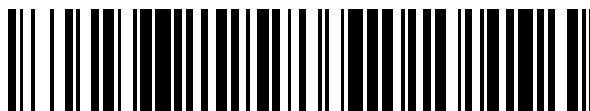


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 409**

51 Int. Cl.:

A61F 2/06 (2013.01)

A61M 29/02 (2006.01)

A61L 27/18 (2006.01)

A61F 2/82 (2013.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2011 PCT/US2011/028201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11113001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11754211 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2544624**

54 Título: **Sistema de andamiaje para reparar problemas cardiovasculares**

30 Prioridad:

11.03.2010 US 312847 P

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

16.10.2019

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**KAUFMANN, J. JORDAN MASSEY;
AGRAWAL, MAULI y
BAILEY, STEVEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 727 409 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema de andamiaje para reparar problemas cardiovasculares

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La invención generalmente se refiere a dispositivos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Más específicamente, la invención se refiere a la ingeniería tisular para el tratamiento de aneurismas u otros tejidos cardiovasculares dañados.

2. Descripción de la técnica relevante

10 Los aneurismas aórticos abdominales, comúnmente denominados como AAA, consisten en un aumento del 50 % de la aorta abdominal que se cree que es causado por la descomposición de la túnica media, una capa de la pared del vaso compuesta principalmente de células de músculo liso. Aunque la causa exacta del AAA no se entiende bien, se cree que es un proceso complejo que involucra fuerzas hemodinámicas, así como la remodelación de la matriz extracelular local, la infiltración de macrófagos y linfocitos y el aumento de las enzimas de la matriz metaloproteínasa, todas las cuales juegan un papel en la destrucción de las fibras de elastina y las células de músculo liso. Con el tiempo, una reducción gradual de las fibras de elastina medial, el adelgazamiento del colágeno dentro del medio y el engrosamiento de la íntima aumentan la tendencia aneurismal. La pérdida de elasticidad y fuerza de la túnica media junto con la producción de colágeno compensatorio conducen a la expansión arterial, formando un aneurisma. Histológicamente, se observa la fragmentación de la elastina en el aneurisma, la inflamación transmural crónica y la disminución de las células del músculo liso. La progresión del aneurisma se caracteriza por mediadores moleculares y proteinasas extracelulares que degradan la matriz, incluidas las metaloproteinasas de matriz 2 y 9. El volumen de colágeno incrementado se ha considerado como una causa potencial de crecimiento y ruptura del aneurisma.

15 Los estudios muestran que el 3 % de todos los individuos de 50 años o más, predominantemente hombres, tienen AAA. Además, el 2,1 % de los hombres mayores de 65 años de edad morirán de aneurismas aórticos rotos. La aorta media a nivel renal es de aproximadamente 2 cm de diámetro; por lo tanto, un aneurisma es técnicamente una dilatación de 3 cm. A la edad de 65 años, el 5 % de los hombres y el 1,7 % de las mujeres tienen un diámetro aórtico de al menos 3 cm. La prevalencia del AAA mayor o igual a 3 cm aumenta 6 % con cada década más allá de los 65 años de edad. Sin embargo, la mayoría de los aneurismas no se consideran clínicamente relevantes hasta que alcanzan los 4 cm y, por lo general, no se prescribe cirugía hasta que alcanzan aproximadamente los 5 cm. Se sabe que el riesgo de ruptura aumenta con el diámetro del aneurisma. Sólo el 25 % de los pacientes con aneurismas rotos llegan al hospital y sólo el 10 % llegan a la sala de operaciones. Debido a dichas altas tasas de mortalidad, es importante tratar el aneurisma antes de que se rompa.

25 El tratamiento actual del AAA incluye o bien cirugía abierta o bien la reparación endovascular del aneurisma, dependiendo de la fisiología y patología del paciente. El tratamiento quirúrgico abierto de los aneurismas fue realizado por primera vez por Dubost y sus colegas en 1951, pero fue reintroducido por Charles Rob en 1963 utilizando el actual enfoque retroperitoneal. Con el enfoque retroperitoneal, el acceso al aneurisma no es superior a la 11ª costilla cuando el paciente está boca abajo. Un método quirúrgico abierto alternativo es la técnica transperitoneal en la que se accede al aneurisma a través de una incisión a lo largo de la línea media. En 1991, Juan Parodi introdujo un enfoque alternativo al método quirúrgico abierto en el que se utilizó el acceso iliofemorales para insertar un injerto endovascular para cubrir el aneurisma: la reparación del aneurisma endovascular (EVAR).

35 La EVAR utiliza la tecnología de stent para colocar el injerto sobre el aneurisma y dentro de las arterias iliofemorales, dividiéndose en la bifurcación. El injerto sirve para bloquear el segmento aneurismal de la aorta sin causar gran daño a las arterias. Actualmente, los injertos-stent aprobados por la FDA contienen o bien un injerto de poliéster tejido (PET) o de ePTFE sobre un stent de acero inoxidable, de aleación de cobalto-cromo o de nitinol. Los injertos se fijan utilizando ya sea autoexpansión, stents, púas o una combinación de éstas. Sin embargo, debido a que el injerto tiene la intención de separar la parte no saludable del flujo sanguíneo, existen problemas inherentes en la implementación. La tortuosidad de la aorta y la bifurcación ilíaca, en particular una angulación de 90° o mayor, pueden conducir a una fuga interna después de la implantación en la que la sangre se filtra entre el injerto y el lumen de la aorta, alcanzando el aneurisma. La calcificación y los eventos trombóticos también juegan un papel en la limitación de la efectividad de la EVAR, particularmente cuando la calcificación es superior del 50 % o la trombosis es del 25 %-50 %. El éxito de un injerto EVAR se define generalmente por la ausencia de cualquiera de los cuatro tipos de fugas internas. La fuga interna tipo I ocurre cuando la sangre fluye entre el injerto y la pared del vaso tanto en los extremos proximal como distal del injerto. Cuando la sangre fluye dentro del saco del aneurisma desde los vasos ramificados, se considera una fuga interna de tipo II. Las fugas internas de tipo III son el resultado de anastomosis deficientes entre diferentes secciones del injerto. Si la fuga ocurre a través del material del injerto, se considera una fuga interna de tipo IV. Los Tipos II y IV generalmente se resuelven espontáneamente, mientras que los Tipos I y III representan un mayor peligro y se deben reparar durante un procedimiento posterior.

Las pruebas de injertos endovasculares para el tratamiento del AAA requieren primero una evaluación adecuada del cultivo celular *in vitro* y pruebas de las propiedades mecánicas estructurales, y luego un modelo animal del AAA apropiado para ser evaluado adecuadamente, particularmente en términos de coagulación y sistemas fibrinolíticos. Tanto los modelos caninos como los porcinos se consideran apropiados para ensayar los dispositivos EVAR actuales.

Una técnica popular utilizada para inducir un aneurisma en un animal es el modelo de parche que consiste en suturar un parche elíptico fabricado de materiales como yeyuno, vena ilíaca, fascia rectal o Dacron en una incisión longitudinal hecha en la aorta. Esta técnica permite un aumento gradual y una ruptura similar a la que se observa en humanos. El mayor inconveniente de esta técnica es su inconsistencia con la formación y anatomía fisiológica del aneurisma. Las técnicas más relevantes desde el punto de vista fisiológico incluyen el extirpado por arrancamiento mural, un modelo en el que se cortan la adventicia y el 60-70 % de la media, lo que permite la expansión de la pared del vaso, y el modelo de elastasa, que utiliza la exposición temporal a un agente elastolítico para romper las capas de la pared del vaso. Sin embargo, esta técnica es difícil de controlar.

El documento US 2009/088828 A1 se refiere a un dispositivo médico que comprende una estructura tubular adaptada para ser implantada en la vasculatura de un mamífero, estando formada la estructura tubular, al menos en parte, por fibras poliméricas no tejidas cargadas eléctricamente.

El documento US 2003/195611 A1 se refiere a un recubrimiento y un método que utilizan la electrodeposición de fibras muy pequeñas.

Resumen de la invención

Un dispositivo para tratar un problema cardiovascular incluye un andamiaje expandible compuesto de fibras electrohiladas compuestas de un compuesto biodegradable. El andamiaje es, en esencia, tubular y comprende una superficie cóncava y una superficie convexa, en donde la superficie cóncava tiene una concentración más alta de fibras que la superficie convexa, en donde la superficie cóncava incluye fibras con una apariencia más enlazada y la superficie convexa incluye fibras que son más lineales; en donde el andamiaje se coloca en la vasculatura de un mamífero para dirigir el desarrollo del tejido y controlar el flujo sanguíneo dentro del problema cardiovascular no deseado. La superficie cóncava del andamiaje puede impedir el flujo sanguíneo y las fuerzas mecánicas provocadas por el flujo sanguíneo a través del andamiaje y la vasculatura, reduciendo de este modo la ruptura de la vasculatura proporcionando al mismo tiempo una superficie adecuada para la adhesión de las células, mientras que la superficie convexa menos concentrada facilita la entrada y la organización de las células, y en donde el andamiaje es completamente degradable con el paso del tiempo, dejando el tejido nuevo en su lugar.

En una forma de realización, un dispositivo para tratar un problema cardiovascular incluye un andamiaje expandible soportado por tecnología de stent.

El problema vascular puede ser un aneurisma, un vacío o un espacio semivacío. Las fibras pueden comprender poli (α -hidroxi ésteres), o polímeros naturales, tales como Elastina, Colágeno, ADN, ARN, Glucosaminoglicanos o mezclas de los mismos.

El stent puede ser un stent expandible.

En la presente memoria se describe un método para tratar un problema vascular que consiste en insertar un dispositivo según se describió anteriormente en la vasculatura de un mamífero; y asegurar el dispositivo en la vasculatura.

Breve descripción de los dibujos

Las ventajas de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica con la ventaja de la siguiente descripción detallada de las formas de realización y en referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

La FIG. 1 representa un diagrama esquemático de un electrohilador;

Las FIG. 2A-2C muestran gráficos que comparan el efecto de la concentración de la solución, la velocidad de extrusión y el voltaje sobre la fuerza de tracción máxima de los andamiajes tubulares electrohilados;

Las FIG. 3A-3C muestran gráficos que comparan el efecto de la concentración de la solución, la velocidad de extrusión y el voltaje sobre la deformación en el momento del fallo de los andamiajes tubulares electrohilados;

La FIG. 4 representa un gráfico de la porosidad media de los andamiajes fabricados utilizando diversos parámetros;

La FIG. 5 representa imágenes SEM del contraste entre las superficies cóncava y convexa de un solo andamiaje tubular, que representa el gradiente de cambios morfológicos en todo el andamiaje;

Las FIG. 6A-6C representan gráficos de la degradación de los andamiajes tubulares electrohilados durante 90 días en PBS a 37 °C agitados a 50 RPM (n=6);

La FIG. 7 representa una imagen SEM de células endoteliales aórticas humanas esparcidas sobre un andamiaje tubular electrohilado;

La FIG. 8 representa la actividad metabólica de las células del músculo liso aórtico humano en cultivo estático durante 14 días en andamiajes tubulares PCL con electrohilados;

- 5 La FIG. 9 representa la actividad metabólica de las células del músculo liso aórtico humano en un biorreactor sobre andamiajes tubulares electrohilados;

La FIG. 10 representa un gráfico que compara las células del músculo liso aórtico humano utilizando diferentes técnicas de esterilización y siembra;

Las FIG. 11A-B representan imágenes SEM de andamiajes electrohilados A (nano) y B (micro) a 2000X;

- 10 Las FIG. 12A-B representan gráficas de cambio en la actividad metabólica de hAoEC y hAoSMC en respuesta a andamiajes de diferentes morfologías de fibras (normalizados a valores del día 0 para cada muestra);

Las FIG. 13A-B representan gráficos de la proliferación celular a lo largo del tiempo de hAoEC y hAoSMC en andamiajes compuestos ya sea de nanofibras (A), microfibras (B) o películas (C). Determinada utilizando Picogreen para medir el contenido de dsDNA, n=6;

- 15 Las FIG. 14A-D representan imágenes SEM de microfibras electrohiladas con células endoteliales aórticas humanas en los días 1, 3, 7 y 10;

Las FIG. 15A-D representan imágenes SEM de microfibras electrohiladas con células de músculo liso aórtico humano en los días 1, 3, 7 y 10; y

- 20 Las FIG. 16A-L representan imágenes de microfibras electrohiladas con células de músculo liso aórtico humano en los días 1, 3, 7 y 10.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

La EVAR utiliza la tecnología de stent para colocar un injerto sobre el aneurisma desde dentro del vaso sanguíneo, esencialmente bloqueando el saco aneurismal del flujo sanguíneo. Muchos de los riesgos asociados con la EVAR se deben a la introducción permanente de un material que no es bioactivo. Dichos riesgos se pueden eludir utilizando un enfoque de ingeniería tisular para tratar el AAA. La ingeniería tisular es un medio para reconstruir un tejido mediante la introducción de un andamiaje biodegradable que se siembra con células en un área defectuosa. El andamiaje proporciona una estructura tridimensional en la que las células pueden proliferar y organizarse en un nuevo tejido. Cambiar las propiedades del andamiaje altera la forma en que las células crecen y se organizan. La adopción de un enfoque de ingeniería tisular para tratar los aneurismas aórticos abdominales permitiría que las células nativas se infiltrasen en el andamiaje y se remodelasen en una pared aórtica de diámetro adecuado.

- 30 Aplicando conceptos de ingeniería tisular, nuestro sistema utiliza un andamiaje tubular altamente poroso colocado sobre el aneurisma endovascularmente y sembrado naturalmente mediante células infiltradas. Esto permite que el aneurisma sea "repavimentado" a medida que las células secretan componentes de la matriz extracelular y se organizan en respuesta a la morfología del andamiaje. Las células infiltradas provendrán tanto de la sangre que fluye a través del andamiaje como del tejido circundante. Inicialmente, las células actúan de acuerdo con la respuesta de cicatrización de la herida. Luego, las células inicialmente adheridas señalan a otras células más apropiadas para que se adhieran y migren a través del andamiaje.

- 40 A medida que las diferentes células se adhieren, migran y proliferan, tiene lugar un proceso de remodelación en el que los componentes de la matriz extracelular y las fibras del andamiaje se descomponen en algunas áreas y se refuerzan en otras. Por lo tanto, a medida que pasa el tiempo, el andamiaje es reemplazado lentamente por tejido funcional organizado en respuesta a las condiciones fisiológicas. Eventualmente el andamiaje se degradará por completo dejando el tejido en su lugar con la forma correcta y conteniendo componentes vitales tales como colágeno, elastina y vasa vasorum. En este punto, el aneurisma se minimizará o dejará de existir.

- 45 Al colocar el andamiaje endovascularmente, es capaz de reducir el efecto de los estímulos mecánicos al mismo tiempo que proporciona una estructura con alta porosidad sobre la cual las células apropiadas se pueden adherir, migrar, proliferar y organizar en una nueva pared vascular. Además, la infiltración de células aumenta la resistencia del andamiaje, la conformidad y la integración en el tejido existente. Esto reduce las posibilidades de fugas internas presentes en los actuales injertos de stent EVAR. A medida que la pared del vaso se remodela, el andamiaje se degrada permitiendo que el nuevo tejido adquiera tanto forma como función.

- 50 A diferencia de los actuales tratamientos EVAR, que tratan de presentar una barrera impermeable, el andamiaje descrito en la presente memoria será inicialmente permeable para permitir la infiltración celular. Una vez que las células apropiadas se adhieren, dejan los componentes de la matriz extracelular y proliferan, el andamiaje se vuelve, en esencia, impermeable. Además, el andamiaje es biodegradable, de modo que a medida que se forma nuevo tejido, nuestro andamiaje se descompondrá lentamente por vías metabólicas naturales.

A diferencia de los actuales vasos sanguíneos de ingeniería tisular, el dispositivo descrito se puede colocar dentro del tejido cardiovascular dañado con una escisión o daño mínimo al tejido circundante.

En una forma de realización, los andamiajes destinados a ser utilizados en un vaso sanguíneo obtenidos por ingeniería tienen: una porosidad y un área superficial conducente a la migración, proliferación y diferenciación celular; rigidez y resistencia mecánica congruentes con los vasos nativos; y una tasa de biodegradación que coincide con la formación de tejido. En una forma de realización, un andamiaje está destinado a la aorta y se configura para ser implantado endovascularmente. Se inserta un stent para el despliegue en una aorta utilizando un catéter en la arteria femoral y se expande hasta el tamaño nominal de la aorta en el sitio del aneurisma. En una forma de realización, el andamiaje incluye un material que puede soportar la expansión de 5-6 veces del stent en la aorta que es necesaria para un procedimiento EVAR. Además, el andamiaje incluye un material que se degrada y pierde propiedades mecánicas a medida que el tejido se desarrolla, lo que permite que las tensiones mecánicas se transfieran gradualmente al nuevo tejido.

El andamiaje incluye un material biodegradable. En una forma de realización, el andamiaje consiste en fibras no tejidas de policaprolactona (PCL). La PCL es un material biodegradable que se utiliza comúnmente en aplicaciones clínicas aprobadas por la FDA en base a su resistencia, propiedades elásticas y tiempo de degradación prolongado. Otros polímeros que se pueden utilizar como andamiaje incluyen, pero no se limitan a, poli (α -hidroxi ésteres) tales como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el poli (D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA). Estos polímeros se degradan a través de la hidrólisis de su enlace éster en monómeros ácidos que se pueden eliminar del cuerpo a través de las vías metabólicas normales, haciéndolos por lo tanto adecuados para aplicaciones de biodegradación. La naturaleza sintética de la PCL la hace más fácil de adaptar para una aplicación particular debido a su consistencia. También se pueden utilizar polímeros naturales tales como colágeno, elastina o ADN para esta aplicación.

