

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 074 082**

21 Número de solicitud: 202630211

51 Int. Cl.:

A61L 27/56 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

18.02.2026

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.07.2026

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(80,00%)

Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES;
YUSTE SOSA, Iván (15,00%) y
LALATSA, Aikaterini (5,00%)

72 Inventor/es:

SERRANO LÓPEZ, Dolores Remedios;
GONZÁLEZ BURGOS, Elena María;
RAMÍREZ SAYNES, Bianca Isabel;
YUSTE SOSA, Iván;
LALATSA, Aikaterini y
SANZ RUÍZ, Pablo

54 Título: **CHIP MICROFLUÍDICO EN 3D PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE OSTEOINTEGRACIÓN/BIOINTEGRACIÓN E INFECCIONES EN SCAFFOLDS ÓSEOS Y/O COMPONENTES PROTÉSICOS EN MINIATURA**

57 Resumen:

Sistema modular 3D para el estudio de procesos de osteointegración/biointegración e infecciones en andamios óseos y/o componentes protésicos en miniatura.

La invención se refiere a un chip (1) microfluídico en 3D para el estudio de procesos de osteointegración/biointegración e infecciones en andamios óseos y/o en componentes protésicos en miniatura que incluye 2 o más cámaras (3), abiertas en su cara superior, conectadas en serie o en paralelo mediante canales (8) de flujo que conforman un conjunto con una entrada (4) común para todas las cámaras y una salida (9) común o bien con una entrada y una salida para cada cámara.

También se refiere a un sistema modular de cultivo tridimensional (organ-on-a-chip) para el estudio de infecciones, osteointegración, biointegración y modelos multiorgánicos que incluye 2 o más chips (1) microfluídicos en vertical u horizontal con una conexión hermética entre las cámaras (3) de los distintos chips (1), y su uso.

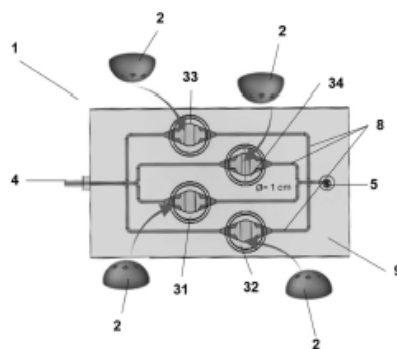


Figura 13

ES 3 074 082 A1

DESCRIPCIÓN

CHIP MICROFLUÍDICO EN 3D PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE OSTEOINTEGRACIÓN/BIOINTEGRACIÓN E INFECCIONES EN SCAFFOLDS ÓSEOS Y/O COMPONENTES PROTÉSICOS EN MINIATURA

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo de la bioingeniería, concretamente en el desarrollo de dispositivos *in vitro* para el modelado de microambientes tisulares complejos, incluyendo hueso, mucosa oral y otros tejidos. El sistema está destinado a la investigación de terapias, biomateriales y estrategias de prevención y tratamiento de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, dentales y otros dispositivos médicos, así como al estudio de la osteointegración y la biointegración.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las infecciones asociadas a implantes representan una de las complicaciones más graves en diversas especialidades médicas, especialmente en ortopedia y odontología. En artroplastias, las infecciones periprotésicas pueden comprometer la viabilidad de la prótesis y la función del miembro afectado, mientras que, en odontología, patologías como la estomatitis protésica o la periimplantitis amenazan la estabilidad y durabilidad de los implantes dentales. Estas infecciones suelen ser difíciles de tratar, implican microorganismos resistentes y pueden requerir cirugías de revisión, con elevados costes y morbilidad.

La funcionalidad y el éxito a largo plazo de un implante dependen en gran medida de su interacción con el tejido circundante. En el caso del hueso, se busca la osteointegración, definida como la unión directa y estable entre el hueso vivo y la superficie del implante, sin tejido fibroso intermedio, lo que garantiza estabilidad mecánica y durabilidad. En otros contextos, especialmente cuando el implante está en contacto con tejidos blandos como mucosa oral, piel o tejido conjuntivo, se requiere biointegración, entendida como la integración biocompatible y funcional con dichos tejidos, proporcionando un sellado eficaz frente a la entrada de microorganismos y evitando reacciones adversas.

Los modelos de cultivo celular bidimensional (2D) utilizados convencionalmente para evaluar la biocompatibilidad y la eficacia antimicrobiana de implantes y biomateriales no reproducen de forma adecuada las condiciones fisiológicas del microambiente tisular, lo que reduce la fiabilidad de los resultados y retrasa la transferencia clínica de nuevas soluciones terapéuticas.

Aunque existen plataformas de *organ-on-a-chip*, estas no permiten, en un único sistema, estudiar simultáneamente procesos de osteointegración o biointegración junto con infecciones, evaluar estrategias de prevención y tratamiento frente a patógenos específicos y simular de forma realista el flujo y el aporte de nutrientes en un entorno tridimensional.

En el estado de la técnica se han descrito diferentes dispositivos *organ-on-a-chip* para la recreación de microambientes tisulares, incluyendo entornos óseos. Por ejemplo, la patente WO2022134294 describe un chip microfluídico hidrofóbico o superhidrofóbico, desmontable y reutilizable, basado en canales micrométricos para el cultivo y adhesión celular.

La solicitud CN118374439 propone un modelo dinámico de tejido óseo basado en un canal perfundido. De forma similar, la patente CN117511739 describe un chip para órgano óseo cuya geometría incluye canales microfluídicos elaborados con biotintas

Por otro lado, US20250092345 divulga una plataforma interorgánica para sistemas microfisiológicos en chip, con acoplamiento de cámaras tisulares en paralelo integradas en un único chip.

La patente EP2914713 describe un *multi-organ chip* con mejoras en viabilidad celular y homeostasis, y con un diseño basado en capas celulares superpuestas.

Asimismo, existen desarrollos enfocados a recrear microambientes tumorales óseos, como la patente CN115651909, relativa a un modelo de órgano para osteosarcoma.

En la literatura científica se han propuesto múltiples plataformas *organ-on-a-chip* orientadas a hueso y al entorno orodental, con distintos grados de madurez para modelar infecciones. En el ámbito periimplantario oral, Dhall et al. introducen un *dental implant-on-a-chip* que permite estudiar interacciones huésped–material–patógeno en un contexto de enfermedades periimplantarias [1]; el sistema integra células gingivales y materiales relevantes, y se basa en microcanales y microtrenchs de pequeña sección.

Desde la perspectiva de la infección ósea, diversos trabajos han establecido la relevancia biológica del sistema lacuno-canalicular (OLCN) en la persistencia de *Staphylococcus aureus*; por ejemplo, se ha demostrado la invasión y tránsito de *S. aureus* por canalículos submicrométricos en modelos *in vitro* y *ex vivo*, lo que explica su evasión inmune y cronicidad en osteomielitis, hallazgos que justifican chips con control de flujo y arquitectura porosa/anisótropa, pero que no resuelven por sí mismos el ensayo integrado de infección + (osteo)integración en cámaras de gran volumen [2].

De forma transversal, las revisiones de *bone-on-a-chip* publicadas recientemente sintetizan avances en microfluídica aplicada a fisiología y patología ósea (osteoporosis, metástasis, reparación), destacando ventajas frente a 2D/animal y la necesidad de microambientes 3D perfundidos; no obstante, estos marcos suelen describir dispositivos de canal/pozo y cámaras reducidas para cultivos celulares [3,4].

En paralelo, el campo periodontal ha consolidado modelos micro(mili)-fluídicos para estudiar interacciones huésped–microbio (p. ej., *P. gingivalis*, *S. mutans*) y huésped–material, incluyendo configuraciones tipo *gum-on-a-chip* con canales estratificados que emulan surco gingival, epitelio, tejido conectivo y vasculatura; estos sistemas son valiosos para estudios de patogénesis y cribado [5].

En la literatura científica se han desarrollado diversos modelos *bone-on-a-chip* orientados a reproducir el microambiente óseo y evaluar procesos asociados a la osteointegración de implantes y biomateriales. Algunos sistemas incorporan andamios tridimensionales biomiméticos y perfusión controlada para promover la diferenciación osteoblástica y la formación de matriz mineralizada bajo condiciones de flujo fisiológicamente relevantes, lo que permite analizar la adhesión celular y la maduración tisular sobre superficies implantarias en entornos controlados [6]. Otros dispositivos han empleado *scaffolds* impresos en 3D integrados en chips microfluídicos para comparar diseños en términos de infiltración celular y mineralización, o microestructuras cerámicas que permiten estudiar simultáneamente la osteogénesis y la respuesta inmune local, factores críticos para la integración estable de un implante [7, 8]. Asimismo, se han diseñado modelos con canales que simulan hueso sano u osteoporótico para evaluar el efecto de la microarquitectura sobre la capacidad osteogénica, aspecto de gran relevancia en pacientes con hueso comprometido. En el ámbito periimplantario, se han reportado plataformas *implant-on-a-chip* que incorporan materiales de implante y células gingivales o epiteliales, en un sistema de cocultivo espacialmente separado dentro de microcanales de gran altura y utilizando la terapia de fotobiomodulación (PBM) [1].

Frente a estos trabajos, la invención descrita en esta memoria aporta (i) cámaras 3D intercambiables de hasta ~2 cm aptas para mini-implantes y *scaffolds*, (ii) perfusión controlada por cámara o entrada común para todas las cámaras, (iii) acoplamiento vertical u horizontal de chips independientes (multi-tejido), y (iv) diseño orientado a ensayos combinados de infección + osteointegración/biointegración, facilitando pruebas de tratamiento y prevención en condiciones más fisiopatológicas que los modelos microcanal convencionales.

Referencias

1. Dhall, A., et al., *A dental implant-on-a-chip for 3D modeling of host-material-pathogen interactions and therapeutic testing platforms*. Lab Chip, 2022. **22**(24): p. 4905-4916.
2. Masters, E.A., et al., *An in vitro platform for elucidating the molecular genetics of S. aureus invasion of the osteocyte lacuno-canalicular network during chronic osteomyelitis*. Nanomedicine, 2019. **21**: p. 102039.
3. Kim, M.K., et al., *Bone-on-a-Chip: Biomimetic Models Based on Microfluidic Technologies for Biomedical Applications*. ACS Biomater Sci Eng, 2023. **9**(6): p. 3058-3073.
4. Zhong, C., et al., *Advances in the Construction and Application of Bone-on-a-Chip Based on Microfluidic Technologies*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2024. **112**(12): p. e35502.
5. Sriram, G. and H. Makkar, *Microfluidic organ-on-chip systems for periodontal research: advances and future directions*. Front Bioeng Biotechnol, 2024. **12**: p. 1490453.
6. Bahmaee, H., et al., *Design and Evaluation of an Osteogenesis-on-a-Chip Microfluidic Device Incorporating 3D Cell Culture*. Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 557111.
7. Ye, S., et al., *A ceramic microbridge microfluidic chip to study osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in bioactive ceramic immune microenvironment*. Bioact Mater, 2025. **45**: p. 520-533.
8. Han, J., et al., *Development of a Scaffold-on-a-Chip Platform to Evaluate Cell Infiltration and Osteogenesis on the 3D-Printed Scaffold for Bone Regeneration*. ACS Biomater Sci Eng, 2023. **9**(2): p. 968-977.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Chip microfluídico en 3D para el estudio de procesos de osteointegración/biointegración e infecciones en *scaffolds* óseos y/o componentes protésicos en miniatura.

La presente invención proporciona un sistema modular de cultivo tridimensional fabricado mediante impresión 3D, capaz de reproducir de forma controlada y reproducible el microambiente tisular para el estudio de infecciones, osteointegración y biointegración, incluso simultáneamente, en implantes ortopédicos, dentales y otros dispositivos médicos. El sistema modular está compuesto por múltiples módulos intercambiables, que se pueden acoplar vertical u horizontalmente. Cada módulo es un chip microfluídico que contiene múltiples cámaras conectadas en serie o en paralelo mediante canales; cada cámara está diseñada para alojar un andamio biomimético o un componente protésico a escala reducida, y permite cultivar distintos tipos celulares y cocultivarlos con patógenos de interés.

En la presente memoria descriptiva se usan indistintamente los términos chip, chip microfluídico y módulo para referirse a cada uno de los chips microfluídicos que integran el sistema modular y que, además, también puede utilizarse de manera independiente. Se utiliza el término “módulo” como pieza o conjunto unitario de piezas que se repiten en una construcción de cualquier tipo, para hacerla más fácil, regular y económica; y el término “sistema modular” como conjunto de módulos que, relacionados entre sí ordenadamente, contribuyen a un determinado objeto.

También se utilizan indistintamente los términos entrada o puerto de entrada y salida o puerto de salida.

Los módulos, el sistema modular y el dispositivo permiten realizar ensayos de biocompatibilidad, toxicidad y eficacia antimicrobiana en condiciones tridimensionales más próximas a las reales que los cultivos 2D, evaluando no sólo la respuesta ósea en términos de osteointegración, sino también la interacción con tejidos blandos en términos de biointegración. Además, gracias a su diseño modular, cada módulo puede acoplarse a otros chips que representen distintos tejidos para crear sistemas modulares multiorgánicos, posibilitando el estudio de interacciones tisulares y de la respuesta a infecciones en entornos más complejos. Esta versatilidad, junto con la precisión y personalización que ofrece la fabricación mediante impresión 3D, amplía significativamente el rango de aplicaciones en investigación biomédica y en el desarrollo de nuevos materiales, recubrimientos y estrategias terapéuticas para la prevención y tratamiento de infecciones asociadas a implantes.

