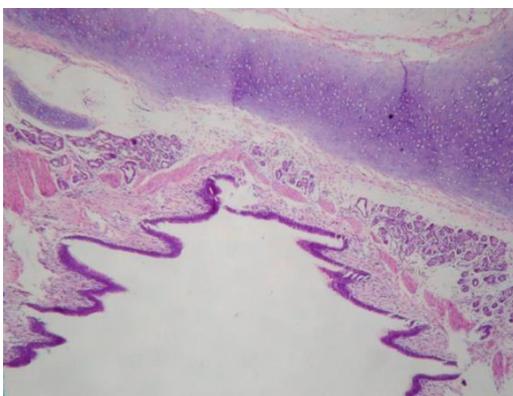
f. **Prototipo de quimerización pulmonar:** este ha sido diseñado en conjunto con el grupo de Farmacología de la Universidad del Valle y el grupo de investigación de la Fundación Valle del Lili, este prototipo pretende simular las condiciones de un pulmón ex vivo y en el poder realizar el proceso de quimerización en el laboratorio. Para probarlo y hacer correcciones anatómicas del diseño se realizó la canulización de la arteria pulmonar con tubo de tórax: 20 french y bronquio principal izquierdo con TOT: 6 mm con balón, con el fin de acondicionar el prototipo a los pulmones porcinos. Ensamblaje del prototipo a cargo de Jaime Muñoz y Oscar Gutiérrez (Universidad del Valle)



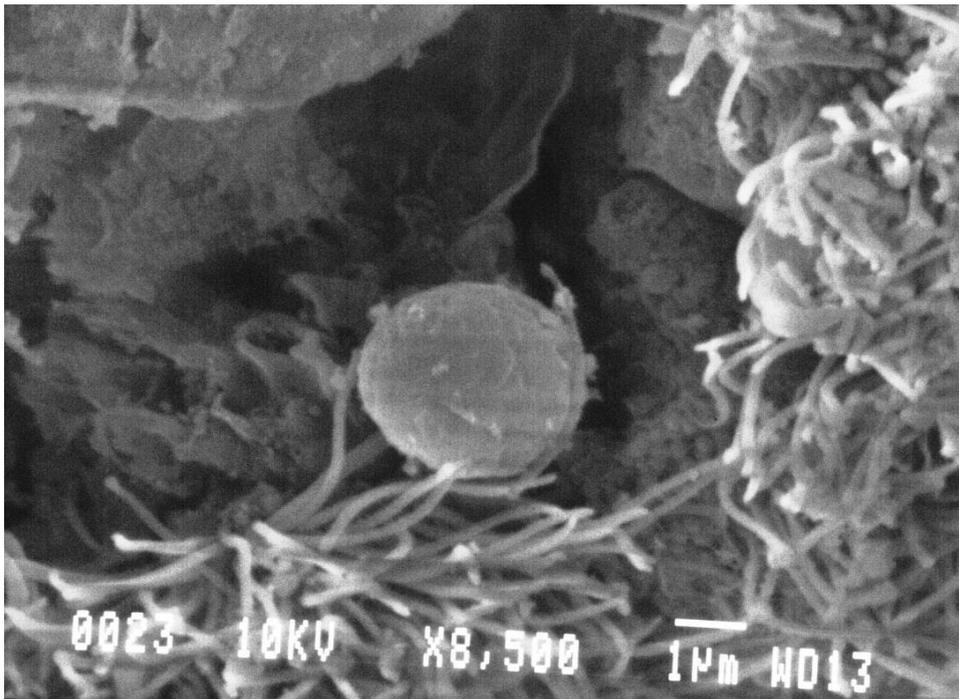
Prototipo donde se evidencian el sistema de adecuación vascular y ventilatorio para el pulmón porcino.



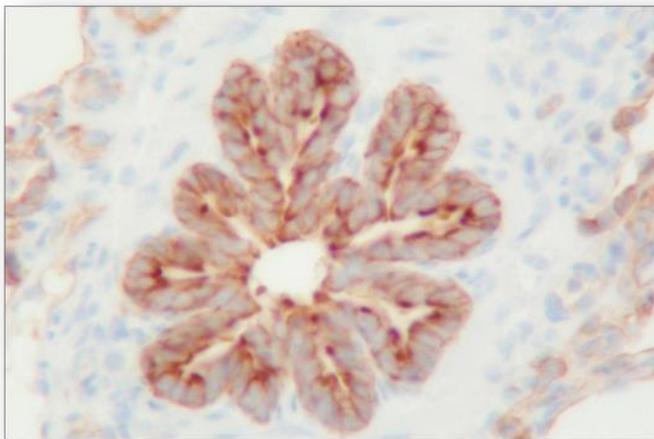
g. **Estudio anatomopatológico del pulmón porcino:** se tomaron biopsias de arterias, venas pulmonares, bronquio, bronquiolos, pleura y parénquima pulmonar porcino para realizar su comparación con el tejido humano pulmonar y evaluar las variables anatómicas a considerar de la experimentación. Realizamos técnicas básicas como la coloración de hematoxilina y eosina (H&E), estudio de inmnohistoquímica donde estudiamos marcadores de línea linfoide B, línea linfoide T, marcadores epiteliales (citoqueratina AE1/AE3) e índices de proliferación celular con el marcador Ki-67. Además evaluamos la arquitectura de las cilias porcinas con microscopia electrónica de barrido. Participación de la Dra. Luz Fernanda Sua (Patóloga pulmonar y molecular, ciencias biomédicas PhDc) y Gustavo Porras (Químico y Biología Molecular Msc (e)) (FVL).



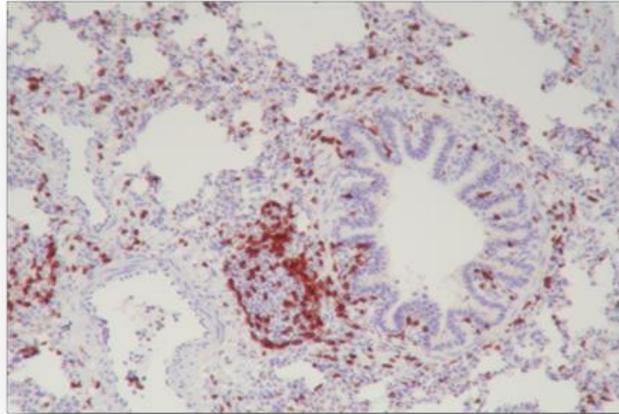
Bronquio, bronquiolos y parénquima pulmonar porcino (H&E)



Estudio de cilias porcinas con microscopia electrónica de barrido (MEB).



Expresión proteica del gen Citoqueratina AE1/AE3 (Técnica de inmunohistoquímica)



Expresión de linfocitos de línea linfocítica T con el CD3 (Técnica de inmunohistoquímica)

#### Conclusiones histopatológicas:

**TEJIDO PULMONAR PORCINO ES COMPARABLE CON EL TEJIDO PULMONAR HUMANO, LO QUE LO HACE UN BIOMODELO OPTIMO PARA ESTUDIO Y EXPERIMENTACIÓN DE LA VIA RESPIRATORIA**

Sistema de conducción, transición e intercambio comparable con el humano

Bronquios, bronquiolos y alvéolos comparables con el humano

El epitelio pseudo estratificado gradualmente baja en altura y pierde los cilios en los bronquiolos como en el humano

La distribución del neumocito tipo 1 y 2 es igual que el humano

Presencia de BALT en el tejido pulmonar porcino. Esta información es importante para la evaluación del tejido trasplantado

**FASE TRES:** actualmente en desarrollo, en ella estamos estandarizando las variables de ventilación ex vivo y condiciones necesarias para el control metabólico pulmonar durante el procedimiento de quimerización donde utilizaremos el protocolo desarrollado en tráqueas del grupo in vitro, además de las condiciones requeridas por medicina crítica del trasplante en el periodo post-trasplante inmediato y su sostenimiento por 72 horas.

**DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN EN TRASPLANTE PULMONAR PARA ESTE PROYECTO:**  
**INDUCCION DE QUIMERIZACION EN UN BIOMODELO DE TRASPLANTE PULMONAR EXPERIMENTAL**  
**Y SU IMPACTO EN LA PRESERVACIÓN DEL INJERTO**

**Investigador principal:** Liliana Fernández Trujillo MD

**Coinvestigador:** Luz Fernanda Sua Villegas MD, PhD

**Conformación del equipo de investigación multidisciplinario en especialidades y subespecialidades medicas:**

**Hematooncológia:** Dr. Diego Medina, MD

**Anestesiología pulmonar:** Dra. Indira Cujiño, MD

**Cirugía de tórax y trasplante pulmonar:** Dr. Mauricio Velásquez, MD

**Cirugía cardiovascular:** Dra. Marta Giraldo, MD **Neumología**

**intervencionista:** Dra. Liliana Fernández, MD **Medicina crítica del**

**trasplante pulmonar:** Dr. Diego Bautista, MD

**Patología pulmonar, Patología Molecular y Ciencias Biomédicas:** Dra. Luz Fernanda Sua, MD,  
PhD

**Citogenética y Genética Molecular:** Dra. Lisa Ximena Rodríguez MD, Msc, PhD

**Responsables de los procedimientos durante el desarrollo del proyecto:**

**1. Laboratorio de cultivos celulares in vitro. Grupo de Farmacología universidad del Valle:**

a. Se aislarán y cultivarán stem cell y contenido medular completo en contacto con el parénquima pulmonar de cerdos de 40 kg de la especie Landrace Large White, siguiendo el protocolo de quimerización realizado en las tráqueas experimentales porcinas y humanas, protocolo del grupo de investigación de Farmacología-Univalle en el laboratorio in vitro.

b. Una vez determinemos los mejores tiempos para el proceso de quimerización en el parénquima pulmonar con estudio in vitro evaluando la presencia del cromosoma y con la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) y por genética molecular detectando el origen (propio, del

donante ó mixto) a través del análisis de marcadores polimórficos STR (short tandem repetition) estos serán injertados en 10 cerdos de forma subcutánea, 5 con inmunosupresión y 5 sin recibir inmunosupresión, serán seguidos por 90 días para observar la presencia de necrosis y para evidenciar en biopsia los cambios asociados al rechazo.

**Laboratorio de experimentación animal ICESI:**

a. Se realizarán los trasplantes subcutáneos quimerizados de los diferentes experimentos realizados in vitro por el grupo de Farmacología-Univalle, se requiere sedación, anestesia y una pequeña cirugía para el implante del injerto, en 10 cerdos en total.

b. Se realizarán los trasplantes pulmonares de los biomodelos quimerizados y no quimerizados, bajo las condiciones técnicas del trasplante estandarizado para humanos y el cuidado crítico del biomodelo en el bioterio, será bajo condiciones estrictas de seguimiento y mantenimiento en su estado crítico post-operatorio, realizaremos 6 experimentos en total (biomodelos quimerizados 6 y no quimerizados 6).

c. Se realizará el seguimiento con biopsia transbronquial y lavado bronco alveolar (BAL) bajo fluoroscopia con sedación para estudiar la respuesta en el tejido al rechazo (según las guías de The International Society for Heart and Lung Transplantation, ISHLT), estudiaremos la presencia del cromosoma y del porcentaje de quimerización por PCR evaluando los STR y presencia de neutrófilos en el BAL durante el tiempo de sobrevivencia de los biomodelos así: 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses y 18 meses.

**Bioterio de ICESI:**

a. Se mantendrán los cerdos bajo el cuidado del veterinario, donde se hará el seguimiento estricto de los biomodelos, con manejo del dolor, medicamentos inmunosupresores, antibióticos, alimentación y vigilancia estricta con videos.

b. Los biomodelos estarán monitorizados durante la etapa crítica post-trasplante y con personal veterinario las 24 horas y bajo el cuidado de todo el equipo de trasplante pulmonar.

**Laboratorio in vitro, Universidad del Valle, grupo de Farmacología:**

a. Una vez se rescate el pulmón a quimerizar en el biomodelo, este será trasladado al laboratorio de in vitro de la Universidad del Valle según los requerimientos del protocolo de transporte estándar. Según el protocolo ya estandarizado en las pruebas piloto e in vitro se hará el proceso de quimerización para posteriormente trasplantar el receptor, este procedimiento será documentado y

evaluaremos los parámetros fisiológicos necesarios durante el proceso de quimerización.

b. Quimerización del pulmón donado protocolo general: La técnica utilizada para el presente proyecto por nuestro grupo de investigación es quimerizar el órgano del donante. En ésta técnica lo que se hace es extraer el órgano a trasplantar, llevarlo a al laboratorio, ponerlo en condiciones adecuadas de temperatura, humedad, oxigenación, realizando un lavado previo del órgano con solución de cultivo, modificada y suplementada, durante un período no mayor de 8 horas (que podría variar y estandarizaremos con las pruebas in vitro e in vivo); posteriormente, se drena el medio de cultivo, se agrega nuevo medio suplementado, se adicionan células madre mesenquimales extraídas de la medula ósea (cresta iliaca), y se “cultiva” el órgano, controlando la temperatura, oxigenación, pH y demás parámetros fisiológicos por un tiempo no mayor de 8 horas, para ser remitido luego a ser trasplantado.

#### **Departamento de patología y medicina de laboratorio Fundación Valle del Lili:**

a. Se realizarán estudios anatómicos de rechazo hiperagudo, agudo y crónico en la evolución de los experimentos, los cuales serán registrados y archivados de forma digital, lo que nos permite compartir estos resultados con otros grupos de investigación en trasplante pulmonar internacionales.

b. Realizaremos estudio de citología en base líquida para el lavado bronco alveolar (BAL), con cuantificación celular, buscando la presencia especialmente de neutrófilos asociados a la bronquiolitis obliterante (BOS).

c. Se realizará estudio de FISH (hibridación in situ) para el cromosoma Y evaluando el porcentaje de quimerización y rechazo.

d. Se realizará estudio por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para quimerización en cromosomas porcinos por el laboratorio de genética molecular estudiando los STR.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN PARA EL PULMÓN EN ESTE PROYECTO:**

En el 2013 hubo aproximadamente 12.00 pares de pulmones donados para trasplante y alarmantemente solo el 15% fueron aceptados para trasplante. En el mismo periodo, hubo 1794 receptores de trasplante de pulmón 60% hombres y 40% mujeres. Aproximadamente 1650 individuos se encuentran en lista de espera para trasplante pulmonar. Data for National Graft Survival from Scientific Registry of Transplant Recipients ([www.srtr.org/csr/current/centers/default.aspx](http://www.srtr.org/csr/current/centers/default.aspx))

El trasplante de pulmón es una terapia quirúrgica y a menudo es la única oportunidad disponible para pacientes con enfermedad pulmonar en estado terminal. Como sabemos el trasplante de pulmón es el más difícil trasplante de órgano sólido en la actualidad. Un individuo inhala 3.2 litros de oxígeno en cada 8 segundos de respiración y en esa respiración hay cientos de millones de gérmenes y bacterias. Actualmente no hay medicinas o procedimientos o desarrollos específicamente designados para el trasplante de pulmón. Así como el éxito a largo plazo es pobre cuando se compara con las estadísticas de los otros trasplantes de órgano sólido, el 45% a 50% de los trasplantados no sobrevivirán el crucial primer año post trasplante y de los que sobreviven, no sobrepasan los 5 años, y solamente el 20% logra llegar a los 10 años. Data for National Graft Survival from Scientific Registry of Transplant Recipients ([www.srtr.org/csr/current/centers/default.aspx](http://www.srtr.org/csr/current/centers/default.aspx))

Hay muchas áreas promisorias en desarrollo para lograr más pulmones viables disponibles para donación y trasplante, así como también métodos para diagnóstico que anticipen las varias formas de rechazo asociadas con el proceso de trasplante pulmonar.

Debemos de manera multidisciplinaria e interinstitucional trabajar en investigación diligente para desarrollar, procedimientos, tratamientos y medicamentos que puedan mejorar la viabilidad del trasplante y mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes trasplantados de pulmón.

## **JUSTIFICACIÓN DE TRABAJAR EN LA QUIMERIZACIÓN DE PULMÓN:**

El trasplante de pulmón es una terapia innovadora para pacientes con enfermedad pulmonar en estado terminal que resulta del EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), fibrosis quística,

fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar primaria y otras enfermedades pulmonares más raras como la deficiencia de alfa uno antitripsina, sarcoidosis, linfangioleiomiomatosis y linfangiomatosis.

Los pacientes con formas avanzadas de estas enfermedades tienen pobre pronóstico y poca supervivencia a largo plazo. El trasplante de pulmón dramáticamente mejora en corto plazo la calidad de vida. Muchos pacientes experimentan inmediata mejoría en la función pulmonar y retornan su estilo de vida activo después del procedimiento continuando con un programa de rehabilitación activo.

**El éxito a largo plazo después del trasplante pulmonar es decepcionante.** Los pacientes experimentan una frecuencia de rechazo agudo más alta que los trasplantados de otros órganos sólidos. Dentro de los 5 años después del trasplante, de los pacientes que han sobrevivido al menos la mitad desarrollan una forma de rechazo crónico conocido como síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS) (Woodrow JP, Shlobin OA. 2010)

Actualmente no hay ningún tratamiento efectivo para la BOS, se necesitan todos los esfuerzos para entender, prevenir y tratar el rechazo agudo y la BOS en orden de prevenir las muertes y mejorar el éxito a largo plazo del trasplante pulmonar.

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN DE QUIMERIZACIÓN EN PULMÓN:**

### **Objetivo general:**

Desarrollar modelos animales porcinos quimerizados con el protocolo desarrollado por el laboratorio in vitro del grupo de farmacología-Univalle, donde se pueda evaluar el proceso de quimerización y su impacto en el rechazo agudo y síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS) para ser probados en fase preclínica previo al desarrollo de ensayos en humanos.

### **Objetivos específicos:**

1. Desarrollar un procedimiento estandarizado, reproducible y seguro para su implementación en humanos.
2. Determinar el impacto de la quimerización en el uso de los medicamentos inmunosupresores para el trasplante de pulmón.
3. Determinar cuáles son los mejores métodos de seguimiento diagnósticos del proceso de

quimerización y su impacto en el rechazo agudo y BOS.

4. Determinar cómo el proceso de quimerización impacta en las infecciones después del trasplante pulmonar.

#### **METODOLOGÍA DEL TRABAJO EN QUIMERIZACIÓN DE PULMÓN EN EL PROYECTO:**

(Los protocolos estandarizados y escritos paso a paso se encuentran en el centro de investigación de la Fundación Valle del Lili, en caso de ser requeridos serían enviados a los evaluadores, esto con el fin de proteger la propiedad intelectual y futuras patentes).

#### **Metodología de cultivo de pulmón quimerizado y ensayos in vitro en el laboratorio del grupo de farmacología-Univalle según el protocolo del grupo desarrollado para tráqueas y adecuado al pulmón:**

1. Tiempo para su desarrollo: 6 meses
2. Biomodelos a injertar quimerizados en machos con inmunosupresión: 5
3. Biomodelos a injertar quimerizados en machos sin inmunosupresión: 5
4. Biomodelos donantes femeninos: 5
5. Biomodelo receptor al cual se le extrae el contenido medular completo: total 10 muestras de medula ósea, se cuantificaran sus poblaciones por citometría de flujo, evaluando su concentración celular, número de células nucleadas y stem cell porcinas.
6. Ensayos in vitro de cultivo de quimerización del parénquima pulmonar con contenido medular del receptor con células madres en diferentes tiempos de quimerización.
7. Se evaluarán las muestras con hibridación in situ fluorescente (FISH) del cromosoma Y y estudio de PCR de STR para evaluar porcentaje de quimerización en cromosomas porcinos y así elegir el mejor tiempo del protocolo experimental.

#### **Metodología del injerto subcutáneo del parénquima pulmonar quimerizado en los biomodelos:**

Tiempo para su desarrollo: 6 meses

1. Todos los biomodelos serán sedados y anestesiados para realizar la inserción del

parénquima pulmonar quimerizado subcutáneo, todos recibirán antibioticoterapia.

2. En total se realizara el procedimiento en 10 biomodelos quimerizados, 5 con inmunosupresión y 5 sin inmunosupresión.

3. Todos los biomodelos serán seguidos y controlados en el bioterio de la universidad ICESI, se tomara una fotografía diaria del área del injerto evaluando la presencia de necrosis.

4. El seguimiento de los biomodelos se realizara por 90 días.

5. En todos los casos se tomara biopsia del área del injerto a los 90 días de seguimiento para evaluación histopatológica.

6. Estas muestras tendrán estudio de hibridación in situ fluorescente (FISH) del cromosoma Y y estudio por PCR de STR de cromosomas porcinos.

#### **Metodología del trasplante pulmonar quimerizado según el protocolo del grupo de Farmacología-Univalle y biomodelo no quimerizado:**

Tiempo para su desarrollo: 24 meses

1. Día uno: con sedación se extrae la médula ósea del cerdo macho receptor, en total 50 cc, se evalúa por citometría de flujo las poblaciones celulares y su viabilidad, se filtran las espículas óseas y posteriores se envían refrigeradas al laboratorio de Farmacología de la Universidad del Valle.

2. Día dos: El cerdo femenino donante, es llevado a cirugía y bajo anestesia general se realiza la neumonectomía izquierda, el pulmón será lavado con Perfadex y trasladado al laboratorio de Farmacología-Univalle, se controlaran variables importantes como la composición de perfusión, temperatura, volumen corriente, presión espiratoria final positiva (PEEP), fracción de oxígeno expirado y la presión arterial durante el proceso de quimerización según el protocolo del grupo de Farmacología-Univalle.

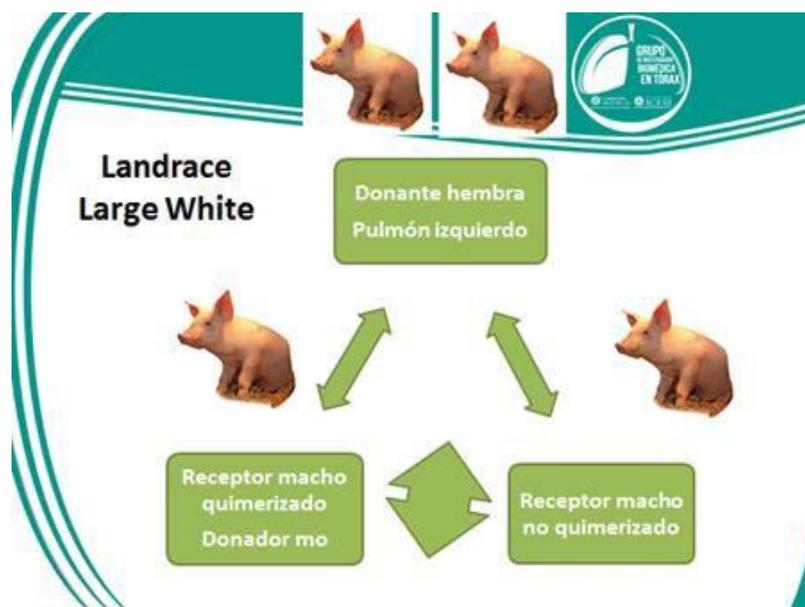
3. Día dos: se realizara el trasplante pulmonar convencional, con crio preservación, lavado con Perfadex y utilización de inmunosupresión. Posterior el biomodelo será llevado al área del bioterio diseñada para su estadía, monitorización y control. Serán vigilados las 24 horas.

4. Día tres: se realiza el trasplante pulmonar quimerizado, con control metabólico ex vivo, este biomodelo recibirá inmunosupresión y las dosis del inmunosupresor serán variadas según los resultados de quimerización determinados por FISH y PCR. Posterior el biomodelo será llevado al área del bioterio diseñada para su estadía, monitorización y control. Serán vigilados las 24 horas.

5. Seguimiento y mantenimiento de los biomodelos: estos serán controlados por el equipo de cirugía de trasplante, neumología intervencionista, anestesiología, medicina crítica y el equipo técnico y veterinario. Se espera retirar los elementos invasivos en el menor tiempo posible. Los biomodelos serán grabados las 24 horas. Se tomarán radiografías y evaluación de PaO<sub>2</sub>:FiO<sub>2</sub> de acuerdo a la clasificación internacional conocida. Una vez se establecen los biomodelos de su condición postquirúrgica el seguimiento será así: 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses y 18 meses con lavado broncoalveolar (BAL) y biopsia transbronquial, buscamos hallazgos histológicos de rechazo agudo el cual será clasificado de acuerdo a los criterios histológicos internacionales y la presencia de bronquiolitis obliterante después de los 6 meses del trasplante que se clasificará de acuerdo a los criterios histológicos internacionales en humanos (guías de The International Society for Heart and Lung Transplantation, ISHLT).

6. Todos los lavados bronco alveolares (BAL) y biopsias tendrán estudio histopatológico registrado digitalmente, estudio de cromosoma Y por hibridación in situ y PCR para STR para porcentaje de quimerización.

7. El control microbiológico se realizara con cultivos previo a la cirugía, 24 horas postquirúrgico y 72 horas postquirúrgico con lo que determinaremos procesos infecciosos asociados o no al procedimiento.



Esquematización del cada procedimiento a realizar de trasplante quimerizado y no quimerizado, en total utilizaremos 12 cerdos.

**Determinaremos la evaluación del quimerismo con los siguientes parametros:**

1. El patrón genético de la muestra control es idéntico al patrón genético del donante, lo que equivale a un quimerismo de 100%
2. El patrón genético de la muestra control es idéntico al patrón genético del receptor previo al trasplante = quimerismo de 0%.
3. El patrón genético de la muestra control es una mezcla de los patrones genéticos del donante y del receptor previo al trasplante. Aquí observamos diferentes proporciones de quimerismo, las cuales serán calculadas con base en el número de marcadores genéticos que muestren quimerismo comparado con el total de marcadores analizados.

**PROGRAMA DE ACTIVIDADES:**

Ver capítulo 9.

**MARCO CONCEPTUAL:**

Entre los años de 1988 y 1993, el número de trasplantes de pulmón realizado en todo el mundo aumentó dramáticamente de 89 a 1160 anualmente (Chirstie JD et al., 2010). Entre los años de 1993 y el año 2000, el número de trasplantes según informó la sociedad internacional de trasplante de corazón y pulmón (ISHLT) se registró un incremento muy modesto con una actividad en meseta de alrededor de 2000 procedimientos anualmente (Chirstie JD et al., 2010). Sin embargo, ha habido un crecimiento constante en el número de procedimientos realizados anualmente desde el año 2000 y más de 3000 trasplantes se informaron en el año 2009 (Chirstie JD et al., 2010).

Mientras que parte de este aumento puede atribuirse a una mayor participación en el registro de la ISHLT, el rápido aumento en actividad desde el año 2005 sugiere que el sistema de asignación de pulmones implementado en los Estados Unidos desde el año 2005 ha aumentado el número de trasplantes. La escasez de pulmones de donantes ha sido el principal factor limitante para el número de trasplantes realizados. Las tasas de donantes para el pulmón han sido considerablemente inferiores a las del riñón, hígado y corazón. Los pulmones son rescatados sólo

en el 15 por ciento de todos los donantes cadavéricos, considerando que los riñones y el hígado se obtienen en el 88 por ciento y los corazones en el 30 por ciento de donantes fallecidos (Division of transplantation, Bureau of health resources development, 2005). Estas disparidades son probablemente debido a la vulnerabilidad de los pulmones, a posibles complicaciones que surgen a menudo antes y después de la muerte cerebral de los donantes como: traumatismo torácico, bronco-aspiración, lesiones pulmonares asociadas al ventilador, neumonía y edema pulmonar neurogénico. Sin embargo, puede ser asociado que para el trasplante pulmonar el 40 por ciento de los donantes fueron rechazados (LB Ware et al, 2002). Además, los estudios sugieren que la perfusión del pulmón exvivo puede mejorar la lesión pulmonar en algunos casos y permiten el trasplante de donantes previamente considerados inadecuados (Ingemansson R et al., 2009 & Cypel M et al., 2009).

En los primeros años, el trasplante de pulmón único fue más frecuente que el trasplante bilateral. Pero, mientras que el número de trasplantes de pulmón único realizado anualmente se ha mantenido estable, el número de trasplantes bilaterales consistentemente ha aumentado y ha superado el número de procedimientos de pulmón único en el año 2002 (Division of transplantation, Bureau of health resources development, 2005). Las enfermedades más comunes que llevan al trasplante pulmonar, en orden de frecuencia son: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, deficiencia de alfa-1 antitripsina y la hipertensión pulmonar idiopática.

Según el informe de registro del año 2011, la mediana de supervivencia para los receptores adultos es de 5,5 años, pero los receptores bilaterales parecen tener una mejor supervivencia media que los receptores de pulmón único (6.8 versus 4.7 años, respectivamente) (Division of transplantation, Bureau of health resources development, 2005).

#### **Métodos de preservación:**

La solución de preservación óptima pulmonar, la temperatura de almacenamiento, el volumen, la concentración de oxígeno y los aditivos farmacológicos necesarios para mejorar el éxito del injerto de pulmón son desconocidos. Sin embargo, varias técnicas de preservación del pulmón han sido desarrolladas para los pulmones de donantes rescatados desde los principales insultos (isquemia, almacenamiento en frío y reperfusión) que pueden contribuir a la disfunción primaria del injerto y a la mortalidad a largo plazo (de Perrot M et al, 2003 & 2005). En general, la preservación de los pulmones rescatados se inicia con una inyección de una solución hipotérmica

por la arteria pulmonar de 50 a 60 mL/Kg que es una solución conservante, junto con la administración tópica de una solución fría (Hopkinson DN et al, 1998 & Fischer S et al., 2001). El pulmón se enfría uniformemente y se elimina la sangre desde el lecho vascular pulmonar, evitando trombosis y lesión endotelial por neutrófilos retenidos (Veith FJ et al., 1971). A partir de entonces, los pulmones son transportados de 4 a 8 °C en un estado parcialmente insuflado.

### **Solución de preservación:**

Trabajos experimentales e informes clínicos han favorecido el uso de soluciones extracelulares (coloides) sobre intracelulares (altas en potasio, cristaloides bajos en sodio) tipo soluciones de preservación (Steen S et al., 1993 & Arnaoutakis GJ et al., 2010). Ejemplos de soluciones extracelulares bajas en potasio incluyen al dextran (LPD)-solución de glucosa (por ejemplo, Perfadex (Vitrolife®, Suecia)) que fue desarrollada específicamente para la preservación del pulmón, solución de Cambridge, Celsion y Papworth. Papworth contiene lactato de Ringers, manitol, albúmina y sangre del donante. Euro-Collins y la Universidad de Wisconsin son soluciones intracelulares. Actualmente, Perfadex es la solución de preservación que se utiliza en la gran mayoría de los programas de trasplantes de pulmón en todo el mundo.

Los componentes clave de las soluciones LPD son el dextrano y la concentración baja de potasio. Dextrano-40 en la solución LPD que funciona como un agente oncótico, tiende a mantener el agua en el compartimiento intravascular, disminuyendo así la formación de edema intersticial. Dextrano-40 también reduce la agregación de eritrocitos y trombocitos circulantes, que puede mejorar la microcirculación y reducir la activación celular (Keshavjee SH et al., 1992).

La concentración baja en potasio mantiene las presiones normales de la arteria pulmonar durante la infusión. Un desarrollo es la solución extracelular basada en dextrano-glucosa. La adición de glucosa está diseñada para apoyar el metabolismo aeróbico y mantener la integridad celular durante la isquemia prolongada. Perfadex es una solución de glucosa-LPD que ahora está disponible en todo el mundo y de uso en los centros de trasplante pulmonar. La adición de glucosa a una solución de preservación de pulmón aprovecha el único aspecto de la fisiología pulmonar en trasplante; el pulmón insuflado tiene la capacidad de suministro de oxígeno a su parénquima incluso durante el almacenamiento.

Varios estudios han encontrado mejores resultados después del trasplante (por ejemplo, la frecuencia de disfunción primaria del injerto, duración de la dependencia al ventilador y mortalidad a 30 días) con la solución extracelular individual (Struber M et al., 2001 & Muller C et al., 1999 &

Rega F et al., 2003 & al obtener Thabut, 2001 & Oto T et al., 2006). Por ejemplo, un estudio retrospectivo examinó resultados en 310 trasplantes pulmonares consecutivos, cuyos pulmones de donantes fueron preservados con solución Euro-Collins, Papworth o Perfadex (Marasco SF et al, 2011). La preservación de pulmón con solución de Papworth se asoció con mayor mortalidad en comparación con las otras soluciones; preservación con Perfadex se asoció con una menor incidencia de disfunción primaria del injerto pulmonar en las primeras 48 horas.

Otro estudio examinó retrospectivamente la probabilidad de disfunción primaria del injerto pulmonar entre 157 pacientes consecutivos, cuyos pulmones fueron preservados con una de las tres soluciones de preservación del pulmón (Perfadex, Euro-Collins y Papworth) (Oto T et al, 2006). Perfadex fue superior en la prevención de los casos moderados a severos de la disfunción primaria del injerto y se evidenció una tendencia hacia la superioridad en la evolución post-trasplante (Muhlfield C et al., 2007 & Okada Y et al.,). En otro estudio retrospectivo, LPD (4161 receptores) se comparó con la solución (294 receptores) de la Universidad de Wisconsin (Arnaoutakis GJ et al., 2010). LPD se asoció con una menor mortalidad al año entre los receptores de alto riesgo, pero no se observó ninguna diferencia en la mortalidad general entre los grupos.

**Aditivos farmacológicos:** dos agentes farmacológicos, prostaglandinas y glucocorticoides se han utilizado ampliamente para la preservación del pulmón. Estos medicamentos son utilizados como pretratamiento del donante antes de lavar el pulmón y como tratamiento para el receptor, durante y después de la reperfusión.

**Prostaglandinas:** las prostaglandinas E1 (PGE1, alprostadil) e I2 (PGI2, prostaciclina, iloprost (un análogo de PGI2)) originalmente fueron elegidos para la preservación del pulmón, porque su actividad vasodilatadora compensaba la vasoconstricción inducida por el frío de la solución de preservación y permitían una mejor distribución de la perfusión (Puskas JD et al., 1992). Posteriores estudios han encontrado que las prostaglandinas tienen propiedades adicionales, particularmente la regulación de la expresión de citoquinas proinflamatorias que son probablemente las más importantes en el mejoramiento de isquemia-reperfusión (Novick RJ et al., 1992 & Gohrbandt B et al. 2005). Muchos centros inyectan rutinariamente en la arteria pulmonar PGE-1 justo antes de enjuagar con solución de preservación el pulmón, aunque se carecen de datos científicos en seres humanos.

**Metilprednisolona:** altas dosis de metilprednisolona se han convertido en un complemento empírico

de los protocolos clínicos más por sus acciones antiinflamatorias (Kirk AJ et al, 1993 & Venkateswaran RV et al., 2008). Metilprednisolona a 15 mg/kg, por lo general es administrada por vía intravenosa en el donante antes del rescate y en el receptor inmediatamente antes de la reperfusión

**Temperatura de la solución de preservación:** mientras la temperatura óptima se ha debatido, en la mayoría de los centros se utiliza una temperatura de 4 a 8 °C (De Perrot M et al., 2005). La hipotermia reduce la actividad metabólica, lo que puede mantener la viabilidad celular frente a la isquemia (5 por ciento de la tasa metabólica a 37 °C). La preservación de la temperatura fría sigue siendo un componente importante de la preservación pulmonar (DE Pegg, 1986 & Muller C et al., 1997).

**Flush anterógrado y retrógrado:** lavado anterógrado se refiere a la administración de la solución de limpieza a través de la arteria pulmonar, con drenaje de las venas pulmonares. Flush retrógrado se refiere a la administración de la solución a cada vena pulmonar, generalmente de 250 mL a cada una, con el desagüe a través de la arteria pulmonar. La combinación de ambos procesos parece lograr la mejor función pulmonar; la mayoría de centros de trasplantes combinan un lavado anterógrado seguido de una descarga retrógrada (Venuta F et al., 1999).

En un modelo experimental, una descarga retrógrada mejora la preservación del pulmón, en comparación con el lavado anterógrado solo (Struber M et al, 2002). Este efecto se atribuyó a un lavado más efectivo de eritrocitos en los capilares y a una mejor distribución de la solución. También proporciona la ventaja añadida de la eliminación de cualquier coágulo o émbolos en las arterias pulmonares.

**Volumen de solución de preservación:** aunque los datos científicos son limitados en relación con el volumen ideal de solución de preservación, típicamente alrededor de 60 mL/kg de la solución se infunde después de la extracción del pulmón, esto lava correctamente los pulmones de las células sanguíneas y enfría uniformemente los pulmones (De Perrot M et al., 2005). Generalmente este procedimiento toma entre 15 a 20 minutos (Fischer S et al, 2001).

**Presión de la infusión de solución de preservación:** los datos son limitados en cuanto a la presión óptima de la arteria pulmonar para la infusión de la solución de preservación. La necesidad de separación completa de la cama vascular tiene que ser equilibrada contra el riesgo de lesiones a la vasculatura pulmonar de baja presión (De Perrot M et al., 2005). Utilizamos normalmente una

presión de perfusión en la parte inferior (10 a 15 mm Hg) y no se excede de una presión de perfusión máxima de 22 mmHg (30 cm H<sub>2</sub>O) (Tanaka H et al., 1998 & Sasaki M et al., 1996). Una vez que haya salido del lecho vascular, la perfusión se interrumpe durante el almacenamiento.

**Insuflación de pulmón:** la insuflación de los pulmones con una mezcla de oxígeno durante el período de isquemia protege al pulmón. Sin embargo, la información científica sobre la presión y concentración de oxígeno ideal y la insuflación es limitada (DeCampos KN et al, 1998 & Kayano K et al., 1999). Basado en estudios en modelos animales, se cree que existen tres mecanismos principales que contribuyen al efecto protector de la insuflación con aire oxigenado:

- Mantenimiento del metabolismo aeróbico eficiente
- Preservación de la integridad pulmonar del surfactante
- Mejoramiento del transporte del fluido epitelial

La insuflación del pulmón es generalmente limitada al 50 por ciento de la capacidad pulmonar total o a una presión de las vías respiratorias de 20 cmH<sub>2</sub>O para evitar sobre distensión (DeCampos KN et al, 1998 & Kayano K et al., 1999). Generalmente, se utiliza una tensión de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>) que va desde el 30 al 50 por ciento. Una vez que han sido insuflados los pulmones, la tráquea se sujeta para almacenamiento.

**Temperatura de almacenamiento:** la temperatura ideal para el almacenamiento de pulmón de donantes sigue siendo incierto. La preservación entre 4 a 8 °C disminuye la actividad metabólica celular y preserva la función celular, sin embargo el almacenamiento en frío puede agravar algunos aspectos de la isquemia-reperfusión (De Perrot et al, 2003). Específicamente en el pulmón, la hipotermia puede causar aumento líquido extravascular y vasoconstricción pulmonar, contribuyendo a la disminución del intercambio del oxígeno y al aumento de la resistencia vascular después de la reperfusión. Algunos trabajos experimentales han sugerido que los pulmones que se conservan a 10 °C en lugar de 4 °C tienen una función pulmonar superior después del trasplante (Wang LS et al., 1989). Sin embargo, la temperatura más común para el almacenamiento de pulmón sigue siendo 4 °C, esto porque la logística de transporte puede prolongar el tiempo de almacenamiento y se requieren un margen de seguridad proporcionado por la temperatura más baja.

**Tiempo de isquemia:** no se conocen los tiempos isquémicos óptimos y aceptables, pero a mayor tiempo de isquemia, mayor es el riesgo de lesiones graves de reperfusión. El tiempo de isquemia de

hasta 8 horas generalmente se considera aceptable. El riesgo de disfunción primaria del injerto y el incremento de la mortalidad a 30 días, se observa con tiempos de isquemia superior a 8 horas. Sin embargo, tiempos de isquemia de hasta 10 o 12 horas han sido reportados (De Perrot M et al., 2003 & Ganesh JS et al., 2007 & Thabut G et al., 2005). Por lo tanto, la decisión de aceptar los pulmones con tiempos de isquemia prolongados se hace dentro de la constelación del paciente y en la evaluación de factores de riesgo predictivos en los donantes del pulmón (por ejemplo, edad, variables clínicas, historia de fumador, etc.) y también al examen del estado o condición del receptor.

**Trasplante de pulmón único (SLT):** el trasplante único de pulmón extiende el suministro limitado de donantes de órganos a más pacientes, pero ofrece menos función pulmonar como un búfer de complicaciones tardías. Se realiza una incisión de toracotomía posterolateral o anterolateral estándar de SLT. Mientras que la ventilación es sostenida en el pulmón contralateral, se extirpa el pulmón el cual es desinflado y movilizado. Si desarrolla hipoxemia irreversible, se conecta la arteria pulmonar para eliminar el shunt a través del pulmón desinflado, sin ventilación. La hipoxemia refractaria o inestabilidad hemodinámica en esta etapa sería una indicación de derivación cardiopulmonar, que está siempre en espera. Finalizada la disección, se deben salvaguardar los nervios frénico y vago en el lado izquierdo y se debe evitar el nervio laríngeo recurrente. Se extrae el pulmón nativo y se implanta el pulmón del donante. Las tres anastomosis se realizan de la región posterior a la anterior en secuencia anatómica: bronquio, arteria pulmonar y las venas pulmonares-aurícula izquierda.

**Bypass Cardiopulmonar:** la necesidad de la derivación ha sido difícil de predecir antes de la cirugía y varía con la enfermedad pulmonar del receptor. La derivación rara vez ha sido necesaria en recipientes con enfermedad pulmonar obstructiva, pero ha sido requerida entre el 17 a 41 por ciento de los pacientes con enfermedad pulmonar restrictiva (Hirt SW et al, 1992 & Triantafillou AN et al, 1994). Pruebas de función pulmonar preoperatoria y oxigenación en reposo no han sido discriminatorias; sin embargo los parámetros hemodinámicos preoperatorios pueden ser útiles (de Hoyos et al, 1993). En los pacientes con hipertensión pulmonar severa es más probable que se necesite de derivación. La presión de la arteria pulmonar siempre aumenta cuando se conecta la arteria pulmonar, más en pacientes con enfermedad restrictiva que en aquellos con enfermedad obstructiva, pero el cambio en el índice cardíaco en última instancia determina la necesidad de derivación. En pacientes con enfermedad restrictiva el bypass generalmente ha sido necesario, si la disminución en el índice cardíaco es mayor de 1.0 a 1.5 L/min/m<sup>2</sup> (Hirt SW et al.,

1992 & De Hoyos A et al, 1993).