Además de elegir un material factible, el proceso de fabricación del andamiaje debe ser apropiado para la aplicación dada. El electrohilado es un proceso de fabricación de fibras que utiliza fuerzas electrostáticas para formar fibras no tejidas. Se aplica un voltaje alto de una polaridad a una solución o fundido polimérico, lo que causa repulsión coulombica ya que la concentración de iones positivos excede la de iones negativos. A medida que la solución o el fundido se expulsa y se aplica el voltaje, las cargas similares dentro de la gota expulsada se repelen entre sí. La combinación de la repulsión dentro de la gota expulsada y la atracción hacia el colector permite que las moléculas dentro de la gota superen la tensión superficial que mantiene la forma de la gota. Un chorro de solución acelera entonces hacia el colector, permitiendo que el solvente volátil se evapore en la distancia entre la punta de la hilera y la placa colectora. Cuando un líquido se expulsa a una velocidad suficiente y se aplica un potencial mayor que el umbral, el chorro es continuo y forma fibras continuas no tejidas que van desde unos pocos nanómetros hasta unos pocos micrómetros en la unidad de recolección. La policaprolactona electrohilada produce un tejido no tejido conforme muy adecuado para utilizar en andamiajes de aorta debido a la posibilidad de alta porosidad y tamaños de fibra comparables a las de los componentes de la matriz extracelular, así como a su degradación y propiedades mecánicas. Al cambiar los parámetros de procesamiento o la unidad de recolección, se pueden formar infinidad de andamiajes diferentes.

Los parámetros del proceso de electrohilado tienen un efecto significativo en el diámetro y consistencia de la fibra resultante. Para preparar un andamiaje para su utilización en la reparación de aneurismas, es deseable entender cómo estos parámetros afectan a las propiedades de los andamiajes resultantes que desempeñarán un papel en la proliferación celular y en el éxito del andamiaje en general. El electrohilado se basa en combinaciones apropiadas de una serie de parámetros que incluyen la concentración de la solución, la velocidad de extrusión, el voltaje aplicado, la distancia entre la punta y el colector, la temperatura, la humedad, la volatilidad del solvente y las características del polímero. Se estudiaron los efectos de estos parámetros sobre las propiedades de la policaprolactona electrohilada. Para limitar el número de variables que afectan simultáneamente al resultado, la distancia de la punta al colector del dispositivo de electrohilado se mantuvo en 10 cm, y la rotación del mandril se fijó en 587,5 RPM en base a estudios preliminares. Además, se utilizó policaprolactona disuelta en cloroformo como polímero y las condiciones ambientales dentro del equipo de electrohilado se mantuvieron en el rango: 23-24 °C de temperatura y 45-55 % de humedad.

En una forma de realización, una vez que se produce el andamiaje, se trata con plasma gaseoso para introducir en la superficie fracciones que conducen a la infiltración y proliferación celular. El tratamiento con plasma gaseoso de un andamiaje puede incluir el sometimiento del andamiaje a un plasma formado por un gas reactivo. Un gas reactivo puede incluir oxígeno, nitrógeno, argón, amoníaco o combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, el andamiaje se trata con estímulos químicos que incluyen, pero no se limitan al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiotensina II (Ang II), colágeno VIII, colágeno I o colágeno V.

Se utiliza entonces un sistema de stent para desplegar el andamiaje. El andamiaje se puede unir a un stent de acero inoxidable, aleación de cromo-cobalto, nitinol o polimérica. El sistema de andamiaje del stent se implanta utilizando procedimientos EVAR normales en los que se accede a una arteria femoral para introducir el sistema endovascular y luego se despliega utilizando un catéter de balón. Las configuraciones alternativas pueden incluir hacer girar las fibras directamente sobre el stent; alterar el polímero utilizado; utilizar un solvente diferente; o utilizar púas en lugar

de un stent. Cada una de estas configuraciones se diseñaría esencialmente utilizando la misma forma de realización que la original, pero implicaría cambios menores en las características del despliegue o la degradación del sistema de andamiaje.

Después de que el sistema de andamiaje se expanda en la aorta aneurismal, las células de la sangre, así como del vaso nativo se infiltrarán en el andamiaje como resultado de la respuesta de cicatrización normal de la herida. Debido a que el tubo está en una forma expandida, las fibras se alinearán de alguna manera concéntrica permitiendo que las células del músculo liso se orienten a lo largo de la misma dirección, similar a la túnica media nativa, mientras que el flujo sanguíneo instigará la endotelialización con células orientadas en la dirección del flujo. Con el tiempo, el andamiaje del biomaterial se degrada hidrolíticamente y se elimina a través de vías metabólicas naturales, dejando nuevo tejido en su lugar. Debido a que las células se infiltrarán en el andamiaje, el injerto resultante se conectará directamente al tejido nativo, lo que reducirá o eliminará por lo tanto la aparición de fugas internas, a diferencia de los actuales sistemas de injerto con stent. Además, el refuerzo proporcionado por el colágeno y otros componentes de la matriz extracelular puede contribuir a aumentar la rigidez y la resistencia de los andamiajes electrohilados observadas cuando las células están presentes. Como ventaja adicional, la remodelación del tejido puede permitir que la vasculatura colateral se adhiera a la nueva pared del vaso, a diferencia de los injertos con stent utilizados actualmente.

Investigando la interacción de diversas células en las fibras electrohiladas, se ha observado que los andamiajes fabricados de polímeros más resistentes a la degradación y que contienen suficiente porosidad promueven la integración y proliferación celular supuestamente debido a la estructura tridimensional. Esto apoya la suposición ampliamente sostenida de que las células prefieren las superficies tridimensionales en lugar de las bidimensionales durante un período de tiempo.

En una forma de realización, las fibras dentro del andamiaje pueden variar de diámetro (<200nm a >10µm) y se pueden disponer para mostrar diferentes porosidades (70-85 % porosas) para adaptar diferentes tipos de células y tendencias de adhesión. Además, se ha observado que la orientación de la fibra desempeña un papel en la adhesión, la migración y la proliferación celular. Las células ubicadas dentro de las fibras dispuestas frecuentemente muestran una orientación similar - una característica que se puede utilizar para el crecimiento de los tejidos alineados. La investigación de la respuesta celular a los andamiajes fibrosos no alineados frente a los alineados muestra que cuando los fibroblastos se cultivaban en las fibras de poliuretano (PU) alineadas en lugar de las no alineadas, había una mayor cantidad de colágeno producido en los andamiajes alineados, aunque no se detectó un aumento en el número de células. La concentración de fibra por área y la curvatura de la fibra pueden alterar la adhesión, la proliferación y la remodelación celular. Por lo tanto, los andamiajes se diseñan para incluir un gradiente morfológico desde el lado cóncavo hasta el convexo. El lado cóncavo, incluye las fibras con una apariencia más enlazada, mientras que el lado convexo incluye las fibras que son más lineales. Esta diferencia morfológica puede ayudar en la organización de los diferentes tipos de células a través del andamiaje sin la necesidad de una estructura adicional. Además, el cambio puede ayudar a reducir el flujo sanguíneo a través del andamiaje, reduciendo de este modo la fuerza mecánica sobre el aneurisma y reduciendo la posibilidad de ruptura.

La tecnología actual utiliza más materiales bioinertes que pueden dar lugar a una cápsula fibrosa como resultado de la respuesta inmune. Las formas de realización descritas animan al injerto a endotelizar de modo que no sea rechazado (encapsulado). En una forma de realización, un injerto de andamiaje, formado según se describe en la presente memoria, puede utilizar la respuesta inmune proporcionando un medio para que las células se adhieran, migren y proliferen de manera organizada. El gradiente entra en juego con las células cuando las células endoteliales se adhieren a la superficie cóncava enlazada - tienen más puntos potenciales de contacto sin comprometer la porosidad. Las células endoteliales prefieren crecer en una sola capa, por lo que la concentración de fibras puede ayudar en su adhesión y comunicación. Mientras tanto, el lado convexo, más lineal y menos concentrado se diseña para las células del músculo liso que prefieren organizarse en estrías y seguir la longitud de la fibra. La linealidad de las fibras puede ayudar en su organización en estrías circunferenciales. Al proporcionar un andamiaje diseñado para las células en lugar de una superficie inerte, las complicaciones pueden disminuir. Los injertos de andamiaje descritos en la presente memoria pueden permitir que los vasos sanguíneos, que suministran sangre a la aorta, se desarrollen por necesidad. Esto no es posible, en general, con la tecnología actual que simplemente bloquea estos vasos y probablemente conduzca a la ruptura de los sacos si uno de estos está suministrando sangre al saco.

Para adaptar los andamiajes a una aplicación particular, se examinaron los efectos de la concentración de la solución, el voltaje aplicado y la velocidad de extrusión sobre la fuerza de tracción y la deformación, la porosidad y la morfología de las fibras, cambiando uno por uno estos parámetros. Después de que estos resultados fueron compilados, se eliminaron los parámetros que producían andamiajes con esfuerzos o deformaciones inaceptables y tres conjuntos de parámetros que producían un andamiaje de alta, media y baja porosidad continuaron en un estudio de degradación durante un período de 90 días.

En todo nuestro trabajo, el electrohilador utilizado era un modelo fabricado a medida que constaba de una fuente de voltaje de 0-30 kV (Information Unlimited) conectada a una aguja roma de 22Gs, 2" (Hamilton) en una jeringa hermética a gas de 2,5 ml (Hamilton). En la FIG. 1 se muestran una imagen y un esquema del electrohilador. La jeringa fue presionada con un actuador lineal bipolar no cautivo (Haydon Switch and Instruments) controlado con un controlador biotapa (Peter Norberg Consulting, Inc.) utilizando comandos en serie introducidos a través de la función

de terminal Hyperlink del PC. En el trabajo preliminar, se utilizaron comandos en serie de 50r, 125r y 200r para definir la velocidad de marcha en microetapas/s/s para girar el motor a velocidades de 16,575 mm/h, 42,188 mm/h y 67,5 mm/h respectivamente. Esto produjo flujos de solución de polímero de 0,012 ml/min, 0,029 ml/min y 0,047 ml/min que son comparables a los parámetros encontrados en otros estudios. El terminal positivo de la fuente de alto voltaje se conectó a través de una pequeña pinza de cocodrilo a aproximadamente 3 mm de la punta de la aguja. Para andamiajes planos, se conectó una placa colectoras compuesta de lámina de aluminio reemplazable sobre una pantalla de aluminio al terminal negativo de la fuente de voltaje y se colocó a menos de 1 mm de la punta de la aguja mediante un tornillo sensible. Cuando se fabricaron los andamiajes tubulares, la lámina de aluminio y la pantalla fueron reemplazadas por un sistema de mandril de aluminio. El mandril estaba compuesto por una barra de aluminio de 0,5 de diámetro unida al terminal negativo a través de un casquillo. Se hizo girar utilizando un motor de 12 VCC de imanes permanentes (Grainger) que se hizo funcionar utilizando solamente 3 VCC para dar 587,5 RPM. El área de hilado estaba rodeada por una caja de acrílico para reducir las interferencias externas. Los andamiajes se almacenaron en frascos individuales a temperatura ambiente bajo vacío a 634,92 mmHg (25 inHg). Tanto los andamiajes planos como los tubulares se clasificaron según sus parámetros de fabricación para determinar cómo estos parámetros afectan a las propiedades mecánicas. Además, se exploró el efecto de los parámetros de fabricación sobre la porosidad y la degradación de los andamiajes tubulares.

Los parámetros del electrohilado se optimizaron para determinar qué configuración proporciona la mejor resistencia a la tracción y las mejores características de expansión. Después de la prueba inicial de un rango más amplio de distancias entre la punta y la placa colectoras, concentraciones de solución y voltajes aplicados, se realizó un experimento para examinar los parámetros con mayor posibilidad. Las muestras se tomaron utilizando policaprolactona (Mn 80000 kDa, Aldrich) disuelta en cloroformo ($\geq 99,8$ % grado HPLC; Sigma-Aldrich). Para los andamiajes planos se utilizaron concentraciones del 8 %, 10 % y 12 % en peso, mientras que para los andamiajes tubulares se utilizaron soluciones del 10 %, 12 % y 14 % en peso. Cada solución se utilizó en un plazo de 24 horas y se almacenó en botellas de ámbar selladas entre cada uso. En las primeras pruebas se examinó la PCL en DCM con resultados deficientes y, por lo tanto, se eliminó de los estudios adicionales.

Para los andamiajes planos, se aplicaron voltajes de 8kV, 11kV, 14kV y 17kV a cada concentración y se presionó la jeringa con el comando serial 50r correspondiente a un caudal de 0,012 ml/min. Además de una entrada de 50r, la solución al 12 % en peso también se hiló utilizando comandos de 125r y 200r para los mismos voltajes. Esto permitió analizar el efecto de la concentración en los andamiajes resultantes, así como los efectos del voltaje y el caudal.

Cada muestra plana tenía un espesor aproximado de 0,3 mm y se cortó para realizar pruebas mecánicas utilizando una cuchilla de afeitar recta. El espesor exacto y el ancho de cada muestra se midió colocando las muestras entre dos portaobjetos de vidrio y utilizando calibradores para determinar el espesor y luego restando el espesor de los portaobjetos. Esta información se utilizó para determinar los valores de tensión durante la prueba mecánica. El diámetro promedio de las fibras, la distribución de los tamaños de las fibras y la morfología de la muestra se analizaron utilizando SEM. Para los andamiajes tubulares, las tiras transversales se cortaron de modo que el eje de extensión al ser probados correspondiera con la tensión circunferencial asociada con la expansión uniforme de los andamiajes tubulares. Se colocaron dos hojas de afeitar rectas paralelas, con una separación de 0,5 cm, lo que permitió cortar tiras constantes sin arrastrar la hoja a través de las muestras. Antes de la prueba, el ancho y el espesor de cada tira se midieron utilizando un microscopio invertido con un aumento de 40x con el software Bioquant®. Se tomaron diez mediciones de cada dimensión y se utilizó el promedio para determinar un área transversal promedio de cada muestra. La tira media total midió 1,1 cm x 0,538 cm x 0,080 cm.

Para los ensayos de tracción y alargamiento, se siguió la norma ASTM D 5035, método de ensayo estándar para la fuerza de rotura y alargamiento de tejidos textiles (Strip Method), con algunas modificaciones debido a las limitaciones del tamaño del andamiaje. Los andamiajes electrohilados fueron cortados en tiras de 20 mm x 10 mm y colocados en abrazaderas separadas 10 mm para una tasa constante de prueba de extensión (CRE) utilizando un sistema Insight 5 (MTS) con una célula de carga de 889,64N (200 lbf). Para cada tira se registraron tensiones, deformaciones, fuerzas, desplazamientos y tiempos, pero en el análisis sólo se utilizaron las tensiones y deformaciones debidas a la variación del espesor de la muestra. El método de ensayo se configuró para aplicar una precarga de 0,5 N para ajustar la holgura en las muestras y luego se movió el actuador en 1.000 mm/s hasta 150 mm. La longitud de la extensión se estableció para que excediera el cambio de circunferencia que ocurriría cuando se insertase un injerto utilizando un catéter 22F y luego se expandiese a 40 mm de diámetro.

Los datos recogidos de la prueba de tracción de los andamiajes planos mostraron una clara distinción entre las concentraciones más bajas y más altas en términos de deformación. Con soluciones tanto del 8 % como del 10 % en peso, los andamiajes fallaron a una deformación relativamente baja. Sin embargo, todas las soluciones del 12 % en peso excedieron las propiedades de fuerza de tracción y deformación de sus contrapartes de menor concentración. Dentro del grupo del 12 % en peso, hubo menos distinción cuando se compararon las tasas de expulsión y los voltajes, pero el rango medio en ambos pareció más favorable.

Se cortaron seis andamiajes planos de cada parámetro en octógonos de 1,5 cm de diámetro y tres de cada uno fueron esterilizados con gas plasma oxígeno, mientras que los otros tres fueron esterilizados con gas EtO. El tratamiento tuvo lugar justo antes de la siembra y las muestras se humedecieron con un medio celular suplementado de crecimiento del músculo liso (Medium 231 + SMGS, Cascade Biologics) y luego se incubaron durante 30 minutos. Los andamiajes fueron sembrados con células de músculo liso aórtico humano (Cascade Biologics, P4) a una

densidad de 2×10^4 células/cm² utilizando una técnica de siembra por goteo. Los andamiajes sembrados se colocaron en una incubadora y los medios se cambiaron cada dos días durante 7 días. En el día 7, los andamiajes se fijaron con 4 % de Formalina y luego se tiñeron con FITC y DAPI. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio confocal de fluorescencia Leica.

5 Sobre la base de una evaluación cualitativa del número de células por andamiaje, las muestras tratadas con plasma gaseoso y fabricadas con la PCL disuelta en cloroformo mostraron los resultados más prometedores. Aunque el tamaño de la muestra no era lo suficientemente grande como para ser estadísticamente significativo, el patrón dominante de propagación y proliferación celular en andamiajes tratados con plasma gaseoso, a diferencia de los andamiajes con EtO, así como en andamiajes con fibras más bien más grandes que más pequeñas, da alguna orientación para estudios futuros.