Cada módulo del sistema modular incluye múltiples cámaras conectadas en serie o en paralelo, que se comunican mediante un puerto de entrada común o entradas independientes, y que incluyen una abertura superior individual que permite introducir y extraer elementos de ensayo de forma sencilla y controlada. Estas cámaras están dimensionadas para alojar

elementos de ensayo intercambiables que pueden consistir, alternativamente, en un andamio o *scaffold* biomimético impreso en 3D con materiales como la policaprolactona (PLC) o la policaprolactona y la hidroxiapatita (PCL–HA), que reproduce las propiedades estructurales y mecánicas del hueso, o bien en un componente protésico en escala reducida, ortopédico o dental, como un acetábulo de titanio o un implante dental, con un diámetro comprendido en el intervalo de entre 2 mm y 20 mm. La geometría interna del chip permite optimizar el flujo del medio de cultivo a través de las cámaras mediante un conjunto de canales, garantizando un aporte constante de nutrientes y oxígeno y la eliminación de residuos metabólicos, reproduciendo así de manera fiel las condiciones fisiopatológicas que se dan *in vivo*. Para la elaboración del chip se puede utilizar cualquier material rígido, resistente al desgaste, biocompatible y que se pueda utilizar en impresión 3D, como pueden ser resinas quirúrgicas (por ejemplo, las resinas comerciales Formlabs Surgical Guide Resin, NextDent SG (3D Systems), Detax Freeprint® MED, EnvisionTEC E-Guide Tint), los polímeros de muy altas prestaciones (como polietere tercetona o polietere quetincetona, PEEK/PEKK, de la familia poliarileter tercetona, PAEK, así como PLA (ácido poliláctico), ABS (acrilonitrilo-butadieno-estireno) y/o COC (copolímero de cicloolefina).

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un chip microfluídico, o módulo, en 3D para el estudio de procesos de osteointegración/biointegración e infecciones en *scaffolds* óseos y/o en componentes protésicos en miniatura que incluye 2 o más cámaras que presentan una abertura superior, tienen un diámetro de hasta 2 cm y que, cuando hay más de 2 cámaras, pueden estar conectadas en serie o en paralelo mediante canales de flujo; y un conjunto de canales de flujo que presenta al menos una entrada y, al menos, una salida. El número de cámaras preferido es entre 4 y 8 y pueden estar dispuestas de distintas maneras:

- conectadas secuencialmente en grupos de, al menos, dos cámaras; en este caso, pueden tener tamaños diferentes, especialmente, pueden tener dos tamaños diferentes en todos los grupos;
- con una única entrada de flujo y una única salida, entrada que se divide en tantos canales de flujo como cámaras tiene el chip y canales de flujo que se vuelven a unir en una única salida.

Además, el chip microfluídico, o módulo, en 3D puede contar con uno o varios elementos de conexión hermética a uno o más módulos, situados bien en la superficie superior y/o inferior del módulo o bien en las superficies laterales del módulo.

Por otro lado, el chip microfluídico, o módulo, en 3D puede incluir en una o más cámaras un elemento de ensayo que puede ser un *scaffold* biomimético tridimensional y/o un componente protésico en miniatura que puede llegar a tener un diámetro de 2 cm. Los *scaffold*,
5 preferentemente, se elaboran con policaprolactona (PCL) o con PCL + hidroxiapatita (HA). Los componente/s protésico/s se seleccionan del grupo formado por: componentes acetabulares ortopédicos, implantes dentales y/o coronas dentales.

Dos o más chips microfluídicos se pueden unir dando lugar a un sistema modular 3D. En
10 estos sistemas modulares 3D el conjunto de canales de flujo de dos o más módulos o chips microfluídicos pueden estar interconectados.

Otro aspecto de la invención se refiere a un dispositivo que incluye uno o más chips microfluídicos o un sistema modular y, además, incluye tubos de entrada y salida, una o varias
15 bombas peristálticas y al menos un reservorio de medio para el control del flujo en el conjunto de canales.

El sistema modular, así como cada módulo y el dispositivo, admiten el cultivo de distintos tipos celulares, incluyendo osteoblastos, fibroblastos gingivales, queratinocitos orales y otros tipos
20 relevantes según la aplicación, así como el cocultivo con patógenos de interés médico como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis* o *Streptococcus mutans*, entre otros, para modelar procesos infecciosos en implantes ortopédicos y dentales. Mediante la abertura superior de cada cámara, es posible aplicar directamente sobre el andamio o el componente protésico diferentes formulaciones terapéuticas o preventivas,
25 como recubrimientos antimicrobianos, sistemas de liberación controlada de fármacos o agentes osteoinductores, evaluando su eficacia y toxicidad en un entorno más representativo que los modelos convencionales en 2D.

De igual modo, tanto el sistema modular como cada módulo o el dispositivo, se pueden utilizar
30 para la evaluación *in vitro* de procesos de osteointegración, biointegración, eficacia o prevención de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, dentales u otros dispositivos médicos.

Así, otro aspecto de la invención se refiere a un método de evaluación *in vitro* de procesos de
35 osteointegración, biointegración y/o de tratamiento o prevención de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, dentales u otros dispositivos médicos que comprende:

- a) diseñar un chip microfluídico y un elemento de ensayo, en función de la aplicación deseada, como los descritos en esta memoria;

- b) fabricar el chip y el elemento de ensayo del paso a) mediante impresión tridimensional con materiales biocompatibles;
 - c) sembrar el elemento de ensayo con células humanas o animales;
 - 5 d) introducir el elemento de ensayo sembrado en una cámara del chip a través de la abertura superior de la cámara;
 - e) incorporar formulaciones terapéuticas o preventivas a través de la abertura superior de la cámara;
 - f) conectar el chip a un sistema de flujo controlado mediante tubos de entrada y salida,
 - 10 bomba peristáltica y reservorio de medio;
 - g) evaluar la capacidad de osteointegración y/o la actividad antimicrobiana *in vitro* bajo perfusión de un flujo controlado de las formulaciones terapéuticas o preventivas de paso e).
- 15 Opcionalmente, sobre el elemento de ensayo se puede desarrollar un biofilm, para ampliar los análisis.

Uniendo dos o más chips y conectándolos mediante elementos de conexión hermética se puede elaborar un sistema modular 3D en el que realizar ensayos *in vitro* de procesos de

20 osteointegración, biointegración y/o de tratamiento o prevención de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, dentales u otros dispositivos médicos. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método que comprende:

- a) diseñar dos o más chips microfluídicos como los descritos en esta memoria y dos o más elemento de ensayo en función de la aplicación deseada;
- 25 b) fabricar los chips y los elementos de ensayo del paso a) mediante impresión tridimensional con materiales biocompatibles;
- c) sembrar los elementos de ensayo de cada chip con células humanas o animales de igual o distinto origen
- d) introducir los elementos de ensayo sembrados con células de un mismo origen en las
- 30 cámaras de cada uno de los chips a través de la abertura superior de la cámara;
- e) incorporar formulaciones terapéuticas o preventivas a través de la abertura superior de la cámara;
- f) conectar los distintos chips mediante los elementos de conexión hermética formando un sistema modular;
- 35 g) conectar el sistema modular del paso f) a un sistema de flujo controlado mediante tubos de entrada y salida, bomba peristáltica y reservorio de medio;

h) evaluar la capacidad de osteointegración y/o la actividad antimicrobiana *in vitro* bajo perfusión de un flujo controlado de las formulaciones terapéuticas o preventivas de paso e).

5 Preferentemente, las células humanas o animales utilizadas son osteoblastos. En el caso de los microorganismos, pertenecen a la especie *Candida albicans*. Y, antes incorporar formulaciones terapéuticas o preventivas a través de la abertura superior de la cámara, se puede desarrollar un biofilm sobre el elemento de ensayo.

10 El sistema modular permite acoplar varios chips de forma vertical u horizontal para simular la interacción entre distintos tejidos, por ejemplo, colocando en el chip inferior un modelo de hueso o implante, en uno intermedio tejido muscular o conjuntivo, y en el superior piel o mucosa oral. Cada chip puede disponer de circuitos de flujo independientes o interconectados, lo que posibilita el cultivo con medios de cultivo específicos para cada tipo
15 celular a la vez que se estudian las interacciones tisulares.

La invención presenta una serie de ventajas significativas frente a los modelos *in vitro* convencionales. Su versatilidad permite su aplicación en múltiples áreas, incluyendo ortopedia, odontología y el estudio de tejidos como piel y mucosa, adaptándose a diferentes
20 necesidades de investigación. Al reproducir de manera más fiel las condiciones fisiopatológicas del microambiente tisular, ofrece resultados más representativos que los obtenidos en cultivos bidimensionales (2D), lo que aumenta la fiabilidad de los experimentos. Su diseño modular facilita la realización de ensayos en paralelo y por triplicado, optimizando el tiempo y la reproducibilidad experimental. La fabricación mediante impresión 3D posibilita
25 una producción rápida, precisa y altamente personalizable, permitiendo modificar el diseño según el tipo de estudio. Todo ello convierte al sistema modular y a cada módulo en una herramienta idónea tanto para la investigación preclínica como para el desarrollo y validación de nuevos productos médicos.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de
35 dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Diseño e impresión 3D del chip microfluídico mediante estereolitografía (SLA) (Figuras 1a-c) fabricado con cuatro cámaras (3) de 6 mm de diámetro, una entrada común (4) dividida en 4 canales (8) que alimentan cada una de las cámaras (3) y con una salida (5) común de medio (a) vista superior y lateral del diseño del sistema modular para cultivo 3D; (b) vista superior y lateral del diseño en el *software* Autodesk Fusion 360 del sistema modular para cultivo 3D; (c) imagen del chip microfluídico impreso en 3D mediante SLA; (d) vista superior de un chip microfluídico diseñado con cuatro cámaras (3), con cuatro entradas (4) independientes que alimentan las 4 cámaras (3) y cuatro salidas (5) independientes; (e) imagen del chip microfluídico descrito en (d) impreso en 3D mediante modelado por deposición fundida (MDF); (f) vista superior de un chip microfluídico diseñado con seis cámaras (3), con seis entradas (4) independientes que alimentan cada una de las cámaras (3) y seis salidas (5) independientes; (g) vista lateral del chip descrito en (f); (h) vista superior de un chip microfluídico diseñado con cuatro cámaras (3), con cuatro entradas (4) independientes que alimentan las 4 cámaras (3) y cuatro salidas (5) independientes; (i) vista lateral del chip descrito en (h); (j) vista superior de un chip microfluídico diseñado con cuatro cámaras (3), con cuatro entradas (4) independientes que alimentan las 4 cámaras (3) que a su vez están interconectadas con otra cámara secuencial para albergar prótesis (2) en miniatura y posteriormente conectadas con cuatro salidas (5) independientes; (k) vista lateral del chip descrito en (j).

Figura 2. Viabilidad celular (VC (%)) de las líneas celulares hFOB 1.19 (a) y células Saos-2 (b) tras 24 horas de exposición a discos impresos en 3D mediante SLA con la resina BioMed Clear de Formlabs (R); frente al control (C).

Figura 3. Diseño CAD (A) e imágenes de *scaffolds* para andamiaje celular de PCL (B) y PCL con hidroxiapatita (PCL-HA) (C) impresos en 3D mediante FDM.

Figura 4. Resistencia mecánica de los *scaffolds* de PCL y de PCL-HA expresada como el módulo de Young (M. Young (Mpa)).

Figura 5. Representación esquemática de la siembra celular en los *scaffolds*: siembra celular (C), adhesión (A) y adición del medio (M).

Figura 6. Actividad metabólica, en porcentaje de Alamar Blue reducido (%), de células hBMSC, Saos-2 y hFOB 1.19 en *scaffolds* de PCL y PCL-HA en los días 1, 7 y 21 después de la siembra celular. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) están expresadas mediante *.

Figura 7. Proliferación y morfología celular en *scaffolds* de PCL y de PCL-HA. (a) Imágenes de microscopía confocal de hBMSCs, células Saos-2 y células hFOB 1.19 en *scaffolds* de PCL y PCL-HA en los días 1, 7 y 21 después de la siembra celular. Clave: Las células vivas se muestran en verde y las células muertas en rojo; (b) Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de *scaffolds* de PCL-HA con células hFOB 1.19 a 66x; (c) Imágenes de SEM de *scaffolds* de PCL-HA con células hFOB 1.19 a 6293x.

Figura 8. Cuantificación del contenido de ADN (ng) en los *scaffolds* el día 21 tras la siembra con las diferentes líneas celulares. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) están expresadas mediante *.

Figura 9. Deposición de calcio en los *scaffolds* el día 21 tras la siembra celular. (a) imágenes de *scaffolds* de PCL y PCL-HA después de la tinción con rojo de alizarina, tomadas con un microscopio óptico a 1x; (b) porcentaje de deposición de calcio (Ca (%)) en la superficie de los *scaffolds*. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) están expresadas mediante *.

Figura 10. Comparación de la viabilidad celular (VC (%)) con diferentes formulaciones farmacéuticas incluyendo implantes parenterales y principios activos testada en cultivo 2D en placas de 48 pocillos y en el sistema modular con el and (amajaje de PCL-HA tras 48 horas. Clave: C, control, UI, implante sin fármaco, VI, implante cargado con vancomicina, AI, implante cargado con anfotericina B (AmB), VAI, implante cargado con vancomicina y AmB, V, vancomicina, A, AmB, VAI, vancomicina y AmB, T, triton, CP, control en la placa, CC, control en el sistema modular. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) están expresadas mediante *.

Figura 11. Formación de biofilm (B) en *scaffolds* de PCL-HA con células HFOB 1.19. (a) Número de UFC (unidades formadoras de colonias) en los *scaffolds* después de 48 horas de cultivo con *C. albicans*; (b) Imágenes de SEM de *scaffolds* de PCL-HA con células hFOB 1.19 y *C. albicans* a 140, 400 y 1400x, tras 48 horas de cultivo.