**Anastomosis bronquial:** la anastomosis bronquial ha sido el sitio más vulnerable para las complicaciones. El riego sanguíneo bronquial a los pulmones del donante se interrumpe durante el trasplante, por lo que el bronquio donante es dependiente del flujo retrógrado de la sangre bronquial a través de la circulación pulmonar, a menos que se realice la directa revascularización bronquial. Originalmente, una anastomosis bronquial end-to-end, combinado con un omentopexy fue el enfoque estándar y la revascularización directa fue rara vez realizada (Cooper JD et al. 1987. Sin embargo, la técnica ha evolucionado considerablemente (Shennib H et al., 1994 & Griffith BP et al., 1994).

La cicatrización bronquial ha sido buena sin omentopexy o una envoltura de tejidos (Calhoon JH et al., 1991 & Colquhoun IW et al., 1994) y el uso de una anastomosis telescópica, con las porciones cartilaginosas de los donantes y los bronquios receptores intussuscepted, ahora se ve favorecido por la mayoría de los cirujanos.

La revascularización de la arteria bronquial es anatómicamente y técnicamente factible, pero las arterias bronquiales de los donantes deben salvarse cuando se rescatan los pulmones. La revascularización se logra por la anastomosis de la arteria bronquial de los donantes y para el receptor la arteria (mamaria), torácica interna. Esta técnica ha sido empleada con éxito en único y doble trasplante de pulmón, pero agrega algo de tiempo y complejidad a la operación (Daly RC et al., 1993 & Pettersson GB et al, 2010). Mientras la revascularización tiene un atractivo teórico, sus beneficios son inciertos y no ha sido ampliamente empleada (Patterson GA, 1993 & Inci I et al., 2010).

Una serie de 67 anastomosis bronquiales consecutivas para el trasplante de pulmón sugiere que las complicaciones anastomóticas son incommunes, con las actuales técnicas quirúrgicas que no utilizan la revascularización bronquial directa (Schmid RA et al., 1997). A lo largo de 236 exámenes con broncoscopía, sólo uno de 67 anastomosis (1.4%) mostró necrosis focal limitada.

**Perfusión normotérmica:** con el fin de aumentar la disponibilidad de donantes de órganos, se utilizan los órganos mayores y a veces lesionados del donante. El uso de los pulmones subóptimos de donantes y las dificultades de evaluación de la función pulmonar antes de la muerte cardíaca, han hecho necesario explorar una técnica alternativa de conservación (Maathuis MH et al., 2007) la preservación hipotérmica inhibe el metabolismo celular y elimina la posibilidad de importantes procesos reparadores que ocurren después de lesiones de órganos de donantes. Por esta razón la

normotermia (37 ° C) o cerca de normotérmica (25 a 34 ° C) perfusión ex vivo se está volviendo popular como una alternativa de preservación en el trasplante de riñón y el hígado (Brasile L et al, 2002 & Imber CJ et al. 2002). Intentos de usar una máquina de ventilación y perfusión para la preservación del pulmón han fracasado en el pasado, en gran medida debido al desarrollo de edema pulmonar y aumento en la resistencia vascular pulmonar (Hardesty RL et al., 1987 & Genco CM et al., 1992).

Un sistema de perfusión acelular ex vivo pulmonar (EVLP) puede mantener los pulmones de donantes durante al menos 12 horas a temperatura corporal sin inducir lesiones, esto ha sido probado en los pulmones humanos y porcinos (Cypel M et al., 2008 & Cypel M et al, 2009). Después del uso prolongado EVLP, la función pulmonar después del trasplante fue excelente. Usando esta técnica de perfusión acelular se permite la evaluación de la función pulmonar ex vivo. Sin embargo otro modelo animal de EVLP tuvo menos éxito; con seis horas de EVLP los problemas pulmonares se manifestaron por una mayor resistencia vascular pulmonar (PVR) y una mayor presión en la vía aérea hacia el final del procedimiento (Erasmus ME et al., 2006). Un ensayo clínico en curso utiliza la perfusión ex vivo normotérmica del pulmón, como un método para evaluar el pulmón de donantes y optimiza inicialmente todos los parámetros para el trasplante y su transporte demostrando el beneficio de este sistema (Wallinder A, et al, 2012 y 2014).

### **RECURSOS DISPONIBLES:**

**Plantas físicas y equipos:** Laboratorio de experimentación animal ICESI que cuenta con quirófano y la dotación necesaria para el procedimiento quirúrgico, Bioterio ICESI y laboratorio de patología y medicina de laboratorio de la Fundación Valle del Lili donde se cuenta con equipos de histología, histoquímica, citología en base líquida, inmunohistoquímica, citometría de flujo, extracción de DNA, equipos para cuantificación y control de calidad del DNA, equipos para realizar estudios de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real ( PCR), termocicladores, citómetros de flujo, microscopios de luz y microscopio de inmunofluorescencia para hibridación in situ fluorescente (FISH) en el laboratorio de citogenética.

**Recurso humano:** Contamos con un equipo humano multidisciplinario, donde todos los participantes somos médicos formados, con especialidad y subespecialidad en hematología, cirugía de trasplante pulmonar, cirugía cardiovascular, anestesiología pulmonar, neumología intervencionista, patología pulmonar, patología molecular y genética molecular. Contamos con un PhD en genética,

un PhDc en ciencias biomédicas y un estudiante de maestría en biología molecular en nuestro grupo. Además del personal técnico quirúrgico, circulante, técnico veterinario, bacteriológico, biólogo molecular y cuidado veterinario especializado en el manejo de este biomodelo porcino.

## **RECURSOS NECESARIOS**

### **Personal: (Recursos convocatoria):**

1 personal tipo A (Maestría)

### **Materiales: (Recursos convocatoria):**

Insumos varios para laboratorios cultivo celular.

Insumos varios para la extracción de medula ósea.

Insumos varios para laboratorio de histología, citología en base líquida, inmunohistoquímica, citometría de flujo, citogenética y genética molecular.

Materiales para los procedimientos quirúrgicos.

### **Servicios técnicos: (Recursos convocatoria)**

Servicio de Bioterio universidad ICESI para el mantenimiento de los biomodelos.

### **Equipos (Recursos convocatoria)**

Equipos de fibrobroncoscopia, torre de video y pinzas transbronquiales.

## **PRODUCTOS ENTREGABLES ASOCIADOS A LA INVESTIGACIÓN EN PULMÓN EN EL PROYECTO:**

- Tendremos un procedimiento documentado, controlado, con trazabilidad y estandarizado metodológicamente en animales en el cual estaríamos demostrando su seguridad en humanos.
- Al finalizar la investigación se obtendrá un biomodelo porcino quimerizado con la capacidad de determinar los tiempos máximos y mínimos de quimerización y su respuesta a la terapia inmunosupresora que nos darán una luz de la eficacia del procedimiento y del futuro del injerto.
- Se desarrollarán dos metodologías de seguimiento en biopsia para evaluar la quimerización con pruebas de patología molecular y genética molecular.
- Iniciaremos una integración para la investigación regional en terapias avanzadas logrando

hacer una medicina de traslación.

### **EXPERIMENTOS TOTALES ENTREGABLES (PULMÓN):**

Experimentos in vitro	Experimentos in vivo subcutáneos quimerizados con y sin inmunosupresión	Experimentos in vivo trasplante de órgano completo quimerizado y no quimerizado
<b>20</b>	<b>10</b>	<b>12</b>

### **BIBLIOGRAFÍA.**

Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA, van Krieken JH: Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 2001, 357:33-37.

Kleeberger W, Rothamel T, Glockner S, Flemming P, Lehmann U, Kreipe H: High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis. *Hepatology* 2002, 35:110-116.

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P: Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002, 346:5-15.

Kleeberger W, Versmold A, Rothamel T, Glockner S, Bredt M, Haverich A, Lehmann U, Kreipe H: Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury. *Am J Pathol* 2003, 162:1487-1494.

Ikonen TS, Brazelton TR, Berry GJ, Shorthouse RS, Morris RE: Epithelial regrowth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats. *Transplantation* 2000, 70:857-863.

Qu N, de Vos P, Schelfhorst M, de Haan A, Timens W, Prop J: Integrity of airway epithelium is essential against obliterative airway disease in transplanted rat tracheas. *J Heart Lung Transplant* 2005, 24:882-890.

Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM, Glanville A, Gould FK, Magro C, Marboe CC, McNeil KD, Reed EF, Reinsmoen NL, Scott JP, Studer SM, Tazelaar HD, Wallwork JL,

Westall G, Zamora MR, Zeevi A, Yousem SA: Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant* 2007, 26:1229-1242.

Monaco AP: Chimerism in organ transplantation: conflicting experiments and clinical observations. *Transplantation* 2003, 75:13S-16S.

Toungouz M, Donckier V, Goldman M: Tolerance induction in clinical transplantation: the pending questions. *Transplantation* 2003, 75:58S-60S.

Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ricordi C, Ildstad S, Terasaki PI, Murase N, Kendall RS, Kocova M, Rudert WA: Chimerism after liver transplantation for type IV glycogen storage disease and type 1 Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1993, 328:745-749.

Bonilla WV, Geuking MB, Aichele P, Ludewig B, Hengartner H, Zinkernagel RM: Microchimerism maintains deletion of the donor cellspecific CD8+ T cell repertoire. *J Clin Invest* 2006, 116:156-162.

Araujo MB, Leonardi LS, Boin IF, Leonardi MI, Magna LA, Donadi EA, Kraemer MH: Development of donor-specific microchimerism in liver transplant recipient with HLA-DRB1 and -DQB1 mismatch related to rejection episodes. *Transplant Proc* 2004, 36:953-955.

Starzl TE: Immunosuppressive therapy and tolerance of organ allografts. *N Engl J Med* 2008, 358:407-411.

Nusair S, Or R, Junadi S, Amir G, Breuer R: Simultaneous donor marrow cell transplantation with reduced intensity conditioning prevents tracheal allograft obliteration in a bronchiolitis obliterans murine model. *Chest* 2005, 128:4024-4029.

Li S, Salgar SK, Thanikachalam M, Murdock AD, Gammie JS, Demetris AJ, Zeevi A, Pham SM: CTLA4-Ig-based conditioning regimen to induce tolerance to cardiac allografts. *J Surg Res* 2006, 136:238-246.

Koyama I, Nadazdin O, Boskovic S, Ochiai T, Smith RN, Sykes M, Sogawa H, Murakami T, Strom TB, Calvin RB, Sachs DH, Benichou G, Cosimi AB, Kawai T: Depletion of CD8 memory T cells for induction

of tolerance of previously transplanted kidney allograft. *Am J Transplant* 2007, 7:1055-1061.

Li S, Salgar SK, Kurimoto Y, Yousem S, Pham SM: Mixed chimerism achieved by a nonlethal conditioning regimen induces donor-specific tolerance to lung allografts. *J Surg Res* 2008, 146:289-297.

Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Millan MT, Shizuru JA, Hoppe RT, Lowsky R, Engleman EG, Strober S: Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008, 358:362-368.

Pham SM, Rao AS, Zeevi A, McCurry KR, Keenan RJ, Vega JD, Kormos RL, Hattler BG, Fung JJ, Starzl TE, Griffith BP: Effects of donor bone marrow infusion in clinical lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2000, 69:345-350.

Di Rienzo G, Go T, Macchiarini P. Simplified anastomotic technique for end-to-side bronchial reimplantation onto the trachea or contralateral main bronchus after complex tracheobronchial resections. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 Sep;124(3):632-5.

Strome M, Jeanine S, Ramon E, Douglas H, Robert R, William B et al. Brief report: laryngeal transplantation and 40 months follow-up. *New Engl J Me* 2001: 344: 1676-1679.

Hollander A, Macchiarini P, Gordijn B, Birchall M. The first stem cell-based tissue-engineered organ replacement: implications for regenerative medicine and society. *Regen Med*. 2009 Mar;4(2):147-8. doi: 10.2217/17460751.4.2.147.

Woodrow JP, Shlobin OA, Barnett SD, Burton N, Nathan SD: Comparison of bronchiolitis obliterans syndrome to other forms of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2010, 29:1159-64.

Steen S, Ingemansson R, Eriksson L, Pierre L, Algotsson L, Wierup P, Liao Q, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Sjöberg T. First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2007;83: 2191-2194 [PMID: 17532422 DOI: 10.1016/j.athoracsur.2007.01.033]

Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet* 2001; 357: 25-29 [PMID: 11265950 DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04195-7]

Guías clínicas, quirúrgicas e histopatológicas 2013 y 2014. The International Society for Heart & Lung Transplantation. <http://www.ishlt.org/publications/guidelines.asp>

Hardy JD, Webb WR, Dalton ML Jr, Walker GR Jr. Lung homotransplantation in man. *JAMA* 1963; 186:1065.

Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl Med* 1982; 306:557.

Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto lung transplant group. *N Engl J Med* 1986; 314:1140.

Cooper JD, Patterson GA, Grossman R, Mauer J. Double-lung transplant for advanced chronic obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1989; 306:557.

Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report-2010. *J Heart lung transplant* 2010, 29: 1104.

Division of transplantation, Bureau of health resources development. 2005 Annual Report of the US scientific registry for transplant recipients and the organ procurement and transplantation network-Transplant data: 1995-2004. Health resources and services administration; US department of health and human services, Rockville, MD, 2005.

Ware LB, Wang Y, Fang X, et al. Assessment of lungs rejected for transplantation and implications for donor selection. *Lancet* 2002; 360:619.

Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L, et al. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2009; 87: 255.

Cypel M, Rubacha M, Yeung J, et al. Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9: 2262.

De Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 490.

De Perrot M, Bonser RS, Dark J, et al. Report of the ISHLT working group on primary lung graft dysfunction part III: donor-related risk factors and markers. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1460.

Hopkinson DN, Bhabra MS, Hooper TL. Pulmonary graft preservation a worldwide survey of current clinical practice. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 525.

Fischer S, Matte-Martyn A, De Perrot M, et al. Low-potassium dextran preservation solution improves lung function after human lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121:594.

Veith FJ, Sinha SB, Graves JS, et al. Ischemic tolerance of the lung. The effect of ventilation and inflation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1971; 61: 804.

Steen S, Sjoberg T, Massa G, et al. Safe pulmonary preservation for 12 hours with low-potassium-dextran solution. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 434.

Arnaoutakis GJ, Allen JG, Merio CA, et al. Low potassium dextran is superior to University of Wisconsin solution in high-risk lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2010; 29:1380.

Keshavjee SH, Yamazaki F, Yokomise H, et al. The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103: 314.

Struber M, Wilhelmi M, Harringer W, et al. Flush perfusion with low potassium dextran solution improves early graft function in clinical lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 19:190.

Muller C, Furst H, Reichenpurner H, et al. Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. *Munich Lung Transplant Group. Transplantation* 1999; 68: 1139.

Rega F, Verleden G, Vanhaecke J, et al. Switch from Euro-Collins to perfadex for pulmonary graft preservation resulted in superior outcome in transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22 Suppl 1: S111.

Thabut G, Vinatier I, Brugiere O, et al. Influence of preservation solution on early graft failure in clinical lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1204.

Oto T, Griffiths AP, Rosenfeldt F, et al. Early outcomes comparing Perfadex, Euro-Collins, dan Papworth solutions in lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 2006; 82:1842.

Marasco SF, Bailey M, McGlade D, et al. Effect of donor preservation solution and survival in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 414.

Muhlfeld C, Muller K, Pallesn LP, et al. Impact of preservation solution on the extent of blood-air transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30:414.

Okada Y, Kondo T. Impact of lung preservation solutions, Euro-Collins vs low-potassium dextran, on early graft function: a review of five clinical studies. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 12:10.

Puskas JD, Cardoso PF, Mayer E, et al. Equivalence of eighteen-hour lung preservation with low-potassium dextran or Euro-Collins solution after prostaglandin E1 infusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 104:83.

Novick RJ, Menkis AH, McKenzie FN. New trends in lung preservation: a collective review. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11: 377.

Gohrbandt B, Sommer SP, Fischer S, et al. Iloprost to improve surfactant function in porcine pulmonary grafts stored for twenty-four hours in low-potassium dextran solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129:80.

Pegg DE. Organ preservation. *Surg Clin North Am* 1986; 66: 617.

Muller C, Hoffmann H, Bittmann I, et al. Hypothermic storage alone in lung preservation for

transplantation: a metabolic, light microscopic, and functional analysis after 18 hours of preservation. *Transplantation* 1997; 63:625.

Venuta F, Rendina EA, Bui M, et al. Preimplantation retrograde pneumoplegia in clinical lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118: 107.

Struber M, Honfeld JM, Kofidis T, et al. Surfactant function in lung transplantation after 24 hours of ischemia: advantage of retrograde flush perfusion for preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 98.

Fischer S, Matte-Martyn A, De Perrot M, et al. Low-potassium dextran preservation solution improves lung function after human lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 594.

Tanaka H, Chiba Y, Sasaki M, et al. Relationship between flushing pressure and nitric oxide production in preserved lungs. *Transplantation* 1998; 65:460.

Sasaki M, Muraoka R, Chiba Y, Hiramatu Y. Influence of pulmonary arterial pressure during flushing on lung preservation. *Transplantation* 1996; 61:22.

Kayano K, Toda K, Naka Y, Pinsky DJ. Identification of optimal conditions for lung graft storage with Euro-Collins solution by use of a rat orthotopic lung transplant model. *Circulation* 1999; 100: 11257.

Wang LS, Yoshikawa K, Miyoshi S, et al. The effect of ischemic time and temperature on lung preservation in a simple ex vivo rabbit model used for functional assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989; 98:333.

Ganesh JS, Rogers CA, Banner NR, et al. Does the method of lung preservation influence outcome after transplantation? An Analysis of 681 consecutive procedures. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 134:1313.

Thabut G, Mal H, Cerrina J, et al. Graft ischemic time and outcome of lung transplantation a multicenter analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:786.

Brasile L, Stubenitsky BM, Kootstra G. Solving the organ shortage: potential strategies and the

likelihood of success. *ASAIO J* 2002; 48: 211.

Imber CJ, St Peter SD, Lopez de Cenarruzabeitia I, et al. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation* 2002; 73:701.

Hardesty RL, Griffith BP. Autoperfusion of the heart and lungs for preservation during distant procurement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93:11.

Genco CM, Connolly RJ, Peterson MB, et al. Granulocyte sequestration and early failure in the autoperfused heart-lung preparation. *Ann Thorac Surg* 1992; 53:217.

Steen S, Liao Q, Wierup PN, et al. Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 244.

Steen S, Sjoberg T, Pierre L, et al. Transplantation of lungs from non-heart-beating donor. *Lancet* 2001; 357:825.

Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, et al. Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27:1319.

Cypel M, Rubacha M, Yeung J, et al. Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9:2262.

Erasmus ME, Fernhout MH, Elstrodt JM, Rakhorst G. Normothermic ex vivo lung perfusion of non-heart-beating donor lungs in pigs: from pretransplant function analysis towards a 6h machine preservation. *Transpl Int* 2006; 19:589.

Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques, Freshney, R. I. (ed.) 6th ed., Wiley, New York. 2010

Basic Cell Culture Protocols METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™ Volume 290 THIRD EDITION  
Edited by Cheryl D. Helgason Cindy L. Millar HUMANA PRESS

Cell Biology Protocols . Edited by J . Robin Harris, John Graham, David Rickwood. John Wiley & Sons, L td. England 2006

Embryonic Stem Cells Methods and Protocols Methods in Molecular Biology VOLUME 185 Edited by Kursad Turksen HUMANA PRESS 2002

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death Differ 16:1093-107, 2009

Tissue Engineering. Clemens van Blitterswijk (ed), Academic Press is an imprint of Elsevier, First edition 2008

Principles of tissue Engineering. Robert Lanza, Robert Langer, Joseph Vacanti (ed) Academic Press is an imprint of Elsevier, Third edition 2007

STEM CELL RESEARCH: Medical Applications and Ethical Controversy. Joseph Panno, Facts On File, Inc. New York. 2005.

Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. John G. Day (ed). Second Edition. Humana Press Inc. 2007

Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice. Regine Eibl, Dieter Eibl, Ralf Pörtner, Gerardo Catapano, Peter Czermak (ed), Springer -Verlag Berlin Heidelberg. 2009

Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W et al. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. N Engl J Med 2011;364:1431–40.

Wallinder A, Ricksten SE, Hansson C, Riise GC, Silverborn M, Liden H et al. Transplantation of initially rejected donor lungs after ex vivo lung perfusion. J Thorac Cardiovasc Surg 2012;144:1222–8.

Wallinder A, Ricksten SE, Silverborn M, Hansson C, Riise GC, Liden H et al. Early results in transplantation of initially rejected donor lungs after ex vivo lung perfusion: a case-control study. Eur

### ***5.3.2 .PÁNCREAS: Quimerización de páncreas para la obtención de islotes pancreáticos para trasplante en modelo animal.***

#### **GRUPOS PARTICIPANTES:**

- Grupo Farmacología-Univalle - Escuela de Ciencias Básicas, Universidad del Valle
- Grupo de Investigación Clínica de la Fundación Valle del Lili
- Universidad ICESI

#### **MARCO TEÓRICO**

La prevención y el tratamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles se considera ahora una de las prioridades en países donde antes la mayoría de los recursos se destinaban a los problemas materno- infantiles y enfermedades infecciosas.

Dentro de las ECNT, ocupa puesto de primera línea la Diabetes mellitus, considerada la **pandemia más importante del siglo XXI**, pues la tasa de crecimiento tiene características casi catastróficas en muchos países, aunado al incremento de otro flagelo, la obesidad y el síndrome metabólico.

Con el impulso dado por la Declaración de las Américas (DOTA) varios países están desarrollando programas nacionales de diabetes. La diabetes como un problema de salud pública está aumentando en Latinoamérica.<sup>1</sup>

La Diabetes mellitus 1 (DM1) es causada por la destrucción autoinmune de las células que secretan insulina en el páncreas. La falta de insulina da por resultado un nivel elevado de azúcar en la sangre (hiperglicemia). La DM no tratada puede llevar a cetoacidosis diabética a corto plazo, y a largo plazo a daño del riñón, ceguera, y enfermedad cardíaca severa. El tratamiento convencional de DM 1 se basa en la provisión de insulina exógena. Aunque esta terapia ha sido el soporte principal de manejo de DM durante los últimos 80 años, no es el más óptimo.

Desde que Banting y Best aislaron por primera vez Insulina (entonces conocida como “secreción interna”) de islotes de Langerhans purificados el 30 de julio de 1921, y demostraron que podía reducir el nivel de azúcar en un paciente con DM1, el remplazo de islotes pancreáticos ha

permanecido como la mejor esperanza para curar la enfermedad.<sup>2</sup>

Sin embargo esta posibilidad ha probado ser más difícil que lo anticipado originalmente. Minkowski fue el primero en proponer la inyección de extracto pulverizado de páncreas en 1889, pero encontró que los efectos tóxicos eran inaceptables. Setenta y seis años más tarde Moskalewski demostró que los islotes de páncreas de un cobayo podían modificarse.<sup>3</sup> Desde entonces se han hecho muchos esfuerzos encaminados al refinamiento de técnicas de aislamiento en numerosas especies, incluyendo humanos.

Durante los últimos veinte años se han hecho esfuerzos significativos para desarrollar alternativas de tratamiento de la DM1. Un enfoque general ha sido desarrollar mejores insulinas, y sistemas mejorados de suministro de insulina, como el páncreas artificial, que es una bomba de infusión de insulina regulada por un sensor interno de glucosa. Aunque se han hecho grandes progresos con estos sistemas, ellos tienen inconvenientes, incluyendo el hecho que son mecánicos, costosos y sujetos al fracaso.

Un segundo enfoque es el trasplante de páncreas completo puede dar control metabólico normal de la Diabetes.<sup>4,5</sup> De hecho, éste enfoque de tratamiento ha demostrado evitar la recurrencia de enfermedad renal en receptores de injertos de riñón, revertir lesiones existentes de complicaciones diabéticas y mejorar la mortalidad en un grupo de pacientes con neuropatía autonómica.<sup>6-8</sup> Sin embargo, el trasplante de órgano completo requiere cirugía mayor, inmunosupresión de por vida, e impone otros riesgos, de tal manera que los endocrinólogos han recomendado éste procedimiento a sus pacientes sólo cuando se ha requerido también un trasplante de riñón.

**Otra posibilidad es la del trasplante de islotes pancreáticos de humanos o de fuentes animales para reemplazar las células nativas destruidas.** EL trasplante de islotes ofrece la ventaja de ser mínimamente invasivo, y por lo tanto de riesgo reducido. La seguridad, eficacia potencial y riesgos mínimos del procedimiento son responsables del interés persistente en él.<sup>9</sup>

Además, el trasplante de islotes ofrece una alternativa al incluir nuevas estrategias de inducción de tolerancia de tejidos trasplantados evitando la necesidad de inmunosupresión vitalicia<sup>10-16</sup>. ***Aún en caso de fallo del injerto de islotes, el paciente no tendrá daños significantes y solo revertirá al estado de necesitar insulina.*** El desafío de éste último enfoque es que el material trasplantado sufre los ataques autoinmunes de las células originales, además que por ser “tejido extraño”, están sujetas al rechazo del injerto por el receptor. Para superar estos problemas, se

requiere de medicamentos especiales (con efectos colaterales significativos) diseñados para suprimir la respuesta inmune del cuerpo, y preparaciones especiales de los islotes para que los trasplantes puedan tener éxito.

Es posible que las fallas del pasado tengan origen en las dificultades para recuperar islotes humanos, trasplante de cantidades insuficientes de islotes, los efectos antagónicos de las drogas inmunosupresoras, incluyendo calcineurina y glucocorticoides, rechazo del injerto y enfermedad autoinmune recurrente. Más recientemente se ha reportado éxitos usando métodos que vencen los problemas técnicos y terapéuticos del pasado, incluyendo inmunosupresión crónica y el requerimiento de número grande de islotes. En la actualidad se están haciendo esfuerzos grandes para desarrollar estrategias variadas de tipo inmunológico, molecular y celular de manera tal que éste tratamiento pueda ser disponible para la mayoría de pacientes con Diabetes insulino dependiente.<sup>17,18</sup>

El trasplante de islotes es posible en Colombia teniendo en cuenta la normatividad nacional (Leyes 9ª de 1979 y 73 de 1988, en relación con los componentes anatómicos, y Decreto 2493 04/08/2004).

El trasplante de islotes de páncreas para el tratamiento de los pacientes insulino dependientes, con control inadecuado de la glicemia a pesar de la terapia con insulina, lleva en investigación más de 20 años. Sin embargo la esperanza que tal enfoque resultaría en libertad a largo plazo de la necesidad de insulina exógena, con la estabilización de las complicaciones secundarias de la diabetes, no se han materializado en la práctica. De los alotransplantes desde 1990, únicamente el 12.4% ha producido independencia de la insulina por períodos mayores de una semana, y sólo el 8.2% por un período mayor de un año.

En la mayoría de éstos procedimientos se requiere un régimen de inmunosupresión consistente en la inducción de anticuerpos con una globulina anti linfocítica combinada con ciclosporina, azatioprina y glucocorticoides.

EL grupo de Shapiro en Canadá logró demostrar la viabilidad de trasplantes de islotes en pacientes con Diabetes tipo 1, que presentaban inestabilidad metabólica e historia de episodios severos de hipoglicemia, sin trasplante concurrente de otro órgano. Los resultados publicados indican que **el trasplante de islotes puede producir independencia de insulina con excelente control metabólico**.

## **JUSTIFICACIÓN**

Se calcula que en los próximos 10 años, el número de diabéticos en el mundo aumentará drásticamente, hasta alrededor de 350 millones, incrementando proporcionalmente los costos por las complicaciones. Es además una de las enfermedades infantiles crónicas más comunes.

Para Latino América (LA), con 500 millones de habitantes, la prevalencia de DM en zonas urbanas oscila entre 7% y 8%, mientras en zonas rurales entre el 1% y el 2%, y se espera un aumento de 14% de la prevalencia de DM en los próximos 10 años, con lo cual se alcanzará una cifra de 20 millones de diabéticos.<sup>1</sup>

El mayor determinante del desarrollo de complicaciones tardías es la exposición prolongada a la hiperglicemia. No hay duda que una terapia con regímenes de Insulina Intensivos reducen la aparición y el progreso de complicaciones de Diabetes, pero ellos no son fisiológicos y conllevan el riesgo creciente de producir Hipoglicemia severa, además de constituir un problema difícil de manejar por los pacientes y sus familias.

La razón para el trasplante de islotes es el de proveer control fisiológico del estado metabólico de la DM1, y prevenir las complicaciones a largo plazo de la enfermedad, como lo enfatizan los hallazgos del Ensayo de Control y Complicaciones de la Diabetes (DCCT): el control intensivo de la enfermedad ha demostrado reducir y retardar la incidencia de complicaciones relacionadas con la enfermedad.<sup>19</sup> Pero incluso bajo el mejor cuidado, los niveles de azúcar en sangre no vuelven al nivel normal, y los individuos que reciben la insulina exógena son susceptibles a las reacciones de hipoglicemia con riesgos para la vida.(aunque algunos individuos pueden alcanzar niveles de control de la glucosa cercanos a lo normal con el uso de inyecciones de insulina), estimados en tres a cuatro veces más comunes que con una terapia de metas de control de los niveles de glucosa más laxas. La hipoglicemia recurrente con pérdida de las respuestas de glucagón y catecolaminas pueden llevar a que el paciente no se dé cuenta de la hipoglicemia, lo que requiere una monitoria concienzuda de los niveles de glucosa para evitar daños neurológicos y cognitivos. Así mientras se ha demostrado claramente la necesidad de un control metabólico normal, otros medios para conseguir éste control fisiológico no ha sido establecido.

También, se han ensayado varios enfoques diferentes de tratamiento, con el objeto de restaurar la producción normal de insulina en Humanos. La mayoría de ellos se ha enfocado a trasplante de páncreas completo o de islotes. También se están desarrollando tratamientos alternativos al trasplante que incluyen la micro encapsulación de islotes, la modificación

inmune de islotes, y la substitución de las células maduras humanas por islotes animales o fetales.<sup>20-22</sup>

A pesar de los desafíos, ha habido mejoras crecientes en la proporción de éxito de los trasplantes de islotes. Aproximadamente 30 centros mundiales realizan trasplantes de islotes, y en los últimos diez años, se han realizado aproximadamente 400 trasplantes. Mejoras en las técnicas de cultivo, y regímenes de inmunosupresión modificada han conducido a supervivencia prolongada del injerto.

Los resultados más impresionantes han sido informados por el equipo de la Universidad de Alberta en Edmonton, Canadá, usando un régimen inmunosupresor libre de glucocorticoides, este grupo ha podido mantener la viabilidad del injerto por un periodo medio de seguimiento de un año. Los resultados de este y otros centros son muy animadores.

El protocolo de Edmonton usado en varios centros alrededor del mundo, representa una “prueba de principio” que el trasplante de islotes pudiera eliminar la necesidad de la terapia con insulina.

En nuestro laboratorio de In Vitro, Farmacología, Facultad de Salud, Universidad del Valle en Cali se utilizará el protocolo de Alberta (Canadá) modificado por el Diabetes Research Instituto de la Universidad de Miami, para la obtención y purificación de las células de los islotes  $\beta$  de páncreas.

## **OBJETIVOS QUIMERIZACIÓN DE PANCREAS**

### **Objetivo General:**

Implementar el proceso de quimerización de páncreas en modelo animal para evitar el rechazo post trasplante y disminuir la terapia de inmunosupresión de órganos

### **Objetivos Específicos:**

- Quimerización de páncreas previo a aislamiento.
- Aislamiento y cultivo de los Islotes pancreáticos.
- Subsecuente implante, en subserosa gástrica.
- Encapsulamiento químico – alginato polilisina o similares.
- Almacenamiento en dispositivo de platino para implante intraabdominal.
- Realizar el Trasplante de Islotes quimerizados y encapsulados.

## **ANTECEDENTES**

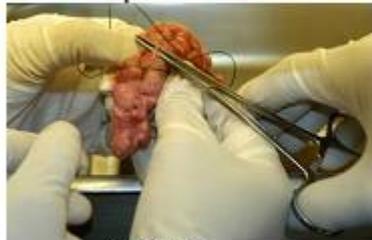
**Trasplante de páncreas e islotes pancreáticos:** varios cientos de tales trasplantes se han hecho. La tasa de éxito del procedimiento del islote ha ido mejorando y pronto podrá rivalizar con la tasa de éxito del trasplante de riñón, mayor al 80 por ciento. Sin embargo, todos estos trasplantes dependen de inmuno- supresión para evitar el rechazo del implante — y los métodos actuales de inmunosupresión tienen efectos secundarios que rivalizan con la morbilidad de la diabetes. Vemos poca probabilidad de inmuno- supresión sin complicaciones en el futuro cercano (en colaboración con la clínica Fundación Valle del Lili, se efectuó el primer aislamiento y trasplante de islotes en Colombia a un paciente previamente trasplantado de riñón, con éxito parcial).



Transporte de Pancreas



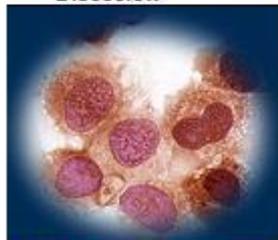
Diseccion



Diseccion



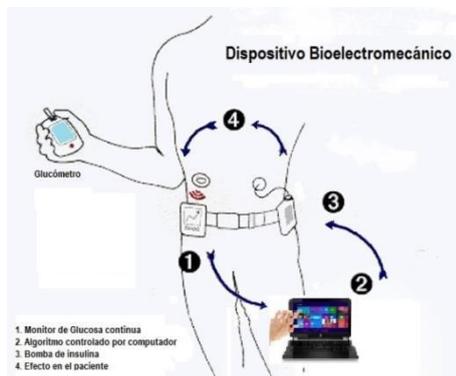
Aislamiento



Islotes aislados



Implante de islotes



**Dispositivos bioelectromecánicos (Bomba de insulina acoplada a sensor):** se está desarrollando un páncreas electromecánico, que combina un sensor de glucosa, una bomba de insulina con un reservorio y una computadora para determinar la velocidad de la bomba. Una versión que incorpora los dos primeros ya está siendo utilizada por muchos diabéticos, y en este campo se ha avanzado rápidamente. La principal dificultad ha sido que no hay ningún sensor de glucosa lo suficientemente sensible, preciso y estable. Por otra parte, la investigación sugiere fuertemente que un sensor solo no puede controlar la bomba de

insulina en la ausencia de información acerca de la ingesta calórica, ya que está determinada por la información suministrada por el paciente. La mayoría de la experimentación clínica hasta el momento se limita a períodos nocturnos, cuando no se consume comida.

**Medicamentos y terapia de células madre:** algunos investigadores están tratando de desarrollar medicamentos para controlar el funcionamiento inmune defectuoso que ataca las células beta e islotes. Otros están trabajando en drogas que pueden regenerar las células beta o mantenerlas con vida y funcionamiento. En un estudio, inyectando a pacientes con sus propias células madre, para reemplazar las células inmunes disfuncionales, permitió el re-crecimiento de células  $\beta$  productoras de insulina por un tiempo limitado.

**Genética e Ingeniería celular:** en este enfoque, las células están diseñadas para evadir el sistema inmunológico del hospedero. Esto puede acompañarse de inmunosupresión específica. Aunque prometedor, la tasa de progreso hasta el momento indica que evasión inmune completa por células producidas por Bioingeniería (en ausencia de una barrera física) no será posible durante muchos años.

**Páncreas Bioartificial:** el páncreas bioartificial contiene islotes funcionales o células vivas y en una matriz artificial. La matriz puede ser en principio muchos polímeros diferentes; una especie común es el alginato. El componente celular puede ser islotes primarios de Langerhans (cosechadas de donantes vivos o animales), líneas de células cultivadas o cultivos de células genéticamente fabricadas. *(En ésta fase se tratará de quimerizar páncreas de cerdo previo al aislamiento, y posterior encapsulación y almacenamiento en un reservorio de Platino /Iridio, aleación totalmente inerte y de uso común en implantes en diferentes tejidos. En una fase posterior se harán los ensayos de xenotrasplantes - ver Australia, con Quimerización del Páncreas de cerdo previo al aislamiento de los islotes - Este es el enfoque adoptado por nuestro proyecto).*

## **ANTECEDENTES DE LOS INVESTIGADORES EN EL DESARROLLO DE LA TEMÁTICA**

### **Islotes – aislamiento.**

Entre los años 2002 y 2005 en colaboración con el equipo de trasplantes de la Fundación Valle del

Lili, se realizaron unos ensayos preliminares de procesamiento de tejido pancreático, obtención de islotes y viabilidad de los mismos. Se procesaron 29 páncreas completos obtenidos de donadores de órganos con corazón batiente (los demás órganos fueron utilizados en los diferentes programas de trasplantes en varios centros del país.

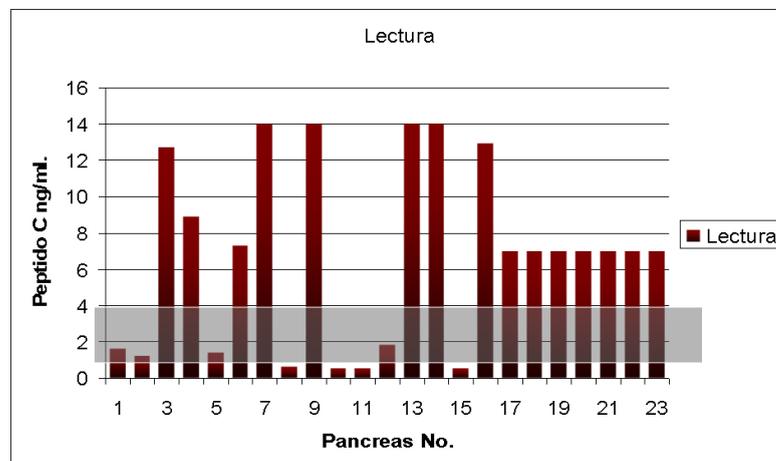
Inmediatamente después de obtenido los órganos, extraídos de acuerdo a las técnicas descritas, se transportaron al laboratorio de IN VITRO en solución de Wisconsin refrigerada. Después de retirar las cápsulas, se cortó cada órgano en trozos pequeños, y se colocó en solución de disociación. Se efectuó separación por gradiente de densidad, se analizó viabilidad total (no diferencia células endocrinas de exocrinas) por el método XTT<sup>®</sup> Roche, y se criopreservaron las muestras para análisis de funcionalidad por determinación de Péptido C.). De ellos se recolectó buen número de islotes en 20 de los órganos procesados.

**Resultados del programa conjunto In Vitro – FVL 2003 – 2006:** (Presentados en reunión de Cosesan en 2006, y simposio de investigaciones, Universidad del Valle, 2007).

Resultados:

CASOS PROCESADOS	29
CASOS ANALIZADOS	20
PROMEDIO EDAD	23.4 Años
TIEMPO MEDIO INICIO PROCESO	1 hora
PROMEDIO VIABILIDAD (AT - XTT)	85%
H	16
M	7

#### Determinación de Péptido C (ng/mL)



### Resultados del aislamiento de Islotes.

Edad	Sexo	Peptido C	Viabilidad (AT)	Viabilidad XTT
22	M	1.6	95%	1.004
12	M	1.2	87%	1.024
25	F	12.7	89%	2.800
19	M	8.9	83%	2.290
28	M	1.4	75%	1.100
20	F	7.3	85%	1.450
15	M	> 14.0	88%	2.626
23	F	0.61	82%	1.000
18	M	> 14.0	96%	2.731
35	M	< 0.5	88%	1.040
35	F	< 0.5	88%	1.001
11	F	1.8	70%	1.040
35	F	>14.0	95%	2.731
13	M	>14.0	94%	2.607
15	M	< 0.5	75%	1.004
35	F	12.9	89%	2.430
22	M	>7	80%	1.613
18	M	>7	72%	2.290
22	M	>7	90%	2.320
52	M	>7	89%	2.179
23	M	>7	75%	2.731
22	M	>7	82%	1.999
20	M	>7	92%	2.000

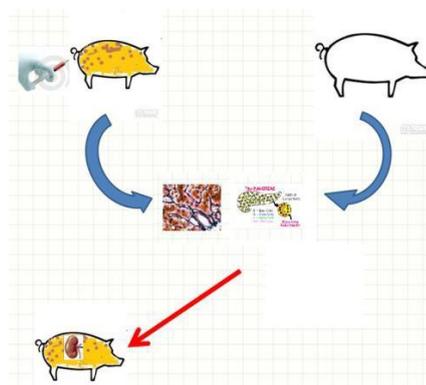
Sorprendentemente, a pesar de la congelación por un promedio de 30 días, se encontraron niveles importante de PEPTIDO C en las muestras de los donantes marcados en azul, indicativos de presencia de un número grande de islotes funcionales (en los protocolos descritos se recomienda la realización del trasplante de las células dentro de las siguientes 4 horas después de la extracción). La viabilidad de los islotes presentó muy poca variación antes y después de la congelación. Nota: Ninguna de estas células fueron trasplantadas, y se mantienen en congelación para determinaciones posteriores.

## METODOLOGÍA

### Trasplante de islotes quimerizado, implantando en mucosa gástrica

- El modelo animal de diabetes será previamente tratado químicamente para causarle un episodio diabético por medio de un método farmacológico Av. Diabetol. 2007; 23(6): 432-438) (Receptor).

- Posteriormente, se planea quimerizar el páncreas del donante con células madre mesenquimales extraídas previamente del cerdo con diabetes (receptor).
- Realizar el proceso de separación y cultivo de los islotes (como está descrito en la siguiente sección de quimerización de órganos).
- **Procesamiento de Páncreas del donante para obtención de islotes:**
  - Canulación del Ducto pancreático
  - Perfusión del páncreas en solución de lavado
  - Limpiar y remover cápsula
  - Cortar en trozón el órgano
  - Disociación en agitación 20-30 minutos cámara de Ricordi
  - Evaluación microscópica del tejido cada dos minutos
  - Recolección del material aislado
- Al terminar la separación de los islotes, se tomarán muestras para control de Calidad así:
  - Proliferación y viabilidad celular (XTT, azul de tripam)
  - Recuento de islotes y pureza (DTZ)
  - Presencia de péptido C
  - Concentración de insulina, proinsulina, glucosa
  - Controles Microbiológicos (bacterias, hongos)
  - Posteriormente se hará el implante en los sujetos diabéticos.