10 Al ajustar los parámetros de electrohilado para andamiajes planos observamos que, aunque cada parámetro tiene un efecto en las fibras resultantes, la concentración de una solución tiene un mayor impacto en la morfología de las fibras que la tasa de expulsión o el voltaje. A medida que aumentaba la concentración de una solución, también aumentaba el diámetro de la fibra. Sin embargo, concentraciones superiores al 12 % en peso mostraron dos tamaños de fibra distintos, presumiblemente donde una fibra más pequeña se hiló separada de otra más grande debido a la repulsión de la carga dentro del chorro a medida que se producía el hilado. Tal vez el efecto más distintivo de la dependencia de la concentración se puede observar con el pequeño cambio en la concentración que ocurrió cuando el solvente se evaporó mientras la solución estaba en la jeringa, esperando a ser utilizada, lo que creó fibras consistentes con concentraciones más altas.

15 En base a los resultados de estos estudios preliminares sobre andamiajes planos, se postuló que los andamiajes fabricados con una concentración del 12 % en peso extruidos a 0,012 ml/min con 14 kV, así como los andamiajes fabricados con una concentración del 14 % en peso extruidos a 0,029 ml/min con 12 kV, a una distancia de 10 cm, proporcionarán suficiente expansión y porosidad en la máxima resistencia a la tracción. Además, nuestros estudios utilizando hASMC respaldan la viabilidad de que las células prosperen en andamiajes fabricados utilizando estas condiciones. A partir de estos datos, se diseñó e implementó un estudio más robusto que caracteriza los andamiajes tubulares.

20 Según se describió anteriormente, los andamiajes tubulares fueron electrohilados a partir de la PCL y probados mecánicamente utilizando una prueba de tasa constante de extensión (CRE) siguiendo la norma ASTM D-5035 "Método de prueba estándar para la fuerza de rotura y el alargamiento de tejidos textiles" como guía, aunque algunas desviaciones del método fueron necesarias debido a las limitaciones inherentes de los andamiajes. El método de la tira se utilizó porque está prescrito para los textiles no tejidos bajo la norma, aunque difiere de algunos métodos actualmente citados que utilizan la forma de un hueso de perro. El fallo se definió como el punto en el que la resistencia a la tracción llegó a ser menor o igual al 50 % de la resistencia a la tracción final. Para calcular la tensión se utilizó una célula de carga de 889,64N (200 lbf) que enviaba datos a Test Works 4 (Sistemas MTS). Tanto la tensión como la deformación se registraron y trazaron a partir de los datos en bruto registrados por Test Works 4. Se ensayaron nueve muestras de cada combinación de parámetros de electrohilado (n=9). Sin embargo, en algunos casos hubo deslizamiento entre las muestras y las abrazaderas durante la prueba y éstas no se incluyeron en el análisis.

30 Se utilizó un picnómetro con una cámara de 1,0 cm³ y gas helio (AccuPyc 1340, Micromeritics) para determinar el volumen real de cada andamiaje tubular, tomando 10 mediciones por muestra. Se utilizó el software Bioquant® para medir el volumen nominal a 40 aumentos en un microscopio invertido. Para la medición nominal, las muestras se intercalaron entre dos portaobjetos de vidrio y se tomó una medición del área. A continuación, las muestras se colocaron de punta y se tomaron diez mediciones de espesor y se promediaron. El área se multiplicó por el espesor promedio para determinar un volumen nominal promedio. El volumen nominal y el volumen real se utilizaron para determinar la porosidad de las muestras. Se midieron seis muestras de cada conjunto de parámetros (n=6) y luego se promediaron para determinar la porosidad promedio para cada conjunto de parámetros. Utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM), se obtuvieron imágenes de los diversos parámetros y se evaluaron para la morfología general tanto del interior como del exterior de cada muestra.

35 Para el estudio de degradación, se eligió un andamiaje de porosidad alta, media y baja para el análisis de andamiajes considerados factibles para aplicaciones de aneurismas aórticos. Los andamiajes de aorta utilizados con la técnica EVAR se introducen en la arteria femoral mediante un catéter. En general, se prefieren tamaños de catéter más pequeños para reducir el daño a las arterias. Si se utiliza un catéter 22F, la circunferencia del andamiaje tendrá que expandirse 5-6 veces cuando se despliegue en la aorta. Debido a esta exigente alta capacidad de deformación durante el despliegue, los andamiajes con valores medios de deformación inferiores al 550 % se consideraron irrelevantes para el estudio de degradación. El andamiaje considerado altamente poroso tiene una porosidad del $85,4 \pm 1,8$ % (solución al 12 % en peso, 0,012 ml/min, 10 kV); el andamiaje de porosidad media tiene una porosidad del $80,9 \pm 1,5$ % (solución al 14% en peso, 0,029 ml/min, 10 kV); y el andamiaje de baja porosidad tiene una porosidad del $76,8 \pm 5,6$ % (solución al 12 % en peso, 0,029 ml/min, 10 kV aplicados).

40 Se fabricaron un total de 72 andamiajes a partir de estos tres conjuntos de parámetros (24 andamiajes por conjunto) y se pesaron en una microbalanza y luego se sumergieron en 2,0 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS) en un baño de agua a una temperatura de 37 °C agitando a 50 RPM. Después de períodos de 1 hora, 30, 60 y 90

días, se retiraron los andamiajes (n=6) correspondientes a cada conjunto de parámetros y se enjuagaron tres veces en agua desionizada. Entonces, los andamiajes se dejaron secar al vacío durante 48 horas a temperatura ambiente antes de ser pesados por segunda vez y sometidos a continuación a pruebas mecánicas según se describió anteriormente. Los resultados se compararon con aquellos del punto de tiempo de 1 hora que sirvieron como muestras de control para determinar las tendencias en los datos mecánicos y los cambios en la pérdida de peso. Se tuvo cuidado de asegurar que las muestras de cada punto de tiempo fueran ensayadas lo más rápidamente posible y almacenadas al vacío con desecante y protegidas de la luz entre pruebas.

Los conjuntos de parámetros se compararon utilizando ANOVA unidireccional ($\alpha=0,05$) para determinar los efectos significativos de los parámetros sobre la tensión, la deformación y la porosidad, así como la degradación. Para determinar los valores atípicos dentro de una población de datos de muestra se utilizó la prueba Z ($\alpha=0,05$) y los diagramas de caja.

En la Figura 2A-2C se presentan los resultados de la resistencia a la tracción máxima de la prueba de velocidad constante de extensión. Aunque el diseño experimental requirió la utilización de tres velocidades de extrusión distintas, todas las de las muestras producidas a una velocidad de 0,047ml/min se mojaron al llegar al mandril. Esto impidió la formación de fibras y dio como resultado una muestra dura, retorcida, incapaz de ser probada mecánicamente e inapropiada para su utilización como andamiaje tisular. Por lo tanto, las muestras hiladas a una velocidad de 0,047ml/min fueron eliminadas del estudio. Algunas muestras hiladas a 0,029 ml/min exhibieron una colección no uniforme, ocasionalmente hasta el extremo de formar un solo disco en el mandril. Aunque no son uniformes, estos andamiajes contenían fibras bien formadas y se podían ensayar. Debido a que esta era una tendencia recurrente que parece inherente al conjunto de parámetros de fabricación, estas muestras permanecieron en el estudio. La velocidad de 0,012 ml/min no pareció presentar problemas de uniformidad en una escala macroscópica. La mayor resistencia a la tracción máxima (UTS) fue de $1,893 \pm 0,458$ MPa, que se asoció con la solución al 14 % en peso hilada a 0,029 ml/min con 12 kV aplicados. De las nueve muestras de esta configuración probadas, 5 se deslizaron fuera de las abrazaderas y, por lo tanto, no se pudieron medir. Comparando las UTS basadas en las velocidades de extrusión, todas las muestras mostraron una diferencia significativa entre la velocidad más lenta y la más rápida, independientemente de la concentración de la solución o del voltaje aplicado. Cuando se comparó la UTS basada en concentraciones, la única diferencia significativa ocurrió entre concentraciones del 12% en peso y el 14% en peso a 0,029 ml/min cuando se aplicó 12kV. De manera similar, cuando se comparan las UTS basadas en voltaje aplicado, la única diferencia significativa ocurrió al aplicar ya sea 10 kV o 12 kV mientras se utilizaba la concentración del 10% en peso a 0,012 ml/min.

Los requisitos prácticos para un dispositivo que se inserta en un vaso pequeño y luego se expande a un vaso grande incluyen la tensión que se puede lograr antes de fallar. Las figuras 3A-3C muestran los valores medios registrados para la deformación en el momento del fallo a partir de la velocidad constante de la prueba de extensión. La mayor deformación media en el momento del fallo se registró al $951,87 \pm 272,90$ % para la muestra fabricada utilizando la solución al 12 % en peso extruida a 0,029 ml/min con 10 kV aplicados. Al comparar el efecto del voltaje aplicado sobre la deformación, la deformación con 14 kV es significativamente menor que la deformación con ya sea 10 kV o 12 kV aplicados para soluciones tanto al 10 % como al 12 % en peso extruidas a 0,029 ml/min. Sin embargo, cuando la velocidad de extrusión es de 0,012 ml/min, la única diferencia significativa se produce con la solución al 10 % en peso, en la que las muestras con 12 kV aplicados muestran una mayor deformación en el momento del fallo que aquellas con 10 kV aplicados. Examinando el efecto de la concentración sobre la deformación en el momento del fallo, las únicas diferencias significativas se producen entre el 10 % y el 14 % en peso, así como entre el 12 % y el 14 % en peso cuando la solución se extruye a 0,029 ml/min con 14 kV aplicados. Curiosamente, a diferencia del efecto que la velocidad de extrusión tiene sobre la tensión, su efecto sobre la deformación es mínimo. La única diferencia significativa ocurre entre los 0,012 ml/min y los 0,029 ml/min cuando la solución al 10 % en peso tiene 10 kV o 12 kV aplicados.

Además de los requisitos mecánicos, los andamiajes se diseñan para ser favorables para las células. Esto incluye suficiente porosidad para la adhesión, la migración y la proliferación celular. Una de las propiedades ofrecidas de los andamiajes electrohilados es que sus fibras se asemejan a la matriz extracelular y a su naturaleza porosa. La porosidad media dentro de cada grupo de muestras permaneció, en su mayor parte, muy similar y con pequeñas desviaciones estándar según se muestra en la FIG. 4. La velocidad de extrusión tuvo el mayor efecto sobre la porosidad ya que las muestras fabricadas con el 10% en peso con todos los voltajes aplicados; con el 12% en peso con 10 kV aplicados; y con el 14% en peso con 10 kV o 12 kV aplicados mostraron una disminución significativa de la porosidad cuando la velocidad se incrementó de 0,012 ml/min a 0,029 ml/min. Al comparar el efecto de la concentración de la solución sobre la porosidad, la solución al 10 % en peso hilada a 0,012 ml/min con 12 kV aplicados fue significativamente mayor que las soluciones al 12 % en peso y al 14 % en peso hiladas con la misma configuración. Cuando la velocidad de extrusión era de 0,029 ml/min y se aplicó 14 kV, los andamiajes fabricados con una solución al 12% en peso tenían una porosidad significativamente mayor que aquellos fabricados con una solución al 14% en peso que eran significativamente más porosos que los andamiajes con una solución al 10% en peso. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la porosidad del andamiaje cuando se comparó el voltaje aplicado.

Las imágenes SEM revelaron leves cambios en la morfología desde el interior de la muestra hacia el exterior según se muestra en la FIG. 5. Las fibras del lado cóncavo presentaban ocasionalmente una alineación más curva,

mientras que las fibras del lado convexo parecían más lineales. Aunque este no fue el caso para todas las muestras, la concentración al 12 % en peso pareció presentar consistentemente un mayor contraste en la linealidad entre las caras cóncava y convexa, mientras que la concentración al 10 % en peso mostró el menor contraste.

5 Como un polímero biorreabsorbible, se espera que la PCL sufrirá degradación. Sin embargo, es importante que los andamiajes mantengan su integridad hasta que se forme tejido viable. Se puede esperar que los andamiajes de mayor porosidad pueden perder la integridad antes que los andamiajes de menor porosidad debido al área superficial aumentada.

10 Al comparar andamiajes con diferentes porosidades durante un período de tiempo de 90 días, no hubo una diferencia significativa entre la fuerza de tracción máxima desde un punto de tiempo hasta la resistencia inicial para cualquiera de los andamiajes. Los resultados de la fuerza de tracción a lo largo del tiempo se muestran en la FIG. 6A y son comparables con los valores obtenidos en otras áreas de este estudio.

De manera similar a los resultados para UTS, no hubo diferencias significativas en la deformación en el fallo durante el período de 90 días para ninguno de los andamiajes. La FIG. 6B muestra un gráfico de estos resultados.

15 Aunque la pérdida de peso durante el período de tiempo de 90 días fue observada para todas las muestras según se muestra en la FIG. 6C, parece que se estabiliza después de la pérdida inicial y es diminuta.

20 El efecto más definitivo en este estudio fue la relación entre la velocidad de extrusión y la resistencia a la tensión máxima. La velocidad de extrusión puede tener una mayor influencia en la resistencia a la tensión máxima porque, al igual que el proceso de estirado convencional, a medida que el polímero se extruye, es extraído y las unidades individuales del polímero se alinean para proporcionar una mayor resistencia. Sin embargo, debido a que el componente de voltaje está involucrado en el electrohilado, proporciona el mecanismo para extraer en lugar de un estímulo mecánico. La mayor velocidad de extrusión parece dar lugar a una acumulación de carga residual, como lo demuestra la formación de anillos en el mandril a velocidades más altas. Esta carga residual puede estar relacionada con una mayor alineación de las unidades de polímero y, por lo tanto, con una mayor resistencia a la tracción máxima.

25 Según se ha señalado, los andamiajes fabricados con mayores velocidades de extrusión son más propensos a formar andamiajes más gruesos en una parte más estrecha del mandril, lo que ocasionalmente conduce a la formación de un anillo, mientras que las velocidades de extrusión más bajas tienden a formar andamiajes que se extienden a lo largo del mandril de manera más uniforme. El fenómeno del anillo observado puede estar relacionado con un fenómeno de extensión descrito en la polianilina, un polímero conductor de la electricidad, que permite el libre movimiento de los electrones. En lugar de que la polianilina se acumule en una estera plana como los polímeros aislantes, la red de nanofibras tiene una tendencia a expandirse en la dirección del campo eléctrico aplicado. Esta extensión se explica como un tiempo de redistribución de electrones acortado que causa una acumulación de carga eléctrica en partes de la red de fibras que se orientan o doblan en una dirección favorable.

35 Aunque se prefiere la colección uniforme por la consistencia de los andamiajes y la facilidad de fabricación, puede ser perjudicial para las propiedades de expansión del andamiaje. Los andamiajes fabricados a una velocidad de extrusión más baja y, por lo tanto, más consistentes, presentaban una menor resistencia a la tracción máxima y fallaban a valores de deformación más bajos que aquellos fabricados a velocidades más rápidas. Sin embargo, los andamiajes que se fabricaban a mayores velocidades de extrusión presentaban, en general, menor porosidad. Esto puede dictar un compromiso importante para equilibrar las propiedades mecánicas con una porosidad preferida para una mejor migración celular y proliferación para un andamiaje AAA.

40 El lado cóncavo que tiene más fibras curvas y el lado convexo que tiene más fibras rectas dentro del mismo andamiaje pueden contribuir a las propiedades mecánicas de la totalidad del andamiaje. También observamos que algunos andamiajes mostraban estrechamientos significativos que conducían a una deformación aumentada. Con estos andamiajes, generalmente se rompían ya sea por la introducción de vacíos elípticos o por delaminación, insinuando que algunas fibras se están rompiendo antes que otras, provocando una transferencia de fuerzas de tracción a las fibras restantes. Por otro lado, algunas muestras tenían muy poco estrechamiento y se rompieron más abruptamente. Las muestras fabricadas a la velocidad de extrusión más baja tenían más probabilidades de romperse abruptamente, ocurriendo en aproximadamente la mitad de las muestras del conjunto de parámetros. Esto puede explicar el aumento de la desviación dentro de estos grupos en términos de deformación. Sin embargo, se observó que los conjuntos de muestras con grandes desviaciones en la deformación no mostraron grandes desviaciones en la tensión, lo que insinúa que se está produciendo algún tipo de reordenamiento de la fibra para permitir la expansión y el estrechamiento, pero que las propias fibras tienen un umbral de rotura. Esto puede estar relacionado con un gradiente de configuración de fibras y enredo en todo el andamiaje.

55 Al comparar estas propiedades con las tendencias generales de porosidad, los andamiajes con menor porosidad tendían a corresponder con lados cóncavos y convexos más constantes.

En base a los resultados del estudio actual, los andamiajes electrohilados se pueden clasificar no sólo por sus parámetros de fabricación sino también por las características morfológicas en su conjunto. Por ejemplo, el efecto más destacado de un parámetro de fabricación sobre las propiedades mecánicas es el de la velocidad de extrusión

sobre la resistencia a la tracción máxima. Sin embargo, aunque no existe un parámetro igualmente destacado que afecte a la deformación en el momento del fallo, existen varias combinaciones de parámetros que tienen un efecto significativo. En última instancia, el enredo del andamiaje y otras propiedades morfológicas dictan cómo se distribuye la fuerza de tracción y, por lo tanto, influyen en la deformación de los andamiajes individuales en el momento del fallo.