Figura 12. Evaluación de la eficacia de implantes parenterales testados con el sistema modular de cultivo en 3D con el andamiaje de PCL-HA contra la formación y eliminación de biofilms tras 48 horas. (a) Test de profilaxis. Los implantes parenterales se colocan en el mismo momento en que se realiza la inoculación de *Candida*. Clave: control (C), implante sin carga de fármaco (ISC), implantes cargados con AmB (IA), implantes cargados con VAN y

AmB (IVA), AmB (A), VAN y AmB (VA); (b) Test de tratamiento. Los implantes se colocan sobre el biofilm ya formado durante 48 h dentro del sistema modular. Clave: control (C), implantes sin cargar, implantes cargados con AmB, implantes cargados con VAN y AmB, AmB, VAN y AmB. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) están expresadas mediante *.

Figura 13. Vista superior del diseño de un chip microfluídico (1) impreso mediante SLA con prótesis articulares de titanio (2) impresas a pequeña escala con *selective laser melting* (SLM) adaptadas al espacio de las cámaras (3) del chip, se muestra la entrada de medio (4).

Figura 14. Evaluación de la eficacia de implantes parenterales testados frente a *Candida* con el sistema modular de cultivo en 3D tras 48 h conteniendo prótesis de titanio fabricadas a pequeña escala adaptados al espacio de la cámara del chip. Clave: (C) Control sin formulación, (T) Test de Tratamiento y (P) Test de profilaxis. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) están expresadas mediante *.

Figura 15. Representación esquemática del sistema modular multichip con 3 chips microfluídicos (11, 12 y 13) con acoplamiento vertical. a) Vista lateral de la plataforma con tres entradas (41, 42 y 43) de medio y tres salidas (51, 52 y 53) de medio independientes y con tres cámaras que reproducen el módulo óseo/implante protésico (21), el módulo muscular o de tejido conjuntivo (22) y el módulo de piel/mucosa oral (23) b) vista lateral de la plataforma desde otro ángulo; c) vista superior del sistema modular, d) vista del juego de tornillos (6) y tuercas (7) de cada módulo que permiten el acoplamiento de los diferentes chips (11, 12 y 13) en vertical.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance

Ejemplo 1. Este ejemplo se refiere al diseño e impresión 3D de varios chips microfluídicos (Figura 1).

Ejemplo 1.1. Diseño e impresión 3D de un chip microfluídico mediante SLA con la resina BioMed Clear de Formlabs (Figura 1a-c).

Se diseñó un chip microfluídico (1) utilizando el programa Autodesk Fusion 360 (Autodesk®, Mill Valley, CA, EE. UU.) con una longitud total de 70 mm, una profundidad de 40 mm y una altura de 8 mm (Figura 1a). El chip (1) se realizó con una única entrada o puerto de entrada (4) que se divide en cuatro canales (8) de 1 mm de diámetro, los cuales se abren en cuatro pocillos o cámaras (3) independientes de 6 mm de diámetro y 6 mm de altura, con la cara superior destapada, lo que permite colocar y retirar los *scaffolds* o las prótesis en miniatura durante los experimentos, cuando sea necesario. El diseño del chip (1) en Autodesk Fusion 360 se exportó a un archivo digital de lenguaje de teselación estándar (.stl). Este archivo se importó al *software* Anycubic Photon Slicer (Anycubic®, Shenzhen, China). El archivo stl. se convirtió al formato de archivo pwm (Figura 1b) antes de la impresión mediante SLA.

Se utilizó la impresora Anycubic® Photon Mono X SLA (Anycubic®, Shenzhen, China) para imprimir los chips (1) mediante fotopolimerización utilizando la resina de Formlabs Biomed Clear a 405 nm. La resina solidificada se adhirió inicialmente a una plataforma metálica y las demás capas se adhirieron a esta primera capa, creando el objeto deseado. El espesor de cada capa fue de 0,1 mm. Las primeras seis capas fueron expuestas a la luz ultravioleta durante más tiempo que las demás (70 s) para asegurar una buena fijación a la plataforma metálica. Las capas restantes se expusieron a luz ultravioleta durante 5,5 s. Una vez impresos, los chips (1) se lavaron en isopropanol durante 15 minutos y se curaron con luz ultravioleta durante 1 h con Anycubic Wash and Cure 2.0 (Anycubic®, Shenzhen, China) para eliminar cualquier residuo de resina no polimerizada.

Tras la impresión 3D se observa que el chip (1) microfluídico presenta una alta definición con todos los canales (8), el puerto de entrada (4) y el puerto de salida (5) abiertos y con un alto grado de correlación con el diseño (Figura 1c).

Además del chip mostrado en las Figuras 1a-c, se muestran otros chips (1) con distintos tamaños de las cámaras (3) para adaptarlos a las dimensiones del producto a albergar y con otras disposiciones de canales y puertos de entrada y de salida.

Ejemplo 1.2. En la Figura 1d, se muestran chips (1) con cámaras de 10 mm de diámetro x 10 mm de altura. En este ejemplo la entrada no es común, sino que se trata de cuatro entradas (4) independientes una para cada una de las cámaras (3); por otro lado, el chip (1) presenta cuatro salidas (5) que también son independientes. Esto permite tener un control individualizado del flujo que atraviesa cada cámara (3), aunque requiere de más bombas peristálticas que en el ejemplo 1.1 o de un divisor de flujo conectado a la salida de las bombas.

En la Figura 1e) se muestra la imagen del chip (1) impreso en 3D mediante MDF y utilizando un copolímero de cicloolefina (Creamelt®) para realizar la impresión 3D mediante MDF.

Ejemplo 1.3. En la Figura 1f, se demuestra que el número de cámaras (3) por chip (1) es adaptable según el diseño a realizar. En este caso se muestra un chip (1) con 6 cámaras (3) de 10 mm de diámetro x 10 mm de altura alimentadas por seis entradas (4) independientes que alimentan cada una de las cámaras (3) y seis salidas (5) independientes; la Figura 1g muestra una vista lateral de este mismo chip (1).

Ejemplo 1.4. En la Figura 1h, se muestra un chip (1) semejante al del ejemplo 1.2, pero con cámaras de 20 mm de diámetro x 20 mm de altura. La Figura 1i muestra una vista lateral de este mismo chip (1).

Ejemplo 1.5. En la Figura j, se muestra el diseño de un chip (1) que tiene dos cámaras (3) acopladas de forma secuencial. La primera cámara (35) está destinada a la colocación de un *scaffold*/cemento óseo (2) con formulación y la segunda cámara (36) sirve para introducir una prótesis (2) en miniatura con biofilm adherido en su superficie. La Figura 1k muestra una vista lateral de este mismo chip (1).

Ejemplo 2. Este ejemplo se refiere a la desviación de las dimensiones del chip (1) elaborado según el Ejemplo 1.1 con respecto al diseño tras la impresión 3D mediante SLA y mostrado en las Figuras 1a-c.

Después de la impresión 3D, se inspeccionó visualmente la geometría del chip (1) y se midieron las dimensiones con un pie de rey para evaluar el grado de correlación con el diseño CAD. Los diámetros de los canales (8) y los pocillos o cámaras (3) se midieron con el *software* ImageJ (Bethesda, MD, EE. UU.) para analizar la desviación del diseño CAD durante el proceso de impresión 3D. El sistema modular presentó unas dimensiones con una alta correlación superior al 98% respecto al diseño establecido inicial. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

	Dimensiones del chip en mm (Longitud x profundidad x altura)	Diámetro canal (mm)	Diámetro cámara (mm)
Diseño	70 x 40 x 8	1	6
Chip impreso	69.5 ± 0.17 x 39.8 ± 0.1 x 7.9 ± 0.1	0.98 ± 0.06	5.93 ± 0.13

Tabla 1. Correlación entre las medidas del diseño y las del chip (1) microfluídico para cultivo 3D tras la impresión.

Ejemplo 3. Este ejemplo se refiere a la biocompatibilidad de la resina de Formlabs BioMed Clear empleada para la fabricación del chip mostrado en las Figuras 1a-c con células Saos-2 y la línea celular hFOB 1.19 (Figura 2).

5 La toxicidad de la resina se evaluó utilizando discos impresos en 3D (13 mm de diámetro y 1 mm de altura) utilizando la resina de Formlabs BioMed Clear. Los discos se imprimieron utilizando los mismos parámetros que para el chip (1) microfluídico así como la etapa de postprocesamiento. Como prueba de concepto, se utilizaron las líneas celulares Saos-2 (osteosarcoma humano) y hFOB 1.19 (osteoblastos humanos). Las células se sembraron en
10 placas de 24 pocillos, a una densidad de 10^5 células/pocillo para células Saos-2, y a una densidad de 10^6 células/pocillo para células hFOB 1,19. Después de 24 horas, se colocó un disco impreso en cada pocillo. Como controles se utilizaron pocillos sin discos. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se empleó el ensayo con MTT (bromuro de tiazolilo azul) para determinar la viabilidad celular en presencia y ausencia de los discos. Se añadió una
15 solución madre de MTT (2 mg/ml en PBS) a cada pocillo (500 µl) y se incubó durante 1 h. Después de la incubación, los cristales de formazán formados se disolvieron usando DMSO. Finalmente, se determinó la absorbancia a 550 nm utilizando un lector de microplacas Spectrostar BMG (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). La viabilidad celular se expresó como porcentaje (%) en comparación con las células de control (C) (100% de la viabilidad celular).

20 Los resultados mostraron que después de 24 horas de exposición a los discos impresos en 3D con la resina (R) BioMed Clear, no hubo una reducción significativa en la viabilidad de las células hFOB 1.19 y Saos-2, lo que demuestra la biocompatibilidad de la resina seleccionada para la impresión 3D del sistema modular microfluídico.

25 **Ejemplo 4.** Este ejemplo se refiere al diseño e impresión 3D de *scaffolds* de PCL y PCL-HA mediante FDM (Figura 3).

El *scaffold* se diseñó utilizando Autodesk Fusion 360 con 6 mm de diámetro, una altura de 2
30 mm con poros cuadrados de 400 x 400 µm y un ancho de las fibras de 200 µm (Figura 3A). El *scaffold* constaba de 10 capas, con un grosor de capa de 200 µm. La orientación de las fibras en cada capa era perpendicular a la orientación de las fibras de la capa anterior. Todas las dimensiones se describen en detalle en la Tabla 2. El diseño se exportó a un archivo digital en lenguaje de teselación estándar (.stl). Este archivo se importó al *software* BioCAD (Regen
35 HU, Suiza) y se convirtió a G-Code.

Se utilizaron dos materiales diferentes para imprimir los *scaffold*, PCL (Figura 3B) y una combinación de PCL e hidroxiapatita (HA) (70:30, p:p) (Figura 3C), empleando en ambos casos PCL granulado. Para la elaboración del *scaffold* se disolvieron 3,5 g de PCL en 20 ml de diclorometano en un frasco de vidrio cerrado con agitación magnética durante al menos 3 horas. Una vez que el PLC se disolvió completamente, se agregaron lentamente 1,5 g de HA a la solución, manteniendo la agitación durante 2-3 horas en un recipiente cerrado. Una vez que la HA se dispersó completamente, se abrió la botella para permitir una evaporación parcial del disolvente para aumentar la viscosidad de la solución (~30 min). Una vez que aumentó la viscosidad, se detuvo la agitación permitiendo la eliminación de las burbujas durante 10 min. Luego, la solución se añadió a una placa de politetrafluoroetileno (PTFE) y se dejó destapada durante toda la noche para que se evaporara el disolvente. Cuando el disolvente se evaporó por completo, se obtuvo una película homogénea de PCL-HA, la cual se cortó en pequeños trozos (< 1 mm) que se utilizaron como gránulos para la impresión FDM.

Se utilizó la impresora RegenHu 3D Discovery FDM para imprimir los *scaffolds*. La temperatura del tanque del extrusor FDM se fijó en 90°C para *scaffolds* que contenían solo PCL y 110°C para PCL-HA mientras que la temperatura de la boquilla fue de 70°C para PCL y 90°C para PCL-HA, con una presión de 3 bar, una velocidad de 40 mm/s y una tasa de alimentación de 15 rpm. El material fundido se depositó sobre un portaobjetos de vidrio utilizando una aguja de 25G (260 µm).

Tras la impresión 3D de los *scaffolds* se observó una mayor desviación con las dimensiones del diseño. Durante la impresión FDM y la deposición del material, se produjo la expansión del mismo, provocando un aumento en el diámetro de las fibras y un menor tamaño en los poros establecidos en el diseño.

Ejemplo 5. Este ejemplo se refiere a la desviación de las dimensiones del *scaffold* con respecto al diseño inicial tras la impresión 3D mediante FDM.

Después de la impresión 3D según se describe en el Ejemplo 4, se analizaron las imágenes de los *scaffolds* con el *software* ImageJ para analizar la desviación del diseño CAD durante el proceso de impresión 3D y evaluar la apertura de los poros final obtenida (n=3). Los *scaffolds* de PCL tuvieron una reducción del tamaño de los poros del 50 %, mientras que los *scaffolds* de PCL-HA tuvieron una reducción del 25 %. En relación al grosor de las fibras, en los *scaffolds* de PCL aumentó doble, pero los *scaffolds* de PCL-HA lo mantuvieron similar al diseño inicial de CAD. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

	Diámetro <i>scaffold</i> (mm)	Poro (mm)	Fibra (mm)
Diseño CAD	6	0.4	0.2
<i>Scaffold</i> PLC	6.51 ± 0.20	0.15 ± 0.04	0.46 ± 0.02
<i>Scaffold</i> PLC-HA	6.21 ± 0.19	0.30 ± 0.03	0.36 ± 0.02

Tabla 2. Correlación de las dimensiones del diseño CAD de los *scaffolds* y los *scaffolds* impresos en 3D. Se muestran los valores de la media ± desviación estándar (DE) (n=3).