Trasplante de islotes quimerizado, implantando en subserosa (o mucosa gástrica).

Modelo Animal porcino:

- Se realizarán 15 implantes con esta técnica al modelo porcino diabético (receptor macho)
- Se utilizaran 2 porcinos sanos (sin diabetes), para lo obtención de islotes
- (donante hembra), por cada implante.

Total de modelos porcinos 30.

### **ENTREGABLES**

Se obtendrán 15 modelos porcinos trasplantados con islotes de páncreas quimerizados implantados en la mucosa gástrica con sus paraclínicos para determinar funcionalidad y reacción inmunológica a los implantes.

### **BENEFICIARIOS INMEDIATOS**

Los beneficiarios inmediatos directos de esta tecnología serán pacientes que padecen DM1, quienes en el futuro cercano podrían ser sometidos a trasplante islotes de páncreas, y aprovechar los adelantos derivados de estas investigaciones, permitiéndoles mejorar su calidad de vida y sus perspectivas de supervivencia. Posteriormente, pacientes diabéticos insulino dependientes, en fase pre – urémica, para evitar el deterioro de órganos blanco, mejorando no sólo su calidad de vida sino normalizando su expectativa de vida.

Igualmente, pacientes, entidades que ofrecen los servicios de trasplante, las entidades prestadoras de salud, la comunidad científica en general, y sobretodo, los pacientes que dependen del trasplante de algún órgano o tejido para continuar su vida, con calidad se beneficiarán en el corto y mediano plazo de los hallazgos y avances en el campo que resulten del presente proyecto.

A nivel académico éste proyecto contribuirá a la formación científica de estudiantes de pre y post grado, en áreas tan diferentes como Ingeniería de tejidos, Farmacología, Microbiología, Genética, Endocrinología, Medicina Interna, Cirugía, impulsando la investigación científica en nuestro país, ofreciendo otras alternativas terapéuticas, a un costo razonable, disminuyendo el impacto socioeconómico e institucional del país.

### **IMPACTO ESPERADO**

Esperamos que el procedimiento de Quimerización del páncreas, previo al proceso de aislamiento

de los islotes productores de insulina tendrá efectos importantes, tanto para la comunidad científica nacional, como para los pacientes que padecen diabetes, y la comunidad creciente de diabéticos, ya que sería la primera vez que se aborda, no solo a nivel nacional sino latinoamericano, esta metodología para el tratamiento de la DM.

Además, pretendemos abordar una patología que se ha convertido en un problema socioeconómico, debido a su morbilidad, con el aumento notorio en los costos para los pacientes, sus familias y para las entidades prestadoras de salud. De hecho, en Colombia, una de las principales complicaciones, *la falla renal terminal se ha convertido en una de las enfermedades consideradas catastróficas, pues los 22.000 pacientes que requieren hemodiálisis (0.05% de la población general), consumen un valor superior a los 2 billones de pesos (que significa 2%) del presupuesto total de salud de la nación.*

Consideramos que es importante avanzar en este campo, apropiarnos de una tecnología adecuada para competir a nivel internacional en el campo científico, e impulsar en nuestro medio la tecnología de los cultivos celulares y la Quimerización de islotes.

La técnica de quimerización quizás sea la respuesta al problema inmediato de compatibilidad entre donadores y receptores, y probablemente pueda ser aplicado a otros órganos vitales, con lo cual se incrementaría significativamente la tasa de éxito de trasplantes

Adicionalmente, es la primera vez que este tipo de investigación se realiza en nuestro medio con la utilización de técnicas de cultivos celulares producidos a nivel local.

A largo plazo este programa pretende ser fuente generador de conocimiento y alternativas de tratamiento a otros usuarios de otros países de la región.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus. Capítulo 1- Epidemiología de la DM2 en Latino América. Revista de la Asociación Latinoamericana de Diabetes. Suplemento 1, 116- 118.

2. Papaspyros, N.S. (1964) *The History of Diabetes Mellitus* (2nd edn), Georg Thieme Verlag.
3. Moskalewski S. (1965) Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp. Endocrinol.*, 5:342-353.
4. Sutherland D. and Gruessner R. (1997) Current status of pancreas transplantation for the treatment of type 1 diabetes. *Clin. Diab.*, 2:152-156.
5. Bilous R.W. *et al.* (1989) The effects of pancreas transplantation on the glomerular structure of renal allografts in patients with insulin-dependent diabetes. *New Engl. J. Med.*, 321:80-85.
6. Fioretto P. *et al.* (1998) Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *New Engl. J. Med.*, 339:69-75.
7. Navarro X. *et al.* (1990) Influence of pancreas transplantation on cardiorespiratory reflexes, nerve conduction, and mortality in diabetes mellitus. *Diabetes*, 39:802-806.
8. Navarro, X., Sutherland, D. E. R., Kennedy, W. R. (1997) Long-Term Effects of Pancreatic Transplantation on Diabetic Neuropathy. *Annals of Neurology*; 42:727-736.
9. Lacy, P.E. 1993. Status of islet cell transplantation. *Diabetes Rev.* 1: 76-92.
10. Lacy, P.E., J.M. Davie & E.H. Finke. (1979). Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24 °C) and a single injection of ALS. *Science* 204: 312-313.
11. Lacy, P.E., J.M. Davie & E.H. Finke. (1980). Effect of culture on islet rejection. *Diabetes* 29: 93-97.
12. Lau, H., *et al.* (1984). The use of direct ultraviolet irradiation and cyclosporin in facilitating indefinite pancreatic islet allograft acceptance. *Transplantation* 38: 566-569.
13. Terasaka, R. *et al.* (1986). The effect of cyclosporin-A, low-temperature culture, and anti- Ia antibodies on prevention of rejection of rat islet allografts. *Diabetes* 35: 83-88.
14. Markmann, J.F. *et al.* (1990). The effect of islet cell culture in vitro at 24 °C on graft survival and MHC antigen expression. *Transplantation* 49: 272-277.
15. Pipeleers, D.G. *et al.* (1990). Transplantation of purified islet cells in diabetic rats. II. Immunogenicity of grafted islet  $\beta$ -cells. *Diabetes* 40: 920-930.
16. Pipeleers-Marichal, M. *et al.* (1990). Transplantation of purified islet cells in diabetic rats. III. Immunosuppressive effect of cyclosporin. *Diabetes* 40: 931-938.

17. Shapiro, et al. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 Diabetes Mellitus using a glucocorticoid- free Immunosuppressive regimen. *NEJM* 343:230-8.
18. Ryan E.A. et al. (2001) Clinical Outcomes and Insulin Secretion After Islet Transplantation With the Edmonton Protocol. *Diabetes* 50:710-719.
19. The DCCT Research Group, (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 329:977-986.
20. Serup P., Madsen O.D., Mandrup- Poulsen T. (2001) Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *BMJ*; 322: 29- 32.
21. Garth I., Warnock G. (1998). Strategies for increasing cell mass: lesson from islet transplantation. *Anadian journal of Diabetes care*; 22, s3: 73- 79.
22. Bonner- Weir S., Taneja M., Weir G.C., et al. (2000). In vitro cultivation of human islet expanded ductal tissue. *PNAS*; 97:14: 7999- 8004.
23. Barret J. (2002). Islet cell transplantation. Is it the answer we hope for? *Juvenile Diabetes Research Foundation International- Countdown*. 23, 3: 16-30.
24. Stratta R.J. (1998). Pancreas transplantation. *Probl. Gen. Surg*; 15: 43- 65.
25. Shapiro A.M. et al. (1995). Portal vein thrombosis after transplantation of partially purified pancreatic islet in a combined human liver/islet allograft. *Transplantation*; 59: 1060-1063.
26. Brandhorst H., et al.. (1998). Assessment of intracellular insulin content during all steps of human islet isolation procedure. *Cell Transplant*;7:489-495.
27. Rosenberg L., et al. (1999). Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery*;126:393-398.
28. Supon P., Wiseman A., (2001) Edmonton Protocol for Pancreatic Islet Transplantation, November.
29. Korbitt G.S., et al. (1996). Large scale isolation, growth, and function of porcine neonatal islet cells. *J Clin Invest*;97:2119-2129.
30. Lacy P.E. and Kostianovsky M. (1967) Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-39.
31. Vargas F., et al., (1988) Endotoxin Contamination may be Responsible for the Unexplained

- Failure of Human Pancreatic Islet transplantation, *Transplantation*,; 65: 5: 722-27.
32. Linetsky E. et al, (1997) Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes*;46:1120-1123.
  33. **Stevens R.B.** et. al. (2001) Is Islet Transplantation a Realistic Therapy for the Treatment of Type 1 Diabetes in the Near Future? *Clinical Diabetes* 19:51-60.
  34. Ricordi C. *et al.* (1989) Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes*, 38:Suppl. 1:140-142.
  35. Ricordi C., et al (1990). Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol. Lat.*;27:185-195.
  36. Rosenberg L., et al. (1999) Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery*;126:393-398.
  37. *Michalska W* (2001) Survival Identification And Monitoring Pancreatic. Islet Grafts International Pancreas And Islet Transplantation Association *Medical University Of Warsaw, Transplantation Institute, Dept. Of General And Transplantation Surgery, Warsaw, Poland* <http://www.ipita.org>
  38. Conova S. (2002) Eying The Best Islets. *In Vivo*; 1: 4, February 25.
  39. Liu E. H., Herold K.C. (2000) Transplantation of the Islets of Langerhans: New Hope for Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11:379-382.
  40. Federici M., et al. (2001) High Glucose Causes Apoptosis in Cultured Human Pancreatic Islets of Langerhans A Potential Role for Regulation of Specific Bcl Family Genes Toward an Apoptotic Cell Death Program. *Diabetes*; 50 : 1290 – 1301.
  41. Fedorow C., et al. (2001). Osmotic and cryoprotectant permeation characteristic of islet cells isolated from the newborn pig pancreas. *Cell Transplant.* 10:651- 659.
  42. Masetti M., et al. (1997). Current indications and limits of pancreatic islet transplantation in diabetic nephropathy *J. Of nephrology*; 5: 245 – 252.
  43. Odorico J.S., Using Human Embryonic Stem Cells to Make Islets for Transplantation: How close are we to the clinic? University of Wisconsin, Madison, Wisconsin <http://www.insulinfreetimes.org/01january/europe.htm>
  44. Toso C., Mathe Z., Oberholzer J., The Current Status of Islet Transplantation in Europe

[http://www.insulinfreetimes.org/01\\_january/europe.htm](http://www.insulinfreetimes.org/01_january/europe.htm)

45. Stoffel M., (2000). Stem cells and in vitro b-cell differentiation. Summary of the 5th EASD/JDFI Oxford Workshop Keble College, Oxford, August 12-14
46. **Calafiore R.**, et al. (2001). Cellular Support Systems for Alginate Microcapsules Containing Islets, as Composite Bioartificial Pancreas *Annals of the New York Academy of Sciences* 944:240-252.
47. Painter, P., et al. (1998). Cardiorespiratory Fitness in Pancreas-Kidney Transplant Recipients. *Transplantation Proceedings*; 30:651-652.
48. Ricordi C., et al. (1990). Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat*;27:185-195.
49. White S.A., Hering B. (2000). Can islet cell transplantation treat diabetes, editorial. *BMJ*;321: 651- 652. in *Cell Science*; 19:255- 268.4

### ***5.3.3. BIODISPOSITIVO: Prototipo dispositivo de almacenamiento celular de islotes pancreáticos quimerizados***

#### **GRUPOS PARTICIPANTES:**

- Recubrimientos Duros y Aplicaciones Industriales- RDAI,
- Farmacología-Univalle (laboratorio In- Vitro)
- FIQ-Bionanomateriales.

**Responsable:** Dr. Federico Sequeda Osorio.

#### **ANTECEDENTES**

El Grupo de investigación RDAI fue originado gracias a un proyecto de investigación con el mismo nombre, que se adelantó en la Universidad del Valle (Facultad de Ingeniería) en asocio con COLCIENCIAS y un grupo de industrias por un monto de \$3700.000.000 (tres mil setecientos millones de pesos). Este grupo es dirigido por el Dr. Federico Sequeda Osorio y su propósito principal es la elaboración de Nuevos Materiales - Recubrimientos Duros.

Las líneas de investigación son las siguientes:

- Desarrollo de BIOMATERIALES- Recubrimientos Películas Delgadas para aplicaciones biomédicas, incluyendo estudios de BIOCMPATIBILIDAD.
- Fabricación de Recubrimientos Duros utilizando técnicas de Deposición de Vapor Físico (PVD-Physical Vapor Deposition).
- Caracterización Mecánica, Tribológica, Estructural y química de Recubrimientos.
- Simulación del Proceso de Deposición de Recubrimientos Duros.

El grupo se destaca por sus investigaciones e innovación, en el cual se refleja en más de 80 publicaciones artículos Internacionales y Nacionales en las mejores revistas de su área, categoría A, COLCIENCIAS.

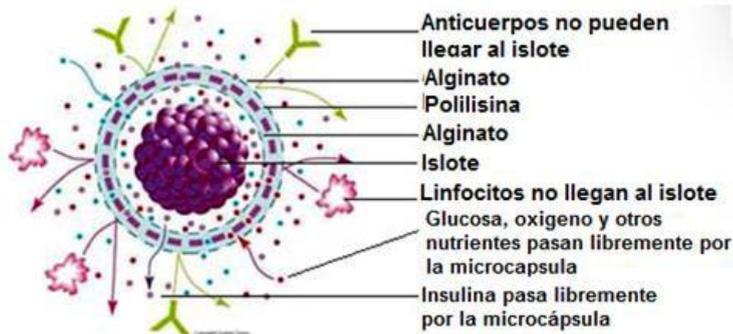
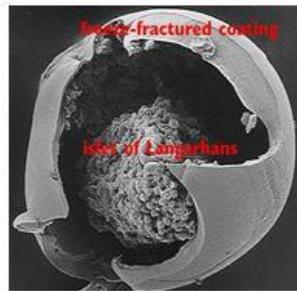
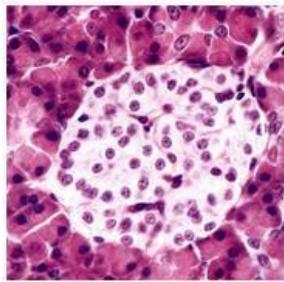
Actualmente, se trabaja el área de Biocompatibilidad, el cual el objetivo principal es mejorar las propiedades mecánicas, tribológicas y biocompatibles (citotoxicidad, genotoxicidad) de sustratos

fabricados con materiales utilizados en la elaboración de implantes de cadera, placas, tornillos, varillas, clavos y otros componentes. Para ello se desarrolló un proyecto titulado “Estudio de las Propiedades mecánicas y biocompatibles de recubrimientos para aplicaciones en implantes Biomédicos”, con un presupuesto de: Doscientos tres millones de pesos (\$203.000.000), financiado por COLCIENCIAS y Universidad del Valle, resultado de ello a nivel académico fue: 1 tesis Doctoral, 5 tesis de pregrado y 2 jóvenes investigadores. Se obtuvo la patente titulada “Recubrimiento Biocompatible tipo multicapa-película delgada S/TiN/Ti/TiZr como tratamiento superficial de sustratos-(S) de acero 316 L SS, aleaciones Cr- Co y/o aleaciones de Ti para su uso con efecto neutro sobre la viabilidad de crecimiento celular en aplicaciones biomédicas”, Autores: Alexander Ruden Muñoz, Federico Sequeda Osorio, José óscar Gutiérrez y William criollo, con Numero: 13-138093-00000-0000.

Por toda la trayectoria del grupo de investigación RDAI, en cuestión de materiales y caracterización, se ha trabajado actualmente en el diseño del prototipo, sus dimensiones e investigación del material base a trabajar.

### **DESARROLLO DEL BIODISPOSITIVO PARA ALMACENAMIENTO DE ISLOTES QUIMERIZADOS PARA TRASPLANTE**

A partir del diseño actual se construirá en platino y en aleaciones de materiales biocompatibles un prototipo del biodispositivo para el aislamiento y almacenamiento celular requerido para el tratamiento de trasplante de islotes pancreáticos, cumpliendo con los parámetros clínicos y de ingeniería previamente establecidos para su apropiado desempeño en organismos. El prototipo deberá cumplir con los requerimientos químicos (inertes y resistentes a la corrosión), físicos (dureza y elasticidad) y de biocompatibilidad (no carcinogénico ni mutagénico). El prototipo inicialmente se probará a nivel de laboratorio en las etapas in vitro y posteriormente in vivo.



El prototipo correspondería a un pequeño dispositivo fabricado a partir de una malla metálica de platino y en aleaciones de materiales biocompatibles que se implanta bajo la piel (subcutáneo) y permite el crecimiento en un tiempo determinado de una red de vasos sanguíneos alrededor de la malla (vascularización). Después de una adecuada vascularización, los islotes son implantados dentro del cilindro donde los vasos sanguíneos podrán administrarles de manera inmediata oxígeno y nutrientes vitales al mismo tiempo que se impide el paso a células inmunológicas por efecto de configuración de la malla.

Los avances en el tema de células madre embrionarias para la consecución de islotes pancreáticos representa una importante posibilidad para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM tipo1). Las células madre embrionarias no sólo poseen una alta capacidad de diferenciación, sino que su proliferación es también muy alta, y por tal motivo la comunidad científica considera que este tipo de material puede representar una fuente ilimitada de células y tejidos para el trasplante.

La meta es reducir los altos costos bio-sicosociales de la diabetes, y por ello es que el Equipo de Trabajo requiere terminar el proyecto y pasar de la fase de diseño a la de construcción del prototipo del biodispositivo para llevar a cabo los diferentes ensayos a nivel de laboratorio y de las etapas

preclínicas y clínicas.

En la actualidad, es imperativo contar con el apoyo del Estado para diseñar y crear productos que mejoren la función de órganos y/o tejidos dañados o enfermos mediante el remplazo de éstos, debido a su escasez a nivel local y mundial para el trasplante.

Debemos tener muy presente que cuando clínicamente se opta por el trasplante, se hace necesario suprimir el sistema inmunológico lo que eleva el riesgo para el paciente de contraer otras enfermedades de tipo infeccioso o neoplásico. En el caso particular que nos ocupa, con la implantación del biodispositivo se evitaría el tener que recurrir a este esquema de tratamiento convencional de la DM tipo 1.

## **ENTREGABLES**

Quince (15) prototipos terminados para su respectiva caracterización y evaluación de acuerdo con los cronogramas establecidos.

## **METODOLOGÍA**

**Etapas 1:** Revisión bibliográfica.

Durante todo el proceso se hará una revisión bibliográfica.

**Etapas 2:** Adquisición de materia prima y construcción del prototipo. Adquisición de la malla y ensamble según especificaciones técnicas. Dentro de los materiales que se han evaluado hasta el presente se encuentran los metales preciosos tales como el platino e iridio y polímeros como el PTFE y acero inoxidable AISI 316L, esos últimos a ser utilizados durante las pruebas preliminares de biocompatibilidad, una vez sean recubiertos con películas delgada de platino, preparadas utilizando la técnica de pulverización catódica existente en el laboratorio RDAI de la Universidad del Valle.

**Etapas 3:** Caracterización química y estructural de materiales. Estimación de los factores que afectan las variables respuesta (determinación de las propiedades mecánicas, tribológicas y biocompatibles).

Caracterización de los materiales usando técnicas de absorción atómica (AA), FTIR, XRD y XPS determinando así su composición y fase estructural. La técnica de AA juega un papel importante en las primeras etapas de fabricación del prototipo, ya que me ayuda a controlar la cantidad de impurezas presentes en el prototipo.

**Etapa 4:** Caracterización mecánica, tribológica y corrosión de materiales.

Análisis de las propiedades mecánicas (dureza, módulo de Young) por medio de nanoindentación, propiedades tribológicas (desgaste, coeficiente de fricción) bajo el método de Pin on Disc, propiedades superficiales (rugosidad) - SEM/EDS y corrosión (erosión estática y dinámica, medida de sinergismo).

**Etapa 5:** Valoración de biocompatibilidad. Evaluación de la biocompatibilidad, mediante pruebas de citotoxicidad en cultivos celulares (Línea Celular de Fibroblastos humanos), mediante la determinación de la viabilidad y proliferación celular (Kitt II XTT Cell Proliferacion ROCHE<sup>®</sup>) de los materiales a utilizar con la línea celular que se encuentra almacenada en termos con N<sub>2</sub> líquido en Banco de Células In- Vitro de la Facultad de Salud. Adicional a esto, se realizaran pruebas de genotoxicidad por medio del método de intercambio de cromatidas hermanas (Cariotipo) de la línea celular para determinar alteraciones genéticas.

#### **PROGRAMA DE TRABAJO**

Ver Capítulo 9.

## 5.4. APLICACIÓN DE NANOMATERIALES PARA EL CÁNCER

### **GRUPOS DE INVESTIGACIÓN.**

- Fisicoquímica de Bio y Nanomateriales.  
Responsabilidad: Síntesis de nanocompuestos y caracterización Fisicoquímica de materiales.  
Director: Rubén Jesús Camargo Amado
- Farmacología-Univalle  
Responsabilidad: Cultivos celulares, pruebas biológicas y microbiológicas  
Director: Oscar Gutiérrez Montes)

### **ANTECEDENTES**

El grupo Físico Química de Bio y Nanomateriales (FiQ-Bionanomat), en una de sus líneas de investigación "materiales y procesos para tratamientos en salud", ha realizado investigaciones de síntesis de bio y nanomateriales por el método sol- gel. Por otro lado en asocio con el grupo de investigación Farmacología Univalle, se han realizado pruebas In Vitro e In Vivo de aplicación de los nanocompuestos sintetizados en células cancerígenas y su efecto en células normales.

El grupo FiQ-Bionanomat ha sintetizado nanomateriales híbridos que contienen dióxido de titanio y ha realizado modificaciones en el proceso de síntesis obteniendo lo que se denominó TiO<sub>2</sub>-modificado, a estos nanomateriales se les realizó la caracterización físico-química consistente en la medición de tamaño de partícula, propiedades térmicas y propiedades mecánicas, con el grupo Farmacología se realizaron pruebas de citotoxicidad, genotoxicidad y mutagenotoxicidad al TiO<sub>2</sub>-modificado.

Producto de trabajo de investigación y desarrollo se llegó a uno de los más grandes logros del grupo de investigación que es el obtener un TiO<sub>2</sub>-modificado que generó citotoxicidad células cancerígenas HeLa (células de cáncer de cuello uterino humano), alcanzando un porcentaje de 98.6 % en citotoxicidad. Dicho porcentaje se da al exponer las células al efecto combinado del nanocompuesto y radiación UV-A por un periodo de tiempo no superior a los 40 minutos.

Más interesante aún resulta el descubrir que este nanocompuesto no causó efecto citotóxico sobre la línea celular CHO de células normales de ovario de hámster chino. Se hicieron pruebas bajo las mismas condiciones usadas para el caso de las células HeLa, concentración de 100 ppm a 200 ppm, tiempo no superior a 40 min, con y sin exposición simultánea a luz UV-A, estos resultados no han sido publicados porque están en proceso de patente por parte de la Universidad del Valle. Colciencias a través de la convocatoria 564 del 2012, decidió en febrero de 2013 otorgar los recursos para patentar los resultados de la mencionada investigación en al menos tres países del mundo.

Para este mismo grupo de nanocompuestos posteriormente se les estudió la genotoxicidad y la mutagenicidad In Vitro, demostrando que los materiales no generan daño genético ni mutaciones en las células tratadas, en otras palabras el uso el TiO<sub>2</sub>-modificado no acarrea la posibilidad generar mutaciones o daños genéticos que puedan inducir cáncer.

El segundo elemento usado en el proceso es luz UV-A, esta es una luz de muy baja energía cercana a la de la luz visible, con un potencial mínimo de generar daños conducentes a inducir cáncer, un fotón de UV-A tiene varios millones de veces menos energía que la radiación comúnmente utilizada en los tratamientos de radioterapia.

Con las mencionadas investigaciones se abrió igualmente la posibilidad de realizar ensayos In Vivo en modelos animales, etapa que contribuye en el análisis, desarrollo y comportamiento preclínico del proceso. En este camino ya se han desarrollado pruebas preliminares de toxicidad en modelo animal; como pruebas en Artemia Salina (Reed Muench), los resultados encontrados muestran que el TiO<sub>2</sub> y el TiO<sub>2</sub>-modificado no alcanzan grado de toxicidad aun en dosis tan elevadas como las 1000 ppm.

También en modelo animal y fase **laboratorio** se realizaron pruebas de comportamiento en ratón albino suizo: con estudios como test de Irwin y pruebas de toxicidad sujetos a una inoculación intraperitoneal del nanomaterial por 10 días y dosis diaria de 300 mg/(Kg de ratón), los ratones al final del experimento fueron llevados a patología (Fundación valle de Lili), los resultados mostraron la ausencia de cambios histopatológicos respecto a los ratones control usados en el estudio de toxicidad, lo que indica que los nanocompuestos base de este trabajo no generan daño ni en tejidos y ni en los órganos de los ratones en las dosis ya mencionadas, es un resultado

prometedor para este tipo de nanotecnología. Hace falta hacer pruebas con un mayor número de animales y a dosis aún más altas para hacer más consistentes los resultados.

En el desarrollo preliminar se trabajaron dos proyectos de grado de pregrado y dos tesis de maestría, dentro del marco de dos proyectos de investigación financiados uno con recursos de la Universidad del Valle y otro financiados con recursos de Colciencias, igualmente se publicó un artículo con un desarrollo también preliminar.

Pregrado:

- ✓ Fabián Ernesto Figueroa Jurado, "Citotoxicidad de TiO<sub>2</sub> modificado y luz ultravioleta sobre la viabilidad de las líneas celulares de hela y cho", 2012.
- ✓ Edgar Alfonso Carrejo Castillo, Melissa Millán Sepúlveda, "Efecto citotóxico de la fotocatalisis heterogénea sobre líneas celulares HELA y CHO en presencia de Pt/TiO<sub>2</sub>", 2012.

Maestría:

- ✓ Lina María Montes de Oca Reyes "muerte fotocatalítica de células cancerígenas de piel por efecto del dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>)", 2011.
- ✓ Mónica Jimena Basante Romo, "Muerte Fotocatalítica de células de cáncer de cuello uterino (HeLa) por efecto de nanocompuestos TiO<sub>2</sub>-modificado", 2012.

Proyectos de investigación:

- ✓ Muerte fotocatalítica de células cancerígenas por efecto del Oxido de Titanio (TiO<sub>2</sub>)" (cáncer de piel). Univalle proyecto interno 2009-2010
- ✓ Muerte fotocatalítica de células cancerígenas de útero por efecto del Oxido de Titanio (TiO<sub>2</sub>) y radiación ultravioleta." Colciencias, 2010-2012

Artículo:

- ✓ R. J. Camargo-Amado, Efecto fotocatalítico del TiO<sub>2</sub>-Au sobre células de cáncer de cuello uterino, Ingeniería y Competitividad, Volumen 14, No. 1, p. 9 - 22 (2012).

## **OTROS ANTECEDENTES:**

El cáncer es la principal causa de muerte en los Estados Unidos entre las personas menores de 85 años. Esta estadística preocupante del número de muertes relacionadas con el cáncer se ha mantenido casi igual [1]. Este hecho acentúa la necesidad de una nueva generación de terapias más eficaces para el cáncer. El desarrollo de nuevas terapias se enfoca en los avances en nanotecnologías relacionadas con la detección de cáncer, el análisis, el diagnóstico y la intervención terapéutica [2][3].

La nanotecnología está prestando más enfoques novedosos, incluyendo terapias para el cáncer. La nanotecnología abre la posibilidad de hacer futuras terapias combinadas [4].

Estudios han investigado la acción de TiO<sub>2</sub> en las ciencias de la vida. La fototerapia de células malignas ha sido reconocido como un potencial agente fotosensibilizador de la terapia fotodinámica debido a su efecto foto-toxico [5]. Algunos estudios reportan el TiO<sub>2</sub> como una sustancia con posibles y futuros usos en los tratamientos de diferentes tipos de cáncer [6]. El dióxido es tenido en cuenta por su citotoxicidad al estar expuesto a la luz y se busca sobreponer las limitaciones existentes en los tratamientos convencionales, eliminándolos parcialmente o complementándolos [7].

Pocos estudios han explorado la combinación de terapias fotodinámicas con aplicación de nano-TiO<sub>2</sub> con la quimioterapia al mismo tiempo [8] y la estrategia de llevar las drogas como nanopartículas coloidales ha sido desarrollado para aumentar la capacidad de los medicamentos contra el cáncer inhibiendo la resistencia que pueda presentar la célula a la droga.

El dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) es uno de los óxido más investigado en la ciencia de superficies de óxidos metálicos. Sus propiedades físicas y químicas están determinadas predominantemente por su superficie [9]. El TiO<sub>2</sub> es ampliamente usado como aditivo en alimentos [10]; en desarrollo para uso como agente antimicrobiano en envases y recipientes para almacenamientos de alimentos.

Los materiales que miden menos de 300 nm pueden ser absorbidos por células individuales [11], mientras que los nanomateriales que miden menos de 70 nm pueden ser absorbidos incluso por el núcleo de nuestras células, donde pueden causar un daño mayor. Sin embargo, la mayor reactividad química y biodisponibilidad de los nanomateriales puede también significar que las nanopartículas tengan una mayor toxicidad en comparación con la misma unidad de masa de partículas más grandes. Los campos de estudio sobre la toxicidad de nano-TiO<sub>2</sub> aún se encuentran

en proceso. Interesa conocer que niveles de exposición podrían tener efectos nocivos para la salud humana, o si existe un nivel inocuo de exposición.

Aunque ya existen algunas pruebas, y todos los organismos públicos de evaluación de riesgo reconocen que las nanopartículas implican una toxicidad diferente, las evidencias científicas sobre riesgos de productos de la nanotecnología son aún escasas.

En cuanto a la terapia fotodinámica (PDT) no hay riesgo de diseminar el cáncer en los tejidos adyacentes, o de fármaco-toxicidad acumulativa. Por lo tanto, se puede repetir la terapia las veces que se crea necesaria y se puede aplicar nuevamente sobre el tejido ya tratado [7], [12].

El estudio de eventos celulares y moleculares puede ser investigado mediante técnicas electrofisiológicas. En particular, el método de patch-clamp proporciona información detallada. Además, la técnica de patch-clamp se ha convertido en un método potente para la investigación [13]. Dada la universalidad y la importancia de los canales iónicos, no es sorprendente que su estudio ha dado lugar a una nueva comprensión de los mecanismos de ciertos procesos de la enfermedad y ha dado una idea de los tratamientos para estas enfermedades [14].

### **DESARROLLO ACTUAL Y FUTURO**

En la actualidad los grupos de investigación involucrados en el desarrollo de este tema particular de la aplicación de nanocompuestos para el cáncer, que encaja dentro de los desarrollos de la Medicina Regenerativa, continúan trabajando en su fase de laboratorio en modelo animal (In Vivo), en la determinación de la toxicidad del TiO<sub>2</sub>-modificado en dosis repetidas altas y en dosis muy altas que tienen como tope 5000 mg de compuesto por kilogramo de animal.

Los resultados que se viene generando siguen demostrando que el nanocompuesto no genera efectos adversos como inflamación aguda, crónica, o granulomatosa crónica, ni necrosis, o hiperplasia celular, no hay evidencia de trombosis, ni alteraciones vasculares ni fibrosis, los cuerpos de los ratones en algunos casos de dosis repetidas encapsulan y aíslan los rezagos del nanomaterial que no es desechado en la excreción o en la orina.

Necesariamente el paso a seguir es entrar en Fase Preclínica en modelo animal, completar los estudios de toxicidad en ratones, así como el requerimiento de modelos a los que se les haya generado cáncer, aplicarles los tratamientos con terapia fotodinámica de TiO<sub>2</sub>-modificado más luz UV-A y hacer contraste con animales sanos y de enfermos de control. Esta etapa aplicaría a modelo

animal murino. Adicionalmente se requerirá hacer estudios a nivel celular y molecular para determinar los mecanismos de acción del nanomaterial

### **EL PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO EN NANOMATERIALES.**

En el año 2000 los tumores malignos representaron el 12% de 56 millones de muertes del mundo. Ese mismo año 5,3 millones de hombres y 4,7 millones de mujeres desarrollaron la enfermedad. Un total de 1.660.290 nuevos casos de cáncer y 580.350 muertes por cáncer se preveían que ocurrieran en los Estados Unidos en 2013 [15]. La agencia internacional de investigación en cáncer prevé que para el año 2020 se producirá un incremento de 50% en el número de casos nuevos, los que llegarán a 15 millones.

Para el Ministerio de salud Nacional el cáncer de cuello uterino es una enfermedad crónica degenerativa y es considerado es un problema de salud pública creciente. Las enfermedades crónicas son enfermedades de larga duración y por lo general de progresión lenta.

Las enfermedades cardíacas, los infartos, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes, son las principales causas de mortalidad en el mundo, siendo responsables del 63% de las muertes. En 2008, 36 millones de personas murieron de una enfermedad crónica, de las cuales la mitad era de sexo femenino y el 29% tenían de menos de 60 años de edad. (OMS).

Es conocido a nivel mundial que el número de casos de cáncer aumenta de manera rápida y progresiva. En Colombia, los incrementos en las tasas de incidencia y mortalidad para la mayoría de tipos de cáncer lo definen como un problema creciente de salud pública, que se ubica como la tercera causa de muerte en el país después de la violencia y las enfermedades cardiovasculares.

Por las estadísticas anteriores es relevante continuar con la investigación de tratamientos alternativos como los que el grupo de Físico Química de Bio Y Nanomateriales y el grupo Farmacología UNIVALLE están trabajando. El grupo Físico Química de Bio Y Nanomateriales sintetizó el nanomaterial TiO<sub>2</sub>-modificado que luego se usó para atacar células de cáncer de cuello uterino (HeLa) bajo el efecto de luz UV.

Los resultados de la investigación previa demuestran la selectividad del nanomaterial, ya que ataca a línea celular cancerígena (HeLa) mientras que no genera daño a línea celular normal (CHO). Se lograron citotoxicidades del 98.6% sobre líneas celular HeLa en presencia del nanomaterial y Luz UV,

en 40 minutos de tratamiento. Se comprobó que el nanomaterial TiO<sub>2</sub>-modificado no es genotóxico ni mutagénico, lo que abre la posibilidad de usarlo en dosis repetidas sin el peligro de generar daños genéticos o mutaciones que deriven en cáncer de algún otro tipo.

Con base a estos resultados es conveniente dar inicio con la etapa de pruebas preclínicas usando modelos animales para cáncer.

El problema a enfrentar se puede resumir en que aunque se tiene evidencia promisoriosa del nanocompuesto TiO<sub>2</sub>-modificado:

**No se tienen estudios preclínicos** en modelo animal y por lo tanto **no se sabe** si los efectos benéficos obtenidos en la aplicación en fase de laboratorio, se repetirán en una fase preclínica animal.

Aunque se tienen pruebas preliminares de toxicidad del nanomaterial **no se tiene claridad** en cuanto a la toxicidad en dosis muy elevadas y dosis repetitivas, toxicidad crónica. Adicionalmente **no se tiene claridad** en cuanto a la dosis aconsejable para un tratamiento ni sobre la dosis máxima permisible. **Hace falta definir** los efectos del nanomaterial sobre un tumor cancerígeno en un modelo animal.

Desde el punto de vista de la ciencia básica **es necesario aclarar** el mecanismo físico-químico y biológico celular por el cual actúa el nanomaterial TiO<sub>2</sub>-modificado.

Aunque se sabe del efecto benéfico del nanocompuesto al provocar la disminución prácticamente total de las células cancerosas, y se sabe igualmente que el nanomaterial no afecta las células normales, **no se sabe a ciencia cierta** si el TiO<sub>2</sub>-modificado interactúa con la membrana celular, si afecta los organelos o si traspasa la membrana nuclear.

**No se ha determinado** si el mecanismo de acción del nanomaterial en cuestión, provoca la muerte celular por apoptosis o por necrosis o por una combinación de las dos.

En resumen, por un lado la sociedad tiene un problema creciente de salud pública, el cáncer, mientras que por otro lado los autores de la presente propuesta tenemos resultados de laboratorio realmente promisorios, que posibilitan en un futuro cercano el ofrecer una nueva terapia para el tratamiento del cáncer, una terapia en teoría sin efectos secundarios y selectiva en su

aplicación, será una nueva herramienta para el uso del sistema de salud.

Pero para que se haga realidad hace falta el desarrollo de la fase preclínica en animales, mientras en lo básico hace falta adelantar estudios sobre el mecanismo de acción del nanocompuesto, fuera y dentro de la célula, que expliquen cómo funciona la terapia fotodinámica del TiO<sub>2</sub>-modificado.

En resumen se tiene un problema evidente, el cáncer, se tienen unos resultados en primera fase prometedores, pero insuficientes para llevarlos a su etapa última de uso en humanos, esa brecha se debe trabajar y se pide el apoyo financiero para hacerlo.

## **OBJETIVOS PARA INVESTIGACIÓN EN NANOMATERIALES**

### **Objetivo general.**

Determinar a nivel preclínico el efecto de terapia fotodinámica TiO<sub>2</sub>-modificado y luz UV y para tratamiento del cáncer en modelo animal murino.

### **Objetivos específicos**

- Estudiar los fenómenos que gobiernan el mecanismo de acción de los nanocompuestos en la célula cancerígena y la célula normal. Precisar el efecto del nanocompuesto sobre los organelos de la célula.
- Determinar la distribución del nanocompuesto en el exterior y en el interior de la célula y su mecanismo de transporte.
- Definir el mecanismo de muerte celular de las líneas células en la terapia fotodinámica con TiO<sub>2</sub>-modificado.
- Determinar de toxicidad del nanocompuesto en modelo animal.
- Obtener prototipo de fotobioreactor con control de temperatura y tiempo.
- Determinar del efecto del tratamiento fotodinámico sobre tumores cancerígenos en modelo animal murino.

## **METODOLOGÍA**

Para el desarrollo metodológico del proyecto se cuenta con el apoyo de los grupos de investigación FISCOQUIMICA DE BIO Y NANOMATERIALES de la Facultad de Ingeniería - Universidad del Valle, el grupo FARMACOLOGÍA UNIVALLE de la Facultad de Salud - Universidad del Valle, al igual que los servicios de entidades nacionales como los laboratorios de patología de la Fundación Valle de Lili, los laboratorios de microscopía de la Universidad Nacional Sede Bogotá.

Los grupos pondrán a disposición laboratorios y equipos; el trabajo conjunto y el conocimiento de diferentes disciplinas (Ingeniería Química, Microbiología, Farmacología, Medicina, Medicina veterinaria, Química, Física y Ciencias de los Materiales) que exige este proyecto.

Metodológicamente el estudio se proyecta en fase preclínica de TiO<sub>2</sub>-modificado como herramienta de aplicación y terapia para el cáncer y se divide en las siguientes etapas:

- a. Análisis prospectivo.
- b. Adquisición de modelos animales, de reactivos, materiales, reactivos para líneas celulares.
- c. Adecuación fotobiorreactor.
- d. Mantenimiento y establecimiento de los cultivos y sub-cultivos de líneas tumorales y sanas.
- e. Manejo de modelos animales.
- f. Ensayo de toxicidad en artemia salina. g. toxicidad en ratón albino.
- h. Estudios del mecanismo de muerte celular.
- i. Estudios de transporte del nanomaterial hacia la célula. j. inducción de tumor.
- k. Ataque celular con nanocompuestos y radiación ultravioleta.

### **a. Análisis prospectivo.**

Responsable: Fiscoquímica de Bio y Nanomateriales

Se realizará dentro de las siguientes fuentes de consulta: artículos de revista, libros, normas técnicas, patentes, libros, tesis y posters. Algunos disponibles en bases de datos como son Science Direct, SCOPUS, ISI Web of Knowledge. Con la ayuda de software especializado como son RefViz<sup>®</sup> y MATHEO PATENT<sup>®</sup> se realizará un ejercicio de gestión del conocimiento y análisis prospectivo con búsquedas en bases de datos internacionales y en el servicio de patentes de la Oficina Europea de Patentes, como herramienta útil para constante enfoque y el direccionamiento del proyecto.

### **b. Adquisición de modelos animales, de reactivos, materiales, reactivos para líneas celulares.**

Responsable: Físicoquímica de Bio y Nanomateriales

Se realizará la adquisición de los reactivos y materiales necesarios para el desarrollo del proyecto. Se proyecta realizar entre el 80% y el 100% de la compra de reactivos y materiales en el primer año de trabajo, incluyendo las líneas celulares y parte de los modelos animales necesarios.

En primer año, igualmente se adquirirán los equipos (**Mufla, Horno, Potenciostato- Galvanostato**), necesarios para la síntesis y adecuación de los nanomateriales base del tratamiento de terapia fotodinámica, así como el único equipamiento para caracterización del nanomaterial que se comprará dentro del proyecto (**Espectrofotómetro aditamentos para fluorescencia**), pues las demás pruebas de caracterización se harán por contratación de servicios.

Las líneas celulares American Type Culture Collection (ATCC) que se emplearán en este proyecto algunas ya fueron adquiridas (**HeLa, Casky, Leucemia, cáncer de mama, CHO**) y otras líneas se adquirirán en los primeros seis meses del presente proyecto. Entre las líneas a comprar se incluyen **cáncer de próstata, pulmón, hueso, cerebro y piel**. Todas las líneas se preservarán en el banco de cultivos celulares In Vitro de la sección de Farmacología de la Facultad de Salud, en la Universidad del Valle.

Los modelos animales **ratón albino** se usarán tanto en las pruebas de toxicidad como en los ensayos de inducción de cáncer con y sin inmunosupresión, se adquirirán en el bioterio de la Facultad de Salud Universidad del Valle.

Los modelos animales con supresión genética de la p53 (**JAX Mice Trp53**) y los ratones con deficiencias en el sistema inmune (**Nu/nu**), se usarán para ensayos de inducción de tumores cancerígenos y se adquirirán vía importación ya sea de Estados Unidos, México o Brasil.