Los parámetros del proceso de fabricación - velocidad de extrusión, voltaje aplicado y concentración de la solución - pueden afectar significativamente las propiedades mecánicas y la morfología de los andamiajes de PCL electrohilados que a su vez afectan su eficacia como andamiajes de reparación de aneurismas. Sin embargo, los parámetros tienen un efecto menor sobre la velocidad de degradación de los andamiajes y las propiedades mecánicas correspondientes a lo largo del tiempo. La velocidad de extrusión tiene el mayor efecto tanto en la fuerza de tracción máxima como en la porosidad, a la vez que desempeña un papel menor en el aumento de la deformación en el momento del fallo. La deformación en el momento del fallo parece depender más del voltaje aplicado y de la morfología del andamiaje en general.

Se realizaron estudios adicionales para evaluar la proliferación celular en los andamiajes. Se colocaron andamiajes tubulares en cultivos tanto estáticos como dinámicos y se colocaron o bien células endoteliales aórticas humanas (Cascade Biologics) o bien células de músculo liso aórtico humano (Lonza) en los andamiajes para observar su respectiva proliferación *in vitro*. La FIG.7 muestra células endoteliales aórticas humanas que se extienden sobre un andamiaje cuando se cultivan bajo flujo dinámico. Mientras que los estudios con células endoteliales son preliminares, esta propagación sugiere que las células endoteliales se adherirán a los andamiajes y proliferarán bajo flujo dinámico. En otro estudio, los andamiajes tubulares se esterilizaron bien con gas de óxido de etileno (ETO) (n=3) o bien con gas plasma de oxígeno (GP) (n=3) y luego se colocaron en placas de pocillos individuales y se sembraron por goteo células de músculo liso en los andamiajes. Se permitió que las células proliferaran durante 14 días, con cambios de medios cada dos días. La prueba metabólica AlamarBlue (Invitrogen) se utilizó para extrapolar el número de células en los días 0, 3, 5, 7 y 14 según se muestra en la FIG. 8. Un aumento en el número de células indica que los andamiajes fueron propicios para el crecimiento y la proliferación celular. A continuación, los andamiajes tubulares fueron colocados en un biorreactor y expuestos a un flujo dinámico durante 5 días con cambios de medios cada dos días. Los andamiajes se esterilizaron de nuevo bien con EtO (n=3) o bien con GP (n=3), se sembraron con células de músculo liso aórtico humano y se utilizó AlamarBlue para medir la actividad metabólica en los días 0, 3 y 5. Los resultados de este estudio se muestran en la FIG. 9. El aumento del número de células indica que las células pueden proliferar bajo flujo dinámico. Mientras que estos resultados son positivos, también es importante observar si se adherirán las células en el líquido que pasa por los andamiajes. Se realizó un estudio en el que se esterilizaron andamiajes tubulares bien con ETO (n=1) o bien con GP (n=3) y se colocaron en el biorreactor. Sin embargo, en lugar de sembrar previamente los andamiajes, las células se colocaron en suspensión en el medio que se perfusionaría a través del sistema. En el día 3, se retiraron los andamiajes y se utilizó AlamarBlue para determinar el número de células. Los resultados indican que las células son capaces de adherirse a los andamiajes sin necesidad de sembrar previamente. La FIG. 10 compara los resultados de la prueba de suspensión con los ensayos estáticos y dinámicos en los que las células fueron presembradas. Esta es una indicación importante de que los andamiajes colocados en un sistema de flujo tal como el sistema cardiovascular serán capaces de retener células en el flujo, reduciendo por lo tanto la necesidad de sembrar previamente los andamiajes y, a su vez, reduciendo el tiempo que un paciente debe esperar para recibir el andamiaje.

Se realizaron estudios para comparar diferentes morfologías de andamiajes. La PCL se preparó en tres configuraciones. La primera, A, consistía en electrohilar una solución de PCL al 9 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 8-10 % en peso) en 75:25 Cloroformo: Metanol (por ejemplo, mezcla de alcohol y solvente orgánico halogenado) a 0,035 ml/min con una distancia de punta a colector de 15 cm y 15 kV aplicados a la aguja de la jeringa. La segunda, B, utilizó electrohilado con una solución de PCL al 14 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 13-15 % en peso) en cloroformo (por ejemplo, un solvente orgánico halogenado) a una velocidad de extrusión de 0,029 ml/min, una distancia de 10 cm entre la punta y el colector y 12,0 kV aplicados. El tercer conjunto, C, se fabricó por fundición al 12 % en peso (por ejemplo, alrededor del 11-13 % en peso) de solución de PCL en cloroformo (por ejemplo, un solvente orgánico halogenado) en un pedazo de vidrio, bajo una caja de espuma de poliestireno. Después de que el cloroformo se evaporó, se dejó una película que constantemente tenía el mismo espesor que la configuración B, aproximadamente 0,5 mm. La configuración A produjo andamiajes más delgados, de aproximadamente 0,3 mm. Las muestras "C" sirven como control para comparar la estructura teórica tridimensional de A y B con una estructura bidimensional. El colector, según se mencionó anteriormente, consistía en un trozo de lámina de aluminio, con el lado brillante hacia arriba, que cubría una pantalla de aluminio con el terminal negativo de la fuente de alto voltaje aplicado. Después de fabricar los andamiajes, se cortaron en cuadrados de 5 mm x 5 mm utilizando una cuchilla de afeitar recta. Se utilizó SEM para obtener imágenes de los andamiajes y determinar el diámetro promedio de las fibras. Las FIG. 11A-B representan imágenes SEM de andamiajes electrohilados A (nano) y B (micro) a 2000X.

En algunas formas de realización, los andamiajes se esterilizaron en frascos de destello de vidrio abiertos, exponiéndolos a gas plasma de oxígeno con alto contenido RF durante 3 minutos. Se agruparon los andamiajes para la esterilización de modo que todos los puntos de tiempo de un grupo para ambos tipos de células se esterilizaran juntos para reducir el error que puede resultar en una esterilización diferente dentro de un grupo.

Después de la esterilización, las muestras se pueden exponer a medios de cultivo celular estériles para sus respectivos tipos de células en pocillos individuales de placas de pocillos de adhesión ultra baja.

Las células endoteliales aórticas humanas (EC) y las células del músculo liso aórtico humano (SMC) se compraron a Lifeline cell technologies. El donante de las SMC era un hombre afroamericano de 49 años, no fumador, con hipertensión y enfermedad cardíaca, que murió de hemorragia intracerebral. El donante de las EC fue un varón caucásico de 61 años, no fumador, con hipertensión y enfermedad cardíaca que murió de hemorragia intracerebral. Las SMC se cultivaron en el medio basal de Invitrogen, M231, con suplemento para el crecimiento de células de músculo liso, y las EC se cultivaron en el medio basal de Lifeline con suplemento para el crecimiento endotelial. Ambos tipos de células fueron criados por medio de P5. Las células fueron tripsinizadas, centrifugadas, resuspendidas y contadas utilizando un hemocitómetro. Las SMC se introdujeron en pocillos con medios de EC a una concentración de 4×10^4 células/andamiaje. Las EC se introdujeron en pocillos con medios de EC a una concentración de 4×10^4 células/andamiaje. Las curvas estándar también se hicieron sembrando un rango de volúmenes de cada tipo de célula en una placa de pocillo regular. Se sembraron tres andamiajes para cada punto de tiempo y se sembraron tres réplicas para la curva estándar. Se permitió que las células se adhirieran durante 2,5 horas antes del análisis inicial. Para los datos metabólicos, este estudio se replicó 4 veces, para los datos de proliferación, el estudio se replicó dos veces y para la microscopía, el estudio se replicó dos veces. Se utilizó un $n=3$ para cada replicación.

Para medir la actividad metabólica, se retiraron los medios de los andamiajes y se agregó una solución de alamarBlue (AB) al 10 % en medios a cada pocillo, incluyendo las curvas estándar. La solución AB utilizó los medios respectivos para cada tipo de célula. Los andamiajes fueron incubados durante 2,5 horas con el AB, luego el AB fue alicuotado en volúmenes de 100 μ L en placas de 96 pocillos opacas y negras y leídas con un lector de placas fluorescentes en EX:530 EM:590. Después de retirar la solución AB de los pocillos, se enjuagaron los andamiajes con PBS y luego se envolvieron las placas con los andamiajes con punto de tiempo del día 0 en papel parafilm y se colocaron en el congelador de -80 °C. Los medios fueron reemplazados en los andamiajes restantes y las placas fueron colocadas de nuevo en la incubadora. Este proceso AB se repitió durante los días 1, 3, 7 y 10. Las FIG. 12A-B representan gráficas de cambio en la actividad metabólica de hAoEC y hAoSMC en respuesta a andamiajes de diferentes morfologías de fibras (normalizados a valores del día 0 para cada muestra).

Después de completar y congelar todos los puntos de tiempo, fue realizado un estudio de cuantificación de dsDNA utilizando Picogreen (PG). Los andamiajes se retiraron a una temperatura de -80 °C y se dejaron descongelar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La proteinasa K se diluyó en medios EC a 1mg/ml y se agregaron 100 μ L a cada muestra y curvas estándar. Las placas fueron colocadas en la incubadora, que se subió a 42 °C durante 30 minutos. Las placas fueron retiradas y fueron colocadas en un agitador de placas durante 2 minutos a una intensidad #3. A continuación, las placas fueron colocadas de nuevo a -80 °C y se dejaron durante la noche. A la mañana siguiente, las placas fueron retiradas de los -80 °C y se dejaron descongelar a temperatura ambiente durante 30 min. Se volvieron a colocar en un agitador de placas durante 2 minutos a una intensidad #3 antes de ser congeladas por tercera vez a -80 °C durante otros 30 minutos y descongeladas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 500 μ L de tampón TE a todas las muestras de la placa 1. Luego se retiraron 5 réplicas de 100 μ L cada una a una placa de 96 pocillos libre de DNAasa y ARNasa. Las placas 2 y 3 fueron colocadas en el congelador a -20 °C. La solución de PG del ensayo fue mezclada y constaba de 100 μ l de PG con 21 ml de tampón TE. Se agregaron 100 μ l de solución de PG a las placas de pocillos de modo que el volumen total por pocillo fuera de 200 μ l. Las placas se dejaron incubar unos minutos en la oscuridad y luego se leyeron con un lector de placas fluorescentes en EX:485 EM:528. La misma técnica fue repetida para las placas 2 y 3. Las FIG. 13A-B representan gráficas de la proliferación celular a lo largo del tiempo de hAoEC y hAoSMC en andamiajes compuestos tanto de nanofibras (A), microfibras (B) como de películas (C). Determinado utilizando Picogreen para medir el contenido de dsDNA, $n=6$.

Se utilizó la microscopía electrónica de barrido para obtener imágenes de ambos andamiajes fibrosos antes de la introducción de las células, así como en cada punto del tiempo. Cuando las células estaban presentes, las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4 % y luego se deshidrataron utilizando un gradiente de etanol antes de ser colocadas en un horno de vacío a temperatura ambiente.

Las muestras para cada punto de tiempo fueron fijadas en paraformaldehído al 4 % y luego se tiñeron bien con FITC conjugado α -actin o bien con anti-CD-31 con un fluoróforo y DAPI para teñir los núcleos. Las muestras fueron montadas en Slowfade y luego observadas con un microscopio de fluorescencia confocal utilizando sus respectivas longitudes de onda. Las FIG. 14A-D representan imágenes SEM de microfibras electrohiladas con células endoteliales aórticas humanas en los días 1, 3, 7 y 10. Las FIG. 15A-D representan imágenes SEM de microfibras electrohiladas con células de músculo liso aórtico humano en los días 1, 3, 7 y 10.

El ANOVA unidireccional fue utilizado para determinar un aumento significativo en el número de células y la actividad metabólica. La prueba de Tukey fue utilizada en Post hoc. Una prueba z se utilizó para determinar los valores atípicos.

Las FIG. 16A-L representan imágenes de microfibras electrohiladas con células de músculo liso aórtico humano en los días 1, 3, 7 y 10 (Las FIG. 16A-D representan las SMC en el andamiaje A, las FIG. 16E-H representan las SMC en el andamiaje B, y las FIG. 16I-L representan las SMC en el andamiaje C cada conjunto para los días respectivos

1, 3, 7 y 10). Se ha mostrado que los andamiajes son significativamente diferentes, aunque se fabrican a partir del mismo material utilizando técnicas similares. Los andamiajes "A" se miden para ser $0,245 \mu\text{m} \pm 0,158$, mientras que los andamiajes "B" son de $6,744 \mu\text{m} \pm 0,265$. En base tanto a los datos metabólicos como de proliferación, se puede determinar que las células endoteliales responden más positivamente a las microfibras que cualesquiera películas o los andamiajes de nanofibras fabricados del mismo material. Más específicamente, se debe observar que, en las nanofibras, las células endoteliales muestran metabolismo aumentado, pero no proliferación aumentada, lo que sugiere que las células pueden estar en peligro. Una tendencia similar se observa en los controles de la película, pero no en los andamiajes de microfibra. El contraste de la actividad metabólica, así como de la proliferación con las imágenes visuales de los andamiajes de microfibras sugiere que las células se han infiltrado en los andamiajes, a diferencia de las otras muestras.

REIVINDICACIONES

- 1.** Un dispositivo para el tratamiento de un problema cardiovascular que comprende:
- 5 un andamiaje expandible compuesto de fibras biodegradables no tejidas electrohiladas y en donde el andamiaje es, en esencia, tubular y comprende una superficie cóncava y una superficie convexa y en donde la superficie cóncava tiene una concentración más alta de fibras que la superficie convexa;
- en donde la superficie cóncava incluye fibras con una apariencia más enlazada y la superficie convexa incluye fibras que son más lineales;
- 10 en donde, cuando el andamiaje se coloca en la vasculatura de un mamífero para dirigir el desarrollo del tejido y controlar el flujo sanguíneo en el problema cardiovascular indeseable, la superficie cóncava del andamiaje puede impedir el flujo sanguíneo y las fuerzas mecánicas provocadas por el flujo sanguíneo a través del andamiaje y la vasculatura, reduciendo de este modo la ruptura de la vasculatura y proporcionando al mismo tiempo una superficie apropiada para la adhesión celular, mientras que la superficie convexa, menos concentrada, facilita el ingreso y la organización de las células; y
- en donde el andamiaje es completamente degradable con el tiempo dejando nuevo tejido en su lugar.
- 15 **2.** El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el problema cardiovascular es un aneurisma.
- 3.** El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el problema cardiovascular es un espacio vacío o semivacío.
- 4.** El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las fibras comprenden poli (α -hidroxi ésteres).
- 20 **5.** El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las fibras comprenden polímeros naturales.
- 6.** El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las fibras comprenden Elastina, Colágeno, ADN, ARN, Glucosaminoglicanos o mezclas de los mismos.
- 25 **7.** El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el andamiaje está compuesto de un tejido no tejido.
- 8.** El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las fibras comprenden policaprolactona.
- 9.** El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el andamiaje está compuesto de microfibras no tejidas electrohiladas de un compuesto de biomateriales.
- 30 **10.** El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el andamiaje se soporta por al menos una parte de un dispositivo médico.
- 11.** El dispositivo de la reivindicación 10, en donde el dispositivo médico es un stent.