10 **Ejemplo 6.** Este ejemplo se refiere a la resistencia mecánica de los *scaffolds* de PCL y los *scaffolds* de PCL-HA (Figura 4).

Para evaluar la resistencia mecánica de los *scaffolds* se utilizó el equipo Zwick Z005 (columna única Zwick, Roell, Alemania) con una celda de carga de 2,5 KN. El módulo de Young (Mpa) se determinó aplicando una deformación de compresión libre del 75% con un desplazamiento en rampa de 0,001 mm/s. Para asegurar el contacto entre la superficie de los *scaffolds* (n = 4 por grupo) y la placa de compresión superior del equipo de medida, se utilizó una precarga de 1,5 N. En aquellos casos en los que los *scaffolds* tenían un diámetro superior al de las cámaras (Tabla 2), tanto en este ejemplo como en los siguientes, los *scaffolds* se introdujeron en las cámaras ejerciendo presión, lo que evita que el flujo de medio los mueva.

La adición de HA a los *scaffolds* resultó en un aumento en su rigidez, con valores más altos del módulo de Young. Sin embargo, este aumento no fue significativo, lo que puede estar relacionado con las pequeñas dimensiones de los *scaffolds*.

25 **Ejemplo 7.** Este ejemplo se refiere al procedimiento de sembrado de las células hBMSCs, Saos-2 y hFOB 1.19 en los *scaffolds* y la planificación de los distintos experimentos para evaluar el proceso de osteointegración y la idoneidad de los *scaffolds* como matriz ósea (Figura 5).

30 Se emplearon células hBMSC, Saos-2 y hFOB 1.19, así como dos tipos de materiales, PCL y PCL-HA, para evaluar la biocompatibilidad del *scaffold* impreso en 3D como matriz ósea. Se realizaron las pruebas *alamar blue*, *live/dead*, *picogreen* y *alizarin red* para la evaluación de la actividad metabólica, proliferación, contenido de ADN y deposición de calcio, respectivamente. Se utilizó además microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar la morfología celular (n = 4 para cada experimento y tipo de *scaffold*).

Los *scaffolds* se esterilizaron antes de sembrar las células. Se seleccionaron los *scaffolds* y se insertaron individualmente en placas de 48 pocillos dentro de bolsas de esterilización de papel de Cardinal Health (Cardinal Health, Dublin, OH). Una vez selladas las bolsas, se colocaron y esterilizaron en un esterilizador de óxido de etileno (EtO) (Anprolene, productos Anderson, Reino Unido). Después de la esterilización, los *scaffolds* se transfirieron a una campana de flujo laminar y se colocaron en placas de 48 pocillos, lavándolos 3 veces con PBS 1x y cubriéndolos posteriormente con 500 µl de medio de cultivo. El medio de cultivo para las células hBMSCs fue DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) con alta concentración de glucosa y GlutaMAX™, DMEM para las células Saos-2 y DMEM/F12 50/50 con L-glutamina, sin HEPES y sin rojo de fenol para las células hFOB 1.19. Todos estos medios de cultivo se suplementaron con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de penicilina/estreptomicina. Simultáneamente, se colocaron 200 µl de solución de agarosa al 4% en otra placa de 48 pocillos, para evitar la unión de las células a la superficie del pocillo, que luego se cubrió con 500 µl de medio de cultivo. Las placas se mantuvieron en una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se eliminó el medio de cultivo y los *scaffolds* se colocaron en los pocillos recubiertos de agarosa.

Después de colocar los *scaffolds* en las placas con los pocillos recubiertas de agarosa, se agregaron 20 µl de medio de cultivo con 10⁵ células a la superficie de cada *scaffold* (C). Las placas se incubaron durante 3-4 horas para permitir la adhesión celular (A). Posteriormente, se agregaron 500 µl de medio a cada pocillo (M). El medio se cambió 24 horas después de la siembra celular por medio osteogénico, el cual se cambió dos veces por semana y se preparó inmediatamente antes de su uso. El medio osteogénico consistió en β-glicerolfosfato, dexametasona, ácido ascórbico y medio de cultivo. Los *scaffolds* se mantuvieron en incubación en una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO₂ a 37°C durante un máximo de 21 días, y se realizaron diferentes ensayos, que se describen en los siguientes ejemplos, los días 1, 7 y 21.

Ejemplo 8. Este ejemplo se refiere a la actividad metabólica de las células hBMSCs, Saos-2 y hFOB 1.19 en los *scaffolds* los días 1, 7 y 21 tras la siembra según se describe en el Ejemplo 7 (Figura 6).

La actividad metabólica se evaluó mediante el ensayo *alar blue*, que se realizó los días 1, 7 y 21 después de la siembra celular en los *scaffolds*. El *alar blue* es una solución a base de resazurina que se reduce a resorufina (producto fluorescente) después de su absorción por las células vivas. La actividad metabólica es proporcional a la intensidad de la

fluorescencia. En la Figura 6 se indica en porcentaje (%) en relación con los resultados del día 1 en *scaffolds* de PCL. Después de lavar los *scaffolds* con PBS, se añadió a cada uno una solución de *alamar blue* en medio seguido de una incubación de 4 h. La absorbancia se leyó por triplicado a 570 nm con un lector multimodo Synergy HTX (Agilent Technologies, EE. UU.).

Desde el primer día (D1) después de la siembra de células en los *scaffolds*, la actividad metabólica aumentó en todos los tipos de células. Sin embargo, durante los 21 días, sólo las células hBMSC mostraron un incremento lineal constante. Por el contrario, las células Saos-2 y hFOB 1.19 mostraron una reducción de la actividad metabólica a los 21 días. Cabe destacar que la incorporación de HA dentro de los *scaffolds* dio como resultado un aumento en la actividad metabólica que fue significativo en las células Saos-2 y hBMSC. No se observaron diferencias significativas con las células hFOB 1.19. Esto puede deberse al menor tamaño de estas células en comparación con los otros tipos celulares, pudiendo por ello penetrar de igual forma en ambos tipos de *scaffolds*, incluso con el menor tamaño del poro observado en los *scaffolds* de PCL.

Ejemplo 9. Este ejemplo se refiere a la proliferación de las células hBMSCs, Saos-2 y hFOB 1.19 en los *scaffolds* a los días 1, 7 y 21 tras la siembra según se describe en el Ejemplo 7 (Figura 7).

La proliferación celular dentro de los *scaffolds* se evaluó mediante el ensayo *live/dead* realizado los días 1, 7 y 21 tras la siembra. Este ensayo es un método de fluorescencia de dos colores que permite visualizar células vivas y muertas. Como resultado, el éster acetoximetílico de calceína, no fluorescente y permeable a las células, se transforma en calceína fluorescente (verde) en las células vivas. Por el contrario, el homodímero-1 de etidio (EthD-1) ingresa a las células dañadas y se vuelve fluorescente (rojo) después de unirse a los ácidos nucleicos. Los *scaffolds* se lavaron con PBS y se tiñeron con calceína 4 mM y homodímero-1 de etidio 2 mM en PBS durante 30 minutos a 37 °C, protegidos de la luz. Los *scaffolds* se examinaron utilizando un microscopio confocal de barrido (Olympus FV1000) con longitudes de onda de excitación de 515 nm y emisión de 615 nm.

Como se aprecia en la Figura 7a, el primer día (D1) después de la siembra celular, se observaron solo algunas células vivas sobre los *scaffolds*. A los 7 y 21 días (D7 y D21), las células se habían extendido uniformemente a través de todas las dimensiones de los *scaffolds*, incluido el espacio de los poros. Esto indicó la idoneidad del tamaño de los poros para la proliferación celular incluso considerando la reducción en su tamaño durante la

impresión 3D. No se observaron células muertas a los 21 días después de la siembra indicando la biocompatibilidad de los *scaffolds* con las células óseas.

Ejemplo 10. Este ejemplo se refiere a la evaluación de la morfología de las células hFOB 1.19 en los *scaffolds* de PCL-HA a los 21 días tras la siembra según el Ejemplo 7 (Figura 7).

Como prueba de concepto para evaluar la morfología celular en los *scaffolds*, el día 21 tras la siembra se tomaron imágenes de *scaffolds* de PCL-HA con células hFOB 1.19, utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM). Las imágenes se tomaron después de la fijación con paraformaldehído (PFA) al 4%, deshidratación con diferentes alcoholes (en concentraciones graduadas de etanol en agua) y recubrimiento de oro-paladio.

Las células hFOB 1.19 crecieron de manera homogénea en todos los *scaffolds* de PCL-HA, tanto en la superficie de la fibra (Figura 7b) como hacia la parte interna del poro (Figura 7c), con una morfología alargada en la misma dirección que la fibra similar a la morfología que adquieren en entornos fisiológicos.

Ejemplo 11. Este ejemplo se refiere al contenido de ADN en los *scaffolds* de PCL y PCL-HA sembrados con células hBMSCs, Saos-2 y hFOB 1.19 a los 21 días tras la siembra según se describe en el Ejemplo 7 (Figura 8).

El día 21 tras la siembra (D21), se cuantificó el contenido de ADN (ADN (ng)) en los *scaffolds* mediante el ensayo *picogreen*. Los *scaffolds* se prepararon para la prueba lavándolos con PBS, añadiendo posteriormente el tampón RIPA y almacenándolos a -80°C durante 24 horas. Después de agitar y centrifugar las muestras, el sobrenadante se transfirió al ensayo *picogreen* utilizando el kit quant-iT™ PicoGreen® dsDNA, según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia de las muestras se leyó a longitudes de onda de excitación de 480 nm y de emisión de 520 nm utilizando un lector multimodo Synergy HTX. Se utilizó una curva de calibración estándar para calcular la concentración de ADN.

En las células hBMSC y Saos-2, hubo un aumento significativo en el contenido de ADN entre los *scaffolds* de PCL y PCL-HA, siendo 2 veces mayor para este último. Sin embargo, el contenido de ADN fue similar en ambos tipos de *scaffolds* para células hFOB 1.19, lo cual puede deberse a su menor tamaño en comparación con los otros tipos celulares, pudiendo proliferar de forma similar en ambos tipos de *scaffold*.

Ejemplo 12. Este ejemplo se refiere a la diferenciación osteogénica de las células hBMSCs, Saos-2 y hFOB 1.19 en los *scaffolds* a los 21 días tras la siembra según se describe en el Ejemplo 7 (Figura 9).

- 5 La deposición de calcio indica diferenciación osteogénica, aumentando en etapas de diferenciación superiores. Por ello, el día 21 tras la siembra, se utilizó la tinción *alizarin red* para evaluar la deposición de calcio en los *scaffolds*. Después de lavarlos con PBS, se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación de PFA, los *scaffolds* se lavaron con agua destilada y se tiñeron con alizarina al 2%
 10 (0,5 g en 25 ml de dH₂O) a pH 4,2 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Antes de obtener imágenes, los *scaffolds* se lavaron en dH₂O para eliminar el exceso de tinte. Se utilizó un microscopio óptico (estereomicroscopio serie SZ, Optika SrL, Ponteranica, Italia). Se utilizó el *software* ImageJ para calcular la proporción de tinción en la superficie de los *scaffolds*.
- 15 Se pudo observar una mayor intensidad del color de la tinción en todos los *scaffolds* de PCL-HA en comparación con los de PCL para todos los tipos de células probados (Figura 9a). Como se muestra en la Figura 9b, el aumento en la deposición de calcio (Ca (%)) varió de 2 a 4 veces entre las diferentes líneas celulares. La HA aumenta la diferenciación osteogénica de células óseas humanas, indicando que los *scaffolds* de PCL-HA son los que mejor
 20 mimetizan el microambiente fisiológico. Por este motivo, los *scaffolds* de PCL-HA fueron los que se emplearon en los estudios de toxicidad y eficacia posteriormente.

Ejemplo 13. Este ejemplo se refiere a la evaluación del sistema modular de hueso desarrollado como nuevo modelo *in vitro* 3D para el estudio de biocompatibilidad y toxicidad
 25 de nuevas formulaciones para el tratamiento de enfermedades óseas. Se emplearon *scaffolds* de PCL-HA con células Saos-2, hFOB 1.19 y BJ, comparando los resultados con un modelo *in vitro* 2D (Figura 10).

30 Las nuevas formulaciones consistían en implantes parenterales impresos en 3D, los cuales fueron diseñados en Tinkercad con la forma de tela de araña para adaptarse al componente acetabular de una prótesis de cadera. El proceso comenzó midiendo con precisión las dimensiones de la superficie acetabular, utilizando un calibrador digital electrónico con una resolución de 0,1 mm y una precisión de $\pm 0,2$ mm. Los implantes se fabricaron utilizando una impresora FDM Hyrel 3D Engine SR; se utilizó filamento Hydrosupport®, un diámetro de
 35 boquilla de 0,5 mm y una altura de capa configurada de 0,25 mm. La temperatura de extrusión del filamento Hydrosupport® se estableció entre 210 °C y 215 °C y, para garantizar una adhesión óptima del implante 3D, la temperatura de la plataforma se mantuvo constante a

70 °C. La toxicidad de los implantes se evaluó comparando un modelo 2D *in vitro* con el sistema modular de hueso desarrollado, empleando *scaffolds* de PCL-HA para replicar el microentorno óseo.

Los implantes parenterales fueron diseñados para cubrir completamente la superficie del *scaffold* con un diámetro de 6 mm y 26 mg de peso. Estos implantes contenían 100 µg de vancomicina, 20 µg de anfotericina B (AmB) o una mezcla de ambos antimicrobianos. La carga de fármacos se realizó por difusión pasiva. En estos experimentos se utilizaron células Saos-2, hFOB 1.19 y células de fibroblasto humanas BJ.