Los modelos animales con tumores cancerígenos ya desarrollados a usar en los ensayos finales con nanocompuesto modificado de TiO<sub>2</sub> y luz UV-A, tendrán dos posibles fuentes la primera y base de trabajo serán ratones adquiridos en Jackson Laboratory de Estados Unidos (**B6.129S4(Cg)-Trp53tm2.1Tyj/J**), que son ratones a los que ya le han desarrollado tumores con procedimientos probados y caracterizados. Como una segunda opción o fuente de ratones con tumores, a modo de experimentación se intentará la inducción de cáncer y la obtención en nuestros laboratorios de ratones con tumores desarrollados.

Los otros reactivos a comprar incluyen medios y aditivos para cultivo celular, precursores para

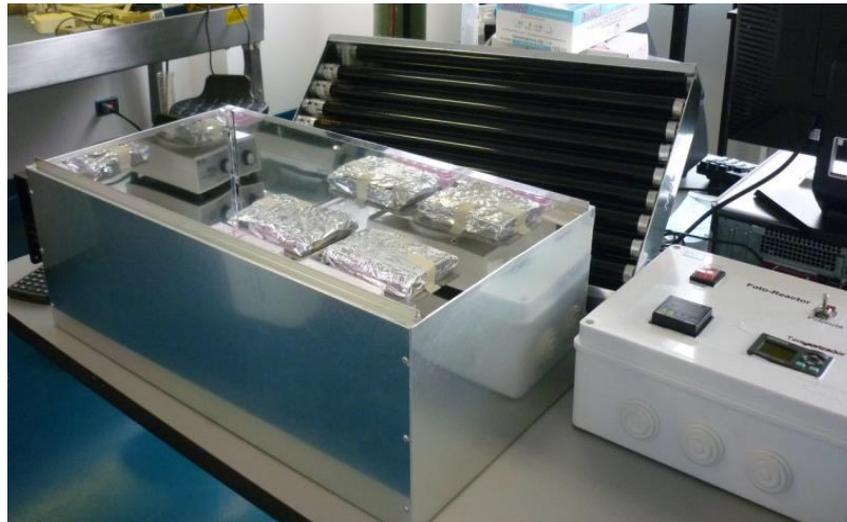
síntesis de TiO<sub>2</sub> modificado, fungibles para fotobiorreactores.

### **c. Adecuación fotobiorreactores.**

Responsable: Físicoquímica de Bio y Nanomateriales

El grupo Físico Química de Bio y Nanomateriales tiene la experiencia en diseño y construcción de fotobiorreactores, se construirá y adecuará los fotobiorreactores necesarios para cumplir con el objetivo de determinar el mecanismo de acción, la difusividad del nanomaterial a través de la membrana celular en presencia de luz UV.

Se desarrollaran dos tipos diferentes de fotobiorreactor, el primero será una continuación de los ya construidos y consistirá de una cámara de reflectancia usando lámparas como fuente de radiación UV, agitación, control de temperatura y tiempo de exposición, se partirá de los ya construidos y que se muestran en la Figura siguiente.



Prototipo de Fotobiorreactor ya desarrollado en la Universidad del Valle.

El segundo modelo será un fotobiorreactor LED portátil, flexible y de alta intensidad de luz UV-A para su aplicación en el modelo animal y que se pueda adaptar al animal y que en estudios futuros sirva para aplicar la terapia fotodinámica en modelos de mayor tamaño como conejos.

### **d. Mantenimiento y establecimiento de los cultivos y sub-cultivos de líneas tumorales y sanas.**

Responsable: Farmacología Univalle

Las líneas celulares se mantendrán en el banco de cultivos celulares en la Universidad del Valle. Se establecerán cultivos y subcultivos de las líneas celulares por dos motivos, **primero** para el estudio del mecanismo de acción del nanocompuesto tanto en células neoplásicas como en células normales y el **segundo** para los procesos de inducción de cáncer en los modelos animales.

En el momento se cuentan con líneas celulares todas ATCC (HeLa, Casky, Leucemia, cáncer de mama, CHO), adicionalmente se adquirirán cinco líneas celulares que son cáncer de próstata, de pulmón, de hueso, de cerebro y de piel todas igualmente de ATCC.

#### **e. Manejo de modelos animales.**

Responsables: Farmacología Univalle, Físicoquímica de Bio y Nanomateriales

Los modelos animales se mantendrán en el Bioterio - Facultad de Salud de la Universidad del Valle. La especie que se usará para hacer estudios de toxicidad analizando dosis únicas, dosis repetidas y dosis límite extra alto de 5000 mg de compuesto por Kg de ratón es:

Nombre: Ratón **albino suizo**

Sexo: hembra y machos Edad: 21

días.

Peso:  $17 \pm 3$  g.

Número mínimo para obtener resultados: 55.

Número aproximado de animales que se va a utilizar: 65 a 75.

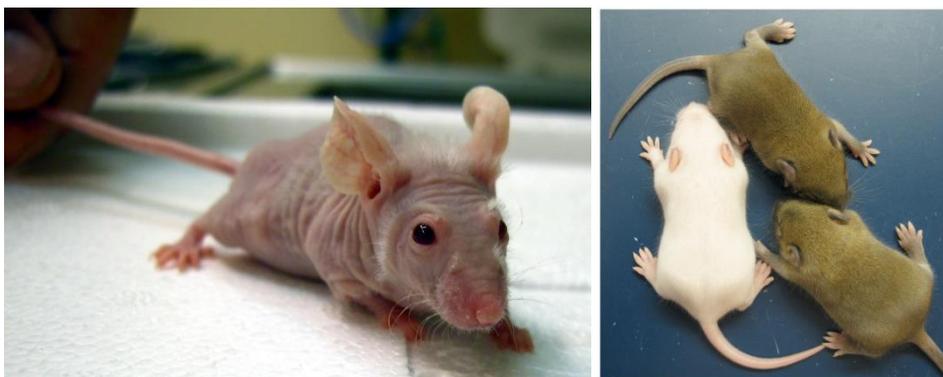
Los modelos animales que se usarán para ensayos de inducción tumores cancerígenos son:

Nombre: Ratón **albino suizo**, los **nu/nu**, los **JAX Mice B6.Trp53**.

Número mínimo para obtener resultados: 30 Albinos, 40 Nu/nu, 8 B6.Trp53.

Número máximo: Lactantes (5 camadas).

Adecuación cámara: Tanto para los ratones Nunu como para los B6.Trp53 se adecuará una cámara pequeña y portátil con temperatura controlada, humedad controlada, reflujo de aire y periodos de luz y oscuridad controlados. Estas cámaras se instalarán dentro de un cuarto limpio con el que cuenta el Grupo Farmacología-Univalle.



### Ratones Nu/un y ratones p53 modificados. Modelos

Animales con tumores cancerígenos desarrollados son:

Nombre: **B6.129S4(Cg)-Trp53tm2.1Tyj/J**, estos ratones pueden ser comprados con tumores de diferentes tipos de cáncer, para la presente investigación se trabajarán con tumores ya sea de cáncer de mama, papiloma de plexus cloroide, cáncer colorectal, carcinoma hepatocelular o cáncer pancreático ya disponibles comercialmente.

Número mínimo necesario: 20 entre hembras y machos.

Número máximo: 30 entre hembras y machos.

Adecuación cámara: Para los B6.129S4(Cg)-Trp53tm2.1Tyj/J se adecuará una cámara pequeña y portátil con temperatura controlada, humedad controlada, reflujo de aire y periodos de luz y oscuridad controlados. Esta tercer cámara se deberá instalará dentro de un cuarto limpio con el que cuenta el Grupo Farmacología Univalle.

### Producción y mantenimiento

Por su condición de inmunodeficientes y enfermos, tanto los ratones nude, los B6.Trp53 y los B6.129S4(Cg)-Trp53tm2.1Tyj/J, deben obligatoriamente mantenerse en ambientes en los que se hayan instalado barreras sanitarias estrictas. La categoría microbiológica de los nude debe ser la **de animales SPF (Specific Pathogen Free)**, esto significa que tendrán su flora intestinal normal pero deberán estar libres de todos aquellos microorganismos específicos capaces de causar infecciones.

En condiciones convencionales pueden sobrevivir entre 14 y 30 días. El bienestar de estos animales depende, en gran medida, del sistema de alojamiento que se elija y **del diseño y control del ambiente**, factores que son críticos para la producción y el mantenimiento. Además se deberán tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

1.- El ambiente físico debe diseñarse y operarse de manera tal que permita establecer controles ambientales estrictos, brindando seguridad y confort a los animales, **minimizando las posibilidades de introducción o transmisión de agentes infecciosos**. No solamente se los puede

mantener en habitaciones acondicionadas **con filtros absolutos (HEPA)**, sino que existe la **alternativa de alojarlos en aisladores flexibles, cabinas aisladoras, estantes ventilados o microaisladores.**

2.- La estabilidad ambiental se logra mediante un buen diseño del **sistema de ventilación**, del **control de la temperatura, de la humedad relativa, y de la velocidad y presión del aire.**

3.- Las áreas de servicios tienen que funcionar como una barrera efectiva entre los animales y el ambiente exterior. **Estas están diseñadas específicamente para el lavado y esterilización de insumos, además se debe contar con un depósito de equipamiento, de alimento y lechos; un área de cuarentena; sala de necropsias; e instalaciones para el tratamiento y eliminación de los desechos.**

4.- Las cajas, rejas, comederos y bebederos que se utilicen para el alojamiento de los animales deben estar de acuerdo con las normativas internacionales en cuanto a su material, dimensiones y diseño; con el objeto de brindar el máximo confort a los ratones y de facilitar en forma eficiente su limpieza y esterilización.

La instalación de barreras absolutas brindará la seguridad necesaria para evitar contaminaciones.

Existe la necesidad de establecer procedimientos para el tratamiento de todos los insumos que se pondrán en contacto con los ratones nude, Trp53 y los B6:

- El alimento debe ser estéril (sometido a autoclave o a irradiación) al igual que el agua de bebida.
- El ratón desnudo requiere una temperatura más elevada que las cepas tradicionales, se **recomienda entre 25 +/- 1º C**, y se debe considerar que en caso de alojarlos bajo un flujo laminar de aire continuo necesitarán una temperatura **de 28º C** para compensar la pérdida de calor corporal.
- La humedad relativa se estandarizará entre el 40 y el 60 %, y la ventilación entre 10 y 15 recambios de aire por hora.
- Un fotoperíodo uniforme luz/oscuridad de 14–10 horas respectivamente es el adecuado; teniendo en cuenta que se debe evitar una iluminación excesiva provenientes de artefactos fluorescentes.

Es conveniente mencionar que en ningún momento del experimento, ninguno de los animales se paralizará con agentes químicos, ni restricciones físicas mayores a 12 horas, ni se le inducirá distress nutricional por más de 24 horas. El grupo de Farmacología UNIVALLE tiene la experiencia y los profesionales expertos para manejo de modelos animales.

En resumen anticipado el número de animales a utilizar de cada tipo de ratón y su relación con las actividades se muestra a continuación:

TIPO RATÓN	ACTIVIDAD	NUMERO DE RATONES
Albinos	Toxicidad dosis única, dosis repetidas, prueba Irwin, Inducción cáncer	120 a 140
Nu/nu	Inducción cáncer	40 a 50
B6.Trp53	Inducción cáncer	8 a 12
B6.129S4(Cg)-Trp53tm2.1Tyj/J	Tratamiento con nanocompuestos y radiación ultravioleta de tumores	20 a 25

#### **f. Ensayo de toxicidad en artemia salina.**

Responsable: Físicoquímica de Bio y Nanomateriales, Farmacología Univalle

Para determinar el grado de toxicidad del nanomaterial y la dosis letal 50 en modelos animales, se realizarán ensayos de Artemia Salina, en los laboratorios de Farmacología UNIVALLE.

#### **g. Toxicidad en ratón albino.**

Responsable: Físicoquímica de Bio y Nanomateriales, Farmacología-Univalle.

Para determinar la toxicidad de los nanomateriales in Vivo se realizarán la prueba de Irwin y posteriormente pruebas de toxicidad por exposición dosis repetida, prolongada y altas y exposición a dosis extra altas superiores o iguales a 5000 mg/Kg de ratón.

Los modelos animales que se usarán son ratones albino suizo, que se adquirirán en el Bioterio de la Universidad del Valle, Facultad de salud.

Nombre: Ratón **albino suizo** Sexo: hembra y machos Edad: 21 días.

Peso: 17 ± 3 g.

Número mínimo para obtener resultados: 24.

Número aproximado de animales que se va a utilizar: 30 a 40.

Las pruebas de toxicidad se realizarán en los laboratorios de Farmacología UNIVALLE, y posteriormente, las muestras se llevarán a patología en la Clínica Valle de Lili por contratación de servicios, para definir la forma como el cuerpo asimila, rechaza o expulsa los nanocompuestos.

La prueba de Irwin ocupa un lugar destacado en la valoración preliminar de nuevos compuestos posiblemente activos sobre Sistema Nervioso Central (SNC). Su sencilla realización así como la suficiente validez de los datos aportados hacen que su práctica sea de gran utilidad antes de proseguir la Investigación con pruebas de mayor complejidad.

El desarrollo de esta prueba quedará se resume en tres grandes categorías:

Estudio de comportamiento (alerta, aseo, irritabilidad, otros).

Estudio neurológico (temblores, convulsiones, ataxia, otros). Estudios relacionados con el SNA (salivación, hipotermia, midriasis).

Se realizará la prueba de Irwin y la prueba de Irwin modificada en los ratones. Los ratones se someterán al siguiente procedimiento.

1. Fase de observación sin manipulación.
2. Fase de observación con manipulación.

En cada fase se estudiarán diferentes parámetros, evaluados según un sistema de puntuaciones "standard" previamente establecido.

Una vez terminado el test de Irwin los ratones de un llamado GRUPO A se dejarán por 10 días, transcurrido este tiempo los ratones serán llevados a patología, la dosis será administrada una sola vez. Se experimentará con el GRUPO B realizando el test de Irwin y continuando con la prueba de toxicidad crónica a este mismo grupo.

*Prueba de toxicidad.*

Toxicidad aguda:

La investigación de los efectos agudos pretende clasificar los nanomateriales por su peligrosidad. Se entiende por toxicidad aguda la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos tras una sola exposición, que pueden variar de irritaciones en las mucosas a la muerte.

Para lo que se determinará la DL50 como el mejor indicativo de la capacidad toxica. Se tendrá en cuenta:

a-Una DL50 inferior a 25mg/kg es tan fuertemente toxica, que no es necesario determinarla con exactitud. [16]

B-DL50 superiores a 5.000 mg/kg representan tan baja toxicidad aguda, que tampoco deben ser investigadas con exactitud [16].

De acuerdo a la determinación de la DL50 se clasificará al nanomaterial como muy tóxicos, tóxicos o nocivos y no tóxicos. El tiempo para que se produzca la muerte por intoxicación aguda es de 24 horas. Se mantendrán todos los ratones en un ambiente idéntico (5 días antes del ensayo) y se efectuará la administración en ayunas a la misma hora, para evitar las influencias ambientales y los ritmos o ciclos circadianos. Posteriormente serán estudiadas las alteraciones morfológicas e histopatológicas como inflamación aguda, hemorragia intersticial, daño alveolar difuso o trombos, al igual que la excreción proteica cualitativa y su comportamiento. Estas pruebas se harán por contratación de servicios en la Clínica Valle del Lili y por HPLC a contratar en una Universidad o centro en Cali que cuente con el servicio.

Toxicidad por exposición repetida o prolongada:

Los efectos por exposiciones prolongadas y de órgano diana se estudian básicamente en ensayos por dosis repetida, se determinará la toxicidad durante 30 días, y serán sacrificados a los 15 días. Debido al metabolismo rápido de los animales y buscando forzar la aparición de signos de toxicidad por administración repetida se aplicará el nanomaterial cada 24 horas, vía Intraperitoneal con una dosis de 600 mg/kg de ratón en un volumen de 0.1 ml. Se evaluarán alteraciones morfológicas e histopatológicas, al igual que el estudio de la expresión de proteínas cualitativamente y estudios de comportamiento.

Se realizará estudio de órganos diana donde se busca determinar por histopatología, histoquímica, inmunohistoquímica, estudio proteico la posible reversibilidad de los efectos detectando si son acumulativos o retardados, la presencia de inflamación aguda, inflamación crónica, necrosis,

apoptosis, formación de células gigantes de tipo cuerpo extraño o trombos y otros cambios morfológicos que se pudieran encontrar. La administración del nanocompuesto será diaria, con estudios observacionales físicos y finalmente se sacrificarán todos los animales a los que se les realizara autopsia, estudio anatomopatológico macroscópico, se pesaran todos los órganos y se dispondrán para el estudio microscópico. Entre los órganos a analizar se incluirán bazo, timo y nódulos linfáticos para evaluar efectos inmunotóxicos. Estas pruebas se harán por contratación de servicios en la Clínica Valle del Lili y por HPLC a contratar en una Universidad o centro en Cali que cuente con el servicio.

#### **h. Estudios del mecanismo de muerte celular.**

Responsable: Físicoquímica de Bio y Nanomateriales, Farmacología Univalle

Se realizarán ensayos para determinar si la muerte celular es apoptótica o necrótica, determinando la activación de la caspasa 3 y caspasa 9 con ayuda de biomarcadores, estudios morfológicos, patológicos y mediante análisis microscopia electrónica de barrido (SEM). Se harán por servicios a contratar con la Fundación Clínica Valle de Lili.

#### **i. Estudios de transporte del nanomaterial hacia la célula.**

Responsable: Farmacología Univalle, Físicoquímica de Bio y Nanomateriales

Se siembran células HeLa y CHO en placas Falcon Culture Slides de 8 pozos. Posteriormente, se adicionará los nanomateriales y se procede con un seguimiento a los 5, 10, 20, 40, 60, 80 minutos de contacto de los nanomateriales con las células, se observará el posible transporte del nanomaterial desde el medio en que se encuentra hasta la célula misma, para tal efecto se usará un microscopio SEM y como marcador se usará el contenido de titanio en la muestra, la técnica específica será el mapeo por SEM-EDS.

Se llevarán placas con células HeLa y CHO al fotobiorreactor y se expondrán a luz UV por tiempos de 10, 20, 30, 40 minutos, cada placa se llevará a patología y morfología en la Fundación Valle de Lili. De igual manera las placas serán analizadas mediante SEM-EDS, haciendo un mapeo composicional.

Para estudiar el transporte del nanomaterial, adicionalmente se analizará harán pruebas con el método de Patch clamp, estudiando los canales iónicos en diferentes niveles, se puede tanto utilizar la técnica de célula completa, para analizar la actividad de todos los canales de la célula, como

también realizar registros de conductancia de un canal específico [17][18] . Mediante el método Patch clamp se manipulará la composición tanto del medio extracelular como del intracelular durante un registro, determinando la variación de concentración del nanomaterial en la célula.

La Universidad del Valle cuenta con el equipo para desarrollar el ensayo con la técnica Patch clamp.

#### **j. Inducción de tumor.**

Responsable: Farmacología Univalle, Físicoquímica de Bio y Nanomateriales

Los ensayos in vivo se harán con ratones Albinos, con ratones albinos químicamente inmunosuprimidos, ratones Nunu y ratones genéticamente modificados en la B6.Trp53. Se usarán algunas de las líneas celulares cancerígenas de las disponibles ATCC, igualmente se intentará hacer seno trasplante, trabajando con tumor de cáncer humano aplicado en el modelo animal. El grupo de farmacología UNIVALLE cuenta con experiencia en el manejo de células, cultivos y células madre y neoplásicas. A través de convenios interinstitucionales y previo cumplimiento de los requerimientos éticos y bajo los procesos de consentimiento informado, se tendrá acceso a muestras preservadas de tumores cancerígenos humanos.

En la literatura [19], se conoce el protocolo de inducción de cáncer de melanoma en ratón modificado genéticamente B6.Trp53, este protocolo será el seguido en el presente proyecto pero se cambiarán las células de cáncer a utilizar, se trabajará con HeLa o Casky y se dejará abierta la posibilidad de trabajar con algunas de las otras líneas que tendrá a su disposición el proyecto y que se ha mencionado antes en el documento. En las pruebas preliminares y como validación de la técnica se trabajara con melanoma o cáncer de piel.

El protocolo en mención se describe a continuación:

#### **Modelo melanoma subcutáneo en ratón.**

El modelo subcutánea es ampliamente utilizado para la evaluación de la terapia en muchos modelos tumorales, incluyendo el melanoma B16. Tras la inyección subcutánea, B16 formará un tumor palpable en 5 a 10 días y crecer a un 1 × 1 × 1 cm de tumor en 14 a 21 días. Cuando se le permite crecer más grande, los tumores a menudo se vuelven necróticas en el centro y comienza a ulcerarse

o sangrar; es aconsejable sacrificar a los ratones antes de este punto. La dosis típica usada es  $1 \times 10^5$  células / ratón, que es 1,5 a 2 veces la dosis tumorigénica mínima en normales C57BL / 6 ratones. Es importante tener en cuenta que, para los experimentos de crecimiento de tumores subcutáneos, la técnica de inyección es extremadamente importante. Cada ratón debe mostrar una "ampolla" claramente visible, definido después de la inyección; si no, un nuevo ratón se debe utilizar. Los ratones sin una "ampolla" clara mostrará un crecimiento tumoral diferida o ningún crecimiento en absoluto.

### ***Materiales***

Cultivo B16,  $\leq 50\%$  de confluencia

Tripsina / EDTA (Life Technologies)

Medio completo (CM), 4 ° C

Solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), hielo

Ratones de 6 - a 12-semanas de edad, hembra C57BL / 6

Etanol 70%

Tubos de centrifuga cónico de 50 ml

Rotor de centrifugar y Sorvall H-2000B , 4 ° C Filtro

de células desechable (Falcon)

Jeringas desechables de 1 ml y 27 ½-G agujas

Calibrador.

Reactivos adicionales y equipamiento para trypsinizing cells, es necesario hacer conteo celular en un hemocitómetro, y hacer la determinación de la viabilidad por exclusión con azul de tripano, tener en cuenta la restricción de ratones (UNIDAD DE 1,3), marcar orejas de los ratones (UNIDAD DE 1,5), y tener buena técnica en la inyección subcutánea de ratones (UNIDAD 1.6)

### ***Preparación de células B16.***

1. Asegúrese de que las células B16 se encuentran en la fase de crecimiento logarítmico cuando se cosecha para la inyección, es decir, los frascos deben ser  $\leq 50\%$  de confluencia.

Que no se dividen las células tumorales de los matraces confluentes puede tardar menos.

2. Aspirar el medio, enjuague el frasco brevemente con 3 ml de tripsina / EDTA, y aspirar de nuevo.

El enjuague ayuda a eliminar el suero bovino fetal (FBS).

3. Añadir 5 ml de tripsina / EDTA e incline para asegurar que todas las células están cubiertas. Golpee firmemente lado del frasco hasta que las células se desprenden y se deslizan por la superficie de cultivo.

No deje a las células con la tripsina por más tiempo de lo necesario, para garantizar una alta viabilidad.

4. Añadir 5 ml de medio completo frío y pipete vigorosamente para obtener las células en suspensión.

5. Trasladar el material al tubo de centrifuga cónico de 50 ml y añadir 40 ml de CM frío para neutralizar la tripsina. Precipitar las células durante 10 min a 663 x g (en un rotor Sorvall H-2000B a 1500 rpm), 4 ° C.

6. Decantar células sobrenadante y volver a suspender en HBSS enfriado con hielo, con el objetivo de  $1-5 \times 10^6$  células / ml.

7. Pasar la suspensión a través de Filtro de células desechable para eliminar los grumos. Contar las células vivas utilizando azul de tripano. Viabilidad debe ser > 90%.

8. Ajuste concentración de células a  $1 \times 10^6$  células / ml en HBSS enfriado con hielo.

### ***Inoculación del ratón.***

9 . Reubicar la área de trabajo, una instalación donde se puedan mantener ratones hembras C57BL / 6 de 6 a 12 semanas de edad, y que las células se mantengan en hielo.

Inyectar las células tan rápidamente como sea posible después de la preparación; viabilidad disminuye lentamente con el tiempo, incluso en hielo.

10. Resuspender las células por invirtiendo el tubo varias veces. Llene 1 ml jeringa 27 ½ - G aguja.

11 .Mojar la piel abdominal con 1 o 2 gotas de etanol al 70 %, separando los cabellos para que la piel se vuelve claramente visible. La aguja perpendicular al abdomen.

12. Inserte la aguja muy superficialmente, de modo que sea visible a través de la piel semi-transparente. Esto requiere un poco de práctica; la clave es permanecer muy superficial sin reemergentes a través de la piel.

13. Deslizar la aguja 5 a 10 mm por vía subcutánea e inyectar 100 µl de la suspensión de células; y poner atención a la apariencia de una " ampolla".

Si no se inserta la aguja lo suficiente resultará en fugas de la suspensión del tumor cuando los ratones masajean la zona después de la inyección. Si no hay resultados claros " ampolla ", se debe sacrificar el sacrificio y se debe utilizar un ratón nuevo.

14. Retirar suavemente la aguja y llevar al ratón a la jaula.

Deseche los últimos 0.5 ml en la jeringa.

#### **Selección aleatoria de los ratones y el seguimiento.**

15. Etiquetar en oreja a los ratones y meterlos en forma aleatoria en las cajas, así se podrá cegar el experimento.

16. Observar los ratones para el crecimiento tumoral. Utilice calibradores para medir tumor perpendicular y diámetros. Los tumores deben convertirse palpable en 5 a 10 días. La humectación de la piel con etanol al 70% facilita la detección temprana del tumor.

#### ***El protocolo para inducir tumor en ratones mediante la Línea celular HeLa es:***

1. Se cultiva las células HeLa in vitro, se mantienen a 37°C.

2. Las células HeLa son inyectadas en la espalda de ratones (2 x 10<sup>6</sup> células / ratón).

3. Cuando el tumor ha alcanzado un tamaño 10 mm alrededor de 2-4 semanas después de la inoculación de las células, se sacrifica al ratón por dislocación cervical.

4. Se extirpa el tumor con unas tijeras y pinzas estériles.

5. Remover el material necrótico del tumor y preparar fragmentos de 3x3x3 mm con escarpelo.

6. Implantar un fragmento de tumor por ratón (de 5 a 8 ratones).

7. Después de 2 a 4 semanas se sacrifica el ratón, y se fragmenta al tumor 3x3x3 mm.

8. Se implantan un fragmento por ratón. (Se repiten los pasos 3 al 5) Después de 5 trasplantes, se remueve el tumor de uno de los animales y se fija en la solución de Dubosc-Brasil y se procede a una rutina de evaluación histológica para chequear que la histología del tejido típica del tumor se mantenga 27.

El volumen del tumor puede calcularse usando la ecuación  $V = ab^2/2$ , donde a es la longitud (mm), b es el ancho (mm), y V es el volumen (mm<sup>3</sup>) de tumor 28,29.

Materiales para la Solución dubosc- Brasil:

4.5 g/L de ácido pícrico. 27.3% (v/v) formaldehido ( de un 37% stock)

6.8% (v/v) ácido acético. 56.8% etanol (de un 95% stock). Se puede almacenar hasta 1 mes a temperatura ambiente. Cuando el tumor inducido en el modelo murino tenga una dimensión mayor

o igual a 1 cm<sup>3</sup>, se someterá al tratamiento con el nanocompuesto de TiO<sub>2</sub> modificado a diferentes dosis, todos bajo la aplicación de luz UV.

#### **k. Tratamiento con nanocompuestos y radiación ultravioleta de tumores.**

Responsable: Físicoquímica de Bio y Nanomateriales

Una vez adecuado los fotobiorreactores y se tengan los modelos animales con cáncer, con tumores cancerígenos subcutáneos y se tenga sintetizado el TiO<sub>2</sub> modificado, se hará el tratamiento de terapia fotodinámica de tumores cancerígenos en modelo animal ratón, con TiO<sub>2</sub>-modificado y la radiación UV-A.

Como punto de control y contraste se tendrán ratones igualmente afectados por un tumor cancerígeno a los que no se les someterá al tratamiento. Las variables a tener en cuenta en los ensayos serán la dosis o concentración de nanopartículas obtenidos como resultado de los ensayos de toxicidad y citotoxicidad, la presencia o no de luz UV-A y el tiempo exposición, los valores de tiempo se toman de la experiencia previa del grupo investigador.

Se analizará el crecimiento del tumor después del tratamiento celular con nanomateriales y se tendrá en cuenta la curva de supervivencia tumoral y la supervivencia de los ratones tratados y no tratados.

Nombre: **B6.129S4(Cg)-Trp53tm2.1Tyj/J**,

Número mínimo necesario: 20 entre hembras y machos.

Número máximo: 30 entre hembras y machos.

El protocolo a seguir en los tratamientos fotodinámicos con TiO<sub>2</sub>-modificado en modelo animal murino será:

1. Anestesiarse el ratón aplicando los sedantes acorde con el peso de ratón usando la máscara para ratón y el equipo para anestesia.
2. Hacer incisión y separar la piel hasta dejar expuesto el tumor.
3. Aplicar e inyectar en el tumor la suspensión con el nanomaterial.
4. Aplicar la luz UV-A directamente sobre el tumor usando el fotobiorreactor.
5. Cerrar y suturar la herida.
6. Repetir el tratamiento a distintos periodos de tiempo y hacer seguimiento del

crecimiento tumoral.

### **I. Ataque celular con nanocompuestos y radiación ultravioleta.**

Responsable: Físicoquímica de Bio y Nanomateriales, Farmacología Univalle.

El análisis de resultados, la escritura de informes y publicaciones es una actividad que se realizará durante el desarrollo del proyecto.

4. El sistema Nacional de salud en lo público y en lo privado y en el ámbito Municipal, Departamental y Nacional.
5. Los comerciantes y la clase empresarial representada en las cámaras de comercio y sus diferentes agremiaciones.

### **PROGRAMA DE TRABAJO PARA LA LÍNEA DE NANOMATERIALES.**

Ver Capítulo 9.

### **BIBLIOGRAFIA**

- [1] R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2013.," CA. Cancer J. Clin., vol. 63, pp. 11-30, 2013.
- [2] E. S. Kawasaki and A. Player, "Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer," Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, vol. 1. pp. 101-109, 2005.
- [3] E.-K. Lim, E. Jang, K. Lee, S. Haam, and Y.-M. Huh, "Delivery of cancer therapeutics using nanotechnology.," Pharmaceutics, vol. 5, pp. 294-317, 2013.
- [4] K. Gilstrap, X. Hu, X. Lu, and X. He, "Nanotechnology for energy-based cancer therapies.," Am. J. Cancer Res., vol. 1, pp. 508-20, 2011.
- [5] T.-Y. Lai and W.-C. Lee, "Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles," J. Photochem. Photobiol. A Chem., vol. 204, no. 2-3, pp. 148-153, May 2009.
- [6] G. D. Venkatasubbu, S. Ramasamy, G. P. Reddy, and J. Kumar, "In vitro and in vivo anticancer activity of surface modified paclitaxel attached hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles.," Biomed. Microdevices, vol. 15, pp. 711-26, 2013.
- [7] D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer.," Nat. Rev. Cancer, vol. 3, pp. 380-387, 2003.

- [8] M. Song, R. Zhang, Y. Dai, F. Gao, H. Chi, G. Lv, B. Chen, and X. Wang, "The in vitro inhibition of multidrug resistance by combined nanoparticulate titanium dioxide and UV irradiation," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 4230-4238, 2006.
- [9] L.-B. Xiong, J.-L. Li, B. Yang, and Y. Yu, "Ti<sup>3+</sup> in the Surface of Titanium Dioxide: Generation, Properties and Photocatalytic Application," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, pp. 1-13, 2012.
- [10] A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, and N. von Goetz, "Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, pp. 2242-50, 2012.
- [11] X. Cao, J. Ma, X. Shi, and Z. Ren, "Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticle size on the performance of PVDF membrane," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 253, pp. 2003-2010, 2006.
- [12] M. D. Lucroy, "Photodynamic therapy for companion animals with cancer," *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.*, vol. 32, pp. 693-702, 2002.
- [13] D. Zhang, "Patch Clamp: A Powerful Technique for Studying the Mechanism of Acupuncture," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, pp. 1-7, 2012.
- [14] L. K. Liem, J. M. Simard, Y. Song, and K. Tewari, "The patch clamp technique," *Neurosurgery*, vol. 36, pp. 382-392, 1995.
- [15] R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2013," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 63, pp. 11-30, 2013.
- [16] M. Repeto and G. Repetto Kuhn, *Toxicologia Fundamental*, 4th ed. 2009.
- [17] A. Rouzrokh, S. A. Ebrahimi, and M. Mahmoudian, "Construction, calibration, and validation of a simple patch-clamp amplifier for physiology education," *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 33, pp. 121-129, 2009.
- [18] B. Sakmann and E. Neher, Eds., *single-channel recording*, Plenum Pre. New York and London, 1983.
- [19] *Curr Protoc Immunol*. 2001 May; CHAPTER: Unit–20.1. doi:10.1002/0471142735.im2001s39.

### ***5.5. LINEA CARDIOMIOCITOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN MODELO PRE-CLÍNICO CON ALOINJERTOS DE CÉLULAS MESENQUIMALES DIFERENCIADAS PARA PREVENIR LA INSUFICIENCIA CARDIACA CRÓNICA SECUNDARIA A UN INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN CERDOS.***

#### **GRUPOS DE INVESTIGACIÓN:**

- G-Bio (Universidad Autónoma de Occidente),
- Farmacología-Univalle.

#### **ANTECEDENTES:**

El grupo G-Bio de la UAO en asocio con el grupo Farmacología de Univalle, ha desarrollado tres proyectos que buscan obtener resultados en el campo de la medicina regenerativa, con el convencimiento del innegable aporte de la Ingeniería Biomédica a la resolución de problemas de salud a través de la tecnología, una de las necesidades más inmediatas de la humanidad para poder ofrecer una alternativa terapéutica viable, sostenible y definitiva a diversas enfermedades que no cuentan con un tratamiento contundente.

Uno de los estudios que se han desarrollado fue la inducción de la celularización de vasos sanguíneos aislados de cerdos con células madre diferenciadas in vitro. La medicina regenerativa con células madre busca semejar los procesos de reparación interna en los que las células especializadas son capaces de renovarse a sí mismas a través de la división celular y pueden ser inducidas a convertirse en un tipo de célula específica que forme tejido específico; el objetivo de esta investigación fue inducir la re-celularización en la matriz de un vaso sanguíneo utilizando células MSC diferenciadas in vitro a endotelio vascular.

Otro de los proyectos se centró en la posibilidad de reducir la caída de la función cardiaca que lleva a una insuficiencia cardiaca crónica luego de un infarto de miocardio, a través de la medicina regenerativa.

La enfermedad cardiovascular isquémica es la causa de mortalidad más frecuente en el mundo, siendo su manifestación más severa el infarto del miocardio; una vez que ocurre el evento isquémico y dependiendo de su duración, se han observado daños secuenciales cuya ocurrencia se evidencia fisiológica y bioquímicamente, seguido de un proceso de cicatrización con tejido fibroso no contráctil que reemplaza a los cardiomiocitos que se pierden irreversiblemente conduciendo a una insuficiencia

cardíaca crónica.

El corazón no posee la capacidad de regenerar el tejido perdido y reemplazarlo por tejido funcional. Los cardiomiocitos se dividen durante la etapa fetal y luego del nacimiento sufren una hipertrofia acompañada de cambios en el perfil proteómico que evitan que se reproduzcan a lo largo de la madurez del humano (1); esta imposibilidad de multiplicación celular hace que frente a un daño del miocardio, el corazón como alternativa deba producir el fenómeno de remodelación cardíaca (proceso reparador por movilización de células madre de circulación periférica o de médula ósea al sitio de la lesión (2)).

En la literatura se han reportado múltiples estrategias terapéuticas para disminuir el impacto de la insuficiencia cardíaca en la calidad de vida de quien la padece, que incluyen desde tratamientos farmacológicos a largo plazo, dispositivos implantables (corazón artificial, bombas de contrapulsación, etc.), técnicas quirúrgicas de transposición de músculo estriado, homo y xenotrasplante parcial o total de corazón, hasta nuevas técnicas de tratamiento con células de distintas procedencias, para restablecer la función contráctil del miocardio.

Actualmente los esfuerzos terapéuticos se enfocan en dos direcciones: diseño y fabricación de dispositivos biomédicos pequeños, autónomos y biocompatibles que puedan reemplazar la bomba cardíaca, y tratamiento con células inyectadas que logren integrarse al tejido en el sitio de la lesión. Con respecto a este último, a pesar de los múltiples estudios realizados con diferentes tipos celulares, aún no se ha obtenido resultados concluyentes. El tratamiento por medicina regenerativa mediante terapia celular permitiría atacar directamente el proceso de fibrosis, ofreciendo una posible solución de fondo para evitar la insuficiencia posterior (3).

### **DESARROLLO ACTUAL:**

La **fase 1** del estudio se tituló “Implementación de un modelo pre-clínico con aloinjertos de células mesenquimales diferenciadas para prevenir la insuficiencia cardíaca crónica secundaria a un infarto agudo de miocardio”; este proyecto de investigación planteó la inducción de una isquemia cardíaca en un modelo animal con ratas Wistar adultas, para comparar el efecto protector de las células madre mesenquimales sin diferenciar, diferenciadas a cardiomiocitos y a células endoteliales *In vitro*, frente a la aparición de la insuficiencia cardíaca crónica, cuando son inyectadas directamente en el tejido afectado solas, o combinadas con una matriz de crecimiento, en diferentes tiempos post-isquemia.

Esta primera fase arrojó resultados sobre el mejor tratamiento celular a aplicar sembrado en una matriz extracelular que podría potenciar la duración del implante y facilitar la integración de las células implantadas al tejido sano adyacente para disminuir la pérdida de la función cardíaca, medida por la fracción de eyección, al mismo tiempo que se pudo identificar el tiempo post-isquemia ideal para realizar el implante.

### **DESARROLLOS FUTUROS:**

La **fase 2** de este estudio pretende evaluar el mejor tratamiento del estudio anterior, en un modelo pre-clínico de animales más grandes, particularmente en cerdos, para ampliar los datos obtenidos en cuanto a seguridad del tratamiento y eficiencia, antes de pasar al modelo clínico en humanos.

Tal como se hizo en la fase 1, para el ensayo en cerdos se inducirá un infarto agudo de miocardio por ligación de la arteria coronaria descendente izquierda para luego inyectar el tratamiento propuesto. La inyección intramiocárdica, que se hace directamente en la región infartada, tiene la ventaja de proveer una ruta de administración directa al miocardio afectado.

El modelo animal tendrá un seguimiento fisiológico y bioquímico que permita identificar la realidad del infarto y los cambios presentados durante el estudio. Se harán evaluaciones por electrocardiografía (ECG) y ecocardiografía para determinar fracción de eyección (ECCG), y se medirán Troponina I cardíaca (cTnI) y albúmina modificada por isquemia (IMA, por sus siglas en inglés), las cuales tienen un 95% de sensibilidad en el diagnóstico temprano del infarto agudo.

En la aplicación de la terapia celular como herramienta de la medicina regenerativa, las células madre se han empleado con resultados diversos, sin dar origen a protocolos claros de aplicación derivados de estudios sistemáticos que evidencien la mejor alternativa en cuanto a la fuente de obtención de ellas, la mejor vía y el tiempo ideal de aplicación. Otro de los puntos cuestionados es si las células madre deben primero diferenciarse cuando son implantadas, para poder restablecer la función cardíaca, lo que significaría tiempo valioso pues está suficientemente demostrado que el daño del miocardio es progresivo a pesar de que desaparezca el elemento agresor. La **fase 2** de este estudio permitirá identificar con mayor seguridad el protocolo que deberá seguirse para la **fase**

**3:** el ensayo en humanos.

Estos estudios se hacen necesarios si se quieren reducir no solamente las cifras de mortalidad por insuficiencia cardiaca crónica, sino las tasas de morbilidad por la misma causa, junto con los costos sociales y económicos que significa no contar con un tratamiento efectivo que evite la pérdida crónica de la función cardiaca luego del evento isquémico. Esta situación de morbimortalidad se ve agravada por la velocidad a la que envejece la población y la imposibilidad de detener el proceso crónico a través de la terapia farmacológica y mucho menos del trasplante de corazón dada la falta de disponibilidad de órganos y los problemas de rechazo; esta patología exige sin dudar, un tratamiento más definitivo y radical que solo es posible a través de la **medicina regenerativa**.

### **OBJETIVOS PARA LA LINEA DE CARDIOMIOCITOS.**

#### **OBJETIVO GENERAL:**

Desarrollar un implante de células derivadas de células madre diferenciadas *in vitro*, que permita disminuir la pérdida de la función cardiaca secundaria a un infarto de miocardio.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Estandarizar la técnica quirúrgica de inducción de infarto de miocardio por ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda en cerdos.
2. Estandarizar la técnica quirúrgica para implantar el tratamiento celular en el corazón infartado de cerdo.
3. Evaluar el efecto del implante de células sobre la función cardiaca medida por la fracción de eyección.

#### **ENTREGABLES:**

Un protocolo estandarizado de implante de células derivadas de células madre diferenciadas *in vitro*, que permita disminuir la pérdida de la función cardiaca secundaria a un infarto de miocardio, para ser probado en humanos.

### **METODOLOGÍA**

El modelo de experimentación serán veinte (20) cerdos adultos, divididos en grupos así:

#### Grupos de experimentación:

- a. Un grupo de cuatro cerdos a los que 24 horas post-infarto se les inyectará en solución salina fisiológica como vehículo, el coctel de células (MSC + células inducidas a cardiomiocitos + células diferenciadas a endoteliales). Cada grupo será evaluado los días 30, 45 y 60 después de la inyección, por ecocardiografía y el día 60 por histología.
- b. Un grupo de cuatro cerdos a los que 24 horas post-infarto se les inyectará en colágeno tipo I como vehículo, el coctel de células (MSC + células inducidas a cardiomiocitos + células diferenciadas a endoteliales). Cada grupo será evaluado los días 30, 45 y 60 después de la inyección, por ecocardiografía y el día 60 por histología.
- c. Un grupo de cuatro cerdos a los que 5 días post-infarto se les inyectará en el mejor vehículo, el coctel de células (MSC + células inducidas a cardiomiocitos + células diferenciadas a endoteliales). Cada grupo será evaluado los días 30, 45 y 60 después de la inyección, por ecocardiografía y el día 60 por histología.
- d. Un grupo de cuatro cerdos a los que 15 días post-infarto se les inyectará en el mejor vehículo, el coctel de células (MSC + células inducidas a cardiomiocitos + células diferenciadas a endoteliales). Cada grupo será evaluado los días 30, 45 y 60 después de la inyección, por ecocardiografía y el día 60 por histología.