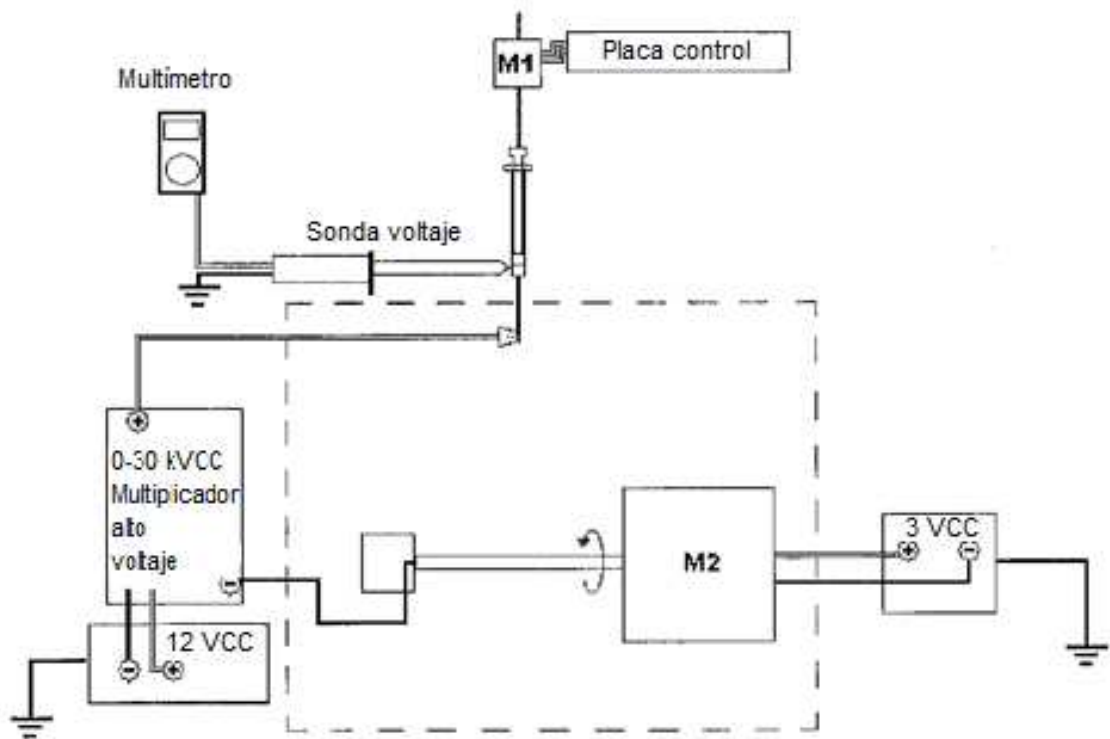


FIG. 1

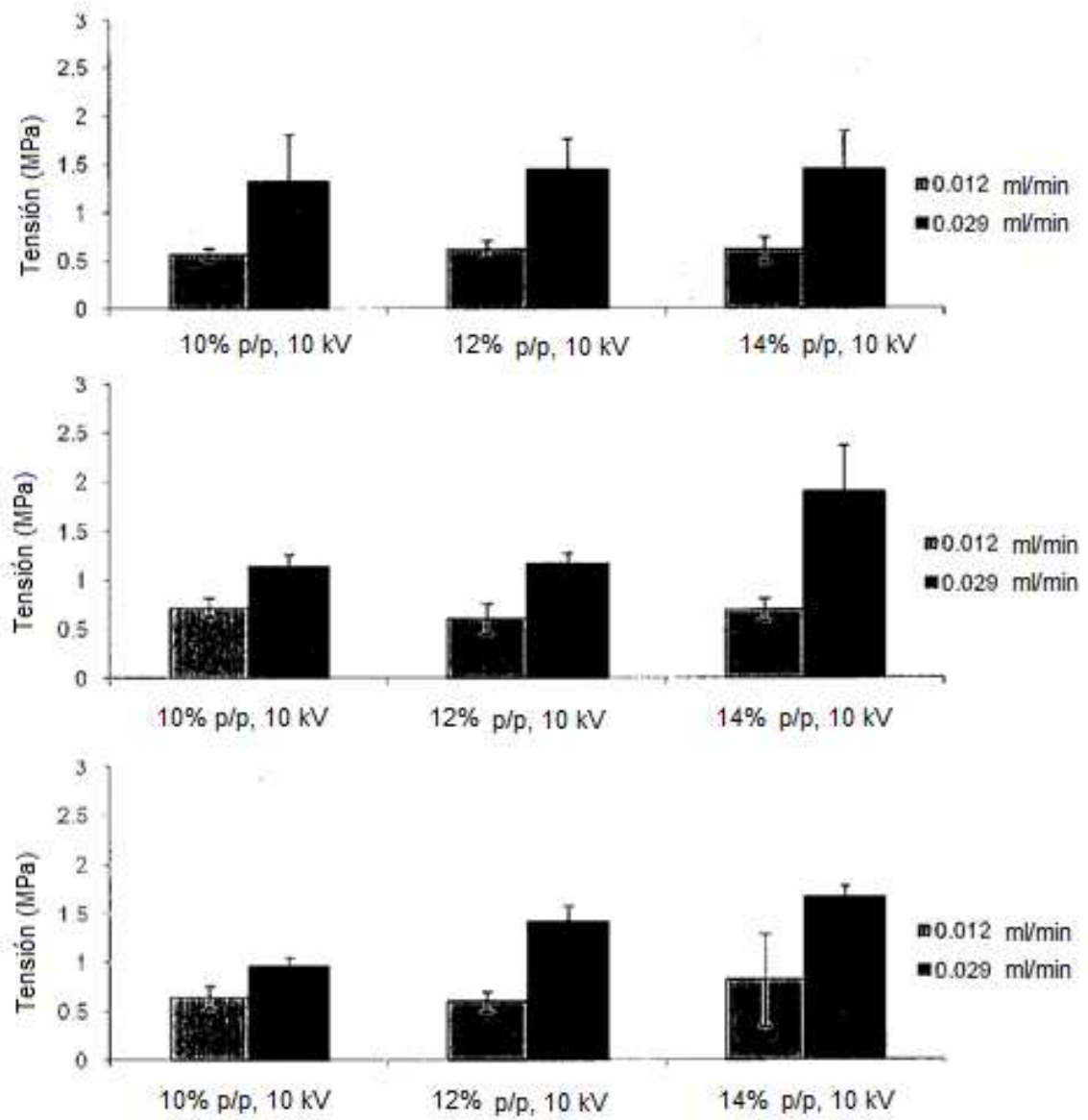


FIG. 2A

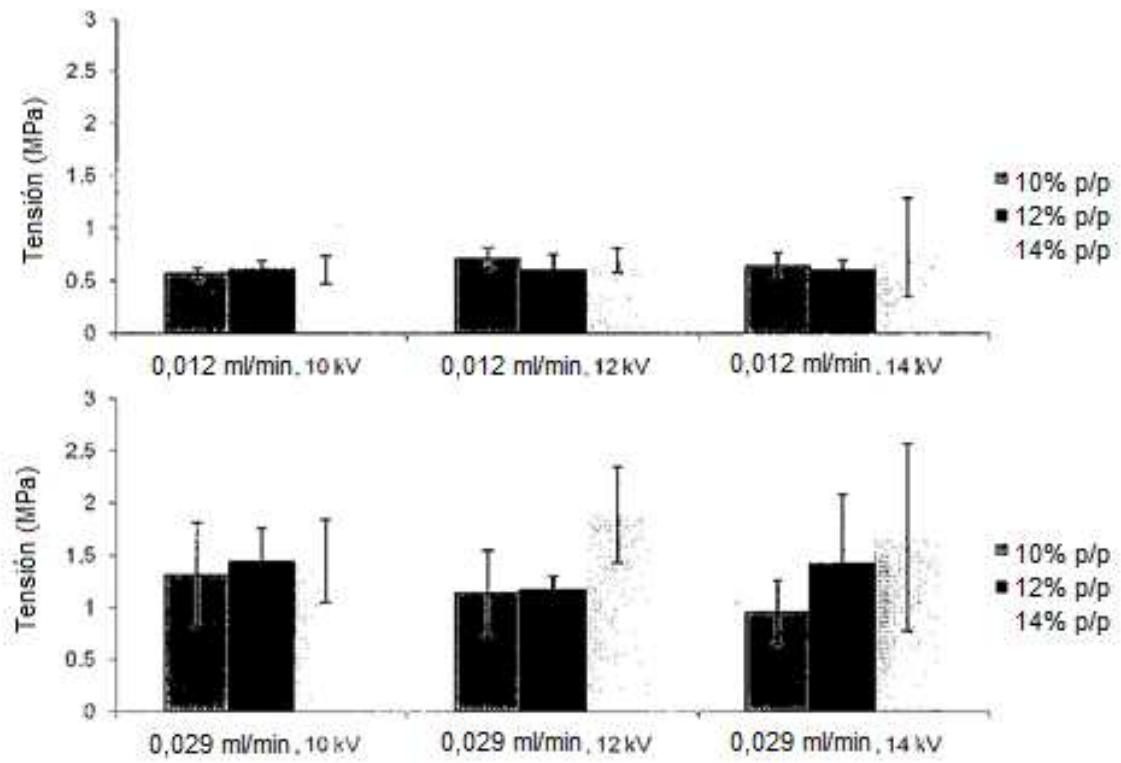


FIG. 2B

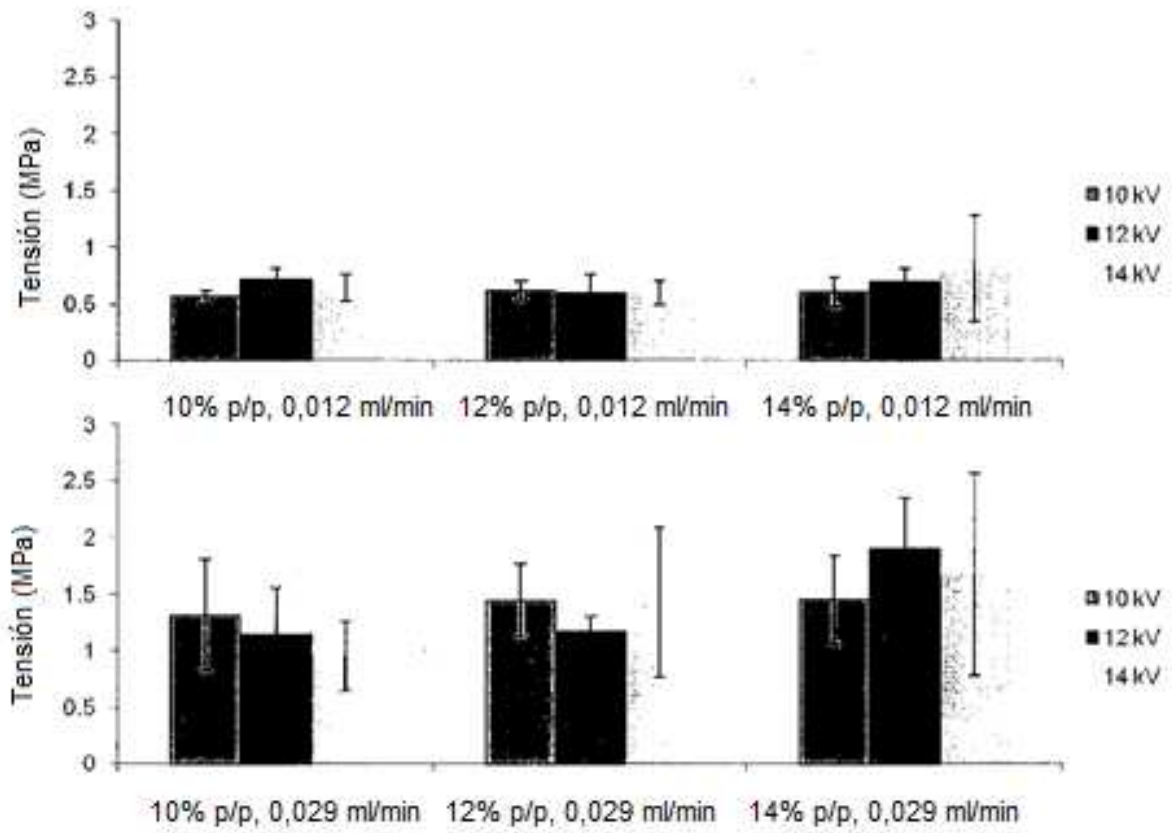


FIG. 2C

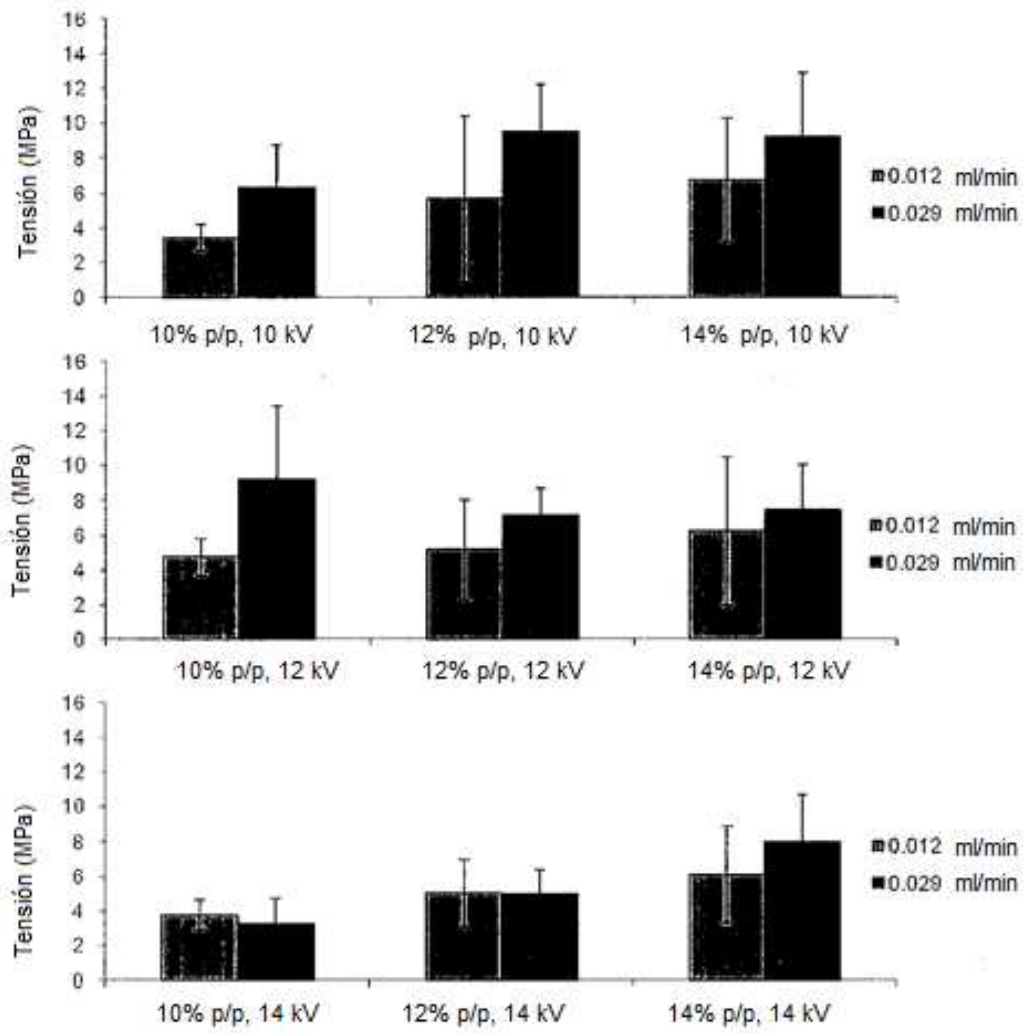


FIG. 3A

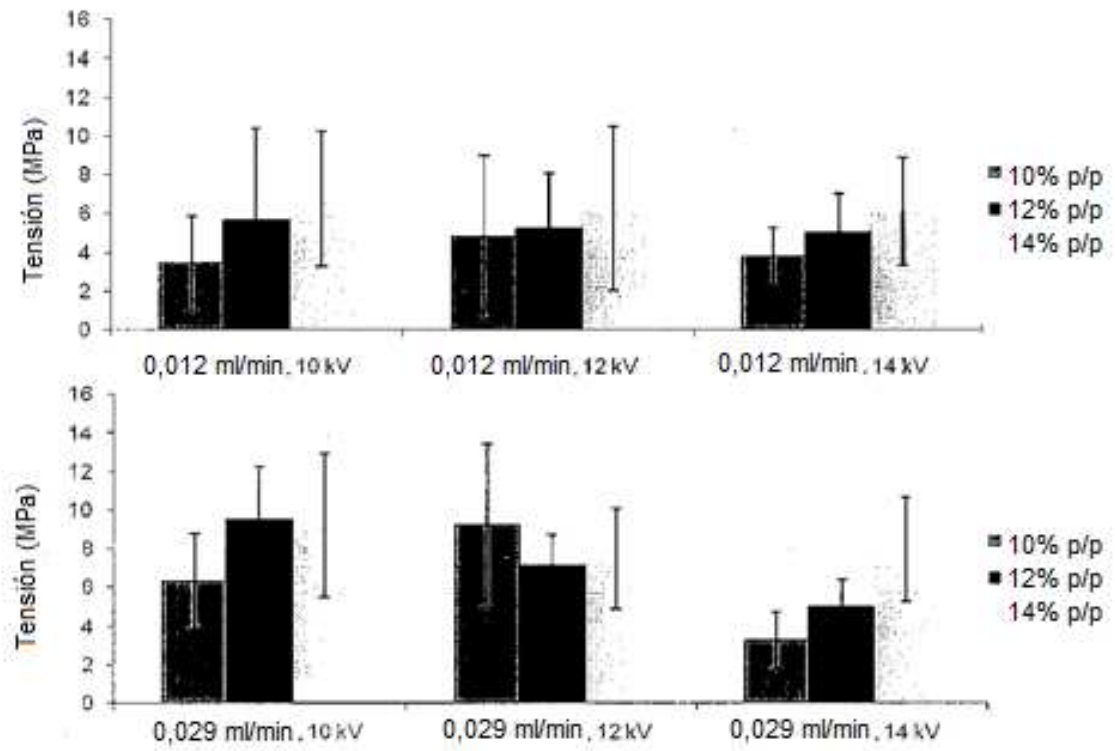


FIG. 3B