Las pruebas *in vitro* 2D se realizaron en placas de 48 pocillos. Las células se sembraron a una densidad de 10^4 células/pocillo para células Saos-2 y BJ y a una densidad de 10^5 células/pocillo para células hFOB 1.19. Después de 24 horas, se agregaron a los pocillos los implantes cargados con vancomicina, AmB, vancomicina-AmB e implantes sin cargar, todos ellos por triplicado. Como control de los fármacos, también se prepararon y agregaron a los pocillos diluciones de los principios activos (APIs). La vancomicina (100 mg) se diluyó en medio de cultivo (10 mg/ml), mientras que la AmB (20 mg) y la combinación de ambos antimicrobianos se diluyeron primero en DMSO para asegurar la disolución completa antes de diluirse en medio de cultivo (2 mg/ml). Cada solución se añadió a cada pocillo, con una cantidad final de 100 µg de vancomicina y 20 µg de AmB por pocillo. Como controles negativos, se emplearon pocillos sin implantes y sin fármacos. Los distintos tratamientos se mantuvieron en cultivo con cada línea celular durante 24 h. Los efectos citotóxicos se determinaron mediante el ensayo MTT. Se añadió una solución madre de MTT (2 mg/ml en PBS) a cada pocillo (500 µl) y se incubó durante 1 h. Como control negativo de la reacción se empleó tritón. Después de la incubación, los cristales de formazán formados se disolvieron en DMSO. La absorbancia se determinó a 550 nm utilizando un lector de microplacas Spectrostar BMG (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). La viabilidad celular se expresó como porcentaje en comparación con las células del control (VC (%)). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Con respecto a las pruebas *in vitro* con los chip (1) microfluídicos de cultivos 3D, en primer lugar, se colocaron los chips (1), elaborados según el Ejemplo 1.1, y tubos Masterflex™ 96400-13 en bolsas herméticas y se esterilizaron durante 1 hora con luz ultravioleta. Los tubos se conectaron a las entradas (4) y las salidas (5) de los chips (1) estériles y se llenaron con el medio de cultivo para eliminar el aire de los canales (8) y cámaras (3). Los *scaffolds* se sembraron y cultivaron con las células, como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 7, durante 14 días y luego se transfirieron al interior de las cámaras (3) de cada chip (1)

microfluídico (n=4). En la cámara 31 se añadió un implante sin cargar sobre el *scaffold*. En la cámara 32, se colocó un implante cargado. En la cámara 33, se agregaron encima del *scaffold* 10 µl de la solución de fármaco correspondiente. En la cámara 34, el *scaffold* se dejó sin tratar como control. Una vez que se agregaron los implantes y las soluciones de los fármacos encima de los *scaffolds*, las cámaras se cubrieron con cinta de politetrafluoroetileno (PTFE), para evitar la filtración del medio de cultivo, pero permitiendo la difusión de gas dentro del incubador. El medio de cultivo se introdujo en cada chip (1) microfluídico mediante un tubo de entrada que se conectó a una bomba peristáltica (101U/R, Watson Marlow, Reino Unido) y una botella de vidrio con 50 ml de medio de cultivo (depósito de medio). El tubo de salida se conectó a una botella de vidrio, donde se descartó el medio. Los frascos de vidrio con el medio fresco y con el medio descartado y los chips (1) se colocaron en una incubadora con una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. El flujo se fijó en 25 µl/min. Esta prueba se realizó por triplicado para cada línea celular e implante, cargados con vancomicina, AmB o una combinación de ambos fármacos. Después de 24 horas, se retiraron los *scaffolds* de los chips (1) y se colocaron en placas de 48 pocillos para el ensayo MTT, que se realizó como se ha descrito en el ejemplo 3.

Como se aprecia en la Figura 10, después de 24 h de incubación en el modelo *in vitro* 2D, la viabilidad celular de las células Saos-2 se redujo significativamente con todos los implantes y con los fármacos testados. La mayor reducción (por debajo del 20%) se encontró con la AmB y la combinación de AmB más vancomicina, tanto cargados en los implantes como disueltos en el medio de cultivo. Por otro lado, el tratamiento con vancomicina no tuvo efecto sobre la viabilidad de las células Saos-2. Utilizando los chips (1) microfluídicos 3D de hueso ninguno de los tratamientos provocó una muerte celular significativa de Saos-2 (viabilidad celular superior al 90 % para todos los tratamientos).

Se observaron resultados similares para las células hFOB 1.19. Hubo una reducción significativa de la viabilidad celular en el modelo 2D, especialmente con la AmB y la combinación de AmB con vancomicina, tanto cargados en los implantes como disueltos en el medio de cultivo (viabilidad celular por debajo del 30%). Por otra parte, la viabilidad celular de las células hFOB 1.19 en el chip (1) fue superior al 90 % en todos los tratamientos.

Finalmente, también se observó el mismo patrón para las células BJ en el modelo 2D. El tratamiento con vancomicina no afectó a la viabilidad celular y la AmB y la combinación de AmB y vancomicina, tanto en los implantes como el fármaco disuelto en el medio, redujeron significativamente la viabilidad de las células BJ. Con respecto al chip, no hubo una reducción significativa de la viabilidad de las células BJ para ningún tratamiento. Sin embargo, el

implante sin cargar, el implante cargado con AmB y vancomicina y la combinación de fármacos redujeron la viabilidad al 80%.

La razón principal detrás de la alta reducción de la viabilidad celular para todos los tipos de células en el modelo 2D fue el hecho de que el implante, en contacto con el medio acuoso, formaba un gel denso que asfixiaba las células. Sin embargo, en el sistema modular 3D, el implante se adhirió a la superficie del *scaffold* imitando el procedimiento quirúrgico y, a pesar de que el implante también formó un gel denso, la mayoría de las células no se vieron afectadas debido a la porosidad del *scaffold* y a la renovación constante de medio, lo que permitió un intercambio de medio y gases efectivo. La alta viabilidad celular obtenida en el sistema modular 3D demostró su utilidad para ensayos de biocompatibilidad de formulaciones avanzadas como pueden ser implantes parenterales, siendo capaz de recrear mejor el microambiente óseo que otras opciones del estado de la técnica.

Ejemplo 14. Este ejemplo se refiere a la formación de biofilms fúngicos, empleando *Candida albicans*, en *scaffolds* de PCL-HA sembrados con células hFOB (Figura 11).

Como prueba de concepto, se realizó un cultivo en el que se emplearon *scaffolds* de PCL-HA sembrados con células hFOB 1.19 y *Candida albicans* para evaluar el desarrollo de biofilms en los *scaffolds*. La formación de biofilms se evaluó con una cepa de la levadura dimórfica patógena *Candida* spp., *Candida albicans* CECT 1394. Para preparar el inóculo, la cepa se cultivó inicialmente en agar dextrosa Sabouraud a 30 °C. Después de 48 h de cultivo, se tomó una sola colonia de una placa de agar Mueller Hinton (MHA) y se resuspendió con una solución salina fisiológica estéril al 0,9% para lograr una absorbancia de 0,1 a 600 nm, correspondiente a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, según el estándar 0,5 de McFarland. La suspensión de *C. albicans* (10 µl) se añadió en la parte superior del *scaffold* sembrado con células hFOB 1.19 y se cultivó como se describe en el Ejemplo 7 en placas de 48 pocillos durante 4 horas sin medio, permitiendo la adhesión celular. Tras las 4 horas, se agregaron 500 µl de medio de cultivo y las placas se mantuvieron en una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO₂ a 37°C. Después de 48 horas, los *scaffolds* se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 ml con solución salina fisiológica estéril al 0,9%, sonicándolos en un baño para separar las células fúngicas del *scaffold*. El sobrenadante se diluyó (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) y se sembraron 100 µl de cada concentración en placas de MHA y se incubaron a 32 °C durante 48 h. Posteriormente, se contaron visualmente las unidades formadoras de colonias (UFC).

Se utilizó la técnica SEM para examinar la morfología y crecimiento del biofilm. Los *scaffolds* cultivados con *C. albicans* durante 48 h se lavaron primero con PBS, tres veces con agua ultrapura y se fijaron con PFA al 4%. Posteriormente se deshidrataron en diferentes concentraciones de etanol en agua (30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% y 99,9% de etanol) y se liofilizaron mediante el liofilizador LyoQuest (Azbil Telstar, S.L., Terrassa, España) a -60°C y una presión de 0,2 bar durante 2 h. Después del recubrimiento por pulverización catódica con oro, las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL 6335F (Mussashime, Japón) con un voltaje de 20 KV a diferentes aumentos.

Después de 48 horas de cultivo con *C. albicans*, los *scaffolds* contenían aproximadamente 4×10^6 UFCs (Figura 11a), lo que indica que, en contacto con microorganismos, estos pueden adherirse y proliferar en los *scaffolds*. Después de 48 horas de cultivo, las imágenes SEM mostraron el patrón de crecimiento de *C. albicans* en los *scaffolds*, así como la producción de hifas (Figura 11b).

Ejemplo 15. Este ejemplo se refiere a la evaluación de los chips (1) microfluídicos de hueso desarrollado como nuevo modelo *in vitro* 3D de testeo de eficacia antimicrobiana en ambientes óseos, empleando *scaffolds* de PCL-HA con células hFOB 1.19 (Figura 12).

Al igual que en el estudio de osteointegración descrito en el Ejemplo 13, se testaron diferentes implantes parenterales cargados con anfotericina, vancomicina o una mezcla de ambos. Se imprimieron al igual que se ha descrito en el ejemplo 13.

De las cuatro cámaras (3) del chip (1), una (31) se utilizó como control, conteniendo *scaffolds* (2) de PCL-HA sembrados con células hFOB 1.19 y *Candida albicans* sin tratamiento farmacológico, según se describe en el Ejemplo 14, con el objetivo de evaluar el crecimiento microbiano en presencia de osteoblastos pero en ausencia del fármaco. En dos de las cámaras (32 y 33) se cultivaron los *scaffolds* de PCL-HA sembrados con células hFOB 1.19 y *Candida albicans* en presencia de fármaco, realizando diversas réplicas (n=3) para el test de profilaxis y tratamiento en donde se compararon implantes cargados y sin cargar y fármaco libre. La cuarta cámara (34) se empleó únicamente con *scaffolds* de PCL-HA sembrados con osteoblastos hFOB 1.19 en presencia del fármaco, con el fin de evaluar la biocompatibilidad.

Los *scaffolds* de PCL-HA con células hFOB 1.19 se cultivaron durante 14 días antes de transferirlos al chip (1).

Para realizar el test de profilaxis, se utilizaron implantes parenterales que se colocaron sobre los *scaffolds* con las células hFOB e inmediatamente cada uno de estos *scaffolds* se introdujo manualmente en una de las cámaras (3) de un chip (1) elaborado como en el Ejemplo 1.1 y
 5 mostrado en las Figuras 1a-c y sobre cada *scaffold* se añadieron 10 µl de una suspensión salina de *Candida albicans*, la cual contenía 10⁸ UFCs, imitando la inoculación de microorganismos durante una cirugía.

Por otra parte, se realizó un test de tratamiento para evaluar la eficacia de los implantes en la erradicación de un biofilm ya formado. Los *scaffolds* con células hFOB en crecimiento durante
 10 14 días fueron inoculados con la misma suspensión de *C albicans* que se utilizó para el test de profilaxis y se incubaron durante 48 h. Este tiempo permite la formación de un biofilm sobre el *scaffold* que, posteriormente, se pondrá en contacto con un implante parental cargado con AmB o bien con AmB y vancomicina, además de implantes parenterales sin carga de
 15 antimicrobianos como control. Tras 48 h de formación del biofilm, los *scaffolds* infectados se transfirieron a un chip (1) microfluídico y en la superficie de los *scaffolds* se colocaron los implantes parenterales. A modo de comparación, en la superficie de los *scaffolds* infectados se añadió una suspensión con los fármacos libres a la misma concentración que la que contienen los implantes parenterales.

En ambos test (profilaxis y tratamiento), los chips (1) se mantuvieron en incubación en una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO₂ a 37°C, durante 48 horas. Los *scaffolds* se sacaron de los chips (1) microfluídicos y se transfirieron a tubos eppendorf de 2 ml con una solución salina fisiológica estéril al 0,9%, sonicándolos en un baño para separar las células
 25 fúngicas de los *scaffolds*. El sobrenadante se diluyó (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴), se sembraron 100 µl de cada concentración en placas de MHA y se incubaron a 32 °C durante 48 h. Posteriormente, se contaron visualmente las unidades formadoras de colonias (UFC). La biocompatibilidad de las formulaciones con los osteoblastos se evaluó en la cuarta cámara (34) según está descrito en el ejemplo 12.

Con respecto al test de profilaxis, no había UFCs en los *scaffolds* en presencia de los implantes cargados con AmB y con ambos principios activos (Figura 12a). Por tanto, los implantes parenterales cargados con antimicrobianos eliminaron por completo los microorganismos, evitando la formación del biofilm.

En el caso del test de tratamiento una vez que se ha desarrollado el biofilm, los implantes redujeron significativamente las UFCs aunque no lograron eliminar completamente el biofilm (Figura 12b). En la cuarta cámara (34), se comprobó que las formulaciones no alteraron la

viabilidad de los hFOB 1.19. Este ejemplo demuestra la idoneidad del sistema modular como modelo *in vitro* 3D para evaluar la eficacia y biocompatibilidad de diferentes fármacos y formulaciones avanzadas en un microentorno de infección ósea.

5 **Ejemplo 16.** Este ejemplo se refiere a la evaluación de los chips (1) microfluídicos de hueso desarrollados como nuevo modelo *in vitro* 3D de testeo de eficacia antimicrobiana en ambientes óseos, empleando prótesis (2) de titanio fabricadas a pequeña escala sobre las cuales se adhieren biofilms (Figura 13 y Figura 14).