#### Grupos control:

- e. Un grupo de dos cerdos a los que se le hará las evaluaciones por ecocardiografía e histología sin algún tipo de intervención, en los mismos tiempos que a los grupos intervenidos.
- f. Un grupo de dos cerdos a los que se le inyectará solución salina fisiológica 24 horas después del infarto y será evaluado por ecocardiografía e histología.
- g. Un grupo de dos cerdos al que se le inyectará colágeno 24 horas después del infarto y será evaluado por ecocardiografía e histología.
- h. Un grupo de dos cerdos al que se le inyectará el mejor vehículo 15 días después del infarto y será evaluado por ecocardiografía e histología.

Antes de iniciar cualquier procedimiento, a los biomodelos se les tomará una ecocardiografía para evaluar la función cardíaca calculando la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo y el electrocardiograma permitirán comparar a través del análisis ANOVA de dos vías, los resultados de los grupos entre sí, y de cada rata consigo misma, antes y después de cada procedimiento.

#### 1. Inducción del infarto de miocardio:

Los cerdos serán anestesiados por vía endovenosa con pentotal sódico en dosis de 40-50 mg/kg. Durante todo el procedimiento se mantendrán monitoreados los signos vitales. Una vez el biomodelo esté anestesiado, se rasura el costado izquierdo. El cerdo es intubado para dar soporte ventilatorio a 60 ciclos por minuto.

La piel se desinfectará y se hará una incisión intercostal separando con un retractor las costillas 4 y 5 para alcanzar el corazón libremente.

La inducción del infarto se hará ligando la arteria coronaria descendente anterior antes de la bifurcación con sutura 6-0 de 3/8. Al momento de iniciarse el evento isquémico, se evidenciará el aspecto cianótico del tejido alrededor del sitio de oclusión, estas observaciones son coincidentes con el cambio en la señal electrocardiográfica (ECG) del animal. La isquemia se mantendrá por 30 minutos, tiempo después del cual se liberará la ligadura del vaso para permitir la reperfusión del tejido.

La herida se suturará capa por capa con sutura 4-0 de ½ no reabsorbible y se suministrará morfina oral en dosis de 5mg/kg cada 12 horas durante las primeras 24 horas.

Para las inyecciones intracardiacas, se anestesiará el biomodelo del mismo modo anterior, se reabrirá la herida y se pondrán las dosis repartidas en tres inyecciones en el borde de la zona infartada con un volumen final de 200µl. El manejo post-quirúrgico de los animales será igual que en las cirugías de inducción del infarto.

El tiempo de sobrevivencia de las ratas será de 60 días después de los implantes, al cabo de los cuales se sacrificarán luego de ser sedados. Para este procedimiento se anestesiarán con inyección de pentotal sódico en dosis de 40-50 mg/kg, posteriormente se inyectarán con una dosis de 0.1ml de KCl saturada intracardiaca para detener el corazón en diástole. Cada corazón será extraído, lavado con PBS 1X y sumergido en paraformaldehído. Los corazones serán preparados en bloques por congelación para realizar los cortes con micrótopo que permitan la visualización al microscopio.

## 2. Obtención de células madre mesenquimales de médula ósea

En este estudio se trabajará con células madre mesenquimales (MSC) obtenidas de la médula ósea de huesos largos de cerdos. Las células se obtendrán de cerdos adultos por punción.

La separación de las MSC del resto de células y tejido medular se hará centrifugando el material obtenido con medio de crecimiento KnockOut™ DMEM, que mantiene la viabilidad y morfología de las células madre, evitando el inicio de un proceso de diferenciación. Luego de esta separación inicial, las células obtenidas serán lavadas con solución salina balanceada de Hank (HBSS) por centrifugación. El sobrenadante del lavado se mezclará con buffer de lisis de glóbulos rojos para obtener las MSC solas.

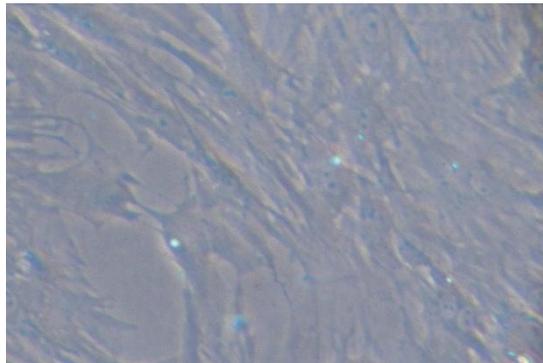
Es importante definir la viabilidad celular con la que se inicia el proceso de cultivo y posterior diferenciación, para lo cual se tomarán 10 µl del precipitado y se mezclarán con azul de Tripán para que las células muertas, cuya integridad de la membrana se ha perdido, tomen el colorante, observándose azules al microscopio; el recuento se hará en cámara de Neubauer. Las células viables, dada la integridad de la membrana no tomarán el colorante, observándose refringentes al microscopio de luz.

Una vez cuantificada la viabilidad celular, se iniciará la etapa de cultivos cuyo objetivo principal es ampliar la cantidad de células madre disponibles. Para lograrlo se colocarán las células en frascos de cultivo del tamaño adecuado al número de células viables obtenidas, y se incubarán en medio KnockOut™ DMEM por 24 horas, luego de las cuales se cambiará el medio de cultivo para eliminar células flotantes y detritos celulares, haciendo recambio cada dos o tres días. Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células se desprenderán del frasco de cultivo por tratamiento con tripsina/EDTA. Las células obtenidas serán conservadas en viales a -80°C hasta su utilización.

Las MSC se caracterizarán por inmunocitoquímica cultivándolas en una placa de 8 pozos con DMEM 1x suplementado con SFB al 10% hasta que se alcance una confluencia de aproximadamente el 90% en cada pozo. Se utilizará un kit de caracterización compuesto por los anticuerpos: conejo anti-integrina  $\beta 1$  (1/500), conejo anti-colágeno tipo I (1/500), conejo anti-fibronectina (1/1000), ratón anti-CD54 (1/100), ratón anti-CD14 (1/100) y ratón anti-CD45 (1/100). Como controles de fluorescencia se añadirán en un pozo 100  $\mu$ l de IgG de ratón (1mg/ml) mezclados con IgG de conejo (1mg/ml) diluidos en PBS 1X, y en otro 100  $\mu$ l de IgG de ratón (1mg/ml) diluido en PBS 1x.

Como anticuerpos secundarios se utilizarán 100 $\mu$ l de IgG asno anti-conejo conjugado Cy3 (AP182C, Millipore) e IgG asno anti-ratón conjugado Cy3. A cada pozo se le adicionarán 100 $\mu$ l de DAPI y se verán al microscopio confocal con longitud de onda de 460nm.

Luego de los cultivos de MSC se espera ver las células así:



MSC en cultivo, confluencia de 90-95%.

### 3. Diferenciación celular

#### Cardiomiocitos

Un tercio de las MSC obtenidas serán pre-tratadas con factores de crecimiento específicos. Las células se pondrán en frascos de cultivo con medio diferenciador compuesto por DMEM suplementado con suero fetal bovino al 2%, ácido ascórbico 100 $\mu$ M y dexametasona 20 $\mu$ M, incubándolas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se cambiará el medio a las 24 horas y de allí en

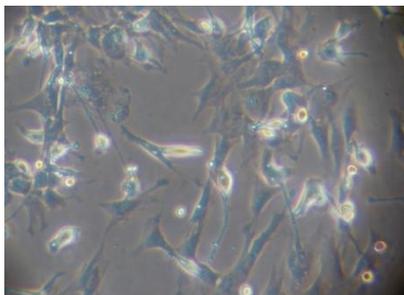
adelante cada tres días hasta completar 7 días, al cabo de los cuales se adicionarán al medio diferenciador factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) 50 ng/ml, factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) 2 ng/ml y proteína morfogénica de hueso 2 (BMP-2, por sus siglas en inglés) 10 ng/ml.

Este pre-tratamiento ha demostrado direccionar las MSC a cardiomiocitos, completándose la diferenciación cuando se ponen las células en co-cultivo con cardiomiocitos adultos (4,5). Dado que las células serán implantadas en el tejido cardíaco, el co-cultivo en este estudio será reemplazado por la interacción in vivo de las células inducidas con cardiomiocitos adultos.

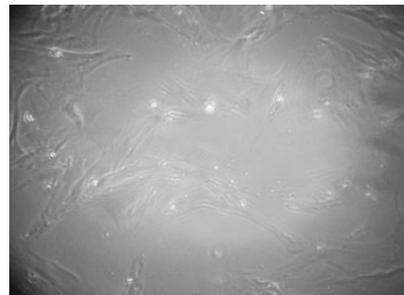
Antes de ser implantadas, las células serán marcadas con 1.1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Dil C18 (3)), que permitirá identificarlas por microscopía confocal en las muestras del tejido cardíaco procesadas para los análisis histológicos.

Las células inducidas a cardiomiocitos serán caracterizadas por inmunocitoquímica. Una alícuota de las células inducidas se deposita en las placas de 8 pozos y se dejan secar sobre la placa en cámara de humedad a 4°C. Una vez seca la placa, se fijan las células con paraformaldehído al 4% y se adicionan los anticuerpos primarios: oveja anti-tropomiosina (1/500), Ratón anti-troponina I (1/100), ratón anti-Actina (1/200), conejo anti-ANP (1/200) y ratón anti-desmina (1/100). Los controles negativos de tinción se hicieron adicionando 100µl de IgG de ratón, conejo y oveja, uno en cada pozo restante y diluido a 1mg/ml en PBS 1X, dejándolos incubar durante toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos secundarios utilizados serán IgG asno anti-ratón Cy3 conjugado, IgG asno anti-conejo Cy3 conjugado e IgG asno anti-oveja Cy3 conjugado. Se adicionan 100µl de DAPI a cada pozo y las láminas se observan al microscopio confocal a 460nm.



MSC

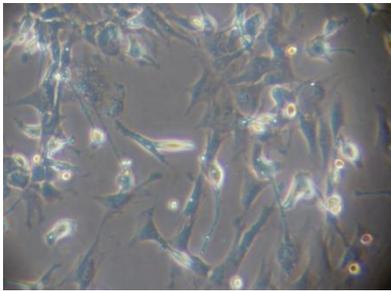


Células inducidas a cardiomiocitos (21 días de cultivo)

## Células endoteliales

Un tercio de las MSC obtenidas serán diferenciadas a células endoteliales. Esta diferenciación se hará cultivando las células en un medio que contiene L-DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5%, factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) 10 ng/ml y FGF 2 ng/ml (6). Las células se mantendrán en cultivo por 21 días cambiando el medio cada tres días.

Antes de su implantación, las células se marcarán con DAPI para ser identificadas por microscopía confocal en las muestras de tejido cardiaco procesadas para los análisis histológicos.



MSC



Células endoteliales (21 días de cultivo)

## 4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO:

El día 60 post-implante los biomodelos serán sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico. Inmediatamente después de la inyección se abrirá el lado izquierdo del pecho del animal, se ligará los vasos aferentes y eferentes del corazón y se cortará por debajo de la ligadura, retirando completamente el órgano de la cavidad.

Una vez retirado, el corazón se lavará con paraformaldehído al 4% en PBS 1x y se perfundirá con la misma solución infundiéndola directamente por la arteria coronaria izquierda. Se harán cortes transversales de aproximadamente 5 mm de espesor, dejando la zona infartada rodeada de tejido sano y se sumergirá la muestra en paraformaldehído al 4% en PBS 1x por 24 horas. Al día siguiente el tejido se pasará a glucosa al 30% en paraformaldehído al 4% en PBS 1x y 24 horas después se pasará a PBS 1x para completar la fijación. El tejido será cortado con criostato para preservar la integridad celular y el marcaje hecho con los colorantes a cada tipo celular, desde el epicardio hacia el

endocardio, en cortes de 25 µm hasta 500 µm de profundidad.

Las placas histológicas obtenidas serán observadas al microscopio confocal a 586 nm para emisión y 554 nm para excitación para ver las células marcadas con Dil (468495, Aldrich), a 450 nm para emisión y 350 para excitación para ver las células marcadas con DAPI (PA-3013, Lonza) y 527 nm para emisión y 514 nm para excitación para las células marcadas con DiO (D4292, Sigma).

Luego de hacer el análisis de las placas con el microscopio confocal, una placa de cada biomodelo será coloreada con hematoxilina eosina (H-E) para analizar la reacción inmunológica local, y otra será coloreada con tricrómica de Masson para observar el colágeno en el tejido. Estas placas serán observadas con microscopía de luz.

### **RECURSOS:**

El proyecto se desarrollará en dos (2) años. Para llevarlo a cabo se requiere el montaje de la sala de cirugía para animales grandes y el cuarto de cultivos celulares.

### **ACTIVIDADES PRINCIPALES:**

1. Estandarización de la técnica quirúrgica para inducir el infarto de miocardio por ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda en cerdos.
2. Obtención, expansión y diferenciación in vitro de células madre mesenquimales de la médula ósea del cerdo.
3. Estandarización de la técnica quirúrgica para implantar el tratamiento celular en el corazón infartado.
4. Control periódico de los animales (pruebas bioquímicas y fisiológicas) para analizar el comportamiento del corazón en respuesta al implante.

### **EL PROBLEMA A TRATAR EN LA LÍNEA DE CARDIOMIOCITOS:**

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) entre 2003 y 2005 murieron en América 104,3 hombres y 88,6 mujeres por cada 100.000 habitantes por isquemia cardiaca. En

2009, el 6% de las defunciones en América se debió a isquemia cardíaca, constituyéndose en la tercera causa de mortalidad durante ese año.

En Colombia no hay un registro adecuado sobre la prevalencia de la falla cardíaca. En uno de los estudios realizados se encontró que 20,1% de los pacientes fueron admitidos con diagnóstico de falla cardíaca, con edad promedio de 68 años; de este Grupo 51,6% fueron de género masculino y 48,4% pertenecían al femenino; la mortalidad durante la hospitalización fue de 16% y durante el seguimiento a tres meses de 31%; a los seis meses fue de 37,6% y 45,2% al año.

En el Valle del Cauca en 2009 la tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica en población mayor de 20 años de edad fue de 102.5 por cada 100.000 habitantes, mientras que en Colombia en 2006 la tasa fue de 262,3 casos por cada 100.000 habitantes, sólo en mayores de 45 años.

Durante el 2009, las enfermedades isquémicas del corazón fueron la causa de mortalidad en Cali en 625 eventos, precedida por los homicidios (1.794 eventos), las enfermedades cerebro-vasculares (942 eventos), las enfermedades hipertensivas (874 eventos) y otras enfermedades del aparato respiratorio (735 eventos), de acuerdo con las cifras de la alcaldía municipal.

El manejo de la falla cardíaca incluye estrategias no farmacológicas que abarcan el ejercicio moderado y monitoreado (en pacientes estabilizados), disminución en el consumo de sal, cuidados nutricionales con énfasis en micronutrientes, disminución de peso, asistencia psicológica, etc. , el uso de medicamentos, particularmente los que inhiben sistemas neurohormonales activados, y la implantación de dispositivos en algunos pacientes. La cirugía y el trasplante también son opciones para individuos seleccionados que padecen enfermedad muy avanzada. Tratamientos más recientes incluyen terapias con nuevos medicamentos y regeneración celular .La terapia con células tiene varios aspectos a considerar que pueden ser determinantes al momento de evaluar su éxito. Los mecanismos que median el impacto de las células implantadas en el tejido subyacente aún no están bien comprendidos.

Varios tipos celulares son sujeto actual de investigación por sus potencialidades en la recuperación post-isquémica del miocardio. La terapia con células tiene varios aspectos a considerar que pueden ser determinantes al momento de evaluar su éxito:

- Los mecanismos que median el impacto de las células implantadas en el tejido subyacente aún no están bien comprendidos.
- No se ha definido cuál es el mejor tipo celular a emplear en un tratamiento por medicina

regenerativa para recuperar la función cardíaca.

- La vía de inyección más adecuada para garantizar la localización del implante en el miocardio infartado, no se ha definido.
- No hay estudios concluyentes sobre los beneficios de sembrar las células a implantar en un biomaterial que permita una mejor integración y supervivencia del implante.
- El tiempo ideal transcurrido desde el infarto hasta la aplicación de las células tampoco está concertado.

### **RECURSOS REQUERIDOS:**

El proyecto se desarrollará en dos (2) años. Para llevarlo a cabo se requiere el montaje de la sala de cirugía para animales grandes y el cuarto de cultivos celulares. Con el siguiente personal:

- Para las cirugías:  
Un profesional con experiencia en cirugía de corazón en animales grandes, con dedicación de 8h/semana, un instrumentador quirúrgico con dedicación de 10h/semana.
- Para la obtención de células:  
Un profesional con experiencia en cultivos celulares con dedicación de 10h/semana
- Para los análisis:  
Un ecografista para tomar las ecocardiografías de los animales con dedicación de 2h/semana, un bacteriólogo para hacer los análisis bioquímicos con dedicación de 6h/semana.

### **PROGRAMA DE TRABAJO:**

Ver capítulo 9.

### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Bicknell KA, Coxon CH, Brooks G. Can the cardiomyocyte cell cycle be reprogrammed? J Mol Cell Cardiol 2007;42:706–721.

2. Qian H, Yang Y, Huang J, Dou K, Yang G. Cellular cardiomyoplasty by catheter-based infusion of stem cells in clinical settings. *Transplant Immunology* 2006; 16:135-147.
3. Collins SD, Baffour R, Waksman R. Cell therapy in myocardial infarction. *Cardiovascular Revascularization Medicine* 2007; 8: p.43-51.
4. Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, Kim TS, Kim MH, et al. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:933-943.
5. Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, Gofflot S, Lavarelle A, et al. Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the cronicly infarcted myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 292: H1095-H1104.
6. Wan SY, Zhang TF, Ding Y. Galectin-3 enhances proliferation and angiogenesis of endothelial cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells. *Trans Proceed* 2011; 43: 3933-3938.

## **5.6. LINEA DESARROLLO DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS OSTEOINDUCTIVOS PARA APLICACIÓN ÓSEA**

### **INVESTIGADORES VINCULADOS A LA LÍNEA DE ANDAMIOS POLIMÉRICOS:**

Héctor Fabio Zuluaga. PhD.

Carlos Humberto Valencia, MSc

José Herminul Mina Hernández, PhD

Mario Alejandro Ortiz, MSc

Liliana Salazar, MSc

Carolina Pustovrh. PhD

Oscar Gutiérrez. MD

Jaime Muñoz. BI

### **GRUPOS DE INVESTIGACIÓN PARTICIPANTES:**

- Tejidos Blandos y Mineralizados, (TEBLAMI), Escuela de Ciencias Básicas Universidad del Valle.
- Síntesis, Mecanismos y Reacción en Química orgánica (SIMERQO), Departamento de Química. Universidad del Valle.
- Materiales Compuestos, Escuela de Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle.
- Farmacología, Escuela de Ciencias Básicas, Universidad del Valle.

### **Grupo Tejidos Blandos y Mineralizados, (TEBLAMI):**

El Grupo de Tejidos Blandos y Mineralizados (TEBLAMI), fue creado en el año 2005 como una respuesta a la necesidad de desarrollar propuestas de investigación interdisciplinarias que permitieran establecer puntos de convergencia entre la morfología, la cirugía y ciencias afines.

- **Categoría:** A
- **Director:** Liliana Salazar, MSc en morfología Liliana.salazar@correounivalle.edu.co

### **Líneas de investigación**

- 1) Variaciones anatómicas
- 2) Biología tisular

Desde su creación, TEBLAMI ha contribuido con la formación de doce maestros en ciencias biomédicas.

A través de los proyectos de investigación tiene vinculados actualmente ocho estudiantes en proceso de formación en maestría, dos en doctorado y cinco como semilleros de investigación, estudiantes de pregrado de medicina y biología. Durante su trayectoria ha tenido dos jóvenes investigadores a través de la línea de biología tisular.

### **Proyectos**

El grupo ha realizado los siguientes proyectos relacionados con la temática del macro proyecto, en lo correspondiente a caracterizaciones biológicas.

1. Inmunolocalización de Osteoprotegerina en el órgano dentino-pulpar del ratón; Universidad del Valle, Convocatoria interna 2004. Investigador principal Liliana Salazar, Est. Maestría Mario Alejandro Ortiz
2. Expresión y aparición de las mucinas gástricas embrionarias y fetales utilizando microarreglos de tejidos; Universidad del Valle. Convocatoria interna 2011 Diana Mendoza, Liliana Salazar, Luis Eduardo Bravo
3. Caracterización histoquímica y morfométrica de músculos sometidos a isquemia y reperusión; Universidad del Valle 2011. Investigador principal Liliana Salazar, Est. Maestría Doris Rosero.
4. Consecuencias de la obesidad materna sobre el desarrollo fetal; Convocatoria interna Universidad del Valle 2012. Investigador Principal: Liliana Salazar; Co-investigadores: Blanca Salazar; Carolina Pustovrh; Est. maestría Ma. Eleonora Tejada; Est. Carlos Andrés Muñoz; Est. Farah El-Sharkawy
5. Efecto de la Obesidad Materna sobre el patrón de expresión de apoptosis en la cardiogenesis de la rata; 2012 Investigador Principal: Mario Alejandro Ortíz; Co-investigadores: Liliana Salazar; Carolina Pustovrh; Est. maestría Ma. Eleonora Tejada.6) Estudio de la Palatogenesis en un biomodelo de obesidad materna inducida por dieta. Convocatoria interna UNIVALLE 2013 Investigador Principal: Yudy Villavicencio; Co- investigadores: Liliana Salazar; Carolina Pustovrh; Mario Alejandro Ortiz; Est. maestría Estefanía Cuellar.
7. Desarrollo de andamios poliméricos bioactivados con osteoblastos, una aplicación para ingeniería de tejidos óseos. Convocatoria interna 2013. Investigador Principal Mario alejando Ortiz. Co-investigadores: Liliana Salazar; Carolina Pustovrh; Fabio Zuluaga, José Herminsul Mina, Oscar Gutiérrez, Jaime Muñoz; Est. Doctorado Carlos Humberto Valencia.

El grupo TEBLAMI se vincula al proyecto en lo concerniente a la aplicación de conceptos biológicos y morfológicos en el diseño de andamios para regeneración ósea, y en la realización de caracterizaciones de histoquímica, inmunohistoquímica y citoimmunohistoquímica.

### **Grupo Síntesis, Mecanismos y Reacción en Química orgánica (SIMERQO)**

En la Universidad del Valle se venía trabajando desde 1997, en diversos proyectos de síntesis química y mecanismos con los cuales se formaron estudiantes de Maestría y de Doctorado como también estudiantes del Pregrado de Química.

En el año 2000 se configuró el grupo SIMERQO con la participación de profesores de la Universidad del Valle, y docentes de la Universidad de Caldas y de la Universidad del Cauca, egresados del Programa de Doctorado de la Universidad del Valle; actualmente tiene clasificación A.

Durante la existencia formal del grupo se han formado en la Universidad del Valle cuatro nuevos doctores en el área de Química Orgánica, 12 Magísteres y numerosos estudiantes de pregrado que han realizado sus trabajos de grado al interior del grupo, se cuenta también con una amplia producción intelectual en artículos en revistas internacionales y nacionales indexadas, presentación de ponencias en eventos Nacionales e Internacionales, y además tiene una patente registrada.

En conjunto con los grupos Materiales compuestos y Biomateriales dentales, y en convenio con la Fundación CIEO / Universidad Militar Nueva Granada de la ciudad de Bogotá, se creó y desarrollo la sublínea de investigación en Biopolímeros para regeneración ósea.

La responsabilidad del grupo en el proyecto se centra en la obtención de insumos para la fabricación de andamios (ácido poliláctico, ácido poliglicólico, quitosano, policaprolactona, etc.); así como las caracterizaciones químicas correspondientes.

### **Grupo Materiales Compuestos**

En el proyecto, el grupo Materiales Compuestos es responsable de la elaboración de los andamios, de las caracterizaciones físicas y mecánicas, así como de los estudios de microscopía electrónica de barrido. Su presentación se hace en detalle en la Línea de Cementos Óseos.

### **Grupo Biomateriales dentales**

El grupo lleva 7 años de constituido, está clasificado en categoría B, ha graduado 15 estudiantes de especialidad en odontología y ha apoyado numerosos trabajos de pregrado en odontología.

El grupo ha contribuido al desarrollo de la línea de polímeros mediante el diseño y realización de pruebas experimentales en animales.

Su participación en la propuesta de proyecto tiene que ver con los diseños de las pruebas en biomodelos animales, sus componentes éticos, su desarrollo; así como futuras aplicaciones en pacientes humanos

Líneas de Investigación:

1. Diseño, elaboración y caracterización de dispositivos biomédicos
2. Diseño, producción y caracterización de biomateriales
3. Estudios de fisiología y biomecánica en odontología
4. Interfaces biológicas

Proyectos:

En relación con la temática de los andamios, el grupo ha participado en el siguiente proyecto:

- Desarrollo de una matriz polimérica obtenida por la técnica de electrospinning para uso en regeneración ósea. Convocatoria 2011. Universidad del Valle. Investigador principal Fabio Zuluaga, coinvestigadores: Mina José, Valencia Carlos, Gutiérrez Oscar, Muñoz Jaime.

### **Grupo Farmacología**

El grupo se vincula al proyecto andamio en lo correspondiente a los ensayos de crecimiento celular.

### **EL PROBLEMA A TRABAJAR EN LA LÍNEA DE ANDAMIOS ÓSEOS.**

Cuando ocurre pérdida de tejido óseo como consecuencia de traumas o extirpación de tumores, las lesiones a menudo se comportan como de “tamaño crítico”, los cuales no cicatrizan espontáneamente, permaneciendo defectos que afectan funcional y estéticamente al paciente.

El material ideal para el manejo de defectos de tamaño crítico es el hueso del mismo paciente, sin embargo, para su aplicación se requiere un segundo sitio donante, lo que implica otras complejidades como: Una cirugía adicional, disponibilidad de volumen adecuado, sobre costos, morbilidad del sitio donante, etc.

En el mercado de los sustitutos óseos hay una oferta de productos provenientes de banco de huesos (aloinjertos), o de origen bovino o porcino (xenoinjertos), materiales que son costosos y no exhiben cualidad osteoinductora.

La ingeniería de tejidos combina materiales sintéticos con células y otros componentes biológicos para ofrecer soluciones a este tipo de situaciones. La interrogante que se quiere resolver con la ejecución del trabajo es: ¿Un andamio polimérico bioactivado con osteoblastos será capaz de soportar el crecimiento celular y tisular, y mostrar actividad osteogénica *in vitro* e *in vivo* en defectos de tamaño crítico?

## **JUSTIFICACIÓN**

El tejido óseo se puede perder por procesos fisiológicos, patológicos y traumáticos; los de origen fisiológico son irreversibles y los otros dos tienen regeneración limitada dependiendo del tamaño de la lesión.

La necesidad de regenerar ha hecho necesario el desarrollo de bancos de tejido originados a partir de donantes (cadáveres) y de empresas procesadoras de tejidos, generalmente procedentes de otras especies como bovinos, equinos y porcinos, para tener una idea de la magnitud de la situación se puede hacer una aproximación desde la óptica del mercado, solo en los Estados Unidos de América se colocan en promedio 500.000 injertos óseos al año (reportes de la FDA), el valor global mundial se estimó para el año 2012 en 11 billones de dólares, y se calcula que para el año 2018, llegara a 27 billones de dólares. (Jinjun Shi. 2010).

El hueso autólogo continúa siendo el Gold Standard en técnicas regenerativas y reconstructivas, pero por las diferentes limitaciones que presenta (necesidad de procedimientos adicionales, pocos sitios donantes, morbilidad, etc.), se recurre a sustitutos óseos (Homoinjertos, Xenoinjertos y Aloplásticos), siendo los homoinjertos una buena alternativa por provenir de la misma especie (donantes).

Los homoinjertos son tejido óseo de origen cadavérico procesado por bancos de tejido, por

pertenecer a misma especie del receptor sería la opción de reemplazo indicada, pero su producción depende de la disponibilidad de donantes.

Los trasplantes y la donación de órganos en Colombia, están reglamentados por la Ley 1172 de 1979, la Ley 73 de 1988 y el Decreto 2493 de 2004, que contemplan que todas las personas son donantes, a no ser que en vida hayan expresado lo contrario por escrito; sin embargo en Colombia no se ha establecido una cultura de donación de órganos y tejidos. Para el año 2013 la negativa familiar a la donación fue del 36,9%, con un aumento de 11.8% en el número de negativas familiares a la donación con relación al mismo periodo del año anterior (Fuente: INS. Informe red de donación y trasplantes tercer trimestre 2013).

La red encargada de prestar el servicio de manejo de tejidos y órganos está constituida por 13 IPS trasplantadoras, de las cuales 2 pertenecen a la ciudad de Cali, (Fundación Valle de Lili y Centro Médico Imbanaco)

De los 13 centros trasplantadores solo cuatro ofrecen el servicio de suministro de tejido óseo: la Fundación Cosme Damián ( Bogotá), La Fundación Banco de tejidos Tissue Bank ( Medellín), El Banco de tejidos del Hospital San Vicente de Paul ( Medellín), y la Fundación Cardiovascular de Bucaramanga, que inició actividades en este campo en el año 2011.

Entre enero y septiembre del año 2013 se obtuvieron un total de 252 donantes de tejido óseo, 99 provenían del INMLCF y 153 de las IPS; en el mismo periodo del año 2012 se obtuvieron un total de 188 donantes de tejido óseo, de los cuales 59 provenían del INMLCF y 129 de las IPS. En el año 2015 a partir de los 252 donantes se pudo obtener 868 tejidos óseos. (Fuente: INS. Informe red de donación y trasplantes tercer trimestre 2013).

Como alternativa al injerto proveniente de donante (cadáver), existen otras opciones como los tejidos originados en otras especies como es el caso de los xenoinjertos, pero estos materiales no son producidos en Colombia y presentan precios aún más altos que los suministrados por los bancos de tejido óseo.

El desarrollo tecnológico ha hecho posible el surgimiento de los biomateriales, productos de origen natural o sintético que pueden ser procesados para servir de matrices y soporte para el crecimiento de células, y pueden ser utilizados para estimular la regeneración de diferentes tejidos, como el óseo.

Las matrices para regeneración ofrecen la ventaja de ser biocompatibles, no producen respuesta inmunológica de rechazo, son moldeables de acuerdo a la necesidad particular del tejido a estimular, se pueden producir en grandes cantidades, y los costos de producción son mucho menores que los requeridos para procesar un tejido proveniente de donantes; pero persiste el problema de los requerimientos biomecánicos del sitio receptor.

En la Universidad del Valle, se ha hecho un esfuerzo por integrar grupos de investigación en la obtención de diferentes biomateriales con uso potencial en regeneración ósea, aplicados principalmente a las áreas de traumatología, ortopedia, y odontología.

Si se logra obtener crecimiento celular o tisular, y demostrar capacidad osteoinductora de los andamios poliméricos se podría estar hablando de un verdadero desarrollo en ingeniería de tejidos óseos, así como de la posibilidad de crear un centro de biotecnología para la producción de dispositivos para regeneración ósea a unos costos asequibles para el sistema de seguridad social y para los mismos pacientes.

## **OBJETIVOS PARA LA LÍNEA DE ANDAMIOS ÓSEOS**

### **Objetivo General**

Desarrollar andamios poliméricos osteoinductivos con el fin de promover la regeneración ósea en sitios de difícil cicatrización

### **Objetivos Específicos**

- Fabricar andamios poliméricos fibrosos y porosos, mediante técnicas de electrospinning y/o lixiviación.
- Bioactivar los andamios mediante su cultivo con osteoblastos
- Describir la capacidad osteoinductora de los andamios poliméricos mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.
- Describir la biointegración de un bloque polimérico bioactivado (Prueba de uso)

## **ANTECEDENTES**

Los accidentes de tránsito en Colombia presentan una gran prevalencia y las estadísticas del instituto colombiano de Medicina Legal muestran una tendencia a conservarse así (Perdomo, 2010). Una de las zonas anatómicas más afectadas en un accidente de tránsito es el complejo

cráneo facial. Los huesos del cráneo y de la cara a menudo presentan problemas para regenerarse, siendo necesario recurrir a técnicas reconstructivas y en el caso del cráneo, a elementos como las mallas y láminas de titanio que aunque logran sellar la cavidad, son incapaces de estimular la regeneración ósea y elevan notablemente los costos del tratamiento.

Los defectos óseos de gran tamaño se comportan como “críticos”, y son incapaces de cicatrizar espontáneamente, siendo necesario la utilización de injertos o sustitutos óseos para estimular la iniciación y desarrollo del proceso regenerativo.

También son considerados defectos de tamaño crítico las cavidades que permanecen como consecuencia de la extirpación quirúrgica de lesiones intraóseas como tumores, quistes, osteomielitis, etc., y las pérdidas fisiológicas de los rebordes alveolares en la cavidad oral.

Los materiales de elección para injerto, son en primer lugar el hueso del propio paciente (autoinjerto), y como segunda opción los aloinjertos, provenientes de un banco de hueso, o los xenoinjertos, que tienen su origen en otras especies.

El desarrollo científico, con la aparición de la Ingeniería de Tejidos, ha permitido una tercera opción que son los aloplásticos, materiales sintéticos capaces de servir como soporte al desarrollo tisular.

De la gran variedad de materiales utilizados, los polímeros por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, son los mejores candidatos para la elaboración de matrices, con las cuales se busca estimular el proceso regenerativo y reparar el tejido dañado mediante la incorporación de células del mismo organismo.

En la Universidad del Valle, mediante esfuerzos conjuntos entre el laboratorio de polímeros del Departamento de Química, la Escuela de Ingeniería de Materiales, la Escuela de Odontología y la Escuela de Ciencias Básicas, se ha desarrollado una red de Investigación encaminada a la obtención y aplicación de polímeros en técnicas de regeneración ósea. En el contexto de esta línea se han realizado varios trabajos de grado a nivel de pregrado de Química e Ingeniería de Materiales (Correa & Godoy, 2011; Correa & Betancourth, 2010; Vásquez, 2010; Valencia & Mateus, 2009; Millán, 2009; Giraldo, 2009), estudios en los que se muestra el potencial del ácido poliláctico en la elaboración de matrices y sustitutos óseos.

Dentro de la misma línea de investigación, se realizaron algunos trabajos de grado a nivel de especialidad clínica, en los cuales se emplearon biomodelos animales para estudiar la biocompatibilidad, y cualidad osteoconductora de los polímeros biodegradables (Niño et al., 2010; Pinzón & Rodríguez, 2010; Valencia et al., 2008; Mutis et al., 2008). Además se observó la capacidad de estimular la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en biomodelos animales, cuando eran combinados con sustancias osteopromotoras como el quitosano (Tobón et al., 2010), o con cerámicas bioactivas como el fosfato tricálcico (Bustamante et al., 2011).

### **El tejido óseo.**

El hueso es un tipo de tejido conectivo mineralizado que se caracteriza por tener rigidez y alta resistencia a la tracción y compresión. Sus funciones son variables, se encarga de dar soporte y brindar protección a otras estructuras, pero también participa en la hematopoyesis y en la regulación del calcio (Lafita, 2003).

El tejido óseo está compuesto por un componente celular y otro no celular; el componente celular son osteoblastos, osteocitos, células de recubrimiento y osteoclastos. El componente no celular presenta una fase proteica y otra mineral. La fase proteica está compuesta principalmente por colágeno tipo I y por proteínas no colágenas como la osteocalcina, osteonectina y proteoglicanos.

Los osteoblastos son células de origen mesenquimatoso, su función es secretar y formar la matriz ósea extracelular, la cual va a actuar como centro de nucleación para el depósito de sales minerales durante el proceso osteogénico (Fernández, 2006a; Fernández, 2006b; Lafita, 2003).

Los osteoblastos tienen una vida activa entre una y diez semanas, pudiéndose diferenciar a osteocitos, células de recubrimiento, o hacer apoptosis.

Cuando se produce la matriz extracelular, el osteoblasto queda atrapado en ella y se diferencia a osteocitos, otros permanecerán en la superficie del tejido recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo.

Los osteocitos son células óseas maduras y relativamente inactivas. Su función es crucial para el

mantenimiento del complejo proceso de homeostasis ósea, mediante la conformación del mecanostato de Frozer, que se encarga de recoger la información de tensión generada sobre el sistema. Conserva la capacidad, limitada, de sintetizar y de reabsorber los componentes de la matriz ósea (*osteolisis osteocítica*) regulando la calcemia.

Por otro lado, los osteoclastos, son células grandes multinucleadas que derivan del tejido hematopoyético y llevan a cabo la reabsorción y la degradación de la matriz ósea mediante un proceso de acidificación (pH 5) que lleva a la disolución de los cristales de Hidroxiapatita. Estas células forman túneles profundos en la superficie del hueso compacto, generando cavidades que son invadidas posteriormente por los osteoblastos para formar nuevo hueso.

Con la participación de las anteriores células el hueso se regenera, lo que se lleva a cabo por una interacción de factores mecánicos y metabólicos. En circunstancias fisiológicas, la formación de hueso está regulada principalmente por cargas funcionales, es decir, en los lugares en donde se reciba cargas en rangos fisiológicos, habrá una diferenciación osteoblástica y se formará hueso nuevo.

En el proceso de reabsorción ósea participan mediadores bioquímicos del metabolismo del calcio (como la hormona paratiroidea, el estrógeno y la vitamina D), que predominan en el control de la resorción ósea, de esta forma en el caso de ocurrir un desequilibrio en el metabolismo del calcio, se activan mecanismos de resorción para liberar calcio de los huesos a la circulación (Fernández, 2006a; Fernández, 2006b; Lafita, 2003).

Existen dos mecanismos de recambio, el modelado estructural y el interno o simplemente remodelado. El modelado estructural se da cuando los huesos largos crecen tanto en longitud como en espesor. Involucra sitios individuales de formación o resorción del hueso que cambian el tamaño, la forma o la posición del mismo. Este modelado se da principalmente durante el crecimiento del individuo, y además es el medio principal de la adaptación esquelética a cargas funcionales y terapéuticas. Todos los huesos son capaces de adaptarse a las cargas funcionales por mecanismos de modelado (Fernández et al., 2006).

El modelado interno o remodelado es el mecanismo del recambio óseo, que responde a estímulos relacionados con la homeostasis de minerales como la del ion calcio en el cuerpo, así como con lesiones en el tejido óseo; para repararlo, involucra secuencias de activación de células, resorción y

formación de hueso. La duración de este ciclo de remodelación para los humanos es de alrededor de cuatro meses para el hueso trabecular y aproximadamente seis meses para el cortical. El proceso de cicatrización inicia con una respuesta inflamatoria, en la que se activan factores quimiotácticos para los monocitos y los macrófagos. Una vez que se activan los macrófagos liberan el *factor de crecimiento de los fibroblastos* (FGF) que estimula a las células endoteliales a expresar el activador del plasminógeno y la procolagenasa 16.

De igual manera, la sangre extravasada forma un coágulo, y las plaquetas que lo integran tienen una función dual: La de hemostasia y la de liberar factores como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF, el factor de crecimiento transformante de tipo B TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento transformante FGF- $\beta$  y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

Con la activación del complemento, la ruptura de vasos y en presencia de células mesenquimatosas pluripotenciales, se realiza la diferenciación de las mismas en osteoblastos. Durante este mismo proceso, en el tejido afectado se presenta hipoxia y como consecuencia se produce una disminución del pH, para que los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares se activen y eliminen los detritus celulares y secreten factores que promueven la quimiotaxis y la mitogénesis.

Alrededor de los 3 a 5 días se genera un tejido de granulación, compuesto por vasos, colágeno y células. El colágeno será el sustrato que contenga los factores a los que serán sensibles las células y el lugar donde ellas se anclaran cuando lleguen a través de los vasos, periostio, endostio y médula ósea, diferenciándose posteriormente en osteoblastos y condroblastos.

El tejido de granulación madura por varias semanas y es reemplazado por el *callo óseo*, que a su vez será sustituido por hueso fibroso inmaduro y posteriormente por hueso lamelar. El papel del callo óseo es muy importante porque estabiliza los fragmentos de la fractura, impidiendo su movilidad, ya que si existe movilidad el tejido que predominará será de tipo cartilaginoso y no óseo (Fernández, 2006b).

El último proceso que ocurre en la cascada de fenómenos de reparación ósea es el remodelado, se trata de un proceso de activación-reabsorción-formación, donde los osteoclastos se activan produciendo las lagunas de Howship, que serán repobladas por osteoblastos que producen material osteoide y cuando éste se calcifique se restaurará la morfología ósea. Este equipo de células se denomina *unidad básica multicelular*.

El remodelado óseo en humanos dura entre 3 y 6 meses (fase *sigma*). En este periodo aparece el cono de corte y aposición en el cual los osteoclastos elaboran un túnel que posteriormente se repuebla de osteoblastos. A medida que el cono de corte avanza es acompañado por las estructuras vasculares que crecen a medida que avanza su actividad erosiva. Por atrás del frente de corte se alinean los osteoblastos, bordeando las paredes erosionadas de la matriz; disponiéndose en forma progresiva para cerrar el túnel creado por los osteoclastos pero sin llegar a obliterarlo. El resultado final de todo este proceso será el Sistema Haversiano en el hueso cortical.

### **Injertos y sustitutos óseos**

La utilización de injertos se ha convertido en una práctica clínica rutinaria en todas las disciplinas quirúrgicas que tienen que ver con tejido óseo. El hueso es el segundo tejido más trasplantado después de la sangre. Se calcula que solo en los Estados Unidos en el año 2006 se realizaron 500.000 procedimientos y en el mundo alrededor de 2,2 millones (Kamran, 2010).