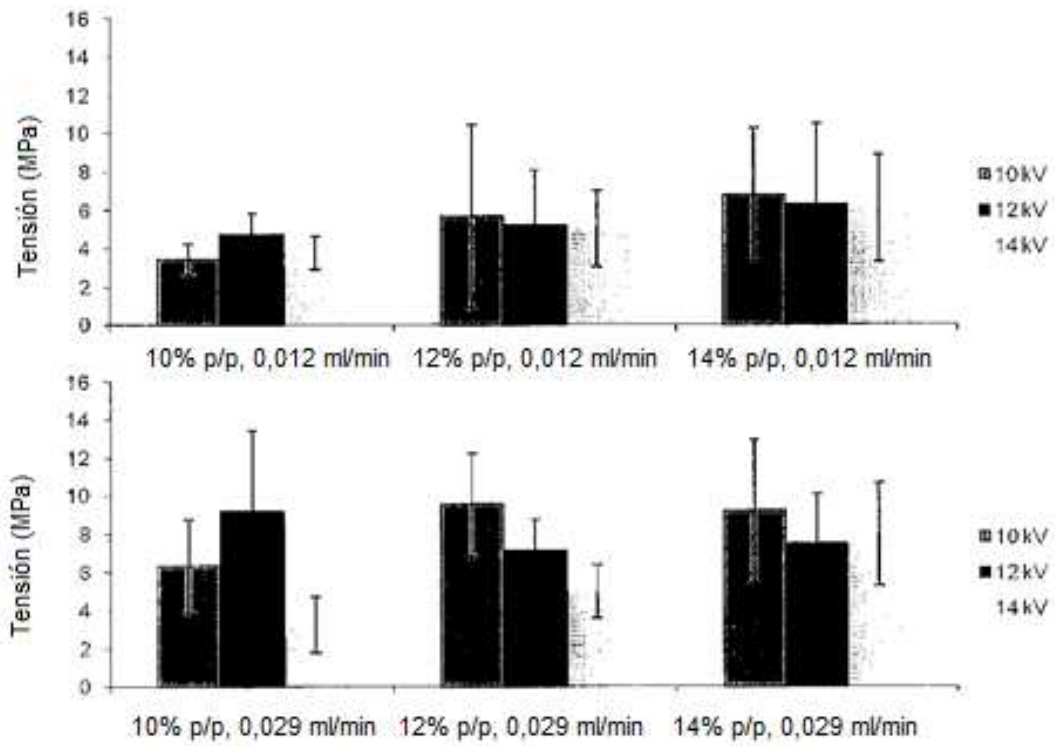


FIG. 3C

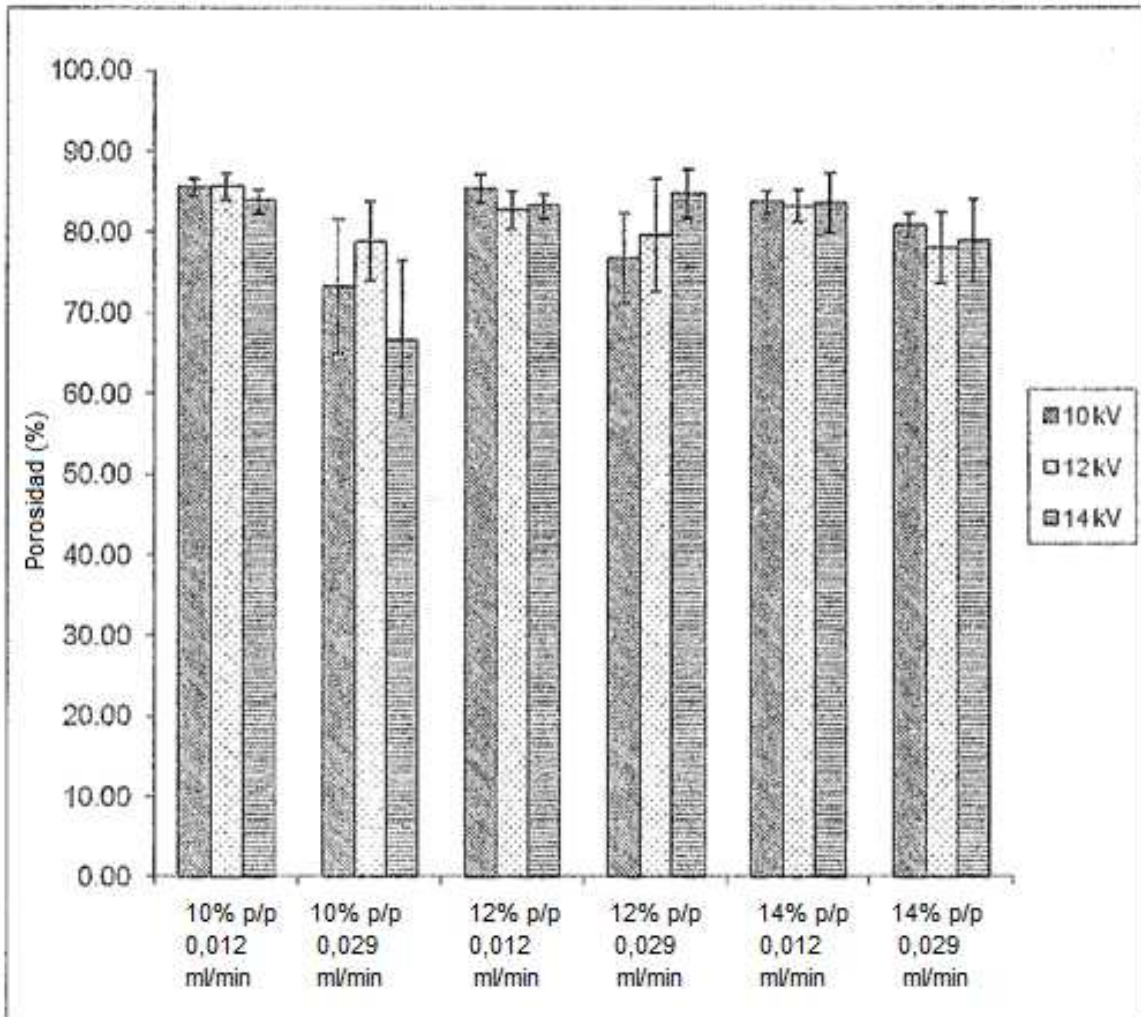


FIG. 4

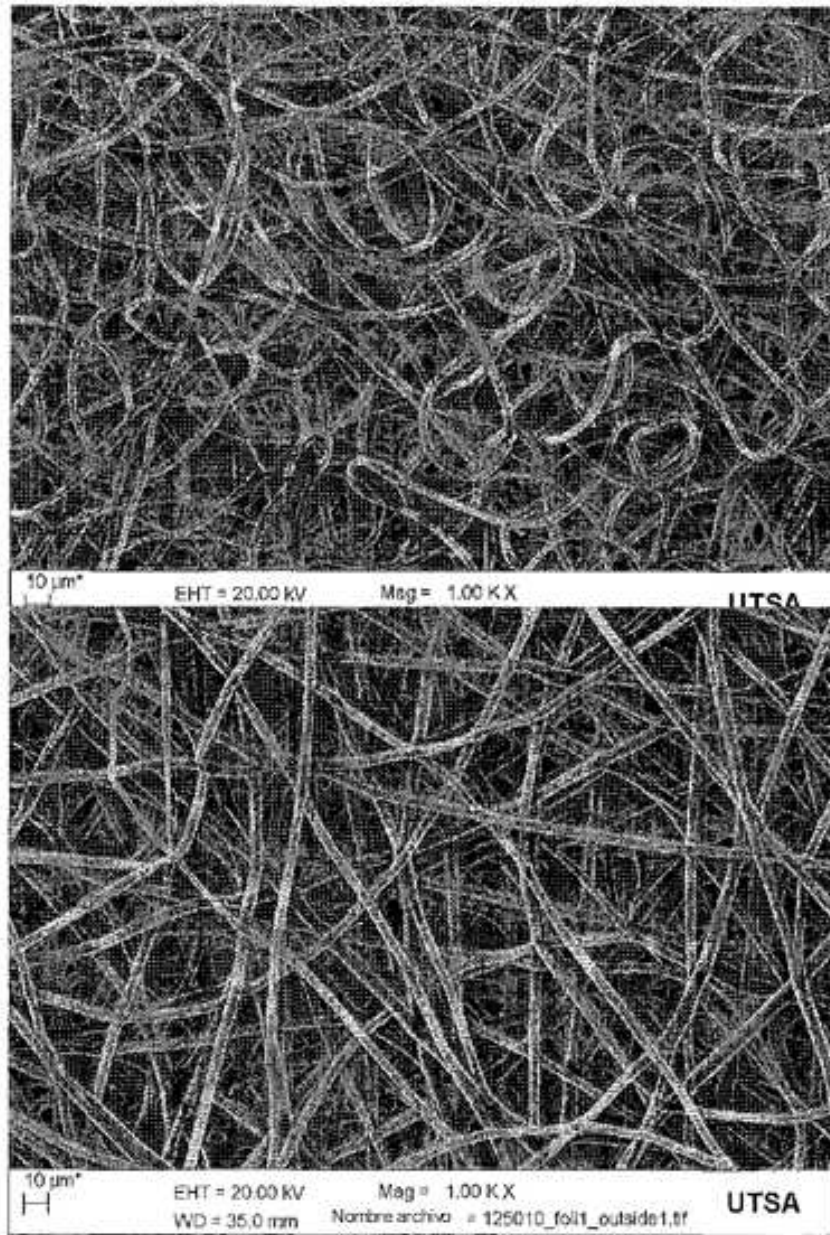


FIG. 5A

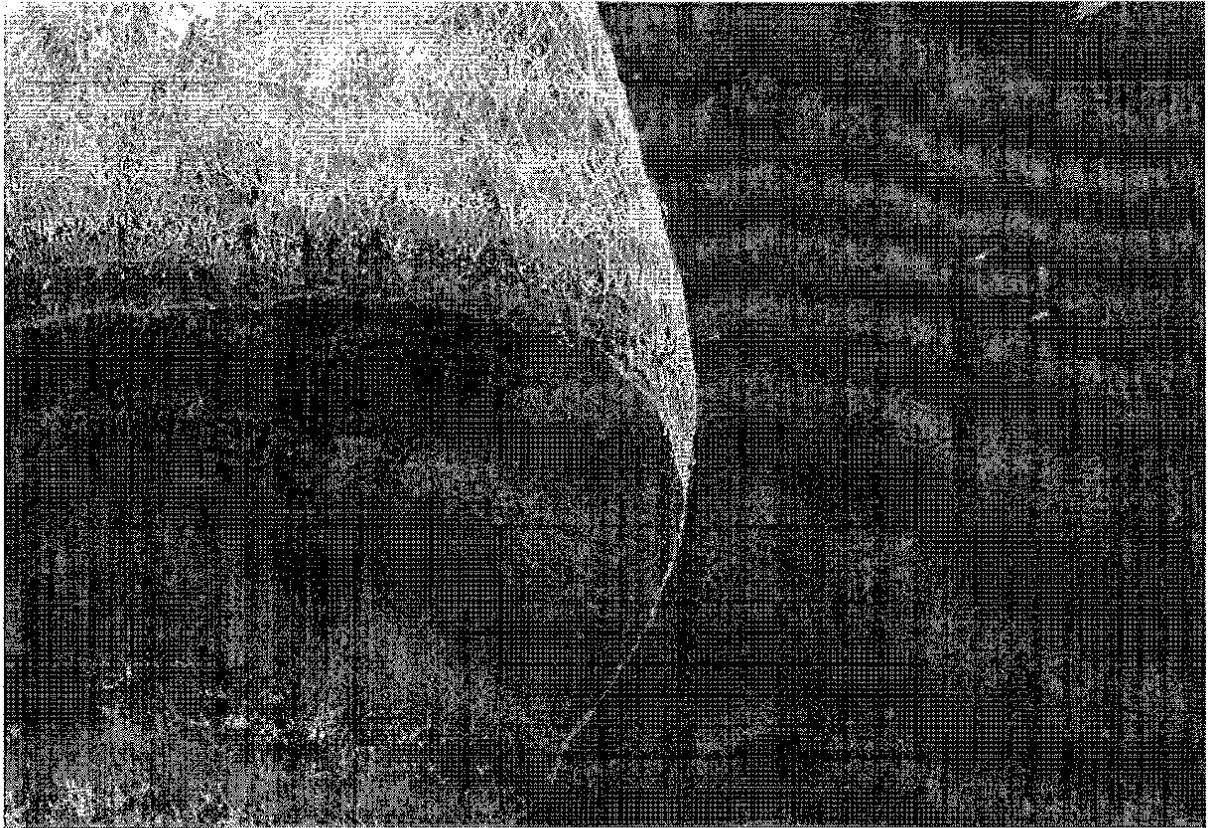


FIG. 5B

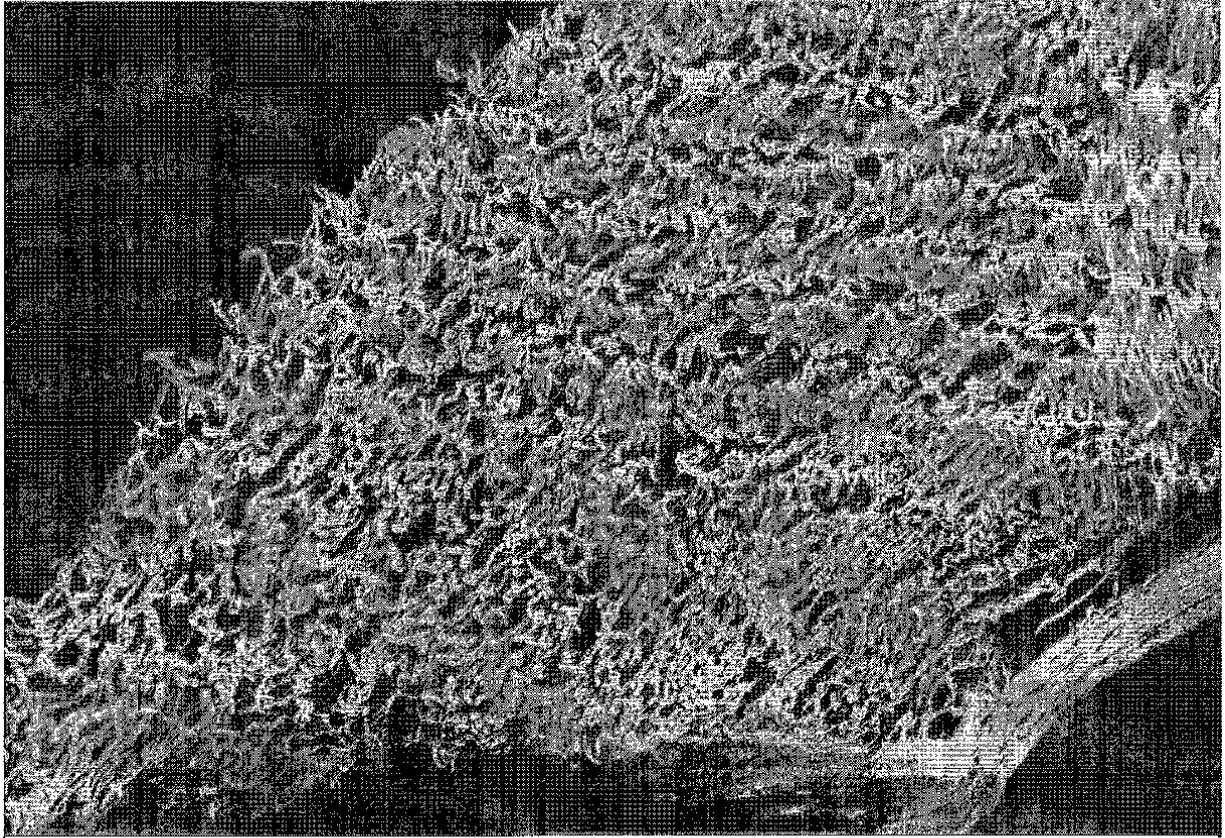


FIG. 5C

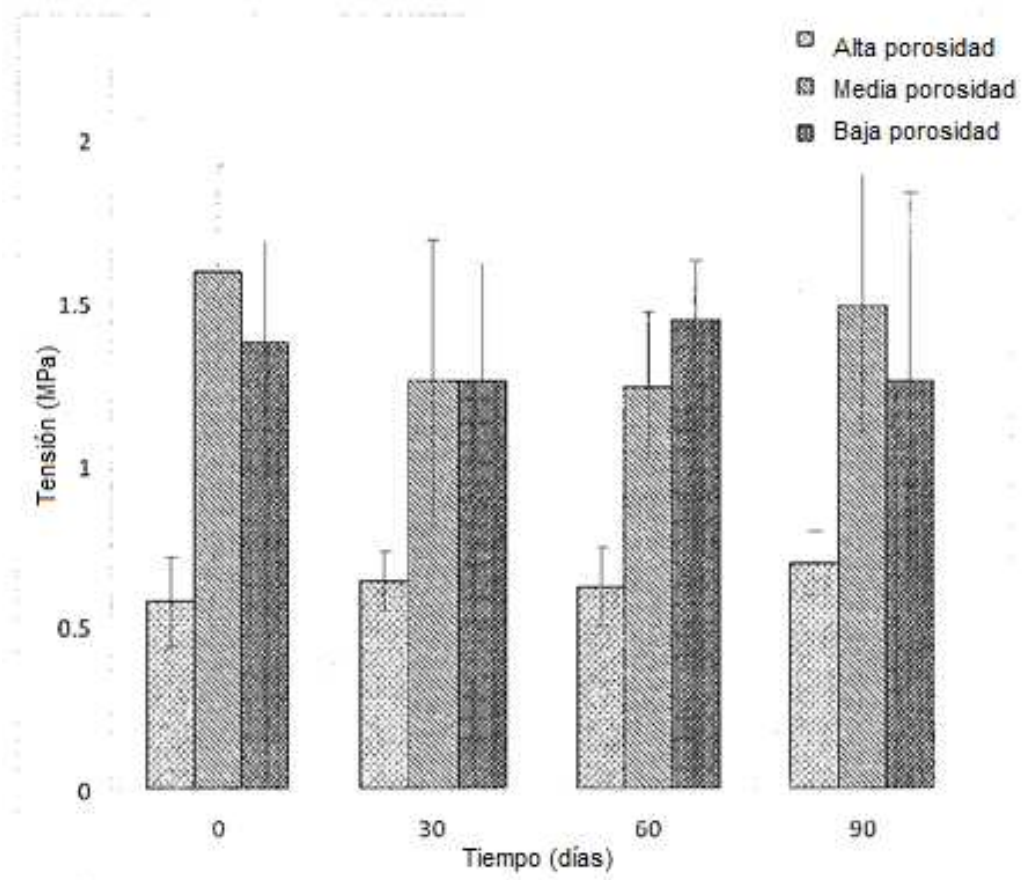


FIG. 6A