10 En este ejemplo, dentro de cada una de las cámaras (31, 32, 33 y 34) de un chip (1) elaborado como se describe en el Ejemplo 1.1, se introduce una prótesis (2) de titanio fabricada en miniatura mediante impresión 3D (SLM, *selective laser melting*). Sobre la superficie de las prótesis de titanio, se investigó inicialmente la capacidad de formación del biofilm mediante la inoculación de 500 µl de una suspensión de *Candida albicans* en PBS y utilizando una placa
15 de 24 pocillos. Se ensayaron diferentes concentraciones estandarizadas de *C. albicans*, 10^6 , 10^5 y 10^4 . Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Tras el periodo de incubación, cada una de las prótesis se lavó con 1 ml PBS estéril para quitar células no adheridas a la superficie de la misma, y posteriormente se añadió otro mililitro de PBS estéril y se agitó con vortex durante 1 minuto para desprender los microorganismos adheridos a la superficie de la prótesis
20 y así poder cuantificarlos. A continuación, se realizó el conteo de UFC mediante el método Miles y Misra (10 µl por gota) sobre placas de agar dextrosa Sabouraud (SDA). Las placas se incubaron a 32 °C durante 24-48 h y posteriormente se procedió al recuento de UCF/ml.

Para la evaluación de la eficacia antimicrobiana, las prótesis (2) de titanio fueron previamente
25 esterilizadas. En este ejemplo, se evaluó un implante parenteral fabricado mediante la técnica de electrospinning que contenía un 2% de anfotericina y un 8% de vancomicina. Para la fabricación del implante mediante electrospinning, las mezclas de excipientes (heparina y soluplus) junto con los fármacos se cargaron en jeringas Terumo luer-lock de 10 mL y se conectaron a un tubo Tygon mediante conectores luer-lock de PP (acoplamientos MF y FM).
30 Se utilizó un equipo de electrospinning (EF050-Electrospinning starter, Fuente de Poder de Alto Voltaje Simple (0–30 kV), precisión de voltaje: $\pm 2\%$, Leonardino Srl., Milán, Italia) equipado con una aguja de electrohilado calibre 20G de acero inoxidable. La placa colectora (120–130 mm), cubierta con papel aluminio, se colocó a una distancia (punta a colector) de 15 cm, mientras que el flujo se mantuvo constante a 2.50 mL/h usando una bomba de jeringa
35 (de un solo canal, con rango de infusión de 0.73 µL/h a 2,568 mL/h). Se dejó secar el implante parenteral obtenido por 2 h, para posteriormente colocarlo al vacío hasta ser utilizado.

En el test de profilaxis, el implante se adhirió sobre la superficie de la prótesis (2) humedeciéndolo con unas gotas de agua desionizada y posteriormente estas fueron incorporadas en tres de las cámaras (31, 32 y 33) del chip (1). En la cuarta cámara (34) del chip (1) se introdujo una prótesis sin formulación en su superficie. Una vez colocadas las prótesis (2) en el chip (1) microfluídico, se perfundió por el puerto de entrada (4) una suspensión estandarizada en PBS de *C. albicans* a una concentración de 10^6 , durante 90 min a una velocidad de 2.1 ml/ h. A continuación, las prótesis (2) se extrajeron del chip (1), se lavaron con PBS para eliminar células no adheridas y se introdujeron en un tubo eppendorf de 2 ml. Se añadió un nuevo mililitro de PBS y se agitó con un vórtex durante 1 min. Por último, se realizó el conteo de UFC mediante el método Miles y Misra (10 µl por gota) sobre placas de agar SDA. Tras 24-48 h de incubación a 37 °C, se contaron las UCF/ml. En el test de tratamiento, se desarrolló previamente el biofilm sobre las prótesis (2) de titanio con *C. albicans* utilizando una concentración de 10^6 durante 24 h, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 14 para los *scaffolds*. Posteriormente, se colocó la misma formulación descrita en el Ejemplo sobre las prótesis (2) con el biofilm ya formado y se introdujeron en las diferentes cámaras (31, 32 y 33) de los chips (1). Una de las cámaras (34) se dejó como control sin tratamiento. Por el puerto de entrada (4), se administró una solución de PBS estéril durante 90 min a una velocidad de 2.1 ml/h. Posteriormente, se extrajeron las prótesis (2) de cada una de las cámaras (3) y se realizó el recuento de UCF/ml como se ha descrito en el Ejemplo 14.

Como se muestra en la Figura 14, en comparación con el control (C) sin tratamiento, se produjo una reducción significativa (4 x) en las UFC/ml tanto en el test de profilaxis (P) como en el test de tratamiento (T) demostrando la utilidad de los chips (1) microfluídicos para evaluar la eficacia antimicrobiana de nuevas formulaciones avanzadas diseñadas como implantes parenterales para recubrimientos protésicos.

Ejemplo 17. Este ejemplo se refiere al diseño del sistema modular multichip con acoplamiento vertical (Figura 15).

La Figura 15 muestra un ejemplo esquemático de configuración de un sistema modular de cultivo 3D en el que se acoplan tres módulos, es decir, 3 chips (11, 12 y 13) microfluídicos, verticalmente para simular la interacción entre diferentes tejidos. En la vista esquemática de la Figura 15a, se representan los tres módulos superpuestos con una sola cámara para simplificar el dibujo: un módulo óseo o de implante protésico (11), un módulo muscular o de tejido conjuntivo (12) y un módulo de piel o mucosa oral (13). Cada módulo tiene una entrada de medio independiente (41, 42 y 43) y una salida correspondiente (51, 52 y 53), lo que

permite la perfusión controlada de medios de cultivo específicos para cada tipo celular sin interferir con los otros módulos. En el interior de cada módulo se dispone una cámara de 2 cm de diámetro que contiene el elemento de ensayo o *scaffold* (21, 22 y 23), que puede ser una membrana porosa que permite el crecimiento celular o un *scaffold* de naturaleza biomimética (por ejemplo, de PCL–HA) o un componente protésico a pequeña escala, según la aplicación deseada. El módulo inferior (11) alberga un *scaffold* óseo o un implante protésico, el módulo intermedio (12) un *scaffold* muscular o de tejido conjuntivo, y el módulo superior (13) un *scaffold* de piel o mucosa oral.

La Figura 15b ilustra el sistema modular desde un plano frontal, mostrando la alineación vertical de los *scaffolds* (21, 22 y 23) y la conexión de las entradas y salidas de medio de cada módulo, lo que asegura un flujo independiente y simultáneo en todos los niveles. La Figura 15 c corresponde a la proyección superior de la cámara central (31), donde se aprecia la disposición de los distintos *scaffolds* y la conexión lateral de los canales de entrada (41, 42 y 43) y salida (51, 52 y 53) de medio.

Los distintos módulos del sistema modular se equiparon con elementos de acoplamiento en vertical que, en este caso, consistieron en tuercas (7) en la cara superior interna de la cámara (31) y tornillos (6) en las superficies inferiores de unión con otro módulo, para garantizar una conexión hermética entre ellos. Cuando el chip (1) tiene dos o más cámaras, o bien se disponen tuerca (7) y tornillo (6) en una sola de las cámaras, o bien se utilizan tuercas de doble rosca que se unen a un tornillo del módulo inferior y un segundo tornillo del módulo superior.

Este diseño permite simular entornos fisiológicos complejos, como la interacción entre hueso, tejido blando y cobertura epitelial o mucosa, posibilitando el estudio de procesos de osteointegración, biointegración y respuesta a infecciones en un contexto multiorgánico controlado. La modularidad del sistema facilita su personalización para otros tipos de tejidos y aplicaciones biomédicas.

REIVINDICACIONES

1. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D para el estudio de procesos de osteointegración/biointegración e infecciones en *scaffolds* óseos y/o en componentes protésicos en miniatura caracterizado por que incluye:

- 2 o más cámaras (3) que presentan una abertura superior, tienen un diámetro de hasta 2 cm y que, cuando hay más de 2 cámaras (3), pueden estar conectadas en serie o en paralelo mediante canales (8) de flujo;

- un conjunto de canales (8) de flujo con al menos una entrada (4) y, al menos, una salida (5).

2. Chip (1) microfluídico, o módulo 3D, según la reivindicación 1, cuyo número de cámaras (3) está comprendido entre 4 y 8.

3. Chip (1) microfluídico, o módulo 3D, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las cámaras (3) están conectadas secuencialmente en grupos de, al menos, dos cámaras (3).

4. Chip (1) microfluídico, o módulo 3D, según la reivindicación 3 en el que cada una de las cámaras (3) de un grupo tiene tamaños diferentes.

5. Chip (1) microfluídico, o módulo 3D, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el conjunto de canales (8) de flujo presenta una única entrada (4) y una única salida (5), entrada que se divide en tantos canales (8) de flujo como cámaras (3) tiene el chip (1) y canales (8) de flujo que se vuelven a unir en una única salida (5).

6. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que está elaborado con un material rígido, resistente al desgaste, biocompatible y apto para la impresión en 3D.

7. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según la reivindicación 6 caracterizado por que el material rígido, resistente al desgaste, biocompatible y apto para la impresión en 3D se selecciona del grupo formado por resinas quirúrgicas y por polímeros de muy altas prestaciones de la familia PAEK (poliariletercetona) (como polieteretercetona o polieterquetincetona, PEEK/PEKK), PLA (ácido poliláctico), ABS (acrilonitrilo-butadieno-estireno) y/o COC (copolímero de cicloolefina).

8. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que incluye al menos un elemento de conexión hermética a uno o más módulos.

5 9. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según la reivindicación 8 en el que el o los elementos de conexión hermética están situados en la superficie superior y/o inferior del módulo.

10 10. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según la reivindicación 8 en el que el o los elementos de conexión hermética están situados en la o las superficies laterales del módulo.

11. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye en una o más cámaras (3) un elemento de ensayo (2).

15 12. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según la reivindicación 11 en el que el elemento de ensayo (2) es un *scaffold* biomimético tridimensional y/o un componente protésico en miniatura con un diámetro máximo de 2 cm.

20 13. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según la reivindicación 12 en el que el/los *scaffold* /s están elaborados bien con policaprolactona (PCL) o bien con PCL + hidroxiapatita (HA).

25 14. Chip (1) microfluídico, o módulo, en 3D según la reivindicación 12 en el que el/los componente/s protésico/s se seleccionan del grupo formado por: componentes acetabulares ortopédicos, implantes dentales y/o coronas dentales.

15. Sistema modular 3D caracterizado por que incluye 2 o más chips (1) microfluídicos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

30 16. Sistema modular 3D según la reivindicación 15 caracterizado por que el conjunto de canales (8) de flujo de dos o más módulos o chips (1) microfluídicos están interconectados.

35 17. Dispositivo que incluye un chip (1) microfluídico según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o un sistema modular según se define en cualquiera de las reivindicaciones 15-16 que, además, incluye tubos de entrada y salida, al menos una bomba peristáltica y al menos un reservorio de medio para el control del flujo en el conjunto de canales (8).

18. Uso del chip (1) definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o del sistema modular 3D definido en cualquiera de las reivindicaciones 15-16 o del dispositivo definido en la reivindicación 17 para el cultivo o cocultivo *in vitro* de células de origen humano o animal con microorganismos patógenos.

19. Uso según la reivindicación 18 en el que los microorganismos patógenos se seleccionan del grupo formado por: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* y combinaciones de los mismos.

20. Uso del chip (1) definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o del sistema modular 3D definido en cualquiera de las reivindicaciones 15-16 o del dispositivo definido en la reivindicación 17 para la evaluación *in vitro* de procesos de osteointegración, biointegración y de la eficacia o prevención de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, dentales u otros dispositivos médicos.

21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 18-19 simultáneo con el uso definido en la reivindicación 20.

22. Método de evaluación *in vitro* de procesos de osteointegración, biointegración y/o de tratamiento o prevención de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, dentales u otros dispositivos médicos que comprende:

- a) diseñar un chip (1) microfluídico según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y un elemento de ensayo (2) en función de la aplicación deseada;
- b) fabricar el chip (1) y el elemento de ensayo (2) del paso a) mediante impresión tridimensional con materiales biocompatibles;
- c) sembrar el elemento de ensayo (2) con células humanas o animales;
- d) introducir el elemento de ensayo (2) sembrado en una cámara (3) del chip (1) a través de la abertura superior de la cámara (3);
- e) incorporar formulaciones terapéuticas o preventivas a través de la abertura superior de la cámara (3);
- f) conectar el chip (1) a un sistema de flujo controlado mediante tubos de entrada y salida, bomba peristáltica y reservorio de medio;
- g) evaluar la capacidad de osteointegración y/o la actividad antimicrobiana *in vitro* bajo perfusión de un flujo controlado de las formulaciones terapéuticas o preventivas de paso e).

23. Método según la reivindicación 22 en el que, antes del paso e), se desarrolla un biofilm sobre el elemento de ensayo (2).

24. Método de evaluación *in vitro* de procesos de osteointegración, biointegración y/o de tratamiento o prevención de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, dentales u otros dispositivos médicos que comprende:

- a) diseñar dos o más chips (1) microfluídicos según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y dos o más elemento de ensayo (2) en función de la aplicación deseada;
- b) fabricar los chips (1) y los elementos de ensayo (2) del paso a) mediante impresión tridimensional con materiales biocompatibles;
- c) sembrar los elementos de ensayo (2) de cada chip (1) con células humanas o animales de igual o distinto origen
- d) introducir los elementos de ensayo (2) sembrados con células de un mismo origen en las cámaras (3) de cada uno de los chips (1) a través de la abertura superior de la cámara (3);
- e) incorporar formulaciones terapéuticas o preventivas a través de la abertura superior de la cámara (3);
- f) conectar los distintos chips (1) mediante los elementos de conexión hermética formando un sistema modular;
- g) conectar el sistema modular del paso f) a un sistema de flujo controlado mediante tubos de entrada y salida, bomba peristáltica y reservorio de medio;
- h) evaluar la capacidad de osteointegración y/o la actividad antimicrobiana *in vitro* bajo perfusión de un flujo controlado de las formulaciones terapéuticas o preventivas de paso e).