Después de muchos años de investigación en bioingeniería se continúa sin encontrar el biomaterial ideal que pueda reemplazar al propio hueso del paciente, de esta forma el hueso autólogo sigue siendo el material de elección para llenar cualquier tipo de defecto debido a sus propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas. Las propiedades osteogénicas del hueso nativo lo convierten en el *Gold standard* para comparar cualquier sustituto óseo.

Por osteoconducción se entiende la propiedad que tiene el material de permitir el crecimiento celular y tisular en su interior y en su superficie. La osteoinducción es la inducción a la cicatrización ósea a expensas de un proceso en el cual las células son “persuadidas” a sintetizar nuevo hueso, e involucra una diferenciación fenotípica de células mesenquimales en células formadoras de hueso, y solo se da en injertos que tienen incorporadas células y proteínas morfogenéticas (Martínez, 2008; Dimar & Glassman, 2007).

La osteopromoción se refiere a la capacidad de fusión que se presenta entre el injerto y el medio biológico, y se debe a la participación de algunos agentes que sin ser propiamente osteoinductivos, si facilitan la integración; ejemplos de ellos son productos como los aspirados de médula ósea, los

concentrados de plaquetas, y las proteínas morfogenéticas (Vaccaro, 2002). Mientras que la osteogénesis es una cualidad que solo posee el hueso autólogo fresco, y es la capacidad de activar el proceso regenerativo a expensas de sus células y de factores de crecimiento.

El desarrollo de la bioingeniería ha hecho posible la producción de una serie de materiales sintéticos con características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, porosidad, y estabilidad, que facilitan la inoculación de células y otros productos como factores de crecimiento que potencializan el proceso de cicatrización y regeneración ósea. Dentro de esos materiales sintéticos que se han venido desarrollando hace más de 40 años, se encuentran los biopolímeros, considerados como sustitutos óseos aloplásticos (Martínez & Donado, 2008; Dimar & Glassman, 2007).

Es importante que estos materiales sean biocompatibles, que tengan gran disponibilidad, que sean fácilmente almacenables, que no generen reacciones inflamatorias y que brinden menores complicaciones y mayor comodidad para el paciente; además, deben ofrecer óptimo contacto con el tejido, para lograr estabilidad volumétrica, mecánica y cohesión interna. La elasticidad, la resistencia frente a la movilidad y deformación también son condiciones necesarias al igual que ser biodegradables (desaparecen en la medida que se van generando nuevos tejidos por medio de un recambio celular), para eliminar la necesidad de ser extraídos quirúrgicamente.

### **Matrices para regeneración ósea**

La evolución en el campo de los sustitutos óseos llevó a la aparición de andamios (*scaffolds*, por su nombre en inglés), estructuras tridimensionales que sirven como soporte temporal para el crecimiento vascular y celular, mientras se da la regeneración tisular esperada.

El desarrollo de nuevos materiales, ha hecho posible la producción de una serie de materiales sintéticos con características físicas y químicas que posibilitan la incorporación de células óseas y otras sustancias, como factores de crecimiento y moléculas de adhesión, que potencializan el proceso de cicatrización ósea, y facilitan la técnica de regeneración ósea guiada. Para que esto ocurra, el andamio debe permitir el transporte de fluidos y nutrientes para la expansión celular y la organización tisular.

El papel del andamio, es proveer un espacio tridimensional para el crecimiento y la adhesión celular.

Después de un tiempo la matriz debe degradarse/reabsorberse, dejando en su lugar el tejido neoformado, y ningún material extraño.

Los requerimientos para un andamio en ingeniería de tejidos óseos son: Biocompatibilidad, rapidez de biodegradación acorde a la rapidez de formación tisular, no toxicidad, absorción de los productos de la biodegradación, alta porosidad y estructura porosa interconectada para el crecimiento y expansión celular. También es conveniente que el material utilizado cumpla con el principio de osteopromoción, sellando el sitio del defecto óseo, impidiendo la migración de células indeseadas, como las de tejido blando, pero a la vez permitiendo el desarrollo del proceso osteogénico.

La biocompatibilidad y la biodegradación/bioreabsorción son características básicas que debe tener un elemento para poder ser utilizado como matriz, ya que el material debe ser colocado *in situ*, degradarse o reabsorberse en un tiempo determinado, pero a la vez permitir la absorción de proteínas plasmáticas, y la unión con células como osteoblastos. La porosidad es vital para la nutrición de las células que van a interactuar con la matriz y para permitir la formación de nuevo tejido en su interior (Jung et al., 2007; Hollister, 2006; Batchelor, & Chandrasekaran, 2004; Vaccaro, 2002).

La ciencia de los materiales ha sido fundamental en el desarrollo de productos para reconstrucción ósea, entre los años 1950-1980 se buscó obtener unos biomateriales que básicamente fueran biocompatibles y exhibieran una cualidad osteoconductora, este fue el origen de los primeros andamiajes para regeneración ósea (andamios de primera generación).

Entre 1980 y el año 2000 se desarrollaron los andamios de segunda generación, compuestos que no solo eran biocompatibles, sino también capaces de interactuar químicamente con el entorno biológico, como los biovidrios y los fosfatos de calcio.

El avance en las técnicas de biología molecular en las últimas décadas permitió la identificación y el aislamiento de diversas células, así como una mayor comprensión de la relación célula- entorno y de los complejos procesos de comunicación; conocimiento que es clave para el desarrollo de una nueva disciplina, la ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos se apoya en los desarrollos de las ciencias naturales y de las ingenierías, para crear estructuras que de alguna forma simulan la matriz extracelular y permiten a las células realizar una primera interacción (guiada) sobre estos dispositivos artificiales.

La ingeniería de tejidos da la posibilidad de utilizar materiales para conformar estructuras tridimensionales, con una macroestructura y microestructura parecidas a la del tejido biológico, y con la posibilidad de obtener crecimiento celular y tisular en ellos a expensas de algunas células y/o sustancias biológicas que han sido previamente incorporadas. Este concepto establece la posibilidad de obtener andamiajes con capacidad osteoinductora (andamios de tercera generación).

Idealmente las matrices para tejido celular deben tener las siguientes características (Mitragotri & Lahann, 2009; Chu & Liu, 2008; Dimitriou, 2005; Yang et al., 2001; Kim & Mooney, 1998):

- La superficie debe permitir la adhesión y crecimiento celular.
- Ni el polímero ni sus productos de degradación deberán producir inflamación o toxicidad cuando son implantados *in vivo*.
- Las características del material deben permitir el procesamiento en estructuras tridimensionales.
- La porosidad debe ser por lo menos del 90% para proveer un área de superficie adecuada para las interacciones celulares y suficiente espacio para la regeneración de la matriz extracelular.
- El material debe reabsorberse una vez cumpla con su función de soporte a la formación tisular.
- La tasa de reabsorción debe estar acorde con la necesidad fisiológica.

## **Biomateriales**

Los biomateriales son usados en la industria biomédica para reemplazar tejidos dañados, el mercado mundial fue en el año 2005 de 300 billones de dólares y presenta un crecimiento del 20% anual (Serino et al., 2003), lo que impulsó un gran interés en el estudio de las propiedades de nuevos y viejos materiales con uso potencial en ingeniería de tejidos.

Los materiales más utilizados son las biocerámicas (hidroxiapatita y fosfatos de calcio), los biovidrios, los polímeros naturales (quitosano y colágeno), y los polímeros sintéticos como el ácido poliglicólico, ácido poliláctico, y la policaprolactona, entre otros.

### **Biocerámicas**

La hidroxiapatita y los fosfatos de calcio son materiales ampliamente utilizados como sustitutos óseos, debido a su similitud con la hidroxiapatita biológica, componente principal del hueso.

Este grupo de materiales son osteoconductores, y se pueden unir directamente a la célula ósea por su afinidad química. La utilización en ingeniería de tejidos es limitada por sus propiedades físicas (resistencia mecánica) y por la lenta bioreabsorción de sus fases cristalinas (Serino et al.,2003).

### **Biovidrios y Silicatos de vidrio**

Materiales osteoconductores, considerados bioactivos por excelencia debido a que al entrar en contacto con los fluidos corporales forman una película de hidroxiapatita carbonatada que les permite interactuar químicamente con el entorno biológico. A pesar de sus excelentes propiedades biológicas, su poca resistencia a la fractura ha sido un limitante para su aplicación (Serino et al., 2003).

### **Polímeros naturales**

**Colágeno.** Derivado de la matriz extracelular, sirve de soporte natural para la adhesión, proliferación y crecimiento celular. Ha sido muy utilizado en aplicaciones tisulares (Serino et al., 2003).

**Quitosano.** Este material ha sido muy estudiado en los últimos años por una aparente habilidad para atrapar factores de crecimiento en los sitios de cicatrización.

## Polímeros sintéticos

A diferencia de los polímeros naturales, exhiben propiedades mecánicas y características de moldeabilidad que permiten la elaboración de estructuras tridimensionales, que asemejan la macroestructura y microestructura del tejido óseo.

Los más utilizados son el ácido poliláctico, poliglicólico y la policaprolactona, tienen la ventaja de ser versátiles, pudiendo alterarse la resistencia, y las tasas de reabsorción/biodegradabilidad de acuerdo a las necesidades clínicas (Serino et al., 2003).

**Ácido Poliláctico (PLA).** Pertenece a la familia de los poliésteres alifáticos y ha sido intensamente estudiado por ser un polímero biodegradable, con alta resistencia mecánica y un módulo de Young superior al del polietileno y el poliestireno. El PLA es un material altamente versátil obtenido del ácido láctico que a su vez es producido 100% con recursos renovables como maíz, remolacha, trigo y otros productos ricos en almidón. El ácido poliláctico exhibe propiedades que son equivalentes o mejores que algunos polímeros basados en el petróleo, lo que lo hace conveniente para una amplia variedad de aplicaciones, entre las que se cuenta el uso como dispositivos médicos biocompatibles y bioabsorbibles (Hang et al., 1989).

El PLA es fácilmente procesable en equipos estándar de procesamiento de plásticos para producir piezas moldeadas, películas o fibras. Es uno de los pocos polímeros en los cuales la estructura estequiométrica puede ser fácilmente modificada, polimerizando una mezcla controlada de los isómeros L y D para producir un polímero de alto peso molecular, cristalino o amorfo, que puede ser usado para entrar en contacto con alimentos, siendo considerado como seguro. El isomerismo óptico del ácido láctico tiene una gran influencia sobre el metabolismo del monómero y las propiedades del polímero resultante. Este tipo de isomerismo resulta del hecho de que uno de los átomos de carbono (el centro asimétrico) tiene cuatro grupos unidos a él, que no son idénticos y por lo tanto no son superponibles en su imagen especular. Tanto el ácido láctico D como el L son física y químicamente idénticos en todos los aspectos excepto en que cada uno rota en dirección opuesta, D, dextrorrotación a la derecha y L, levorrotación a la izquierda (Hang et al., 1989).

El PLA es degradado por una simple hidrólisis del enlace éster y no requiere la presencia de enzimas para catalizar la hidrólisis, la velocidad de degradación depende de la forma y tamaño del

artículo, la relación de isómero y la temperatura de hidrólisis (Hang et al., 1989). El ácido poliláctico de alto peso molecular es un termoplástico incoloro, satinado y rígido, con propiedades mecánicas, similares a las del poliestireno. El PLA amorfo es soluble en la mayoría de solventes orgánicos por ejemplo tetrahidrofurano (THF), solventes clorados, benceno, aceto-nitrilo y dioxano (Witte et al., 1989).

La propiedad que exhibe el ácido poliláctico de ser biocompatible, degradarse completamente dentro del tejido vivo al estar en contacto con los fluidos corporales, y el tener menor o mayor resistencia de acuerdo a su peso molecular, lo han convertido en un material de elección para elaborar andamios para regeneración ósea (Fuente et al., 2006; Alcalde, 2005; Garlotta, 2001; Freed et al., 1994).

***Policaprolactona (PCL).*** Se obtiene mediante la polimerización por apertura de anillo de la  $\epsilon$ -caprolactona. La PCL es un poliéster semicristalino, presenta una temperatura de fusión muy baja, 59-64°C y una Tg de -60°C. Se comporta como un material biocompatible y podría ser utilizado como sutura biodegradable. Por otra parte, debido a que la PCL tiene un intervalo de degradación elevado (del orden de 2 años) y un bajo punto de fusión, es habitual utilizarla en forma de copolímero (Jones et al., 2002).

Este poliéster alifático puede ser degradado enzimáticamente en el medio ambiente, mientras que en el cuerpo se degrada por hidrólisis no enzimática. En la actualidad, la PCL se ha considerado para diversas aplicaciones médicas (Serrano et al., 2004), tales como suministro de medicamento, regeneración de tejidos, andamios para el crecimiento de fibroblastos y osteoblastos, nanocompuestos para reparación ósea y sustitución renal (Chen et al., 2007). La PCL posee estructura de planos en zigzag como el polietileno (PE), debido a su número relativamente grande de grupos metileno en la cadena. La Tg baja (-60°C) lo convierte en un polímero suave, con una alta flexibilidad en su cadena principal, siendo ésta una característica que es única entre los poliésteres. Sin embargo, las propiedades mecánicas son escasas y la tasa de degradación a través de la hidrólisis es muy baja, por el balance hidrofílico/hidrofóbico entre los grupos éster y metileno; lo que significa que algunas modificaciones, por ejemplo, copolimerización, mezcla o funcionalización son requeridas para el buen desempeño del material en una amplia gama de usos. La técnica de funcionalización es particularmente importante para aplicaciones biomédicas, porque permite optimizar algunas características de interés, entre otros, la tasa de degradación *in vivo*, adhesión celular, compatibilidad con otros polímeros, interactuar con minerales como hidroxiapatita

y así sucesivamente. Por otra parte, los grupos funcionales se han utilizado para la interacción específica con proteínas o células (Serrano et al., 2005; Hao et al., 2003).

Entre los diversos tipos de biomateriales, la policaprolactona, presenta grandes ventajas debido a su biocompatibilidad, bajo costo, fácil procesabilidad y lenta tasa de degradación hidrolítica. Se ha utilizado para la reconstrucción de varios tejidos, tales como huesos, piel, nervios y retina. Las membranas ultra delgadas de PCL, proporcionan aplicaciones prometedoras en ingeniería de tejidos blandos, especialmente para su regeneración aplicada al tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Serrano et al., 2005); así mismo, el despiece de la policaprolactona ha sido investigado sobre todo a largo plazo, en implantes para la liberación de medicamentos, como coayudante en la formación de tejidos y para tratamientos de regeneración ósea (Hao et al., 2003).

### **Proceso de *Electrospinning***

Electrospinning o electrohilado es una técnica que utiliza fuerzas eléctricas para producir fibras de polímero con diámetros que van de 2 nm a varios micrómetros, usando soluciones de polímero tanto naturales como sintéticas. Esta técnica ha tenido un gran incremento en la investigación y a nivel comercial en la última década (Ramakrishna, 2005; Buchko et al, 1999).

Hay básicamente tres componentes para cumplir con el proceso: Una fuente de alto voltaje, una aguja de pequeño diámetro y un colector metálico. En el proceso de electrohilado, se emplea alto voltaje para inducir las cargas eléctricas dentro de la solución de polímero, antes de llegar al colector la disolución se evapora o solidifica y se recoge como una red interconectada de pequeñas fibras en el colector (Buchko et al, 1999).

En general, se trata de una técnica para producir nanofibras de una amplia gama de polímeros, que además, ofrece una gran variedad de ventajas entre las que se destacan la generación de porosidad intercomunicada, la capacidad de ajustarse a una gran variedad de tamaños y formas, mayor cantidad de polímero por unidad de volumen, y la capacidad de controlar la composición de la nanofibra para lograr los resultados deseados en cuanto a composición y funcionalidad. Debido a estas ventajas la obtención de nanofibras ha sido ampliamente utilizada en diversas aplicaciones tales como filtración, sensores químicos, electrodos de materiales biológicos, andamios, etc. (Mit-Uppatham et al., 2004).

## **Crecimiento de células en andamios**

La estructura porosa y la orientación isotrópica de la fibra en dos dimensiones, obtenidas utilizando la técnica de electrospinning, se asemeja a la distribución natural que se presenta en la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), imitando esta estructura se tendría un candidato prometedor para la regeneración de tejidos dañados. Tres factores son importantes en cuanto al comportamiento *in vitro* de células, estos son la química de los andamios, las propiedades arquitectónicas y la arquitectura. La matriz extracelular (ECM) natural, se compone de varias proteínas y azúcares dentro de una red tridimensional. Esta mezcla de materiales proporciona las propiedades mecánicas que son ideales para el apoyo a nivel celular y de tejidos, promoviendo la actividad específica, evitando citostasis entre las células.

Los materiales pueden ser diseñados para imitar la resistencia a la tracción y propiedades de compresión en ciertos tejidos, así como recubrimientos que puedan impartir una superficie adecuada. Uno de los más grandes desafíos en la actualidad es la creación de la arquitectura adecuada, prestando especial atención tanto a la porosidad (el porcentaje de andamio para el crecimiento celular) como al tamaño del poro. Los andamios de tejido, se utilizan para reparar el tejido humano dañado, las células sembradas se adhieren y crecen en andamios de tejido, inmersos también allí los diversos nutrientes son implantados en los lugares donde existen defectos en los tejidos humanos. Hasta ahora, se han desarrollado diferentes tipos de andamios, con diversos materiales y con tamaño del orden de micras, sin embargo, los investigadores han concluido que tejidos humanos como la sangre, vasos, cartílagos, huesos, nervios y piel, consisten en formas de nanofibras de origen biológico. Este hallazgo, llamó la atención de los investigadores de andamios nanoestructurados, por eso se observa bastante potencial a la utilización de nanofibras de polímeros electrohiladas con el fin de reparar tejido humano dañado (Liang et al., 2007; Anh et al., 2006; Hao et al., 2003; Yoshimoto et al., 2003; Megelski et al., 2002).

## **Reemplazo del andamio polimérico por tejido óseo**

La cicatrización endo-ósea se da por la interacción entre células y sustancias biológicas, cuando se implanta un andamio tridimensional en un defecto quirúrgico, se busca que este actúe como un bioreactor en el cual se desarrollarán procesos de proliferación celular, síntesis de sustancias y vasculogénesis.

La matriz deberá reabsorberse y progresivamente será reemplazada por tejido neoformado, el patrón de reabsorción para un andamio de ácido poliláctico ha sido determinado como de tipo centrípeto (Valencia et al., 2008), pero no es homogéneo, debido a que la dinámica de la degradación hidrolítica del ácido poliláctico llevará a una erosión en su superficie, e incremento en la porosidad; habrá absorción de fluidos, lo que produce hinchamiento y rompimiento de cadenas, los enlaces éster se rompen en forma aleatoria; inicialmente se afectará la parte amorfa, la cual tiene segmentos de extremo de cadenas, plegamientos y cadenas no entrelazadas con rotación libre, y una estructura desorganizada, que facilita la difusión y luego la porción cristalina la cual por ser más ordenada dificulta la difusión (Solis et al., 2009).

Paralelo a la degradación hidrolítica del andamio, se presentará adsorción de proteínas, colonización celular, angiogénesis y depósito de material osteoide; coincidiendo la presencia de zonas de degradación, zonas de formación ósea, y zonas del andamio con cristales de PLA sin evidencia de degradación (Solis et al., 2009). Con el tiempo toda la matriz debería ser reemplazada por tejido óseo neoformado.

### **El osteoblasto y la matriz extracelular**

El osteoblasto es la célula característica del hueso, responsable de la producción de los elementos que constituyen la matriz extracelular.

Desde un punto de vista filogenético, las células osteoblásticas derivan de células mesenquimales, (por tanto son una variedad de tejido conectivo). Debido a que estas células mesenquimales pueden originar numerosos tipos celulares, no se puede hablar de célula formadora de hueso hasta que la célula en desarrollo no se compromete en la estirpe osteoblástica (Vicario, 2004).

En la diferenciación a célula ósea se pasa por las fases de célula precursora pluripotencial (stem cell), de célula osteoprogenitora inducible (células del estroma), y célula osteoprogenitora determinada (preosteoblastos endostales o periostales) que constituye el primer escalón dentro de la estirpe osteoblástica, ya que se trata de células totalmente comprometidas. El paso final de la progresión celular a lo largo de la estirpe osteoblástica es el osteocito, que es un osteoblasto que ha quedado encerrado en hueso calcificado (Vicario, 2004).

A nivel microscópico, la célula se observa con un núcleo redondo basal, un citoplasma basófilo y un aparato de Golgi prominente. Los osteoblastos se observan recubriendo la capa de matriz que están produciendo y que todavía no está mineralizada (material osteoide).

Ultraestructuralmente los osteoblastos se caracterizan por un retículo endoplásmico bien desarrollado, con cisternas dilatadas y un contenido granular denso, un gran complejo de Golgi, una membrana plasmática rica en fosfatasa alcalina y con receptores para la hormona paratiroidea (PTH).

El osteoblasto es una célula secretora, pero pierde esta función cuando la matriz madura convirtiéndose la célula en osteocito y en célula de recubrimiento.

Los osteoblastos poseen una regulación autocrina. Pueden sintetizar y liberar factores de crecimiento en la matriz ósea para estimular la actividad osteoblástica, o pueden interactuar con el osteoclasto, en procesos de diferenciación y actividad osteoclástica (reabsorción ósea).

El proceso de formación ósea se da en varias etapas: 1) Síntesis y procesamiento intracelular del colágeno tipo I. 2) Secreción y procesamiento extracelular del colágeno. 3) Formación de microfibrillas, fibrillas, y fibras de colágeno. 3) Maduración de la matriz de colágeno. 4) Nucleación y crecimiento de los cristales de hidroxapatita.

Al final del proceso se tendrá un 35% de matriz orgánica y un 65% de material inorgánico cristalino.

Para formar la matriz, el osteoblasto sintetiza el colágeno tipo I, que tiene una función estructural, y otras proteínas no colágenas con funciones diversas, como servir para la adhesión (fibronectina, trombospondina, osteopontina, y sialoproteína ósea).

También produce proteoglicanos (condroitín sulfato y heparán sulfato); además diferentes proteínas que se constituyen en componentes de la matriz o participan en procesos de señalización y comunicación intercelular.

Otros productos importantes del osteoblasto son la osteocalcina, la osteonectina y la fosfatasa alcalina, esta última involucrada directamente en el proceso de mineralización y considerada como

un marcador del fenotipo osteoblástico (Vicario, 2004).

Para su actividad, los osteoblastos deben producir factores de crecimiento que se almacenan en la matriz ósea, tales como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), así como diversos factores locales y citocinas, entre las que se encuentra la interleucina 6 (IL-6) (Vicario, 2004).

### **Cultivo de osteoblastos y caracterizaciones**

Los osteoblastos son utilizados en la caracterización de biomateriales que van a ser aplicados en técnicas regenerativas y/o reconstructivas óseas.

Actualmente se pueden recurrir a tres modelos para realizar estudios con este tipo celular: Cultivos obtenidos a partir biomodelos (fetal o adultos), procedentes de hueso humano normal y líneas celulares establecidas (v.g. procedentes de sarcomas) (Vicario, 2004; Meseguer et al., 1994).

En cada modelo se presentarán ventajas y desventajas, como la mezcla de poblaciones celulares, cambios del funcionamiento celular, potencial de crecimiento variable, etc.

En los cultivos de calota y en los de hueso normal humano, se corre el riesgo de la incorporación de otros tipos celulares, por lo que es necesario tener en cuenta el tipo de hueso y la edad, para minimizar la posibilidad de mezcla celular, también, es importante la implementación de técnicas que permitan la separación progresiva de tipo celulares indeseables como los fibroblastos.

Las líneas celulares establecidas son líneas clónicas provenientes generalmente de osteosarcomas. Hay una gran variedad de ellas como la MC3T3-E1, ROS 17/2.8, y UMR 106-01 proveniente de osteosarcoma de rata.

A partir de tumores sarcomatosos humanos se han obtenido otras líneas establecidas como la TE-85, la MG-63, y la SaOS-2; y por clonación de células humanas se han obtenido líneas celulares como la HOBIT (Human Osteoblast Immortalized Transfected) (Vicario, 2004). Las líneas establecidas ofrecen la ventaja de estar purificadas para tener solo osteoblastos.

Los trabajos de Peck y colaboradores en la década del 60 (Peck et al, 1964), permitieron perfeccionar la técnica para aislar osteoblastos viables a partir de calota de ratas. En este sentido se han descrito diferentes técnicas como la digestión enzimática con colagenasa, la clonación, aislamiento mecánico, etc., aplicadas sobre diferentes fuentes tales como hueso humano, calota de fetos de roedores, embriones de pollo, calota y huesos largos de conejo y rata, entre otros (Vicario, 2004).

Pero una vez aisladas las células, los esfuerzos se deben orientar en crear las condiciones adecuadas para lograr mantener una población que sea viable y funcional en condiciones *in vitro*, para que se dé la expresión del fenotipo osteoblástico.

La determinación del fenotipo, o el establecer la naturaleza exacta de las células cultivadas, no se puede hacer únicamente por estudios morfológicos, debido a que en células cultivadas es difícil diferenciar un osteoblasto de una célula mesenquimal, un condrocito o un osteoblasto.

Para caracterizar osteoblastos se recurre a la combinación de diferentes técnicas como: La microscopía (óptica, confocal, electrónica de barrido y transmisión); métodos histoquímicos como la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina, y técnicas de inmunohistoquímica para colágeno tipo I y III, producción de osteocalcina, respuesta a PTH, etc.

### **Caracterización de estructuras implantadas en tejido óseo**

Es importante determinar la formación de tejido óseo en la estructura que ha sido implantada, mediante técnicas convencionales como hematoxilina-eosina, con la que se diferencian células como osteoblastos, osteoclastos y estructuras como osteonas, canales haversianos, etc. Pero si se quiere ser más específico, se debe recurrir a técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, que permiten identificar componentes de la matriz extracelular como proteínas estructurales, colágeno, glicoproteínas, proteínas morfogenéticas, etc.

El colágeno es la proteína estructural más importante de la matriz extracelular, en el hueso se encuentra colágeno tipo I y colágeno tipo III, como fibra reticular. Para estudiar el colágeno en tejido óseo se pueden utilizar técnicas básicas de tinción con hematoxilina-eosina, o más específicas como la tinción de Herovici, la cual no solo define la disposición de las fibras, sino que también permite diferenciar el colágeno en sus dos fases, la inmadura o precolágeno con un color rojo, y la madura

de color azul. Con esta tinción los núcleos se tiñen de color negro y el citoplasma de un tono amarillo.

La técnica de Van Gieson, permite distinguir las fibras de colágeno que forman el soporte para la osificación y las que se encuentran en la matriz extracelular, da una buena definición de la morfología y distribución gracias a los contrastes de los colorantes, el colágeno se observa rojo, los núcleos con color negro y el citoplasma de color amarillo (Montuenga, 2009; Dehesa & Torres, 2008).

Para visualizar el colágeno tipo III (fibras reticulares), se emplea la técnica de Gomori, que tiñe las fibras colágeno de negro (Montuenga, 2009; Dehesa & Torres, 2008).

### **ANTECEDENTES DE LOS INVESTIGADORES EN EL DESARROLLO DE LA TEMÁTICA**

En la Universidad del Valle, mediante esfuerzos conjuntos entre los grupos participantes, se ha desarrollado una red de Investigación encaminada a la obtención y aplicación de polímeros en técnicas de regeneración ósea. En el contexto de esta línea se han realizado varios trabajos de grado a nivel de pregrado de Química e Ingeniería de Materiales (Lozano 2013, Correa & Godoy, 2011; Correa & Betancourt, 2010; Vásquez, 2010; Valencia & Mateus, 2009; Millán, 2009; Giraldo, 2009), estudios en los que se muestra el potencial del ácido poliláctico en la elaboración de matrices y sustitutos óseos.

Dentro de la misma línea de investigación, se realizaron algunos trabajos de grado a nivel de especialidad clínica, en los cuales se emplearon biomodelos animales para estudiar la biocompatibilidad, y cualidad osteoconductora de los polímeros biodegradables (Niño et al., 2010; Pinzón & Rodríguez, 2010; Valencia et al., 2008; Mutis et al., 2008). Además se observó la capacidad de estimular la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en biomodelos animales, cuando eran combinados con sustancias osteopromotoras como el quitosano (Tobón et al., 2010), o con cerámicas bioactivas como el fosfato tricalcico (Bustamante et al., 2011). Trabajos que fueron realizados en el marco de un convenio de colaboración entre la Universidad del Valle y la Universidad Militar Nueva Granada.

Algunos de los trabajos de grado vinculados llevaron a la publicación de los siguientes artículos:

1. Valencia Ll. Carlos Humberto. "Descripción de cambios histológicos en respuesta a una matriz de ácido poliláctico implantada en tibias de conejos". Revista ODONTOS. ISSN 0123-7810. Fundación CIEO., No .30, p 9 – 13. Junio 2008 (<http://www.unicieo.edu.co/revista-odontos/43-revista-odontos/314-revista-odontos-edicion-no-30-abr-may-jun-2008.html>).
2. Valencia Ll. Carlos Humberto, Pastrana P. Elisa, Arroyabe Erika, Morales Cybill. "Determinación del tiempo de reabsorción de una matriz de ácido poliláctico utilizada como sustituto óseo en cavidades preparadas en tibias de conejos". Revista ODONTOS. ISSN 0123-7810. Fundación CIEO., No .30, p 29 – 40. Abril, Mayo, Junio de 2008. (<http://www.unicieo.edu.co/revista-odontos/43-revista-odontos/314-revista-odontos-edicion-no-30-abr-may-jun-2008.html>)
3. Valencia Ll. Carlos Humberto, Pastrana P. Elisa, Arroyabe Erika, Morales Cybill. "Determinación del tiempo de reabsorción de una matriz de ácido poliláctico utilizada como sustituto óseo en cavidades preparadas en tibias de conejos". (Parte II) Revista ODONTOS. ISSN 0123-7810. Fundación CIEO., No 31, p 30 – 34. Diciembre 2008-Febrero 2009. (<http://www.unicieo.edu.co/revista-odontos/43-revista-odontos/315-revista-odontos-edicion-no-31-dic-2008-ene-feb-2009.html>)
4. Pinzón Carolina, Rodríguez Aura M., Ramírez Claudia, Gómez Andrea, Rivera Rodrigo, Valencia Carlos. "Estudio descriptivo de la reacción tisular a un dispositivo de anclaje óseo (BAD) de ácido poliláctico de alto peso molecular implantado en tibias de conejo". Revista ODONTOS. ISSN 0123-7810. Fundación CIEO., No .34, , Mayo, Junio, Julio de 2010 (<http://www.unicieo.edu.co/revista-odontos/43-revista-odontos/318-revista-odontos-edicion-no-34-may-jun-jul-2010.html>)
5. Solís Y., Betancourt C., Zuluaga F., Valencia C.H. "Caracterización e implantación de un relleno de ácido poliláctico para regeneración ósea". Informador Técnico No 73, 6 – 15. 2010. ISSN 0122- 056X  
  
(<https://www.filesanywhere.com/fs/v.aspx?v=8971668f58627076ae6d>)

6. Bustamante Rodríguez Alejandro, Osorio Suarez Guillermo, Sierra Mesa Juan Sebastián, Gómez Andrea, Ramírez Claudia Mercedes, Obando nixon, Garcia Felipe, Zuluaga Fabio “Descripción de los cambios histológicos producidos a 60 días por una matriz de ácido poliláctico de alto peso molecular aglutinada con fosfato tricálcico injertada en calvaria de rata. Revista ODONTOS. ISSN 0123-7810. Fundación CIEO., No .39, Octubre de 2012. <http://www.unicieo.edu.co/revista-odontos/43-revista-odontos/339-odontos39.html>

Los resultados de las investigaciones fueron socializados ante la comunidad académica en los siguientes eventos:

1. Solís Yuliana, Betancourt Carlos, Zuluaga Fabio, Valencia Carlos H. “Producción de ácido poliláctico y su aplicación como matriz de relleno para regeneración ósea”. Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería. Tercer Encuentro Nacional de materiales, Modulo Polímeros, Universidad de Antioquia, Medellín, Noviembre 13 de 2007.
2. Solís Yuliana, Betancourt Carlos, Valencia Carlos H., Zuluaga Fabio. “Ácido polilactico: su caracterización y aplicación como matriz de relleno para regeneración ósea”. Universidad de Antioquia. Primer Congreso Nacional de Biomateriales. CD Rom, ISBN:978-958-714-200-6. Memorias. CB32, 20-27. Medellín. Septiembre de 2008. Presentación oral. <http://ingenieria.udea.edu.co/eventos/biomateriales>.
3. Valencia Carlos H., Solís Yuliana, Betancourt Carlos, Zuluaga Fabio. “Descripción de hallazgos histológicos de una matriz de ácido poliláctico implantada en tibias de conejo”. Universidad de Antioquia. Primer Congreso Nacional de Biomateriales. CD Rom, ISBN:978-958-714-200-6. Memorias. CB58, 62-65. Medellín. Septiembre de 2008. Presentación poster. <http://ingenieria.udea.edu.co/eventos/biomateriales>.
4. Valencia Carlos H. Zuluaga Fabio, Gómez Andrea, Ramírez Claudia. “El Ácido Polilactico: De la degradación hidrolítica a la neo formación ósea”. V Congreso Internacional de Materiales. Universidad Javeriana, Cali, Memorias, BM012M. Octubre 2009. Presentación oral
5. Correa Juan Pablo, Betancourt Jhony, Zuluaga Fabio, Valencia Carlos H. “Síntesis y caracterización de Acido Poli ( L- láctico) y su aplicación como dispositivo de fijación ósea”. V Congreso Internacional de Materiales. Universidad Javeriana, Memorias, BM0200M Cali, Octubre 2009.

Presentación oral.

6. Buitrago Andrés, Machado Jaime, Zuluaga Fabio, Valencia Carlos H. Obtención de ácido poliláctico de alto peso molecular para el diseño de un microtornillo para un implante odontológico". V Congreso Internacional de Materiales. Universidad Javeriana, Memorias, BM015M.Cali, Octubre 2009. Presentación poster.
7. Valencia Andrés, Mateus José F., Zuluaga Fabio, Valencia Carlos H. "Producción y caracterización de una membrana de ácido poli-L- láctico y su evaluación en una prueba piloto in vivo". V Congreso Internacional de Materiales. Universidad Javeriana, Memorias, MP013M.Cali, Octubre 2009. Presentación poster.
8. Vásquez Juan David, Zuluaga Fabio, Valencia Carlos H. "Desarrollo de estructuras porosas en ácido poliláctico (PLA) para regeneración ósea". V Congreso Internacional de Materiales. Universidad Javeriana, Memorias, BM0080M Cali, Octubre 2009. Presentación oral.
9. Correa Juan Pablo, Betancourth Jhony, Zuluaga Fabio, Valencia Carlos H. "Síntesis y caracterización de Ácido Poli ( L- láctico) y su aplicación como dispositivo de fijación ósea". V Congreso Internacional de Materiales. Memorias, BM0200M, Universidad Javeriana, Cali, Octubre 2009. Presentación oral.
10. Valencia Ll. CH., Zuluaga C. H, Ramírez C, et al. "Descripción de los cambios histológicos inducidos por una matriz de ácido poliláctico de alto peso molecular aglutinado con fosfato tricálcico injertado en calota de rata después de 60 días." VI congreso internacional de Materiales. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia, Noviembre de 2011. Presentación oral.
11. Correa Martínez L., Valencia Ll. CH., Zuluaga C. H. "Extracción y fabricación de bloques porosos de ácido poliláctico y quitosano para la regeneración de tejido óseo". VI congreso internacional de Materiales. Bogotá, Colombia, Noviembre de 2011. Modalidad Poster.
12. Valencia Carlos Humberto, Zuluaga Héctor Fabio, Mina José Hermínul, Lozano Lina Marcela, Gutiérrez Oscar, Muñoz Jaime. "Andamios poliméricos obtenidos por electrospinning para aplicación en regeneración ósea". XV Simposio de Investigaciones en Salud. Universidad del Valle. 2013. Presentación oral. Presentación oral.

Como producto de las diferentes investigaciones realizadas se estandarizaron los protocolos para la síntesis de policaprolactona y de ácido poliláctico de bajo, mediano y alto peso molecular; además se obtuvo quitina a partir de micelio de hongos; con estos materiales se elaboraron andamios porosos mediante técnica de lixiviación y fibrosos mediante técnica de electrospinning; los cuales fueron implantados en modelos animales (conejos New zealand y ratas Wistar), y caracterizados por

técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica.

## **Desarrollos**

En la convocatoria interna de la Universidad del Valle (2013-3), se consiguió financiación para el desarrollo del proyecto “Desarrollo de andamios poliméricos bioactivados con osteoblastos, una aplicación para ingeniería de tejidos óseos”. Actualmente el proyecto está en la etapa de Laboratorio, en el marco de esta propuesta se desarrolló un cultivo de osteoblastos primario, de origen murino, el cual fue caracterizado mediante la expresión de fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteoprotegerina; finalizando este año se espera avanzar a la etapa preclínica in vitro con células (cultivo de andamios porosos y fibrosos con osteoblastos), y preclínica in vivo

(Implantación en calota de ratas wistar).

A la fecha se tienen estandarizados los protocolos para obtención del cultivo primario de osteoblastos, y para la fenotipificación mediante la determinación de fosfatasa alcalina, osteocalcina, y osteoprotegerina; al igual que los procedimientos necesarios para fabricar los dos tipos de andamios propuestos.

## **DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN EN ANDAMIOS ÓSEOS EN EL PROYECTO.**

Al finalizar la investigación se obtendrán unas estructuras con aplicación en regeneración ósea y regeneración tisular guiada con uso en Ortopedia / Traumatología y en Odontología.

**Productos:** Estructuras para regeneración y reconstrucción ósea, (andamios porosos y fibrosos), elaborados en ácido poliláctico y quitosano, y bioactivados con osteoblastos; los cuales estarán en presentación tipo particulado, bloque, y membranas; caracterizados y listos para desarrollar en pruebas de uso en modelos humanos (in vivo).

**Actividades experimentales preclínicas:** Se realizarán en total 100 actividades representadas en ensayos de crecimiento celular con andamios con su respectiva caracterización por citoinmunohistoquímica, implantaciones en hueso parietal de ratas wistar con sus respectivas

caracterizaciones por histoquímica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido, y pruebas de uso en mandíbulas de conejo New Zealand con sus respectivas caracterizaciones por histoquímica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido.

## **METODOLOGÍA:**

### **Primer Año**

- Compra de equipos e insumos
- Síntesis y caracterización de ácido poliláctico y policaprolactona
- Extracción y caracterización de quitosano obtenido a partir de quitina
- Elaboración de los andamios poliméricos
- Caracterización físico-química, térmica y mecánica de los andamios poliméricos
- Obtención del cultivo primario de osteoblastos

### **Desarrollo Actividad Síntesis y Caracterización de Ácido Poliláctico y Policaprolactona**

La síntesis del PLA se realizará a partir del ácido L-láctico obteniendo un prepolímero de bajo peso molecular por policondensación. El prepolímero se depolimerizará para obtener el dímero (lacturo). El dímero se polimerizará por apertura de anillo utilizando catalizadores organometálicos y alcoholes como co-catalizadores, en atmósfera inerte, para obtener ácido poliláctico de alto peso molecular.

Análogamente se obtendrá policaprolactona por apertura de anillo partiendo de épsilon-caprolactona, utilizando catalizadores organometálicos y alcoholes como co-catalizadores.

La caracterización se llevará a cabo por espectroscopía de IR, RMN, análisis elemental, DSC, TGA, GPC, viscosimetría y ensayos mecánicos.

### **Desarrollo Actividad Extracción y Caracterización de Quitosano obtenido a partir de Quitina**

La extracción y caracterización del quitosano se realizará siguiendo la metodología aplicada en el laboratorio de polímeros de la Universidad del Valle (Muñoz, 2012).

En la cual el micelio seco es lavado varias veces con agua para eliminar impurezas. Después se secará a 50°C, y se someterá a hidrólisis básica empleando con NaOH bajo agitación mecánica, a

110°C durante 4 h. El material insoluble en el medio alcalino se filtrará y se lavará hasta alcanzar un pH de 8. El sólido obtenido se acidificará adicionando HCl, hasta alcanzar un pH de 3. La mezcla se mantendrá con agitación mecánica, durante 3 h a temperatura ambiente. El sobrenadante se separará por centrifugación y se basificará con NaOH hasta alcanzar un pH de 10 para promover la precipitación del quitosano, el cual se aísla mediante filtración al vacío.

El quitosano obtenido se lava con agua destilada, etanol y acetona para eliminar las impurezas y el NaOH remanente. Finalmente, el sólido obtenido se seca a secar en horno a 50°C.

### **Caracterización del quitosano extraído**

Caracterización espectroscópica. El quitosano se caracterizará mediante espectroscopia infrarroja empleando la pastilla de KBr. Posteriormente, se realizan experimentos de RMN-1H usando DMSO-d<sub>6</sub> como solvente acompañado por dos gotas de F<sub>3</sub>CCOOH para disolver la muestra.

Adicionalmente, el quitosano se caracterizará mediante RMN-15N y RMN-13C en estado sólido con polarización cruzada y rotación al ángulo mágico (CP-MAS). Los experimentos de 13C se llevarán a cabo con una frecuencia de barrido de 29.8 kHz (pulso de 90° de 10 μs), tiempo de contacto de 1 ms, tiempo de adquisición de 50 ms y tiempo de relajación de 1.1 s; se realizan en total 1507 barridos para adquirir los espectros de 13C. Para los experimentos de 15N se usa una frecuencia de barrido de 24.4 kHz (pulso de 90° de 10 μs), el tiempo de contacto de 2 ms, el tiempo de adquisición de 50 ms y un tiempo de relajación de 1.4 s; se realizan 4248 barridos para obtener los espectros de 15N. En todos los experimentos se emplea un rotor de circonio de 4 mm de diámetro con una frecuencia de rotación en el MAS (54.7°) de 5 MHz y una temperatura de 25°C.

Además se determinara:

- Grado de desacetilación del quitosano: Se realizara por dos métodos independientes: Titulaciones potenciométricas y análisis elemental cuantitativo.
- Determinación del peso molecular: El peso molecular promedio viscoso M<sub>v</sub> del quitosano se determinará mediante viscosimetría capilar
- Análisis térmico; Al quitosano aislado se le realizarán estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar su respectiva temperatura de transición vítrea y de fusión, también se estudiara la estabilidad térmica del biopolímero mediante análisis termogravimétrico (TGA).