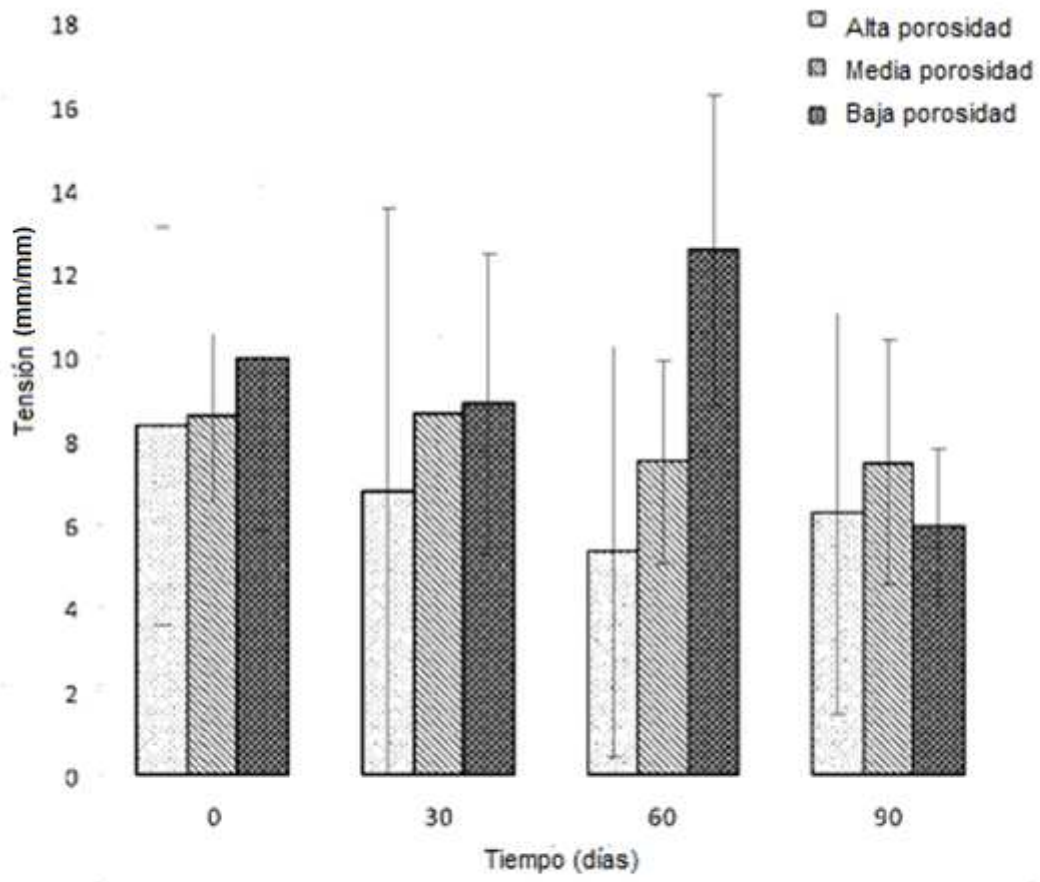


FIG. 6B

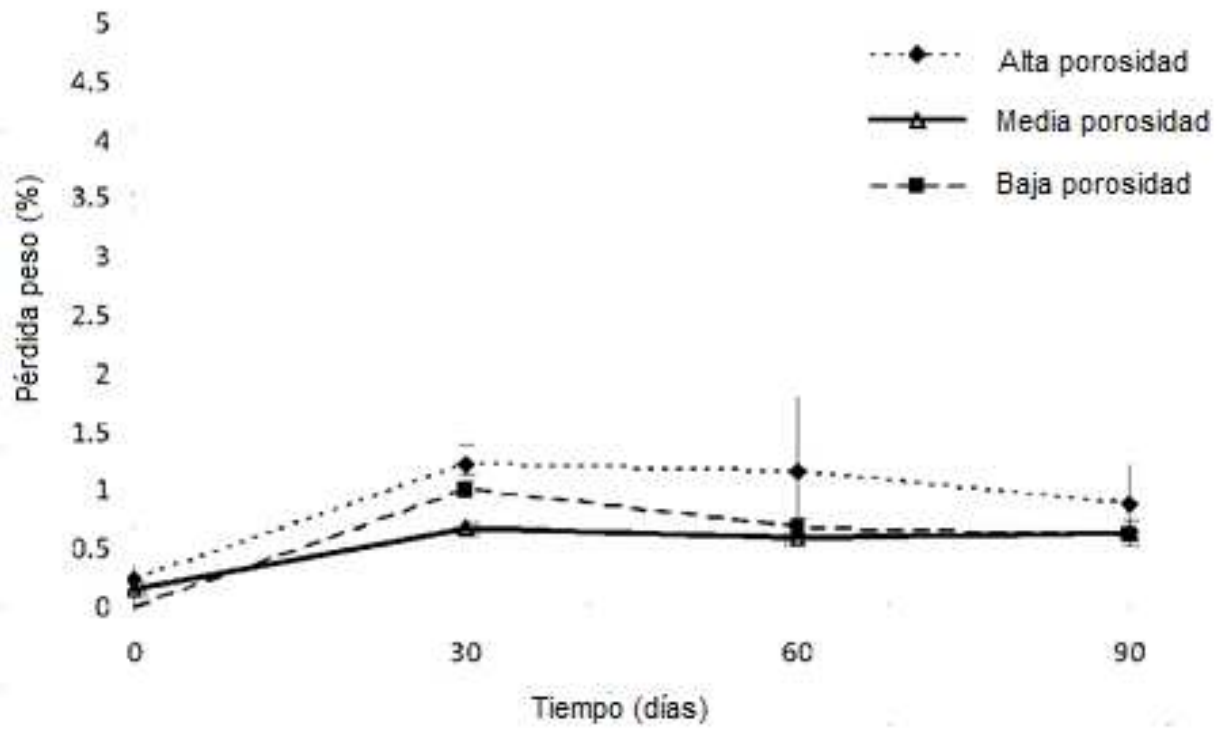


FIG 6C

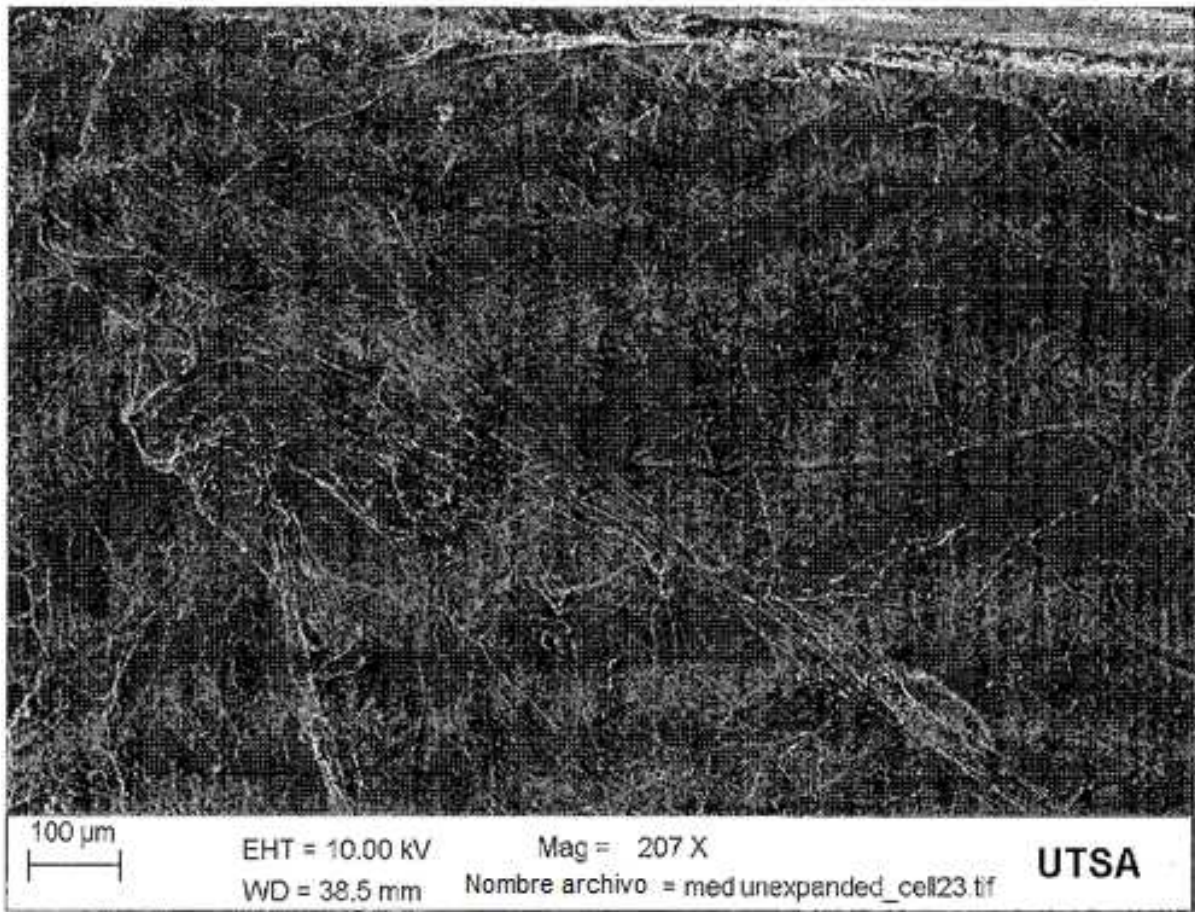


FIG. 7

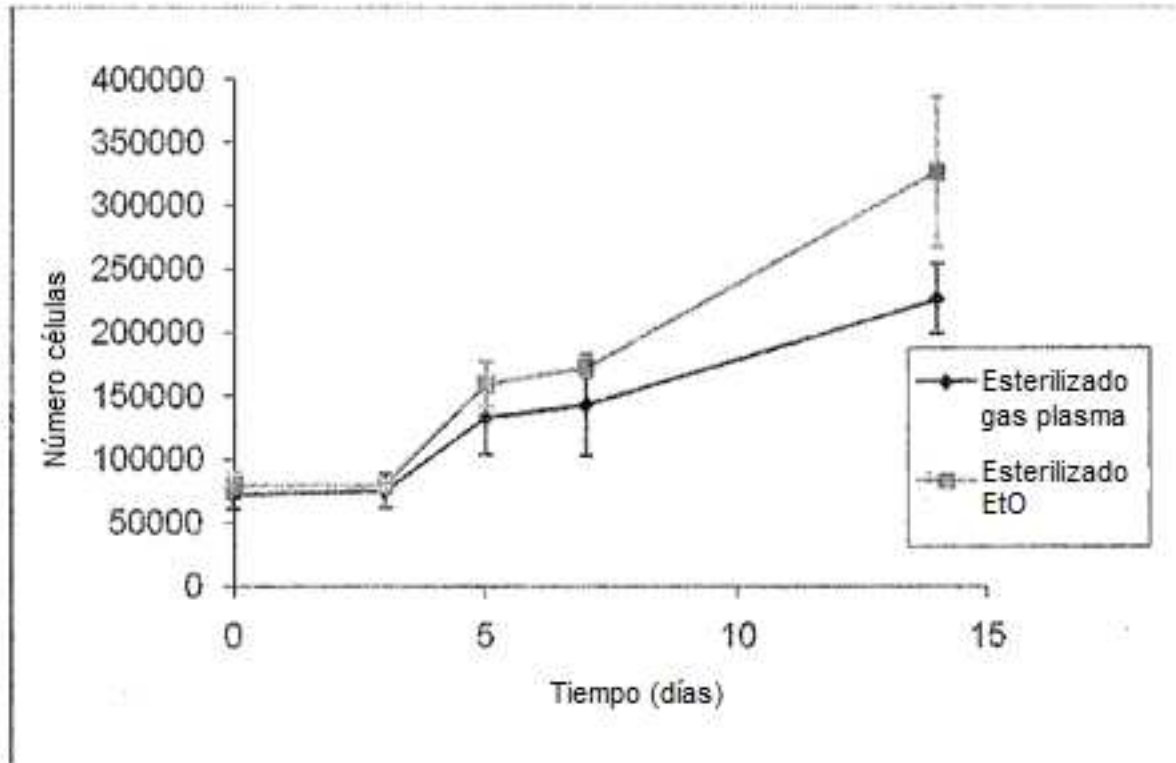


FIG. 8

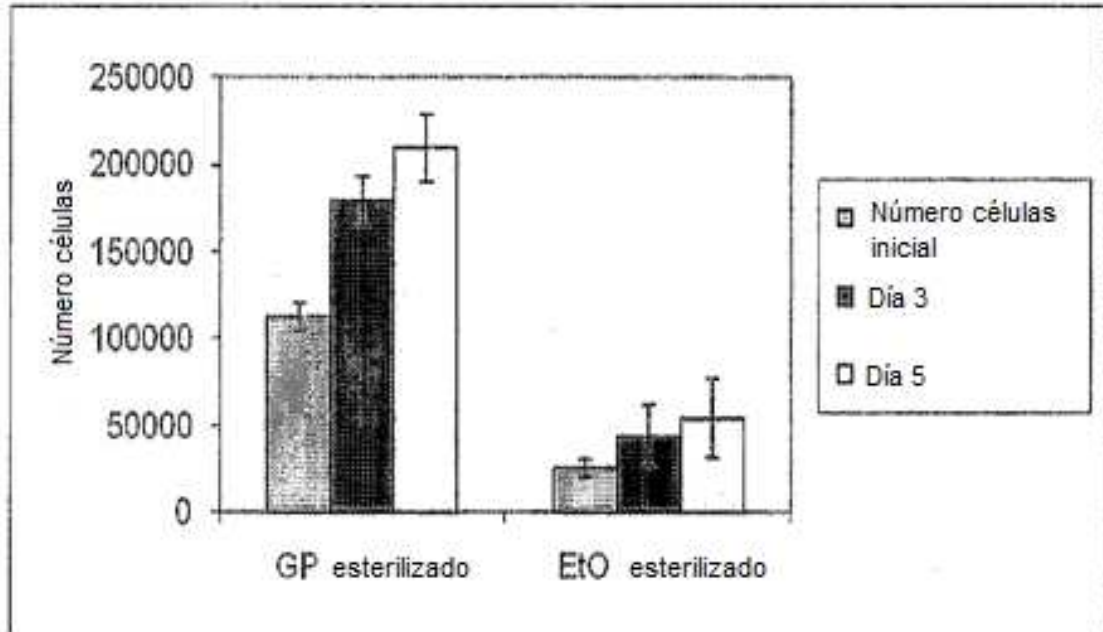


FIG. 9

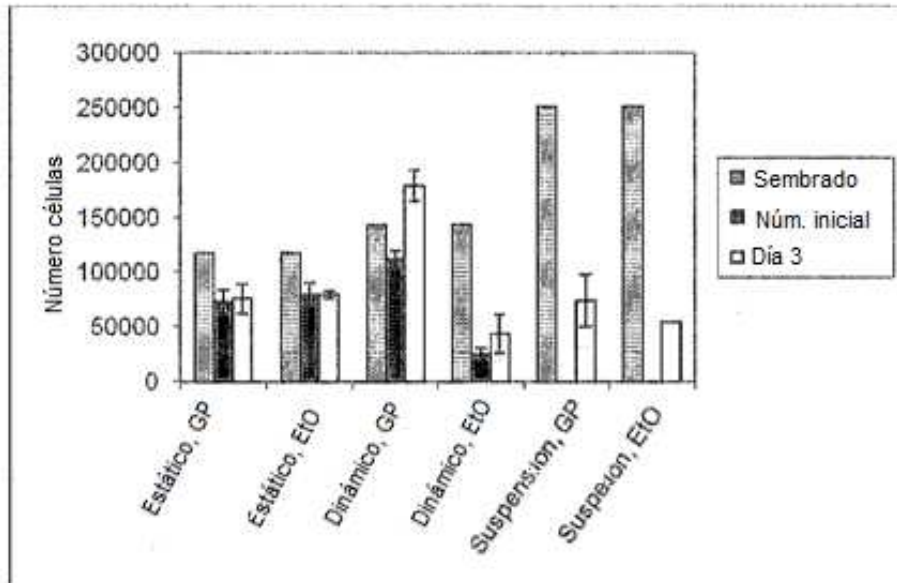
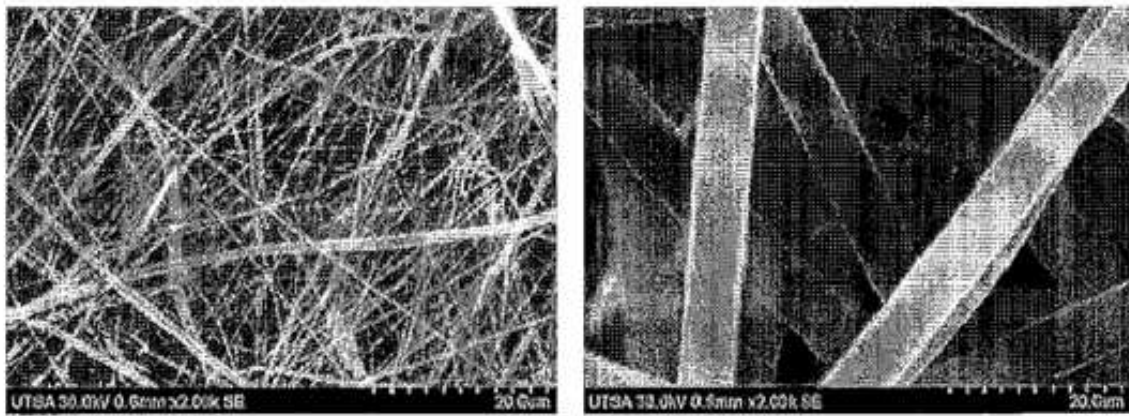