25. Método según la reivindicación 24 en el que las células humanas o animales son osteoblastos.

26. Método según la reivindicación 24 en el que los microorganismos pertenecen a la especie *Candida albicans*.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24-26 en el que, antes del paso e), se desarrolla un biofilm sobre el elemento de ensayo (2).

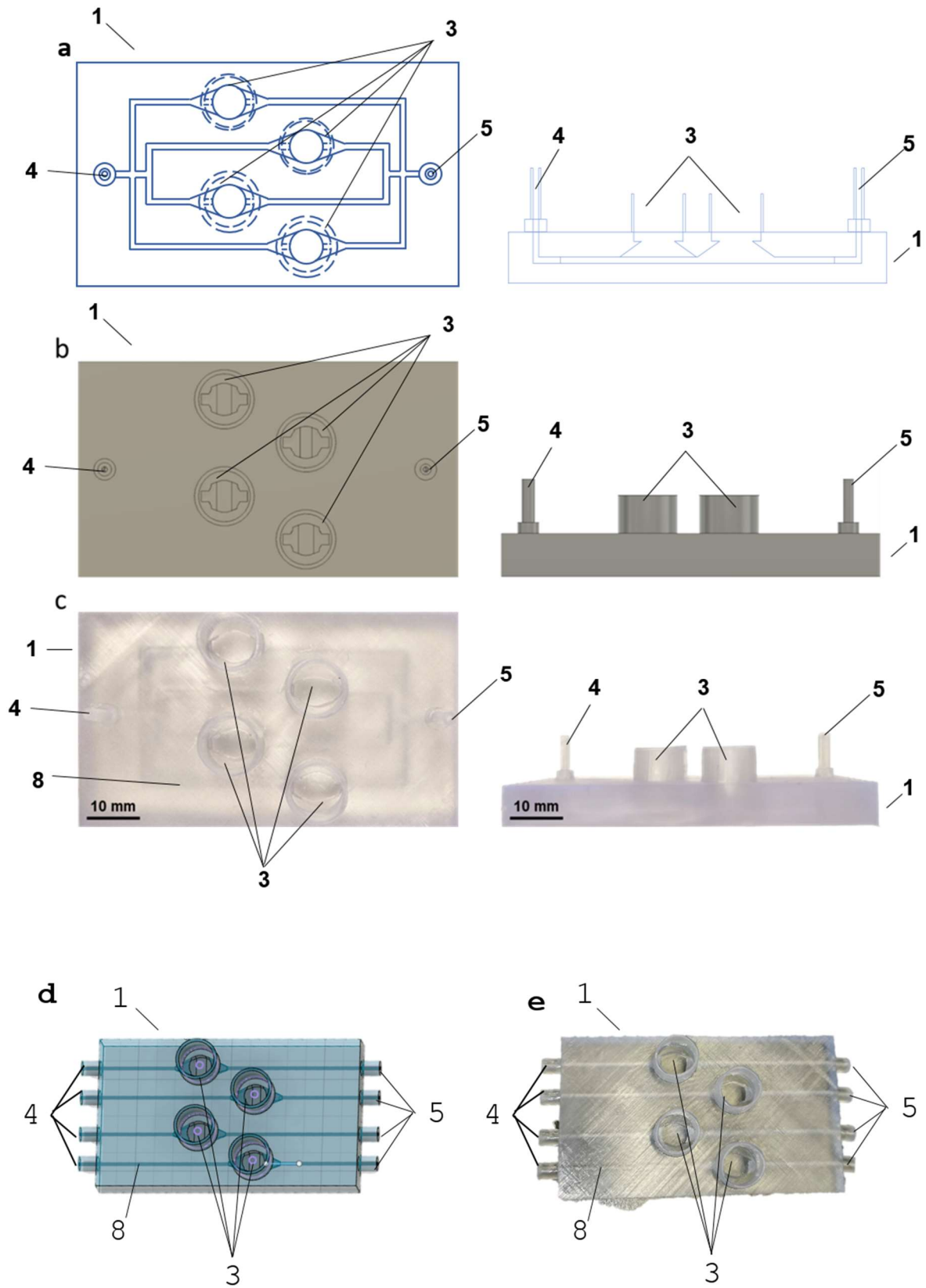


Figura 1a-e

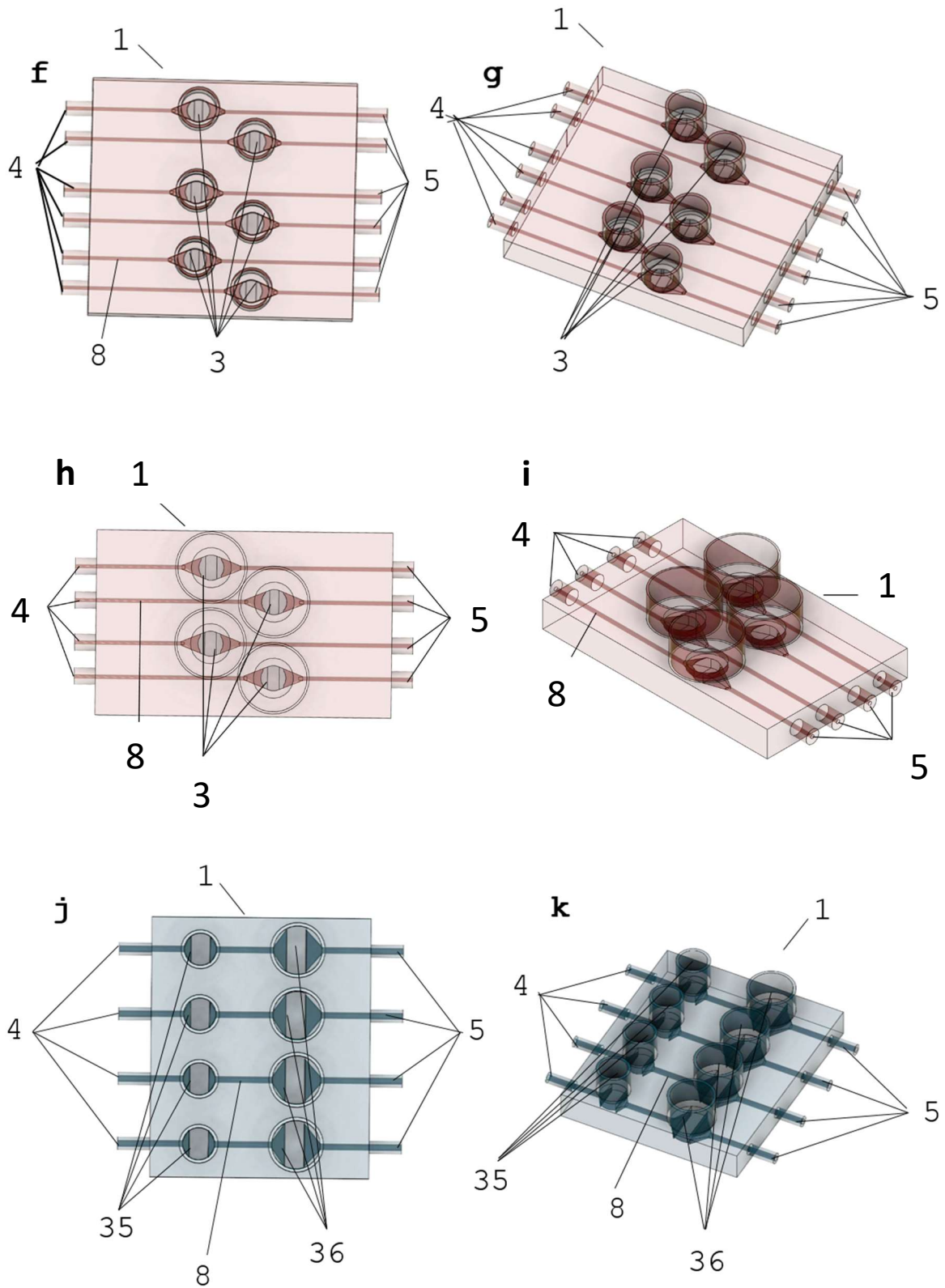


Figura 1h-k