- Difracción de rayos X: Se analizará el difractograma obtenido para el quitosano extraído mediante su comparación con una muestra de quitosano comercial.

### **Desarrollo Actividad Elaboración de los Andamios Poliméricos**

Para la obtención de los andamios se emplearán dos métodos:

En uno de ellos se usará un equipo de electrospinning, compuesto por: una bomba de infusión, una fuente de alto voltaje, jeringas, agujas, mangueras y un colector de aluminio.

En principio, se efectuarán varias corridas con el fin de encontrar la relación ideal entre disolventes y polímero, que permitan la obtención de un haz estable dentro del proceso y la consecución de fibras homogéneas. Se prepararán tejidos conformados por fibras de PLA y PCL, variando las proporciones de estos materiales, con el fin de conseguir andamios con las propiedades requeridas para el adecuado crecimiento de las células.

El otro será el método de dispersión por solvente, moldeo por compresión y lixiviación (Mano et al., 2008; Solchaga et al., 2005).

### **Desarrollo Actividad Caracterización físico-química, térmica y mecánica de los andamios poliméricos**

Se realizará un ensayo mecánico a compresión uniaxial, tomando como referencia la norma ASTM D695-10 y material bibliográfico. Se usarán 3 piezas cilíndricas por cada muestra con una relación longitud diámetro 2:1, las cuales serán acondicionadas según la norma citada. Las piezas serán ensayadas con una celda de 50 Newtons a una velocidad de deformación de 1mm/min a temperatura ambiente.

La resistencia a la compresión se determinará sometiendo las probetas a una fuerza de compresión hasta que el material presente falla, y se procesarán los datos a partir de la aplicación de la ecuación  $s=F/A$ , donde F es la fuerza a compresión (N) y A es el área de la sección transversal. El módulo se determinará según norma. AMPLIAR

Para el análisis de las fibras de PLA y PCL, se empleará un equipo de espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) marca Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer, con Cristal de ZnSe y enterferómetro Michelson. El análisis se realizará a 100 barridos y una

resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

Mediante difracción de Rayos X (DRX), se estudiarán los patrones de difracción de rayos X de las fibras de PLA y PCL, usando un equipo Marca PANalytical, Serie X'Pert Pro, Tubo de Cobre Difractómetro de Rayos X, a 45 kV y 40 mA.

El Análisis Termogravimétrico (TGA) se llevará a cabo en un equipo TA Instruments Ref. Q 50, en un intervalo de temperatura de 50 a 650°C, con una rapidez de calentamiento de 10°C/min y en una atmósfera protectora de nitrógeno, las muestras de las fibras tendrán un peso aproximadamente de 10 mg.

Se realizará una prueba de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), con un equipo TA Instruments Ref. Q 20, tomando un intervalo de temperatura de -60 a 185°C, una rapidez de calentamiento de 10°C/min y en una atmósfera protectora de nitrógeno, el peso promedio de las muestras de fibras será de aproximadamente 10 mg y se emplearán cápsulas herméticas de aluminio.

#### **Desarrollo Actividad Obtención del cultivo primario de osteoblastos**

Se aislarán y cultivarán células óseas a partir de huesos craneales de rata Wistar de 5 días de edad, siguiendo el protocolo propuesto por Bakker & Klein-Nulend

#### **Desarrollo Actividad Caracterización del cultivo primario**

Se realizará fenotipificación mediante la determinación de expresión de Fosfatasa alcalina, Osteocalcina, Osteoprotegerina, y colágeno tipo I de acuerdo protocolo sugerido por IHC Products & Protocol Guide. R&D Systems Tools for Cell Biology Research™. [www.RnDSystems.com](http://www.RnDSystems.com)); las lecturas se harán en microscopio confocal; igualmente se estudiarán las formas y relaciones celulares intracultivo mediante microscopía electrónica de barrido.

#### **Desarrollo Actividad Ensayos de crecimiento celular con osteoblastos en los andamios**

1. Se depositarán los andamios en cámaras de cultivo de 8 pozos, se agregará medio de cultivo, y se adicionarán osteoblastos.
2. Cada 3 días se cambiará el medio de cultivo; se retirarán andamios para análisis a los 7, 14, 21 y 28 días.
3. Se analizarán en cada etapa 5 andamios con técnicas citoimmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido
4. Al sobrenadante obtenido en cada periodo se le realizarán análisis inmunológicos,

mediante la técnica de Western Blot, para determinar la presencia de fosfatasa alcalina, osteocalcina, protegerina y colágeno tipo I.

Mediante el desarrollo de esta actividad se determinará: Forma de los andamios y células en cultivo, maduración osteoblástica, formación de la matriz extracelular, interfaces andamio / Célula, Andamio / Matriz extracelular, Matriz extracelular / células, y se confirmará la bioactivación de los andamios

### **Desarrollo Actividad Implantación en defectos de tamaño crítico en hueso parietal de rata Wistar**

Los andamios activados con osteoblastos serán implantados en defectos de 5 mm de diámetro en el hueso parietal de ratas wistar de 5 meses de edad.

Para la preparación del defecto e implantación de los andamios se seguirá el siguiente protocolo:

1. Técnica de asepsia y antisepsia con Isodine solución®.
2. Anestesia local infiltrativa (lidocaína al 2% con epinefrina 1:80.000). Incisión longitudinal en el centro del cráneo para exponer el hueso parietal, tomando como referencia la sutura sagital.
3. Disección lateral para exponer la zona parietal, a ambos lados de la sutura sagital, sobre la sutura sagital y ligeramente hacia posterior del hueso parietal, se realiza una preparación de 6 milímetros de diámetro, utilizando un motor fisiodispenser para cirugía ósea con una fresa trefina de titanio, de 6 milímetros de corte externo, con irrigación de suero fisiológico.
4. Una vez alcanzada una profundidad de corte de 0.8 mm, se retira la lámina ósea con cucharilla y cureta de Lucas, cuidando de no perforar la membrana meníngea.
5. Si el animal pertenece al grupo control, no se coloca material, se confrontan los tejidos y se sutura por planos con material reabsorbible.
6. Si el animal pertenece al grupo experimental se implanta el material que corresponda ( andamio poroso o andamio fibroso), se confrontan los tejidos y se sutura por planos con

material reabsorbible.

7. Se aplica gentamicina tópica en el área quirúrgica; se aplica Clindamicina Intramuscular, (600 mg), y Tramadol Intramuscular en dosis ajustada al peso.
8. El animal es transferido a la jaula de observación, se coloca lámpara para calentar, se determina la hora en que hay movimientos corporales (levantar la cabeza), y se registra en el cuaderno del investigador.
9. Se manejará un protocolo de analgésico (acetaminofén gotas) por cinco días.
10. Los animales serán observados por lo menos 3 veces al día en los primeros 5 días, cualquier cambio de comportamiento o señal de infección o inflamación anormal será registrado en el cuaderno del investigador.
11. Se espera el tiempo de implantación necesaria y se programan los procedimientos de eutanasia.

#### **Desarrollo Actividad Recuperación de las muestras y estudios histológicos, histoquímicos, inmunoquímicos y de microscopía**

Después del periodo de implantación (30, 45, 60 y 90 días) se debe recuperar las muestras previa eutanasia, de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se pesan los animales y registra la información en el rótulo de la caja del biomodelo.
2. Con el peso individual del biomodelo, se determina la dosificación necesaria de barbitúricos para lograr una sedación en exceso, y se registra las dosificaciones individuales.
3. Se trasladan los animales al espacio para procedimientos asignado en el Laboratorio.
4. Una vez en el laboratorio, se anestesian los biomodelos mediante sedación intramuscular, de acuerdo a la dosificación correspondiente a cada animal.
5. Se colocan campos quirúrgicos estériles sobre la mesa de disección.
6. Una vez obtenida sedación, se aplica 1 cc de Eutanax® intraperitoneal
7. Se verifica la muerte mediante observación de la respuesta sensorial/reflejo, (v.g. la falta de

respuesta a presión de la cola).

8. Se realiza la técnica de asepsia y antisepsia sobre superficies externas del biomodelo utilizando Isodine espuma® o etanol al 70%.
9. Se coloca el biomodelo sobre la mesa de operaciones de cubito supino.
10. Se hace incisión longitudinal por línea media craneal desde el puente nasal hasta base del cráneo, se realizan 2 relajantes oblicuas por encima de las órbitas y otras 2 en zona occipital.
11. Se realiza colgajo de espesor total iniciando desde zona anterior para exponer los huesos del cráneo.
12. Se corta con el equipo piezoeléctrico, el sitio donde está implantado el biocompuesto, cuidando de dejar por lo menos 3 mm de hueso periférico.
13. En los animales control, se corta el sitio donde se creó el defecto vacío dejando por lo menos 3 mm de hueso periférico.
14. Se retira cuidadosamente las muestras y se depositan en un recipiente rotulado que contenga el elemento fijador (formol buferado o glutaraldehído según corresponda).
15. Se marca el recipiente con el código del animal y la clave que corresponda a muestra control o muestra experimental (C, E1, E2), y se registra la misma información en el cuaderno del investigador.
16. Se inicia protocolo de preparación para estudios histológicos.

Posteriormente, se realizarán las preparaciones necesarias para el estudio y determinación de la respuesta osteogénica, mediante histomorfometría y microscopía electrónica y confocal, para identificar estructuras como osteonas, vasos sanguíneos y material osteoide; histoquímica e inmunohistoquímica para identificar actividad osteoblástica y osteoclástica (fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida tartrato resistente, colágeno tipo I y colágeno tipo III).

#### **Desarrollo Actividad Análisis de resultados**

Utilizando un software para análisis de imágenes, se determinará y cuantificará la presencia de células inflamatorias, células óseas, componentes de la matriz extracelular, y estructuras como

osteonas primarias y secundarias, así como vasos sanguíneos.

La información obtenida será procesada para obtener datos estadísticos. Se determinará normalidad por Kolmogorov-Smirnoff, utilizando el paquete estadístico SPSS, y el contraste de hipótesis se realizará por el método Mann-Whitney, para el nivel de significación estadística se establecerá un error tipo I, igual o inferior a 0,05.

### **Desarrollo Actividad Prueba de Uso en Conejos**

Se realizara una prueba de uso en conejos utilizando andamios tipo bloque con el fin de lograr aumentos óseos horizontales.

Las actividades a realizar serán:

1. Obtención y caracterización de osteoblastos a partir de tejido óseo de conejos (se repiten los protocolos ya planteados para osteoblastos murinos).
2. Se realiza un examen tomografico a la mandíbula de un conejo New zealand de 6 meses de edad y se determinan las dimensiones de la zona de triángulo, en la mandíbula.
3. Se diseñan y elaboran bloques poliméricos, mediante impresión 3D, de acuerdo a las dimensiones del triángulo.
4. Se bioactivan los bloques poliméricos mediante el cultivo con osteoblastos
5. Se realizan caracterizaciones a los bloques bioactivados (citoquímica y SEM)
6. Se realizan los procedimientos quirúrgicos para aumento horizontal de reborde óseo en la zona del triángulo mandibular, utilizando los bloques bioactivados, según el siguiente protocolo:
  - Sedación mediante anestesia general
  - Se realizara tricotomía de la zona lateral y basal del maxilar inferior (zona derecha)
  - Se hará desinfección con isodine solución<sup>®</sup>
  - Se anestesiará con lidocaína al 2% con epinefrina, técnica infiltrativa en el área de interés (zonas intraorales y extra orales comprendidas entre el diente incisivo y el tercer molar inferior derecho).

- Se realizará una incisión longitudinal extraoral a nivel submandibular, disecando hasta llegar a tejido óseo y continuando hasta el margen gingival iniciando desde la zona retro molar derecha, continuando sucular vestibular y lingual desde el ultimo molar al primer premolar; siendo la misma extendida hasta la altura del foramen mentonero en la zona del diastema
  - Se preparara la zona receptora y se fijaran los bloques mediante tornillos de osteosíntesis
  - Se reposicionan los tejidos y se sutura con material reabsorbible
  - Se aplica gentamicina en crema en toda la zona
  - Se aplica Clindamicina 600 mg IM, y Diclofenac 75 mg IM
  - Se coloca cuello isabelino
  - Se traslada el conejo a la jaula de recuperación, y posteriormente a su jaula de permanencia
  - Durante los siguientes cinco días se suministrara acetaminofén en gotas
  - Se suministrara alimento y agua ad libitum
7. Se recuperan las muestras y se realizan caracterizaciones biológicas ( Histoquímica, inmunohistoquímica)
  8. Se realizan estudios de microscopia electrónica de barrido
  9. Se analiza la información mediante un software para procesamiento de imágenes

## **RECURSOS**

### **Recursos disponibles**

**Laboratorios:** En la Universidad del Valle se cuenta con laboratorios de química, ingeniería de materiales, histología, y cultivos celulares; lo que va a permitir que los andamios y células sean procesados y caracterizados adecuadamente.

**Recurso humano:** Todos los investigadores vinculados a la propuesta tienen formación de postgrado, así como una amplia experiencia y experticia en las actividades a desarrollar según el

rol y fase de vinculación lo cual se convierte en una garantía que los procesos serán realizados con rigurosidad científica

### **Recursos necesarios**

#### **Personal:**

5 Investigadores, (Contrapartida Univalle)

1 Profesional con posgrado, medio tiempo, por 3 años, (recursos convocatoria)

6 profesionales con pregrado, medio tiempo, por 2 años, (recursos convocatoria)

#### **Materiales:** (Recursos convocatoria)

Insumos varios para laboratorios de Química e Ingeniería de materiales  
Insumos varios para Laboratorio de Histología e inmunohistoquímica  
Insumos varios para Laboratorio de cultivos celulares

Anticuerpos y medios de cultivos

Materiales para los procedimientos quirúrgicos

#### **Servicios técnicos:** (Recursos convocatoria)

Caracterizaciones químicas y físicas

Servicio de Microscopia confocal

Servicio microscopia electrónica

Servicio de Bioterio Universidad del Valle

Servicio de Bioterio universidad ICESI

## **Equipos**

Equipos varios para laboratorio de Química

Equipos varios para laboratorio de Ingeniería de Materiales

Equipos varios para laboratorio de Histología Equipos varios para laboratorio de Cultivos celulares

Equipos para cirugía ósea

## **PROGRAMA DE TRABAJO:**

Ver capítulo 9.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. AHN, Y. C., PARK, S. K., KIM, G. T., HWANG, Y. J., LEE, C. G., SHIN, H. S. & LEE, J. K. 2006. Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers. *Current Applied Physics*, 6, 1030-1035.
2. ALCALDE, J. C. 2005. *Síntesis de ácido poliláctico de bajo peso molecular para aplicación en biomateriales*. Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle.
3. BATCHELOR, A. W. & CHANDRASEKARAN, M. 2004. *Service Characteristics Of Biomedical Materials And Implants*, Imperial College Press.
4. BAKKER A , KLEIN-NULEND J. Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones. en <http://www.springer.com/978-1-61779-414-8>)
5. BUCHKO, C. J., CHEN, L. C., SHEN, Y. & MARTIN, D. C. 1999. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 40, 7397-7407.
6. BUSTAMANTE, A., OSORIO, G. & SIERRA, S. 2011. *Descripción de los cambios histológicos inducidos por una matriz de ácido poliláctico de alto peso molecular aglutinado con fosfato tricálcico injertado en calota de rata después de 60 días*. Especialización en Implantología Oral y Reconstructiva, Convenio Universidad del Valle – Universidad Militar Nueva Granada.
7. CHEN, F., LEE, C. N. & TEOH, S. H. 2007. Nanofibrous modification on ultra-thin poly(epsilon-caprolactone) membrane via electrospinning. *Materials Science & Engineering C- Biomimetic and Supramolecular Systems*, 27, 325-332.

8. CHU, P. K. & LIU, X. 2008. *Biomaterials Fabrication and Processing Handbook*, CRC Press/Taylor & Francis.
9. CORREA, J. P. & BETANCOURTH, J. 2010. *Síntesis y caracterización de Acido Poli (L- láctico) y su aplicación como dispositivo de fijación ósea*. Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle.
10. CORREA, L. & GODOY, J. 2011. *Obtención de una matriz de PLA de alto peso molecular y quitosano para ser usado en regeneración ósea*. Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle.
11. DEHESA, A. & TORRES, C. 2008. Estudio y detección de colágena de la matriz extracelular (MEC)
12. mediante técnicas de tinción específica. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 7, 100- 104.
13. DIMAR, J. R. & GLASSMAN, S. D. 2007. The art of bone grafting. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18, 226-233.
14. DIMITRIOU, R., TSIRIDIS, E. & GIANNOUDIS, P. V. 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 36, 1392-1404.
15. FERNÁNDEZ, I., ALOBERA, M. A., CANTO, M. & BLANCO, L. 2006a. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11, 47-51.
16. FERNÁNDEZ, I., ALOBERA, M. A., CANTO, M. & BLANCO, L. 2006b. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11, 151-157.
17. FREED, L. E., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., BIRON, R. J., EAGLES, D. B., LESNOY, D. C., BARLOW, S. K. & LANGER, R. 1994. Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Nat Biotech*, 12, 689-693.
18. FUENTE, D. A., DIAZGRANADOS, M. A. & PERILLA, J. E. 2006. Método para la obtención de lacturo de alta pureza a partir de la depolimerización de poli(ácido láctico). *Rev. Colom. Quim.*, 35, 115-123.

19. GARLOTTA, D. 2001. A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9, 63-84
20. GIRALDO, D. M. 2009. *Estudio de la aplicación de cementos óseos acrílicos en regeneración ósea*. Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle.
21. HANG, Y. D., HAMAMCI, H. & WOODAMS, E. E. 1989. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels. *Biotechnology Letters*, 11, 119-120.
22. HAO, J. Y., LIU, Y., ZHOU, S. B., LI, Z. & DENG, X. M. 2003. Investigation of nanocomposites based on semi-interpenetrating network of L-poly (epsilon-caprolactone) / net-poly (epsilon- caprolactone) and hydroxyapatite nanocrystals. *Biomaterials*, 24, 1531-1539.
23. HOLLISTER, S. J. 2006. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*, 5, 590-590.
24. JINJUN SHI, ALEXANDER R. VOTRUBA , OMIDFAROKHZAD AND ROBERT LANGER. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering:From Discovery to Applications *Nano Lett.*, 2010, 10 (9), pp 3223–3230
25. JONES, D. S., DJOKIC, J., MCCOY, C. P. & GORMAN, S. P. 2002. Poly(epsilon-caprolactone) and poly(epsilon-caprolactone)-polyvinylpyrrolidone-iodine blends as ureteral biomaterials: characterisation of mechanical and surface properties, degradation and resistance to encrustation in vitro. *Biomaterials*, 23, 4449-4458.
26. JUNG, R. E., HAMMERLE, C. H. F., KOKOVIC, V. & WEBER, F. E. 2007. Bone regeneration using a synthetic matrix containing a parathyroid hormone peptide combined with a grafting material. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 22, 258-266.
27. KAMRAN, K., RASHID, I., MOHD, Z., ABU, B. & TENGGU, A. I. 2010. Bone Grafting and Bone
28. Graft Substitutes. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, 1055-1067.
29. KASAAI, M. R. 2007. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68, 477-488.

30. KIM, B.-S. & MOONEY, D. J. 1998. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 16, 224-230.
31. LAFITA, J. 2003. Fisiología y fisiopatología ósea. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26, 7-17.
32. LIANG, D., HSIAO, B. S. & CHU, B. 2007. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1392-1412.
33. MANO, J. F., HUNGERFORD, G. & RIBELLES, J. L. G. 2008. Bioactive poly(L-lactic acid)-chitosan hybrid scaffolds. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 28, 1356-1365.
34. MARTÍNEZ, J. & DONADO, M. 2008. *Estudio histológico e histomorfométrico de la respuesta ósea frente a un biomaterial sintético compuesto por ácido poliláctico-poliglicólico en un modelo de experimentación animal*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
35. MEGELSKI, S., STEPHENS, J. S., CHASE, D. B. & RABOLT, J. F. 2002. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, 35, 8456-8466.
36. MESEGUER, L., BERNABEU, A., CLAVEL, M., MUÑOZ, J. & RUANO, L. 1994. Aislamiento y cultivo de células osteoblásticas: Interés para la investigación en cirugía ortopédica y traumatología. *Rev. Esp. Cir. Osteoart.*, 29, 235-240.
37. MILLÁN, L. 2009. *Síntesis de ácido poliláctico de bajo peso molecular vía microondas y su aplicación en regeneración ósea*. Química, Universidad del Valle.
38. MIT-UPPATHAM, C., NITHITANAKUL, M. & SUPAPHOL, P. 2004. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 205, 2327-2338.
39. MITRAGOTRI, S. & LAHANN, J. 2009. Physical approaches to biomaterial design. *Nature, Materials*, 8, 15-23.
40. MONTUENGA, L. 2009. *Técnicas en histología y biología celular*, Masson.
41. MUTIS, A., GONZÁLEZ, M. & ESPINOSA, A. 2008. *Respuesta histológica en tibias de conejo a un relleno óseo de polimetilmetacrilato modificado con hidroxapatita y fosfato tricálcico*.

Especialización en Implantología Oral y Reconstructiva, Convenio Universidad del Valle – Universidad Militar Nueva Granada.

42. MUÑOZ, G. 2012. Maestría en Química, Universidad de Valle.
43. NIÑO, J., USA, M. & GARAVITO, S. 2010. *Descripción histológica a veinte días de haber colocado una membrana de ácido poliláctico en tibias de conejo*. Especialización en Implantología Oral y Reconstructiva, Convenio Universidad del Valle – Universidad Militar Nueva Granada.
44. PARADA, L. G., CRESPIÓN, G. D., MIRANDA, R. & KATIME, I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5, 1-16.
45. PECK, W. A., BIRGE, S. J. & FEDAK, S. A. 1964. Bone Cells: Biochemical and Biological Studies after Enzymatic Isolation. *Science*, 146, 1476-1477.
46. PERDOMO, M. E. 2010. Lesiones en accidente de tránsito. Colombia, 2010. *Forensis*, 254-294.
47. PINZÓN, C. & RODRÍGUEZ, A. M. 2010. *Estudio descriptivo de la reacción tisular a un dispositivo de anclaje óseo (BAD) de ácido poliláctico de alto peso molecular implantado en tibias de conejo*. Especialización en ortodoncia, Convenio Universidad del Valle – Universidad Militar Nueva Granada.
48. RAMAKRISHNA, S. 2005. *An Introduction to Electrospinning And Nanofibers*, World Scientific.
49. SERINO, G., BIANCU, S., IEZZI, G. & PIATTELLI, A. 2003. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 14, 651-658.
50. SERRANO, M. C., PAGANI, R., VALLET-REGI, M., PENA, J., RAMILA, A., IZQUIERDO, I. & PORTOLES, M. T. 2004. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*, 25, 5603-5611.
51. SERRANO, M. C., PORTOLES, M. T., VALLET-REGI, M., IZQUIERDO, I., GALLETTI, L., COMAS, J. V.

52. & PAGANI, R. 2005. Vascular endothelial and smooth muscle cell culture on NaOH-treated poly (epsilon-caprolactone) films: A preliminary study for vascular graft development. *Macromolecular Bioscience*, 5, 415-423.
53. SOLCHAGA, L. A., TEMENOFF, J. S., GAO, J. Z., MIKOS, A. G., CAPLAN, A. I. & GOLDBERG, V. M.
54. 2005. Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13, 297-309.
55. SOLÍS, Y., BETANCUR, C. A., ZULUAGA, H. F. & VALENCIA, C. H. 2009. Caracterización e implantación de un relleno de ácido poliláctico para regeneración ósea. *Informador técnico*, 73- 76.
56. TOBÓN, S., NEMOCÓN, F. & GÓMEZ, J. E. 2010. *Descripción de los cambios histológicos inducidos por una matriz de ácido poliláctico de alto peso molecular, injertada en tibia de conejos*. Especialización en Implantología Oral y Reconstructiva, Convenio Universidad del Valle Universidad Militar Nueva Granada.
57. VACCARO, A. R. 2002. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics*, 25, S571-S578.
58. VALENCIA, A. F. & MATEUS, F. 2009. *Elaboración de una membrana reabsorbible y su aplicación en técnicas de regeneración ósea guiada*. Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle.
59. VALENCIA, C., PASTRANA, E., ARROYAVE, E. & MORALES, C. 2008. *Determinación del tiempo de reabsorción de una matriz de ácido poliláctico, implantada en tibias de conejo*. Especialización en Implantología Oral y Reconstructiva, Convenio Universidad del Valle – Universidad Militar Nueva Granada.
60. VICARIO, C. 2004. *El efecto osteoinductor de la matriz de los aloinjertos: Estudio experimental en cultivos de osteoblastos humanos*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
61. VÁSQUEZ, J. D. 2010. *Desarrollo de estructuras porosas en ácido poliláctico (PLA) para regeneración ósea*. Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle.
62. WITTE, V., KROHN, U. & EMEIS, C. C. 1989. Characterization of yeasts with high L[+]-lactic acid production: Lactic acid specific soft-agar overlay (LASSO) and TAFE-patterns. *Journal of Basic Microbiology*, 29, 707-716.

63. YANG, S., LEONG, K.-F., DU, Z. & CHUA, C.-K. 2001. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, 7, 679-689.
64. YOSHIMOTO, H., SHIN, Y. M., TERAJ, H. & VACANTI, J. P. 2003. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 2077 – 2082.

## ***5.6. LINEA DESARROLLO DE CEMENTOS ACRÍLICOS MODIFICADOS CON CAPACIDAD DE ESTIMULAR REGENERACIÓN ÓSEA Y MEJORAR LA FIJACIÓN DE PRÓTESIS ORTOPÉDICAS***

### **GRUPOS DE INVESTIGACIÓN Y ENTIDADES PARTICIPANTES**

#### **Materiales Compuestos – GMC (código COL0007533 – Categoría A1)**

El Grupo de MATERIALES COMPUESTOS de la Escuela de Ingeniería de Materiales pertenece a la Facultad de Ingeniería, de la Universidad del Valle en Cali (Colombia). El grupo es categoría A1, el máximo escalafón del organismo de Ciencia y Tecnología de Colombia, COLCIENCIAS (convocatoria 2010). Así mismo, el grupo Materiales Compuestos hace parte del Centro de Excelencia en Nuevos Materiales, CENM con sede en la Universidad del Valle.

Este grupo fue creado en el año 1986 y trabaja bajo la dirección de la Dra. Ruby Mejía de Gutiérrez y fue el gestor del Plan de pregrado en Ingeniería de Materiales de la Universidad del Valle, que hoy cuenta con aproximadamente 300 estudiantes, así como del programa de Maestría y de Doctorado en Ingeniería Área de Énfasis de Ingeniería de Materiales, este último dio inicio en agosto del 2001, y a la fecha cuenta con diecisiete (17) egresados. La participación del GMC contribuyó a que el programa de doctorado de la Escuela de Ingeniería de Materiales fuera condecorado con el primer puesto en el premio de la Asociación Iberoamericana de Posgrado AUIP a la calidad del Posgrado y el Doctorado en Iberoamérica (2010).

En general, la investigación del grupo se centra en el desarrollo de materiales compuestos de base cerámica o polimérica, particulados, fibrorreforzados y materiales compuestos de aleaciones metálicas, con el objetivo de obtener propiedades de desempeño que superen a los materiales tradicionales o materiales alternativos que contribuyan a la solución apropiada de problemas tecnológicos y ambientales. Incluye en estos desarrollos, el uso ecológico de los desechos, subproductos y coproductos generados en los procesos de producción agrícola, minera, industrial y domiciliaria.

En el grupo se crean los semilleros y jóvenes investigadores a partir de los programas profesionales de pregrado en Ingeniería, especialmente la de Materiales, se impacta el medio asociando la investigación con las necesidades del sector productivo y se logra la inserción internacional a

través de la producción científica y la participación en redes académicas y de investigadores. El grupo cuenta con relaciones colaborativas con investigadores y grupos de diferentes instituciones en España, Estados Unidos, Australia, Reino Unido y algunos países de Latinoamérica, con los cuales ha desarrollado actividades conjuntas.

Directora: Ruby Mejía De Gutiérrez.

Doctor en Ciencias Químicas, Universidad Complutense De Madrid, España.

ruby.mejia@correounivalle.edu.co

Líneas de Investigación:

1. Nuevos Materiales Compuestos y Materiales Alternativos
2. Activación Alcalina y Geopolimerización
3. Valoración y utilización de desechos en la producción de materiales
4. Corrosión y Durabilidad de Materiales

En la línea de Nuevos Materiales Compuestos y Materiales Alternativos, el grupo ha realizado hasta el momento cuatro investigaciones relacionadas con aplicaciones en biomateriales, donde se ha trabajado con cementos óseos acrílicos con aplicación en la fijación de prótesis ortopédicas así como también en el desarrollo de andamios para regeneración de tejidos duros y blandos, basados en polímeros sintéticos como el ácido poliláctico y la policaprolactona principalmente. En estos materiales se han llevado a cabo ensayos de caracterización físico- química, térmica y mecánica, además de pruebas en condiciones In Vitro e In Vivo; consolidándose a partir de estos proyectos: Trabajos de Grado de Pregrado, Tesis de Maestría, artículos publicados en revistas indexadas y ponencias en congresos nacionales e internacionales especializados.

**Responsable:** José Herminul Mina Hernández, Ph.D.

#### **Síntesis y Mecanismos de Reacción en Química orgánica - SIMERQO (código COL0016345 – Categoría A)**

En la Universidad del Valle se venía trabajando desde 1997, en diversos proyectos de síntesis química y mecanismos con los cuales se formaron estudiantes de Maestría y de Doctorado como también estudiantes del Pregrado de Química.

En el año 2000 se configuró el grupo SIMERQO con la participación de profesores de la Universidad del Valle, y docentes de la Universidad de Caldas y de la Universidad del Cauca, egresados del Programa de Doctorado de la Universidad del Valle; actualmente tiene clasificación A.

Durante la existencia formal del grupo se han formado en la Universidad del Valle cuatro nuevos doctores en el área de Química Orgánica, 12 Magísteres y numerosos estudiantes de pregrado que han realizado sus trabajos de grado al interior del grupo, se cuenta también con una amplia producción intelectual en artículos en revistas internacionales y nacionales indexadas, presentación de ponencias en eventos Nacionales e Internacionales, y además tiene una patente registrada.

En conjunto con los grupos Materiales compuestos y Biomateriales dentales, y en convenio con la Fundación CIEO / Universidad Militar Nueva Granada de la ciudad de Bogotá, se creó y desarrollo la sublínea de investigación en Biopolímeros para regeneración ósea.

La responsabilidad del grupo en el macro proyecto se centra en la obtención de insumos para la fabricación de andamios (ácido polilactico, ácido poliglicolico, quitosano, policaprolactona,etc.); así como las caracterizaciones químicas correspondientes.

Responsable: Héctor Fabio Zuluaga, Ph.D.

#### **Tejidos Blandos y Mineralizados – TEBLAMI (código COL0074759 – Categoría A)**

Ya presentado en la Línea de Andamios Óseos.

#### **Biomateriales en Odontología**

Ya presentado en la Línea de Andamios Óseos

#### **Farmacología-Univalle**

Ya presentado en Líneas anteriores.

### **ANTECEDENTES**

El uso de cemento óseo de Polimetacrilato de metilo es el método más común y exitosamente usado

para fijar los implantes ortopédicos a los huesos (Slanea, Vivancob, Meyer, Lynn, y Squirec, 2014). Sin embargo, el Polimetacrilato de metilo (PMMA) es un material que ha sido poco utilizado en el campo de la regeneración ósea, debido principalmente a los problemas asociados a su citotoxicidad y elevada temperatura de polimerización; siendo éstas características precisamente las que restringen su campo de aplicación, a pesar de las ventajas tecnológicas y económicas que éste material exhibe (Lewis, M, 1997). Por estas razones, el uso de los cementos óseos acrílicos convencionales se encuentra limitado a la fijación de prótesis, donde vale la pena resaltar que el cirujano debe preestablecer los problemas eventuales de aflojamiento del implante, debido a la generación de interfases deficientes: cemento/hueso y cemento/prótesis (Magnan, Bondi, Maluta, Samaila, Schirru, & Dall'Oca, 2013).

De acuerdo a la necesidad de mejorar el desempeño de los cementos óseos acrílicos empleados en la fijación de prótesis articulares y/o dentales, en la última década, la mayoría de investigaciones se han dirigido a desarrollar formulaciones de cementos óseos que presenten un comportamiento biocompatible y osteoconductor (regeneración ósea), además de un buen desempeño mecánico. En este sentido, se encuentra que se incorporan cargas bioactivas como la hidroxiapatita y el quitosano (Seok Bong, Young Jick, Taek Lim, Su A, & In Hee, 2004), también se ha modificado la fase sólida de los cementos mediante la combinación de diferentes rellenos bioactivos y biodegradables como el trabajo realizado por (Lopes, García, Fernandes, y Fernandes, 2013), que añaden poli (3-hidroxi-butirato) (PHB) o su del cemento óseo desde las primeras semanas al realizar pruebas en modelos animales y mediante cultivo celular, respectivamente. Por otro lado, se ha trabajado con partículas y fibras con las que se busca mejorar tanto el comportamiento mecánico como la respuesta biológica al tener estos refuerzos altos módulos de elasticidad y superficies que al estar en contacto con los fluidos corporales promueven la regeneración del tejido óseo; (Kotha, Li, McGinn, y Schmid, 2006) reportó que la adición de fibras cortas de titanio tratadas térmicamente puede mejorar la resistencia mecánica de estos compuestos y además al realizar un tratamiento térmico a la fibra se precipita una fase que al estar en contacto con fluidos corporales ayuda a depositar osteoblastos, además en el trabajo realizado por (Slanea, Vivancob, Meyer, Lynn, y Squirec, 2014), así mismo se ha investigado el uso de nanopartículas de sílice mesoporosas, donde han señalado que se obtuvieron mejoras tanto en la resistencia como en el módulo a la compresión. Finalmente, nuevos métodos de preparación del compuesto de cemento óseo como la fabricación de estructuras porosas (andamios porosos) a base de Metacrilato de metilo y quitosano oligosacárido también se han desarrollado, como una ruta

que garantiza la deposición celular y además se plantea que el compuesto puede llegar a presentar buenas propiedades mecánicas al ser el PMMA un material rígido que brinda un buen soporte como andamio para regeneración de tejido óseo (Han, Guiping, y Nie, 2011).

Por otra parte, en la Universidad del Valle con el apoyo del Centro de Investigación científica de Yucatán (CICY), el equipo de trabajo que ha venido investigando en la temática de Desarrollo de cementos acrílicos modificados con capacidad de estimular regeneración ósea y mejorar la fijación de prótesis ortopédicas, se caracteriza por su carácter interdisciplinar en el que cada grupo de investigación desde su campo de conocimiento ha aportado al estado actual de la investigación que ha permitido la formación de un profesional a nivel de pregrado en Química (Trochez, 2012), ocho Ingenieros de Materiales (Galindez, 2014; Castaño y Arango, 2013; Lozano, 2012; Vanegas y Tejada, 2012; Gutiérrez y Montenegro, 2006), así como dos Magister en Ingeniería Área de Énfasis en Ingeniería de Materiales de la Universidad del Valle (Valencia, 2009; España, 2013) y una Joven Investigadora (Lozano 2013; Lozano, 2014) en el marco del programa Jóvenes Investigadores financiado por COLCIENCIAS. De igual manera, los avances conseguidos a partir del trabajo de los estudiantes han repercutido en presentaciones en congresos internacionales y la publicación de artículos científicos en revistas indexadas. Desde el punto de vista científico hasta ahora se ha conseguido la preparación de cementos óseos acrílicos funcionalizados con comonomeros alcalinos y ácidos adicionados con cargas bioactivas y su correspondiente caracterización en una primera etapa de Laboratorio a partir Fourier-FTIR, Difracción de Rayos X-DRX, Microscopia Electrónica de Barrido-SEM, Resonancia Magnética Nuclear-RMN, Granulometría Laser, etc.), térmicos (Calorimetría Diferencial de Barrido-DSC, Análisis Termogravimétrico-TGA, Análisis Dinamicomecánico-DMA), mecánicos (Tensión, Flexión, Compresión, Impacto, Fatiga) y biológicos (Inmersión en Fluido Biológico Simulado); alcanzándose también una etapa preliminar a nivel Preclínico donde se ha conseguido evaluar diferentes formulaciones de cementos óseos acrílicos implantado el material en conejos usados como modelos animales. Es importante resaltar que dentro de los méritos alcanzados, el equipo de trabajo cuenta con el primer puesto del Concurso Nacional Otto de Greiff en su versión 18, donde el Trabajo de Grado “Formulación y preparación de cementos óseos activos adicionados con Quitosano, para prótesis ortopédicas y/o dentales” ganó en la categoría Tecnologías Apropriadas, basándose este proyecto en algunos resultados de las etapas de Laboratorio y Preclínica trabajadas en el proyecto.

Finalmente, a continuación se listan algunos de los productos adicionales a los Trabajos de Grado

con que cuenta el equipo de investigación proponente, que se sustentan en la interdisciplinariedad de los grupos participantes:

### **Proyectos de Investigación**

José Herminul Mina, Héctor Fabio Zuluaga, Carlos Humberto Valencia. Preparación y Caracterización de cementos óseos acrílicos bioactivos para usar en prótesis ortopédicas. Convocatoria interna 2010. Universidad del Valle. Código SICOP C.I. 2625.

Jose Herminul Mina, Héctor Fabio Zuluaga, Manuel Cervantes Uc, Juan Valerio Cauich. Preparación y caracterización de cementos óseos acrílicos para usar en técnicas de regeneración ósea. Convocatoria 555 Bilateral Colombia-México. Código SICOP: CI 9628. CT0907-2012.

### **Publicaciones en Revistas Indexadas**

Karen Lozano, José Herminul Mina, Héctor Fabio Zuluaga, Carlos Humberto Valencia, Mayra Eliana Valencia. Influencia de la incorporación de un co-monómero alcalino e hidroxiapatita en las propiedades de cementos óseos acrílicos. Dyna, año 80, No. 181, p. 153-162. (2013).

Mayra Eliana Valencia, José Herminul Mina, Héctor Fabio Zuluaga, Manuel Cervantes Uc, Juan cementos óseos para vertebroplastia. Revista Ingeniería y Competitividad , Vol.14 No. 1, p.51 - 62, (2012).

### **Presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales**

Luis Vanegas Molina, Duvan Trochez, Tejada Jefferson, José Herminul Mina, Carlos Humberto Valencia, Héctor Fabio Zuluaga. Síntesis y caracterización de fosfatos cálcicos para su utilización como carga, en la preparación de cementos óseos bioactivos. VI congreso internacional de Materiales. Bogotá, Colombia, Noviembre de 2011. Presentación oral.

Karen Lozano, Jose Herminul Mina., Héctor Fabio Zuluaga, Carlos Humberto Valencia. Obtention and in vivo evaluation of funcionalized acrylic cement for bone tissue regeneration. XXI International Materials research Congress. Cancún, México. August. 2012. Presentación Poster.

Mayra Eliana Valencia, Jose Herminul Mina, Héctor Fabio Zuluaga, Juan Valerio Cauich, Manuel Cervantes Uc. Injectability of acrylic bone cements for vertebroplasty prepared with

aminomethacrylates. 22nd European Conference on Biomaterials. The annual conference of the European Society of Biomaterials, Laussane, Switzerland, September 09 – 11, 2009. Presentación Poster.

Claudia España, Jose Herminul Mina, Héctor Fabio Zuluaga, Carlos Humberto Valencia. In vivo and in vitro evaluation of modified acrylic cement with silanized hydroxyapatite for bone tissue regeneration. XXII International Materials Research Congress. Symposium: Biomaterials for medical applications, Cancún – México, de Agosto 11 – 15, 2013. Presentación Poster.

### **Jóvenes Investigadores**

Lozano Nieva Karen Jessenia. Proyecto: Preparación y caracterización de cementos óseos acrílicos bioactivos para usar en prótesis. Convocatoria Nacional para Jóvenes Investigadores e Innovadores 2012.

Lozano Nieva Karen Jessenia. Proyecto: Obtención y caracterización de hidroxiapatita a partir de hueso vacuno para su aplicación como biomaterial. Convocatoria Nacional para Jóvenes Investigadores e Innovadores 2013.

### **Premios**

Primer puesto concurso Nacional Otto de Greiff a los mejores Trabajos de Grado Versión 18 de 2014 en la Categoría Tecnologías Apropriadas, por la tesis “Formulación y preparación de cementos óseos activos adicionados con quitosano, para aplicación en prótesis ortopédicas y/o dentales” realizado por las estudiantes Castaño Gordillo Angélica y Arango Gutiérrez Isabel Cristina, bajo la dirección del profesor José Herminul Mina Hernández.

### **DESARROLLO ACTUAL**

Los avances que se tienen actualmente en la temática asociada con el desarrollo de cementos óseos acrílicos para fijación de prótesis, se han obtenido a partir de investigaciones preliminares relacionadas a proyectos de investigación de convocatorias internas de la Universidad del Valle y de movilidad en el marco de convocatorias bilaterales financiadas entre Colciencias de Colombia y Conacyt de México, aquí se ha trabajado principalmente en las etapas de Laboratorio y Preclínica, donde en la primera de ellas se han efectuado ensayos de caracterización mecánica

(flexión, tensión, impacto, compresión), fisicoquímica (Infrarrojo por Transformada de Fourier-FTIR, Difracción de Rayos X-DRX, Resonancia Magnética Nuclear- RMN, Microscopía Electrónica de Barrido-SEM, Granulometría Laser, etc.), Térmica (Calorimetría Diferencial de Barrido, Análisis Termogravimétrico, Análisis Dinamicomecánico- DMA) y Biológica (Inmersión en Fluidos Biológicos simulados) en el material. A partir de esta primera etapa de laboratorio se han diseñado formulaciones de cementos óseos con cargas bioactivas y co-monómeros alcalinos y ácidos, llegando a optimizar algunas de éstas, que posteriormente se definieron como susceptibles de ser evaluadas en una siguiente etapa Preclínica. En este sentido, en dicha etapa Preclínica posterior, se han adelantado implantaciones de diversas formulaciones del cemento acrílico en biomodelos (conejos), registrándose avances importantes en la formación de tejido óseo al interior del material.