FIG. 10



FIGS. 11A-B

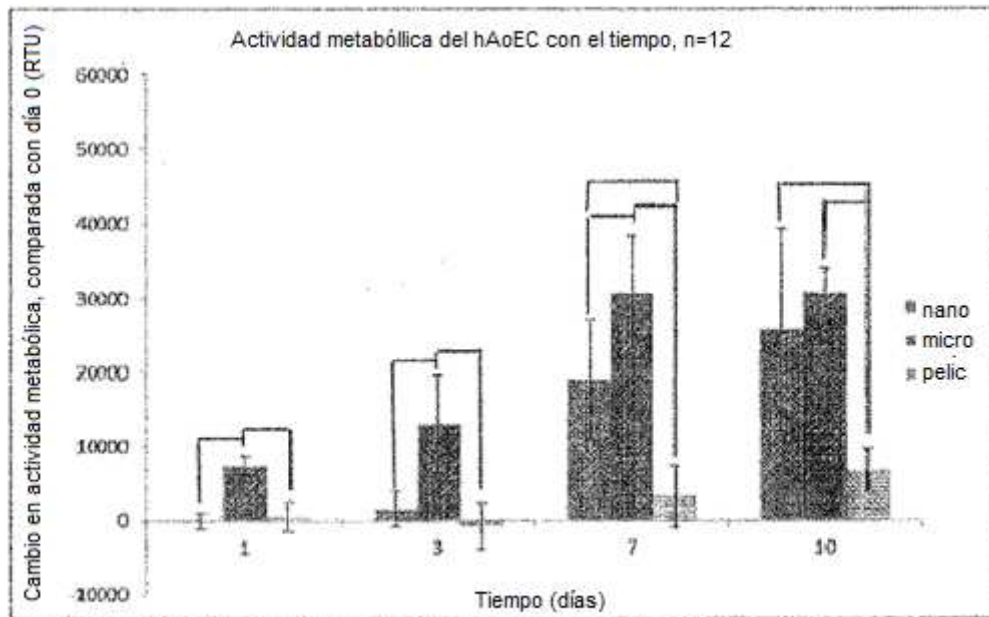


FIG. 12A

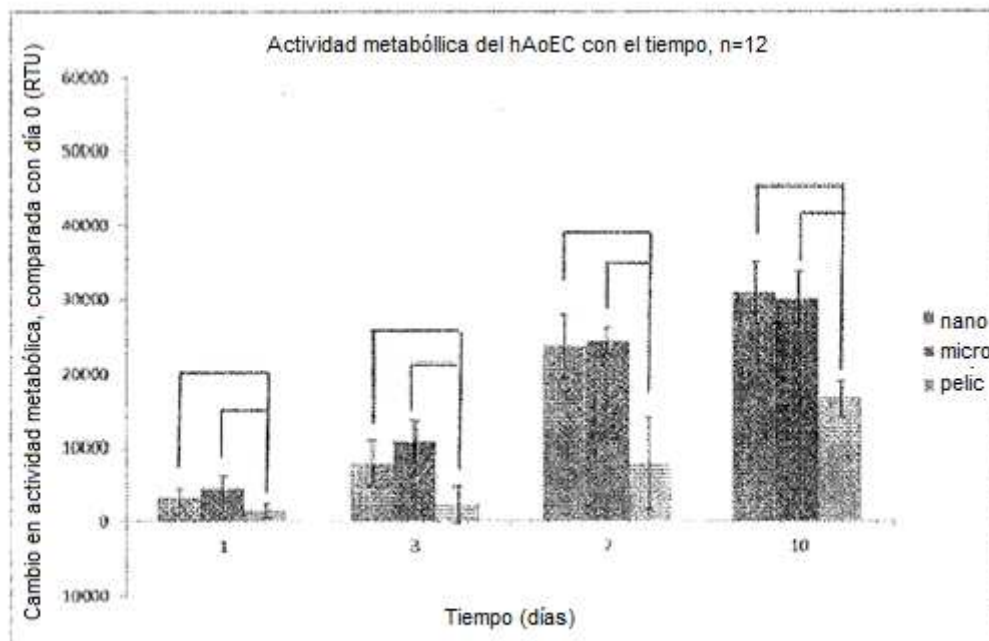


FIG. 12A

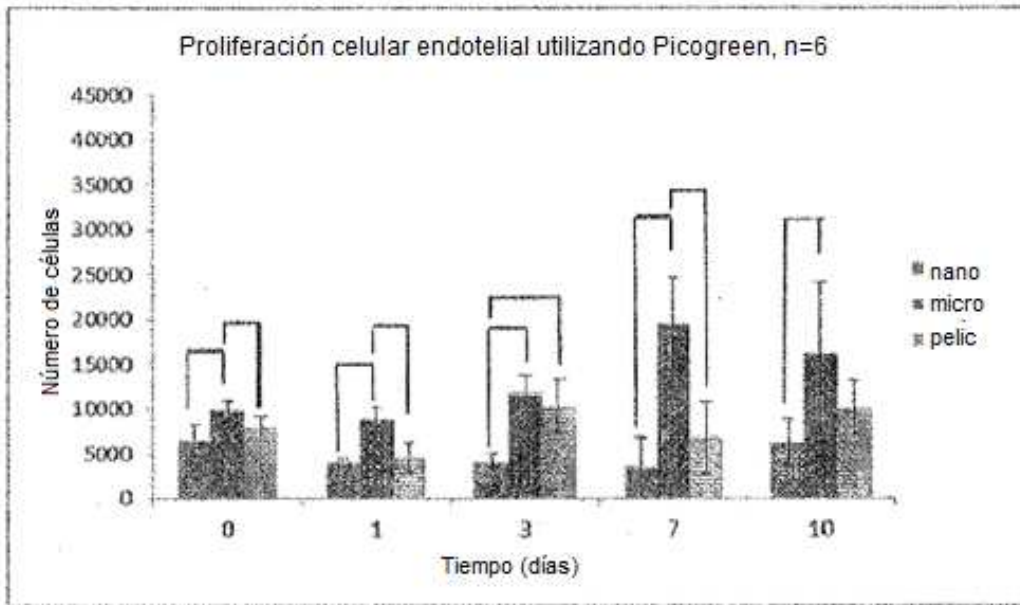


FIG. 13A

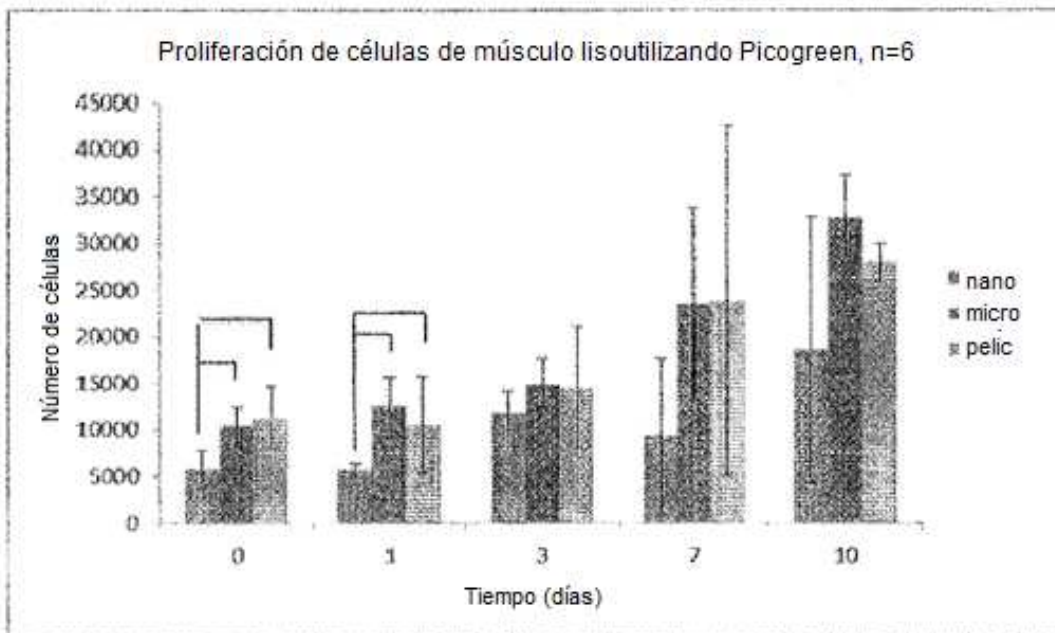
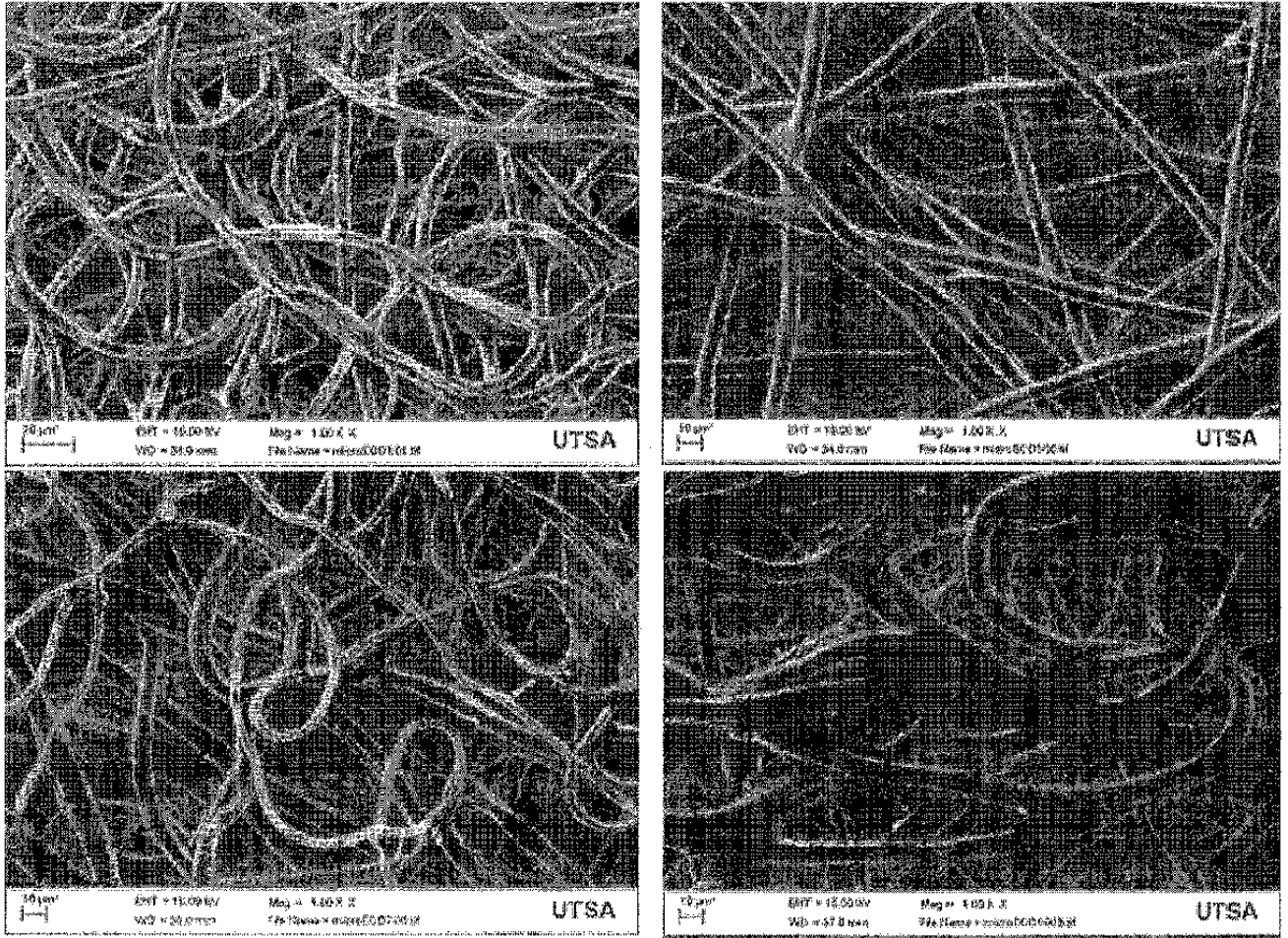
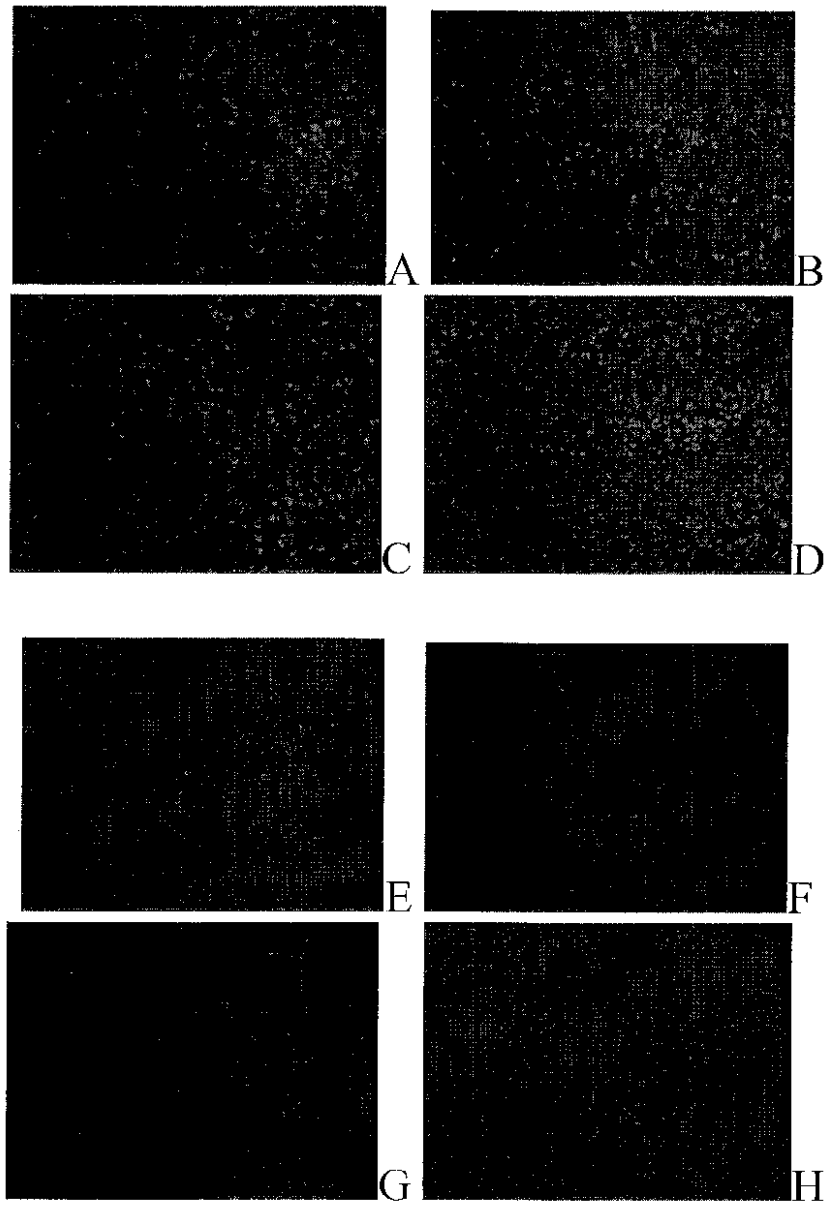


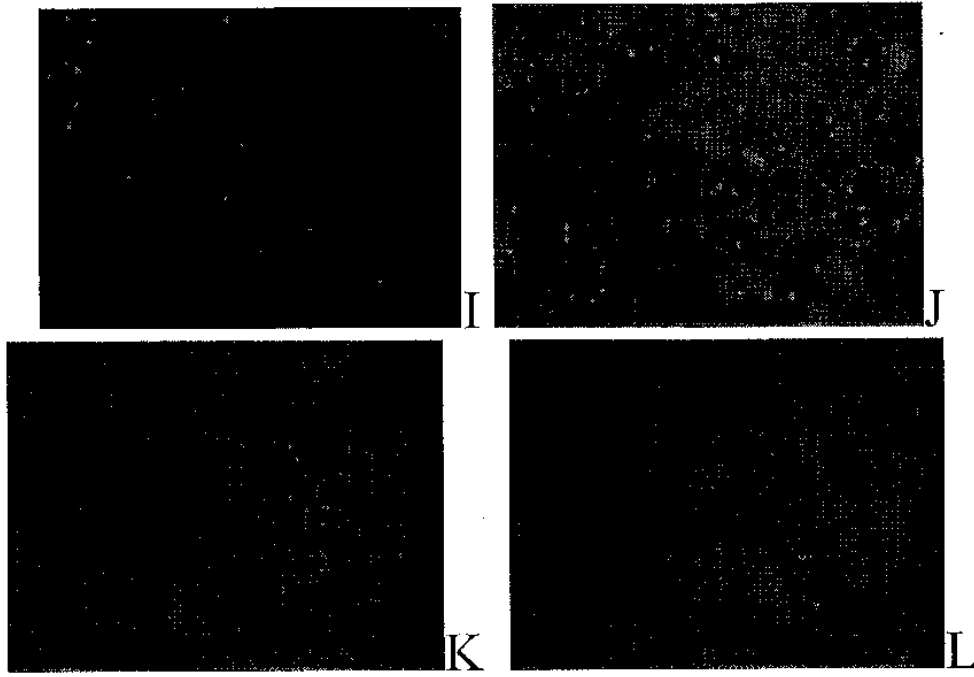
FIG. 13B



FIGS. 14A-D



FIGS. 16A-H



FIGS. 16I-L