### **DESARROLLO A LOGRAR CON EL PROYECTO**

A partir del desarrollo del proyecto, en un trabajo a 36 meses, se establecerán formulaciones de cementos óseos acrílicos basadas en un componente sólido (polimetacrilato de metilo, iniciador, agente radio opaco, cargas bioactivas) y uno líquido (metacrilato de metilo, co-monómero, iniciador) de manera similar a como lo emplean actualmente los cirujanos en la fijación de prótesis articulares, con la diferencia fundamental basada en que las formulaciones desarrolladas en la presente investigación se caracterizarán por su capacidad para promover la regeneración ósea e incrementar la fijación de dichas prótesis que pueden ser ortopédicas y/o dentales. Para llegar al alcance planteado como un desarrollo futuro, se propone el uso de co-monómeros alcalinos y la inclusión de cargas bioactivas entre las que se destacan vidrios bioactivos (vidrio a base de silicato), quitosano y fosfatos cálcicos, estos últimos se pretenden obtener a partir de hueso de ganado vacuno, como un valor agregado del proyecto de investigación. Así mismo, un avance significativo con respecto a los estudios previos se asocia a la implementación de pruebas de uso en las que se evaluarán directamente los cementos para la fijación de prótesis en cerdos a usar como biomodelos, destacándose que ya se tienen resultados previos en conejos y esta experimentación complementaria permitirá consolidar la etapa Preclínica y estar cerca de una etapa Clínica que se podría llevar a cabo posteriormente en otra investigación.

Las actividades a desarrollar en la investigación abarcan la preparación de los cementos óseos acrílicos a partir del planteamiento de diseños experimentales estadísticos, en los que previamente se incluirán los factores de estudio y el tipo de análisis más idóneo. Posteriormente, se efectuarán las pruebas de laboratorio típicas a partir de ensayos mecánicos, fisicoquímicos, térmicos y

biológicos, siendo estos últimos de biocompatibilidad y viabilidad celular, para así seleccionar las formulaciones que cumplan con los estándares de interés (ISO 5833) y pasar a la etapa Preclínica en la fijación de prótesis en los biomodelos para tener resultados directos de la prueba de uso del material. Se realizarán en total 100 actividades representadas en los ensayos descritos anteriormente.

## **METODOLOGÍA.**

### **Revisión bibliográfica**

La búsqueda bibliográfica se realizará al nivel de bases de datos nacionales, internacionales e Internet, artículos diversos publicados en revistas, normas, participaciones en workshops, seminarios y relaciones con otros investigadores. Esta revisión se mantendrá a lo largo del proyecto y se elaborará una base de datos que sirva de soporte para el posterior análisis y discusión de los resultados experimentales.

### **Selección y caracterización de los materiales**

Con base en la revisión bibliográfica se han escogido los materiales mostrados en la Tabla siguiente; sin embargo es factible que a lo largo del proceso de investigación se requieran otros materiales y/o reactivos no relacionados en dicho listado.

<b>Material</b>	<b>Ensayos de caracterización</b>	<b>Parámetro a observar</b>	<b>Posible lugar de adquisición</b>
Metacrilato de metilo (MMA)	RMN	Señales de los protones metoxilo	Merquímica
	FTIR	Enlaces Característicos	
Polimetacrilato de metilo	Viscosimetría	Peso Molecular	Nictone
	Granulometría	Tamaño de partícula	
Co-monómeros	Ficha técnica	Composición	Merquímica

Metacrilato del 2-(dietilamino etilo), (DEAEM)	Ficha técnica	Composición	Merquímica
Iniciador (Peróxido de benzoilo)	Ficha técnica	Composición	Merquímica
Acelerador (N, N-dimetil p-toluidina, (DMPT))	Ficha técnica	Composición	Merquímica
Cargas bioactivas	FTIR	Enlaces Característicos	Merquímica
	Granulometría	Tamaño de partícula	
Agente radio opaco	Granulometría	Tamaño de partícula	Merquímica
Vástagos de acero quirúrgico y/o Titanio	Ficha técnica	Composición	Industrias Metálicas San Pedro

### Planteamiento de Diseños experimentales

En esta investigación el propósito principal es evaluar la influencia de diferentes variables específicas sobre las propiedades de los cementos óseos, en este sentido se plantea el trabajo con superficies de respuesta buscando que el modelo resulte adecuado para maximizar o minimizar algunas de las propiedades más relevantes de dicho material. El planteamiento particular de los factores e intervalos de estudio dependerá de los trabajos de grado que se adelantarán en el marco de la investigación.

### Obtención y caracterización de fosfatos cálcicos a partir de hueso de ganado Vacuno

En primer lugar, los huesos frescos se deberán cortar en trozos más pequeños y se limpiarán bien para eliminar la mayoría de las impurezas adherentes. Después, se colocarán a hervir en agua destilada durante 30 minutos para desengrasar y facilitar la eliminación de los tejidos y la médula ósea; este procedimiento se repetirá dos veces con agua fresca. Luego, cada diáfisis, que es la porción central o cuerpo de un hueso largo, se debe cortar transversalmente en rodajas de 1,5 cm de espesor y el hueso poroso o trabecular en el interior se retirará cuidadosamente para obtener solamente muestras de hueso compacto (Figueredo, 2010).

Posteriormente, las muestras de hueso se sumergirán en etanol al 70% v/v, seguido de un lavado

con agua destilada para desengrasarlas en su totalidad. A continuación, se introducirán en peróxido de hidrógeno (30% v/v) durante al menos 48 h, cambiándose la disolución de manera constante ya que ésta se satura. Por último, se almacenarán las muestras en una disolución de formaldehído (4% v/v) a 4 °C. Antes de su uso, los especímenes se deberán enjuagar a fondo con agua destilada y posteriormente se secarán en un horno de vacío a 50 °C durante 3 días (Figueredo, 2010).

La hidroxiapatita natural se obtendrá después de la calcinación de las muestras de huesos entre los 700 y 1200 °C, durante 18 horas, bajo atmosfera oxidante (aire). Estas temperaturas fueron seleccionadas tras un análisis preliminar en la literatura, puesto que la composición química es estable y las muestras de hueso se componen principalmente de hidroxiapatita por encima de los 700 °C (Figueredo, 2010). Sin embargo, es importante resaltar que uno de los objetivos de esta investigación es establecer la temperatura a la cual se puedan obtener composiciones estables y estructuras favorables para un buen comportamiento bioactivo de la Hidroxiapatita de origen animal. Por último, después de la calcinación, las muestras se deberán colocar dentro de un desecador a temperatura ambiente y se dejarse enfriar de manera natural.

### **Preparación de los cementos óseos**

La preparación de los cementos óseos acrílicos se iniciará con el proceso de mezclado manual entre la fase sólida y la fase líquida de cada formulación, manteniendo constante una relación 2:1. A su vez, la fase sólida estará constituida por PMMA, como polímero base, peróxido de benzoilo (PBO) como iniciador, sulfato de bario como agente de contraste y mezclas de hidroxiapatita y fosfato tricálcico, como refuerzo bioactivo. Así mismo, el componente líquido estará formado por metacrilato de metilo (MMA) como monómero base y dimetil p-toluidina (DMPT), como activador. Finalmente, con base en los resultados reportados por Valencia (2009), se seleccionaran como co-monómeros: el metacrilato del 2-dimetilamino etilo (DMAEM), el metacrilato del 2-dietilamino etilo (DEAEM) y el acrilato del 2-dietilamino etilo (DEAEA), con el fin de tener cementos óseos funcionalizados. En el estudio se mantendrá constante la proporción del peróxido de benzoilo en la fase sólida y el tipo y cantidad de agente activador (DMPT al 2,5 % p/p) en la fase líquida.

### **Caracterización físico-química, térmica y mecánica de los cementos óseos**

#### *Ensayos de Curado*

Estos ensayos se efectuarán introduciendo las mezclas de cemento en un molde de teflón con un diámetro de 10 mm y una altura de 15 mm, tal y como se ha reportado en la literatura (Sabino

*et al.*, 2004). El molde será colocado previamente en un baño de temperatura controlada a dos valores diferentes: 23 y 37 °C. El primer valor de temperatura se elige teniendo en cuenta la norma ISO 5833, mientras que el segundo dato se selecciona con el fin de tener una mayor aproximación del comportamiento *in vivo*, usando como referencia la temperatura promedio del cuerpo humano. El cálculo de los tiempos de curado y de la temperatura máxima alcanzada se realizará de acuerdo a lo establecido en el estándar de la norma ISO 5833.

#### *Propiedades Mecánicas*

De conformidad con lo estipulado en la norma ISO 5833 para cementos óseos acrílicos, los ensayos mecánicos a realizar serán los de compresión y flexión; para el desarrollo de ambas pruebas, las muestras se conformarán a partir del moldeo por compresión del cemento óseo usando una prensa hidráulica y moldes de teflón con las dimensiones normalizadas. Los especímenes de ensayo para la prueba de compresión serán cilindros de 6 mm de diámetro y 12 mm de altura, estas probetas se deberán acondicionar durante una semana a 25°C, antes de ser ensayadas. Las muestras se evaluarán en una máquina de ensayos universales marca Tinius Olsen modelo H50KS, con una celda de carga de 10 kN y una velocidad de cabezal de 20 mm/min. Para la prueba de flexión en cuatro puntos, se ensayarán probetas de 75 mm de largo, 10 mm de ancho y 3 mm de espesor, a una velocidad de cabezal de 5 mm/min. Al igual que en el caso anterior, las probetas serán acondicionadas durante una semana, a temperatura ambiente, antes de hacerse los ensayos. Aunque la norma ISO 5833 no hace referencia al ensayo de tensión, en el presente estudio esta prueba se efectuará con el fin de tener resultados de caracterización complementarios del material, el ensayo se realizará de conformidad con la norma ASTM D638.

#### *Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ )*

Esta prueba se realizará colocando las muestras de cemento (10 mg aprox.) en charolas de aluminio, las cuales posteriormente se calentaran a un intervalo de temperaturas entre 20 y 180°C, a una rapidez de 10 °C/min, en un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC. La  $T_g$  se calculará considerando el punto medio de la transición de la muestra, en el momento en que se presente un cambio en la línea base del termograma. Esta determinación se hará durante la segunda corrida de calentamiento.

#### *Determinación de la cantidad de monómero residual*

Para esta prueba, los cementos serán disueltos en cloroformo deuterado y el monómero residual de

MMA será calculado mediante la integración de las señales de los protones metoxilo del MMA y del PMMA. Para lo anterior, se utilizará un equipo de Resonancia Magnética Nuclear. El ensayo se realizará a las muestras después de su acondicionamiento a temperatura ambiente por una semana.

#### *Evaluación del peso molecular*

El peso molecular promedio en peso (Mw) se determinará por la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC, por sus siglas en inglés). Las muestras se obtendrán por disolución de 100 mg de cemento en 4 ml de THF (Tetrahidrofurano), grado HPLC. El peso molecular se estimará a partir del tiempo de retención, usando una curva de calibración derivada de estándares de Poliestireno (PS) monodispersos. En este sentido, los valores de los pesos moleculares de los cementos óseos se reportarán como equivalentes de poliestireno. Adicionalmente, se efectuarán ensayos de Viscosimetría para la determinación complementaria del peso molecular promedio viscoso de los cementos; aquí con ayuda de un viscosímetro Ubbelohde y un baño termostático para el control de la temperatura, se encontrará inicialmente la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  de las muestras previamente filtradas. Posteriormente con el valor teórico de las constantes  $k$  y  $a$  para polimetacrilato de metilo en tetrahidrofurano a 25°C y utilizando la viscosidad intrínseca, se estimará el peso molecular mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada; de manera similar como lo hicieron Gutiérrez y Montenegro (2006).

#### **Caracterización In Vitro de los cementos óseos**

##### *Determinación de la citotoxicidad*

De acuerdo a la guía del kit de Roche, se determina el porcentaje de citotoxicidad de cada uno de los compuestos analizados, siguiendo el modelo presentado en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = \frac{\text{Lectura Muestra} - \text{Control Bajo}}{\text{Control Alto} - \text{Control Bajo}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

### *Determinación de la viabilidad (Expresión fenotípica)*

Con el objetivo de evaluar la viabilidad de las células que están en contacto con los cementos óseos, se determinará la expresión de fosfatasa alcalina y osteocalcina, como proteínas características del fenotipo osteoblástico, las determinaciones se realizarán a los 2, 10, 25, y 40 días. Se tendrán cinco muestras por cada tipo de cemento, para cada periodo.

### **Etapa preclínica (Determinación de la respuesta biológica de los cementos óseos)**

El protocolo ético para esta investigación deberá ser aprobado por el comité de ética animal de la facultad de Salud de la Universidad del Valle. Esta investigación será de tipo experimental-descriptivo y se realizará en cuatro fases:

#### *Etapa pre-quirúrgica (modelo animal)*

Se seleccionarán como sujetos experimentales cerdos criollos colombianos, (variedad casco de mula), machos, con una edad de 12 meses. Los animales serán obtenidos en la granja de la Universidad Nacional de Colombia en Palmira, Valle del Cauca.

Se emplearán en total 26 cerdos, se utilizarán dos para realizar ensayos clínicos y refinar la técnica quirúrgica, y los otros 24 serán divididos aleatoriamente en dos grupos, uno control y otro experimental; cada uno formado por 12 animales. Los animales del grupo control serán intervenidos para una cirugía de remplazo total de cadera, y la prótesis será cementada con un material comercial. Así mismo, los animales del grupo experimental, también serán intervenidos para una cirugía de reemplazo total de cadera, pero la prótesis será cementada con el material experimental. Cada grupo será dividido en 2 subgrupos, compuesto cada uno por 6 animales.

Se tendrá un Control 1 (C1), y Control 2 (C2). Al C1 se le realizarán estudios de histoquímica e inmunoquímica, y al C2 pruebas de biomecánica. De igual manera, se tendrá un Experimental 1 (E1), y Experimental 2 (E2). Al E1 se le efectuarán estudios de histoquímica e inmunoquímica, y al E2 pruebas de biomecánica. El criterio para calcular el número de animales será estadístico, ya que 6 es el número mínimo por subgrupo que permitirá hacer inferencia. Siguiendo la norma ISO 10993-6 8.5.3 (Animals and Implantation), se evaluarán las condiciones de salud de los animales mediante toma de registros de temperatura corporal, peso, consumo de alimentos; y se realizarán observaciones acerca del comportamiento de los animales, tales como: acicalamiento, mantenimiento del hábitat, posiciones en reposo y alerta.

Los animales serán estabulados en la granja de la Universidad Nacional, o en una granja comercial adscrita a la misma. Se tendrá supervisión permanente de un Médico veterinario y/o Zootecnista. Se manejará una dieta equilibrada que permita mantener a los animales en un peso normal, evitando el sobrepeso.

### *Etapas quirúrgicas*

Los animales serán pesados para determinar las dosis de los medicamentos anestésicos. Se aplicarán las dosis necesarias para obtener el nivel de sedación deseado.

Para lograr la sedación adecuada, se utilizará la técnica de inmovilización farmacológica, mediante inyección intramuscular en la región femoral posterior.

Como medicamentos anestésicos se utilizará Maleato de Acepromacina, (Tranquilan), 0.1 mg por kilogramo intramuscular. Oxilacina al 2 %, (Xilasyne), 0.2 mg intramuscular; y Ketamina 0.1 mg por Kilogramo intramuscular.

Una vez sedado el animal, se posiciona en decúbito lateral sobre la mesa de cirugía. Se rasurará la zona del glúteo derecho y del fémur derecho, para exponer la piel, se desinfectará con una sustancia antiséptica, (Iodopovidona en solución), se ubicará la zona para acceso quirúrgico.

La articulación de la cadera se abordará latero-cranealmente. La incisión de la piel se inicia comenzando dorsal y caudal al trocánter mayor, curvándose sobre el borde craneal del fémur y extendiéndose distalmente hasta la mitad de aquel. Se retrae la piel, y se incide la fascia lata a lo largo del borde craneal del bíceps femoral.

Se retrae el bíceps femoral caudalmente para permitir la incisión de la capa profunda de la fascia lata, y se continúa a través del tabique intermuscular, entre el borde craneal del glúteo superficial y el tensor de la fascia lata. El tensor de la fascia lata se retrae cranealmente.

El glúteo profundo se expone reflejando dorsalmente los glúteos superficial y medio y se incide en forma de L, la incisión comienza perpendicular a las fibras musculares en la inserción trocánterica y continúa en este plano 1 a 3 cm, según el tamaño muscular, para luego seguir en forma paralela a las fibras musculares hasta el borde acetabular.

El origen de los músculos vasto medial y lateral en el canto del trocánter mayor se toma como marca para la incisión de la cápsula articular y se continúa ventralmente a lo largo de su inserción

en el cuello femoral. La exposición puede mejorarse por tenotomía de una porción del tendón glúteo profundo cerca del trocánter, conservando suficiente tendón sobre el hueso para permitir la sutura.

El fémur se rota externamente dislocando la cabeza femoral de la cavidad acetabular. Se procede a retirar el ligamento de la cabeza para facilitar la completa rotación externa. Siguiendo la marca de la guía se procede a la osteotomía de la cabeza femoral, tomando los debidos recaudos para no “tocar” el trocánter mayor y la inserción de los glúteos en él. Para lo cual se utiliza una sierra oscilante.

La cabeza femoral se toma con pinzas óseas y se rota para exponer la porción ventral del cuello, donde generalmente se conserva una adherencia de la cápsula articular que se incide para completar la exéresis.

La mejor reconstrucción del “off set” y de la posición en el plano transversal del fémur se consigue mediante la osteotomía baja, a nivel del trocánter menor. En el plano sagital, la osteotomía a este nivel mejora la posición del implante, pues minimiza el ángulo entre la línea sagital de éste y la del hueso y, de este modo, disminuye la posibilidad de tipping.

Para exponer correctamente el acetábulo, el fémur debe orientarse retrayendo su sección proximal hacia caudo-lateral. El fresado de la cavidad acetabular es uno de los pasos críticos de este procedimiento. La determinación del tamaño de la fresa y, consecuentemente, del diámetro del acetábulo protésico a implantar se preseleccionan a partir de las imágenes radiográficas.

El acetábulo debe fresarse hasta la visualización incipiente de la cortical medial; esto es necesario para asegurarnos una eficiente cobertura dorsal y un buen soporte medial. La profundidad del fresado se considera suficiente cuando la transición entre el hueso cortical medial y el esponjoso se hace manifiesta.

Luego, se perforan 3 orificios alrededor del borde dorsal, craneal y caudal del acetábulo para permitir una mejor penetración del cemento. El fémur se rota 90° y se eleva el extremo proximal utilizando un Hohmann ubicado inmediatamente distal a la fosa trocantérica sobre la superficie caudal del fémur.

Se perfora el canal femoral siguiendo la abertura utilizada para la guía de corte, para lo cual se emplean una fresa quirúrgica o broca del mismo diámetro del tallo a implantar.

La fresa debe estar perfectamente alineada y centrada en el canal medular; en esta posición,

apuntará exactamente a la fosa intercondílea

Para iniciar el labrado del canal medular se utiliza una fresa cónica. Ésta debe poseer una punta roma para poder trabajar sobre el calcar sin temor de perforar la cortical hacia distal. La fresa se usa para remover parte del hueso esponjoso.

Una vez finalizada la preparación, se coloca el tallo de prueba de la medida indicada para verificar y corregir el labrado del canal. Éste debe permitir la colocación del tallo en posición neutra. La ubicación en anteversión provocará un acortamiento relativo en el largo del cuello.

**Posicionamiento y colocación del cotilo.** Se debe retraer caudalmente el fémur a fin de exponer correctamente el acetábulo ya preparado. Hay que tener especial cuidado de no dañar el fémur que ya ha sido fresado.

Tanto los músculos glúteos como la cápsula articular se retraen dorsalmente, mientras que la porción incidida del glúteo profundo y el tensor de la fascia lata se reflejan cranealmente.

Se procede al lavado y posterior succión de la cama acetabular con solución salina. Se utiliza un cotilo de prueba con el propósito de determinar el tamaño que mejor se adapte a cada caso particular.

Se prepara el cemento quirúrgico que corresponda (comercial o experimental), con antibiótico, cuidando de conservarlo en una fase semilíquida a fin de facilitar su "inyección".

Primero, se deposita el cemento con la precaución de no colocarlo directamente dentro del orificio labrado en el cuerpo del ilion, sino cerca de él.

Se coloca el cotilo en el posicionador y se lo orienta respecto a la tuberosidad isquiática y la cresta ilíaca; esos puntos anatómicos, unidos mediante una recta imaginaria, permiten situar el dispositivo en forma paralela.

Una vez orientado correctamente, el cotilo debe ser presionado sobre la cama acetabular.

El cirujano debe visualizar el cotilo en forma tridimensional para comprender la posición que éste debe adoptar. Primero, debe comprobar la orientación principal; luego, la vista ventral con ligera anteversión; y finalmente, la barra vertical orientada en forma paralela a una línea imaginaria entre las tuberosidades isquiáticas.

Es fundamental conservar una buena cobertura dorsal del cotilo posicionado.

El colocador se remueve una vez que el fraguado del cemento le da suficiente consistencia.

**Posicionamiento y colocación del tallo femoral.** El fémur vuelve a rotarse externamente y el extremo proximal se eleva mediante un Hohmann. El canal femoral se lava y seca muy bien para eliminar restos de sangre y fluidos.

Se prepara una nueva dosis de cemento y se inyecta en el canal medular, comenzando lo más profundo posible y ascendiendo hasta rozar el borde. Un canal medular promedio requiere de 12 a 14 cc. El exceso de cemento se remueve con un elevador perióstico.

Se inserta manualmente el tallo alineado con el eje axial del fémur, procurando que el extremo de la prótesis permanezca centrado.

Una vez colocado el tallo, se procede a seleccionar la cabeza con el largo de cuello que mejor se adapte al caso particular. Para esto se utilizan las esferas de prueba, comenzando con la de cuello medio, y aumentando o disminuyendo la medida, según corresponda.

Se reduce la articulación y se comprueba su estabilidad en movimientos extremos. Cuando se ha determinado la imposibilidad de luxación, la cabeza de prueba se reemplaza por la correspondiente definitiva. Para fijarla debidamente, se utiliza el impactor de cabeza femoral, el cual se golpea suavemente con el mazo, unas 5 a 6 veces.

Una vez acoplada la cabeza, se reduce dentro de la cavidad acetabular y se vuelve a evaluar el rango de movilidad y laxitud.

Cierre y consideraciones finales

La cápsula femoral se cierra con suturas reabsorbibles 0 o 2-0. El origen del vasto medial se sutura a la parte craneal del glúteo profundo al que previamente se le colocaron 2 puntos.

Se utilizan puntos continuos en la inserción del tendón de la fascia lata en distal y se continúa en dirección proximal a lo largo de la parte craneal del glúteo superficial. La capa superficial de la fascia lata en distal, y la fascia glútea en proximal se cierran junto al borde craneal del bíceps femoral con puntos continuos. El resto de los planos se suturan rutinariamente.

Se aplicará un antibiótico tópico, (Gentamicina en crema) y aplicará Clindamicina Intramuscular, (600.000 mg) y Tramadol Intramuscular en dosis ajustadas al peso. Después del segundo día, se aplicará desinfectante tópico Curagan NL®, (Cipermetrina - Violeta de genciana) para proteger

la zona quirúrgica.

**Eutanasia.** El encargado de desarrollar esta parte del componente ético será el Médico veterinario, se realizará por sobredosis de barbitúricos, inicialmente se aplicará un exceso de sedante, (2 mg de Maleato de Acepromicina IM), luego se aplicarán 5 mg de Pentobarbital sódico (tramadol®) intravenoso, en los espacios vertebrales cervicales.

#### *Recuperación y preparación de las muestras implantadas*

Después de 90 días, se hará disección del hueso fémur derecho, donde se implantó la prótesis, y se introducirá en un recipiente rotulado con el número del animal y el código del subgrupo (C1, C2, E1 O E2), en una solución fijadora (Formol Buferado o glutaraldehido según corresponda al tipo de estudio). Las muestras se trasladarán inmediatamente al laboratorio para su procesamiento

Las muestras para estudios histológicos serán enviadas a laboratorio de Histología de la Escuela de Ciencias Básicas con la solicitud de realizar los estudios histoquímicos e Inmunohistoquímicos, las muestras para pruebas biomecánicas se llevarán al laboratorio de pruebas mecánicas de la Escuela de Ingeniería de Materiales para su análisis.

**Análisis histoquímico e inmunohistoquímico.** Se realizarán cortes transversales de 1 mm para estudiar las interfaces entre el hueso y el cemento óseo, y entre el cemento óseo y la prótesis.

En las interfaces, en el cemento y en la superficie de la prótesis se tratará de identificar evidencia de actividad osteoblástica y osteoclastica, así como respuestas inflamatorias ante el material cementante, para esto se harán estudios de histomorfometría con un Microscopio Óptico, con focal y un Microscopio Electrónico de Barrido.

También se realizaran pruebas de histoquímica e inmunohistoquímica para identificar fibras colágeno, osteocalcina, fibronectina, vimentina, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida.

**Pruebas biomecánicas.** Se realizarán pruebas de resistencia al zafado de las prótesis implantadas en los animales. Para tal efecto, se tomarán muestras del hueso conteniendo la prótesis cementada y se embeberá por el mismo lado del hueso en una resina epóxica consiguiendo obtener un área transversal rectangular. Finalmente, los especímenes de ensayo basados en muestras del grupo experimental y el grupo control serán ensayados en una Máquina Universal de Ensayos Tinius Olsen modelo H50KS. En la mordaza inferior del equipo se sujetarán las muestras por el lado de la resina, y con la mordaza superior se agarrará el extremo sobresaliente de la prótesis implantada. Con el

ensayo se registrarán los datos de carga contra desplazamiento necesarios para la extracción de la prótesis y a partir de estos se estimará el nivel de adhesión mediante el cálculo de la resistencia cortante interfacial siguiendo el modelo propuesto por Kelly & Tyzon.

### ***Procesamiento de la información y análisis de resultados***

Los estadísticos descriptivos empleados en el texto para datos cuantitativos continuos serán los parámetros habituales de media y desviación típica (DE). Por tener muestras de tamaño 6, no se podrá asumir normalidad por el teorema de límite central, por lo tanto la normalidad de los datos se comprobará mediante la prueba de Kolmogorov- Smirnov, utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows V 9.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Los test de hipótesis que se manejarán serán los de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos independientes, al ser más potente que la prueba de la mediana para detectar diferencias entre dos grupos. El nivel de significación estadística se establecerá con un error tipo I, igual o inferior a 0,05.

### **PROGRAMA DE TRABAJO**

Ver capítulo 9.

### **RECURSOS DISPONIBLES**

**Laboratorios:** En la Universidad del Valle se cuenta con laboratorios de química, Ingeniería de Materiales, histología, y cultivos celulares; lo que va a permitir que los cementos óseos acrílicos sean procesados y caracterizados adecuadamente.

**Recurso humano:** Todos los investigadores vinculados a la propuesta tienen formación de posgrado, así como una amplia experiencia y experticia en las actividades a desarrollar según el rol y fase de vinculación, lo cual se convierte en una garantía que los procesos serán realizados con rigurosidad científica.

### **RECURSOS NECESARIOS**

#### **Materiales**

Los materiales y reactivos incluidos en este ítem se requieren para la preparación de las diferentes formulaciones de cementos óseos acrílicos propuestas en la investigación. Así mismo, se

incluyen los sujetos de prueba (cerdos y conejos) con sus correspondientes alimentos, medicamentos y elementos a implantar.

Metilmetacrilato (MMA)

Metacrilato del 2-(dimetilamino etilo), (DMAEM)

Metacrilato del 2-(dietilamino etilo), (DEAEM) Acrilato

del 2-(dietilamino etilo), (DEAEA) Peróxido de benzoilo

N, N-dimetil p-toluidina, (DMPT)

Sulfato de bario

Polimetilmetacrilato

Vidrios bioactivos

Quitosano

Vástagos de acero quirúrgico y/o titanio

Fosfatos de Calcio

Sujetos de prueba (con alimentos y jaulas)

Medicamentos

### **Servicios**

Los servicios planteados en este apartado se asocian a ensayos de caracterización fisicoquímica, térmica, mecánica y biológica en los cementos óseos acrílicos y los elementos implantados en los sujetos de prueba. Así mismo, se incluyen servicios como el del Bioterio del ICESI y la participación de profesionales que van a asistir en los procesos de cirugía para la implantación y en la selección y mantenimiento de los biomodelos.

Ensayos Mecánicos (tensión, compresión, flexión)

Ensayos Térmicos (curado, DSC)

Ensayos de Cromatografía de permeación en Gel

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Ensayos Viscosimétricos

Exámenes histológicos y microfotografías

Imágenes radiográficas

Asesoría Veterinario

Manejo Bioterio (encargado de animales)

Cirujano Ortopedista

Sala de Cirugía

### **Equipos**

Los equipos que se van a adquirir con rubros del macroproyecto se requieren para adelantar la metodología experimental propuesta y son necesarios para la preparación y caracterización de los cementos óseos acrílicos y los fosfatos cálcicos, así como también para apoyar el proceso de cirugía de los biomodelos.

Equipo radiográfico: Se necesita para asistir la cirugía de implantación de los biomodelos

Sistema de medición de temperaturas de curado: Se requiere para cuantificar la exotermia de los cementos óseos acrílicos

Equipo para esterilización: Se requiere para la esterilización de los reactivos, materiales y cementos óseos acrílicos a emplear en la experimentación

Horno: Se empleará para los tratamientos térmicos de los huesos de ganado vacuno que se emplearán para la obtención de los fosfatos cálcicos

Molino Criogénico: Se requiere para la molienda de los huesos de ganado vacuno que se emplearán para la obtención de los fosfatos cálcicos

Marmita: Se necesita para los procesos de cocción de los huesos de ganado vacuno que se

emplearán para la obtención de los fosfatos cálcicos

Refrigeradores: Se requiere para el almacenamiento de los reactivos que se deben almacenar a baja temperatura

Equipo para análisis Dinámico-Mecánico (DMA): Se empleará el equipo para la caracterización en condiciones dinámicas de los cementos óseos acrílicos

Campana de extracción: Se necesita la campana para el adecuado manejo de los reactivos y preparación de los cementos óseos acrílicos

### **Salidas de Campo**

Se solicita este rubro para efectuar salidas de campo con el fin de comprar y supervisar el manejo de los sujetos de prueba

### **Personal**

5 Investigadores, (Contrapartida Univalle)

1 Profesional con posgrado, medio tiempo, por 2 años, (recursos convocatoria)

2 profesionales con pregrado, tiempo completo, por 2 años, (recursos convocatoria)

### **Viajes**

México-Colombia (Un Investigador del CICY de México en estancia en Colombia por 10 días)

Colombia – México (Un profesional del proyecto en estancia de un mes en el CICY de México)

Colombia – México (Un investigador del proyecto en estancia de 15 días en el CICY de México)

Congreso Internacional (Dos profesionales del proyecto)

Congreso Nacional (Dos profesionales del proyecto)

### **Actividades a realizar y plazos**

#### **Primer Año**

- Selección y compra de equipos, materiales y reactivos

- Obtención y caracterización de fosfatos cálcicos a partir de hueso de ganado Vacuno
- Preparación de los cementos óseos acrílicos
- Etapa Laboratorio (Caracterización Físicoquímica, Térmica, Mecánica y Biológica de los Cementos Óseos Acrílicos)

### **Segundo Año**

- Preparación de los cementos óseos acrílicos
- Etapa Laboratorio (Caracterización Físicoquímica, Térmica, Mecánica y Biológica de los Cementos Óseos Acrílicos)
- Caracterización In Vitro de los cementos óseos
- Etapa pre-quirúrgica (modelo animal)
- Etapa quirúrgica

### **Tercer Año**

- Determinación de la respuesta biológica de los cementos (recuperación de las muestras, estudios histológicos, histoquímicos, inmunoquímicos y de microscopía electrónica de barrido)
- Análisis de resultados

## **OBJETIVOS DE LA LÍNEA DE CEMENTOS ÓSEOS**

### **Objetivo General**

Desarrollar cementos óseos acrílicos, funcionalizados con co-monómeros y refuerzos bioactivos, que puedan promover la regeneración ósea e incrementar la fijación de prótesis ortopédicas.

### **Objetivos Específicos**

- Formular cementos óseos con baja exotermia variando su composición típica con la incorporación de monómeros funcionalizados y refuerzos bioactivos
- Estudiar la influencia de la modificación de los monómeros y la incorporación de las cargas bioactivas, en las propiedades de los cementos óseos, a partir de la caracterización térmica y

mecánica en especímenes normalizados.

- Evaluar el comportamiento bioactivo de los cementos óseos desarrollados, mediante estudios de crecimiento celular e histomorfométricos, llevados a cabo a partir de evaluaciones en condiciones *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar el nivel de unión del cemento óseo a partir de evaluaciones mecánicas de *pull out* en prótesis previamente fijadas en modelos animales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Castaño Gordillo Angélica y Arango Gutiérrez Isabel Cristina. “Formulación y preparación de cementos óseos activos adicionados con quitosano, para aplicación en prótesis ortopédicas y/o dentales”, Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle. Cali – Colombia. (2013).
2. España Peña Claudia Liliana. “Efecto de la silanización de partículas de fosfato cálcico en las propiedades fisicoquímicas, térmicas y mecánicas de cementos óseos acrílicos”, Maestría en Ingeniería área de énfasis en Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle. Cali – Colombia. (2013).
3. Figueiredo, M., Fernando, A., Martins, G., Freitas, J., Judas, F., Figueiredo, H; (2010). Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramics International* 36, 2383–2393.
4. Galindez Yineth. “Caracterización fisicoquímica y estudio del comportamiento mecánico a fatiga de cementos óseos acrílicos con aplicación en fijación de prótesis”, Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle. Cali – Colombia. (2014).
5. Gutiérrez Ospina Leonardo y Montenegro Rosero Melissa. “Estudio de factibilidad técnica para la fabricación de cementos óseos acrílicos con aplicación en biomateriales”. Ingeniero de Materiales. Universidad del Valle. Cali – Colombia. (2006).
6. Han, J., Guiping, M., & Nie, J. (2011). A facile fabrication of porous PMMA as a potential bone substitute. *Materials Science and Engineering*, 31: 1278–1284.
7. Im, H., Miyazaki, T., Kokubo, T., & Nakamura. (2001). *Key Engineering Material*. 192.
8. Kotha, S., Li, C., McGinn, P., & Schmid, S. (2006). Improved mechanical properties of acrylic bone cement with short titanium fiber reinforcement. *J Mater Sci: Mater Med*, 17:1403–1409.

9. Lewis, M. (1997). Properties of Acrylic bone cement: State of the art review. *J. of Biomedical Mat.*, 38, 155-182.
10. Lopes, P., Garcia, M., Fernandes, M., & Fernandes, M. (2013). Acrylic formulations containing bioactive and biodegradable fillers to be used as bone cements: Properties and biocompatibility assessment. *Materials Science and Engineering*, (33) 1289–1299.
11. Lozano Nieva Karen Jessenia. “Influencia de la incorporación de un co-monómero alcalino e hidroxiapatita en las propiedades físicas, químicas, mecánicas y térmicas de cementos óseos acrílicos”, Ingeniero de Materiales, Universidad del Valle. Cali – Colombia. (2012).
12. Magnan, B., Bondi, M., Maluta, T., Samaila, E., Schirru, L., & Dall’Oca, C. (2013). Acrylic bone cement: current concept review. *Musculoskelet Surg*, (97) 93– 100.
13. Sabino, M.A.; Ajami, D.; Salih, V.; Nazhat ,S.N.; Vargas-Coronado, R.; Cauich-Rodríguez, J.V.; Ginebra, M.P. *J Biomater Appl* 19 (2004) 147-161.
14. Seok Bong, K., Young Jick, K., Taek Lim, Y., Su A, P., & In Hee, C. (2004). The characteristics of a hydroxyapatite–chitosan–PMMA bone cement. *Biomaterials*, (25) 5715–5723.
15. Slanea, J., Vivancob, J., Meyerd, G., Lynn, H., & Squirec, M. (2014). Modification of acrylic bone cement with mesoporous silica nanoparticles: Effects on mechanical, fatigue and absorption properties. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 29451–461.
16. Trochez Téllez Duván Antonio. “Síntesis de hidroxiapatita y fosfato beta-tricálcico para su aplicación en la preparación de cementos óseos bioactivos”, Química, Universidad del Valle. Cali – Colombia. (2012).
17. Valencia, M. Caracterización reológica de cementos óseos acrílicos para vertebroplastia y/o cifoplastia preparados con monómeros alcalinos. Tesis de Maestría en Ingeniería Área de énfasis Ingeniería de Materiales. Universidad del Valle. Cali – Colombia. (2009).
18. Vanegas Molina Luis Enrique y Tejada Díaz Jefferson. “Influencia de la incorporación de acetato de vinilo y cargas bioactivas en las propiedades físico-químicas, mecánicas y térmicas de cementos óseos acrílicos”. Ingeniero de Materiales. Universidad del Valle. Cali – Colombia. (2012).

## **6. IMPACTO AMBIENTAL DEL PROYECTO**

La gestión integrada del proyecto de Investigación y Producción de tejidos, órganos y biodispositivos para uso en medicina regenerativa cuenta con procesos cuyo objetivo es asegurar el desarrollo y manejo de investigación y aplicación de tecnologías emergentes para el sector de la salud pública, lo cual afecta directamente sistemas económicos, sociales y culturales, maximizando el bienestar de la población y el estado económico de las entidades prestadoras de salud, sin embargo no compromete directamente a los ecosistemas ambientales. Este proyecto cuenta con la intervención de diversos órganos interventores que garantizan la calidad de los desarrollos y productos como son comités de ética para desarrollos de medicina en pacientes, y también comités de ética para pruebas en animales, y con el INVIMA, y todos los permisos se diligencian en su debido momento, sin embargo no actúa directamente con entidades que garanticen la sostenibilidad del medio ambiente. Indirectamente el impacto sobre el ambiente es positivo ya que contribuirá con estrategias que permitan mejorar la calidad de vida de las personas y la población colombiana, con posibilidad de ser replicadas en otros contextos de la geografía nacional. Los hallazgos de este trabajo, además de ser respuesta a una preocupación creciente de la sociedad, generarán nuevos datos e ideas para la continuidad del programa estratégico de investigación en la medicina regenerativa y bajo el cual se ha logrado unir diversidad de instituciones del suroccidente colombiano.

## ***7. DECLARACIÓN DE PERTINENCIA SOCIAL***

Los resultados de este trabajo constituirán un aporte al desarrollo humano sostenible a través del mejoramiento de la salud pública y en la capacidad de desarrollo y apropiación tecnológica de recursos para aplicación y desarrollo de laboratorios y centros de investigación para así crecer la inversión en salud del suroccidente colombiano, contribuyendo al mejoramiento de la calidad de vida de las poblaciones afectadas en la región y que son objeto de estudio y aportando a la construcción de una conciencia y sensibilidad en torno a la salud pública y sus múltiples desarrollos. Por la metodología participativa, sobre la base del macroproyecto de medicina regenerativa, los resultados del proyecto no solo serán producto del diálogo de saberes de los diferentes actores sino que éstos tendrán una apropiación del conocimiento resultante que podrá ser usado en la situación específica del respectivo actor.

## 8. PRESUPUESTO

													
RESUMEN DEL PRESUPUESTO													
RUBROS	RESUMEN											TOTAL	
	CONTRAPARTIDA								CONTRAPARTIDA		SGR		
	UNIVALLE		ICESI		U.AUTONOMA		FUDACION VALLE DEL LILI		TOTAL DE CONTRAPARTIDA		Efectivo		
Espece	Efectivo	Espece	Efectivo	Espece	Efectivo	Espece	Efectivo	Espece	Efectivo	Espece	Efectivo		
01. Talento humano	\$ 590.376.960,00	\$ -	\$ 400.000.000,00	\$ -	\$ 400.000.000,00	\$ -	\$ 400.000.000,00	\$ -	\$ 400.000.000,00	\$ 1.790.376.960,00	\$ -	\$ 1.196.400.000,00	\$ 2.986.776.960,00
02. Equipos y software	\$ 7.554.416.007,00	\$ -	\$ 600.000.000,00	\$ -	\$ 600.000.000,00	\$ -	\$ 600.000.000,00	\$ -	\$ 600.000.000,00	\$ 9.354.416.007,00	\$ -	\$ 2.004.325.349,00	\$ 11.358.741.356,00
03. Capacitación y participación en eventos	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 0	\$ -	\$ 134.000.000,00	\$ 134.000.000,00
04. Servicios tecnológicos y pruebas	\$ 12.000.000,00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 12.000.000,00	\$ -	\$ 693.780.400,00	\$ 705.780.400,00
05. Materiales, insumos y documentación	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 0	\$ -	\$ 2.272.829.651,00	\$ 2.272.829.651,00
06. Protección de conocimiento y divulgación	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 0	\$ -	\$ 360.000.000,00	\$ 360.000.000,00
07. Gastos de viaje	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 0	\$ -	\$ 138.670.000,00	\$ 138.670.000,00
08. Infraestructura	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 0	\$ -	\$ -	\$ -
09. Administrativos	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 0	\$ -	\$ 800.000.000,00	\$ 800.000.000,00
10. Supervisión	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 0	\$ -	\$ 400.000.000,00	\$ 400.000.000,00
11. Otros	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ 0	\$ -	\$ -	\$ -
<b>TOTAL</b>	\$ 8.156.792.967,00	\$ -	\$ 1.000.000.000,00	\$ -	\$ 1.000.000.000,00	\$ -	\$ 1.000.000.000,00	\$ -	\$ 1.000.000.000,00	\$ 11.156.792.967,00	\$ -	\$ 8.000.005.400,00	\$ 19.156.798.367,00

CONVENCION	QUIMERIZACION	\$ 3.855.206.382,00
	NANOMATERIALES	\$ 761.168.269,00
	CARDIOMICITOS	\$ 703.300.000,00
	ANDAMIOS	\$ 985.950.349,00
	CEMENTOS OSEOS	494.380.400,00