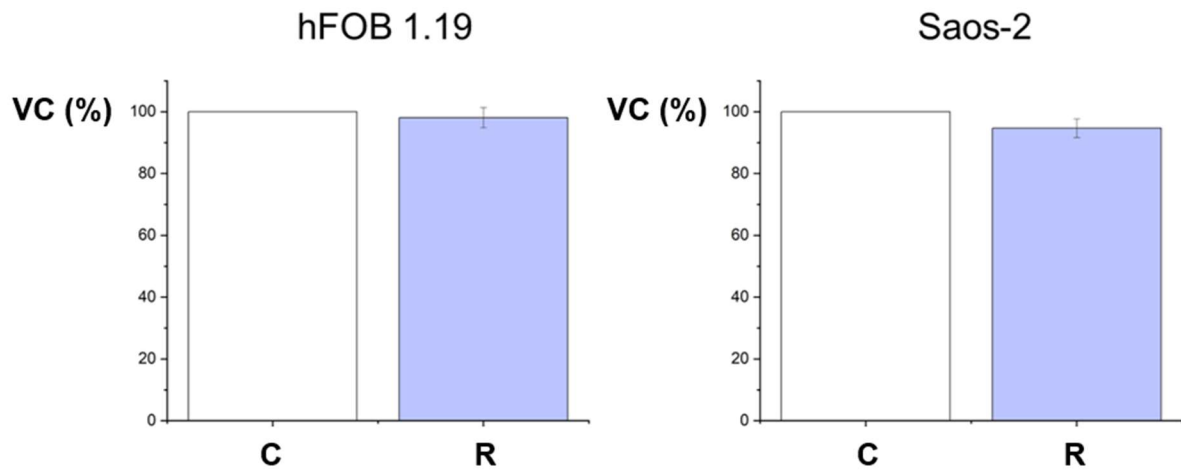


Figura 2

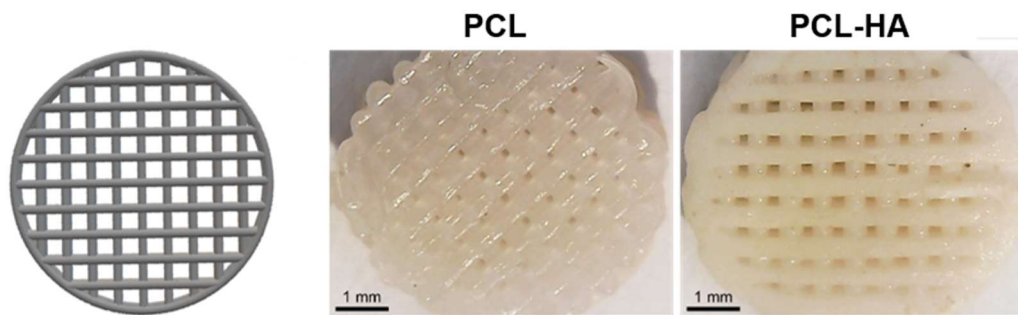


Figura 3

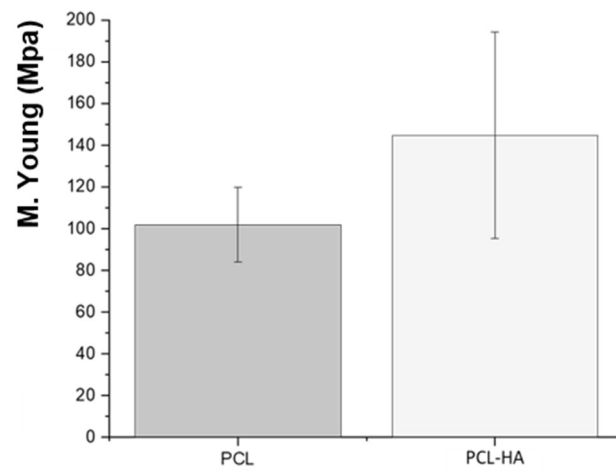


Figura 4

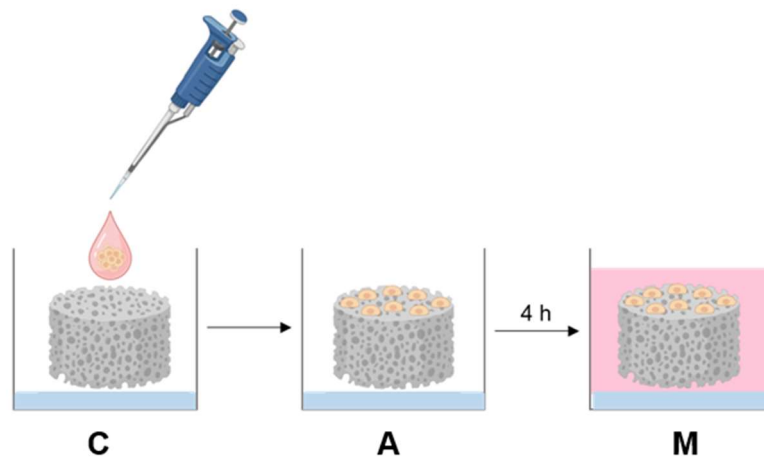


Figura 5

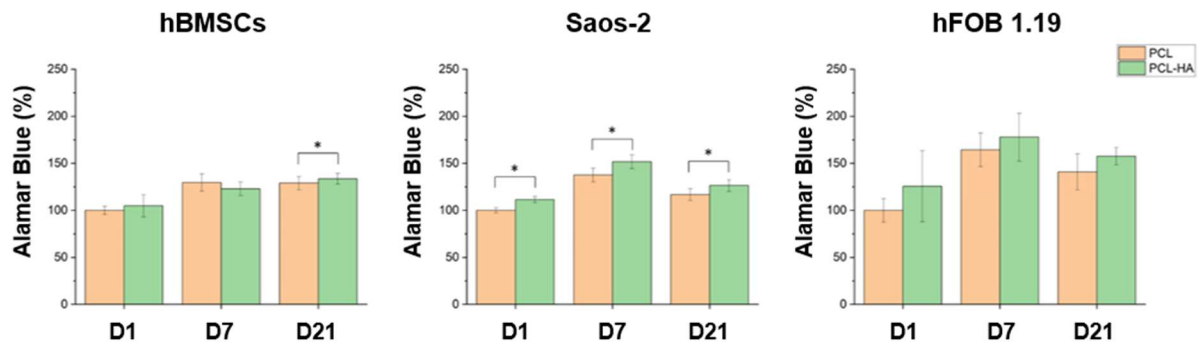


Figura 6

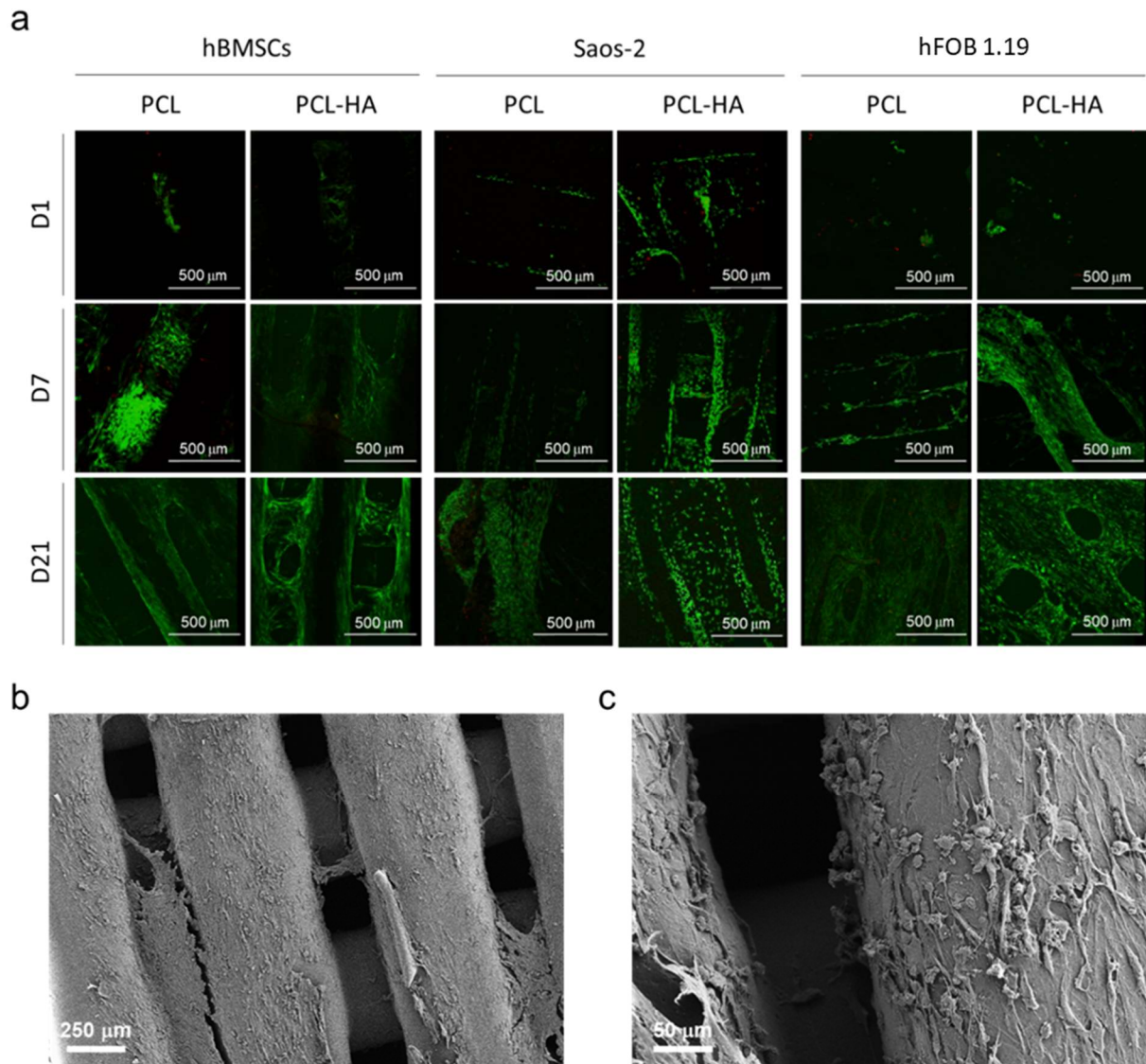


Figura 7

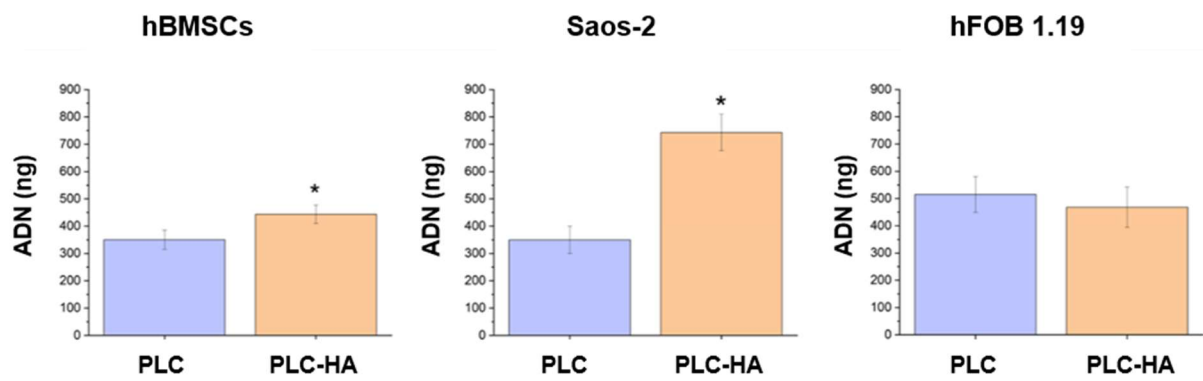


Figura 8

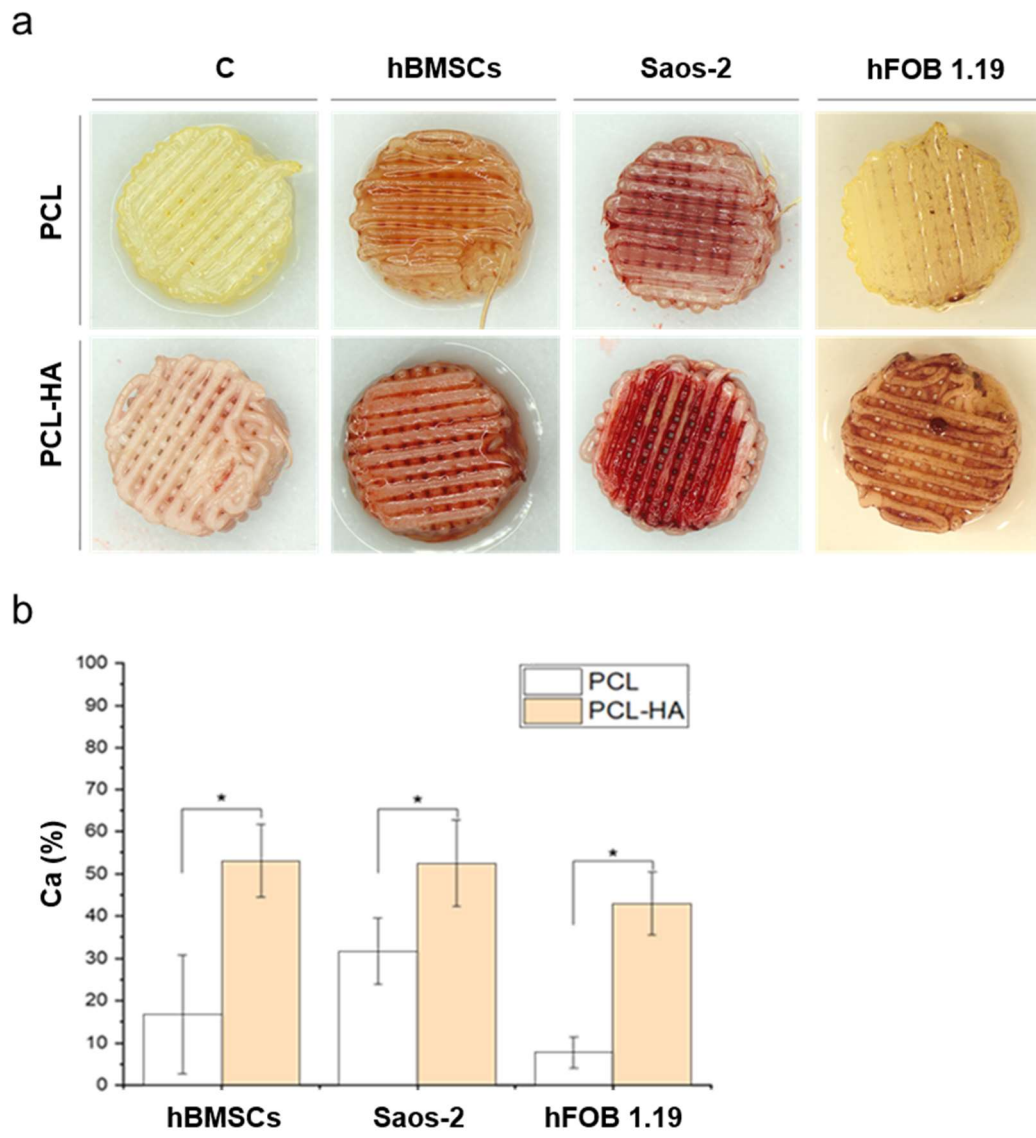


Figura 9

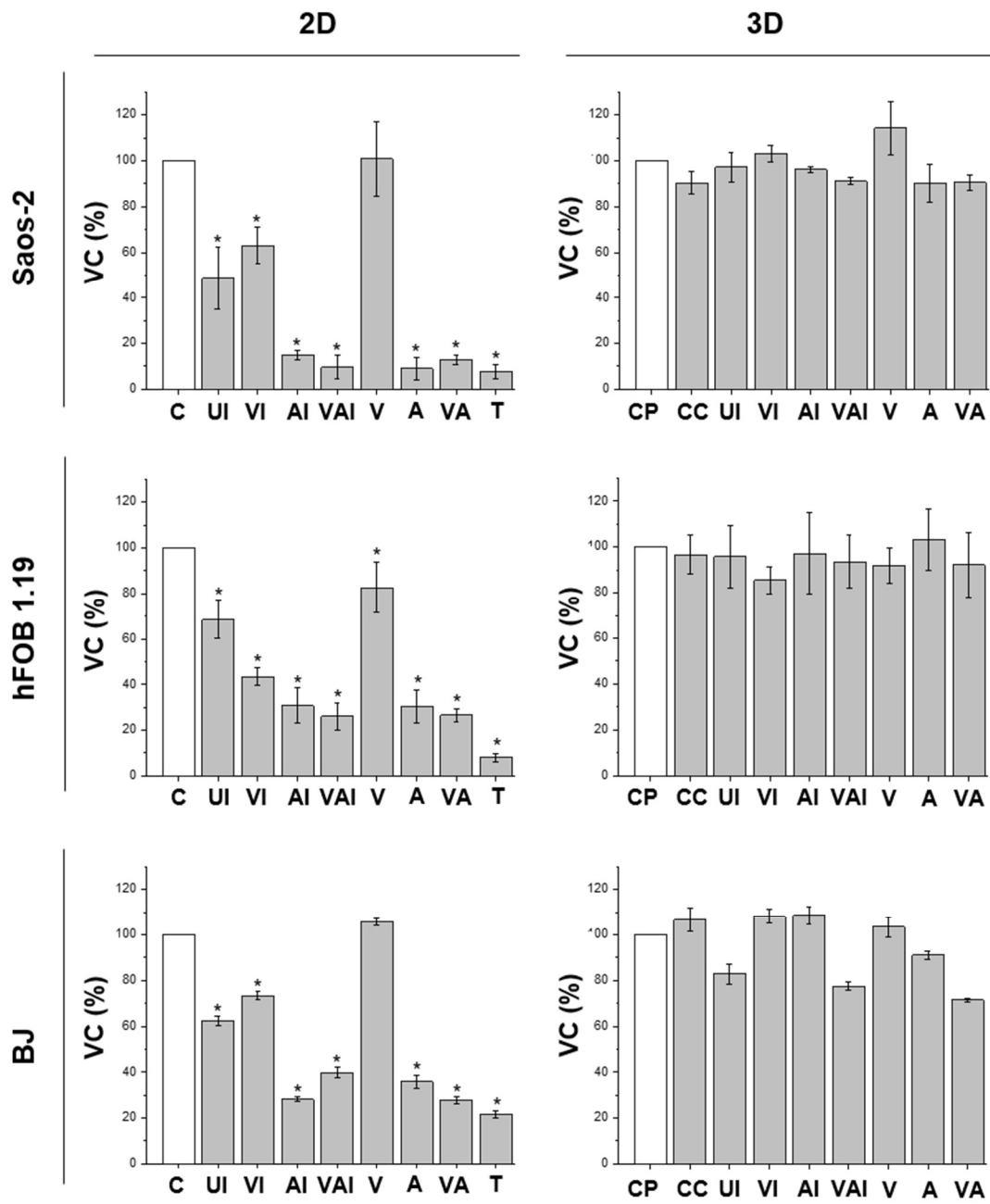


Figura 10

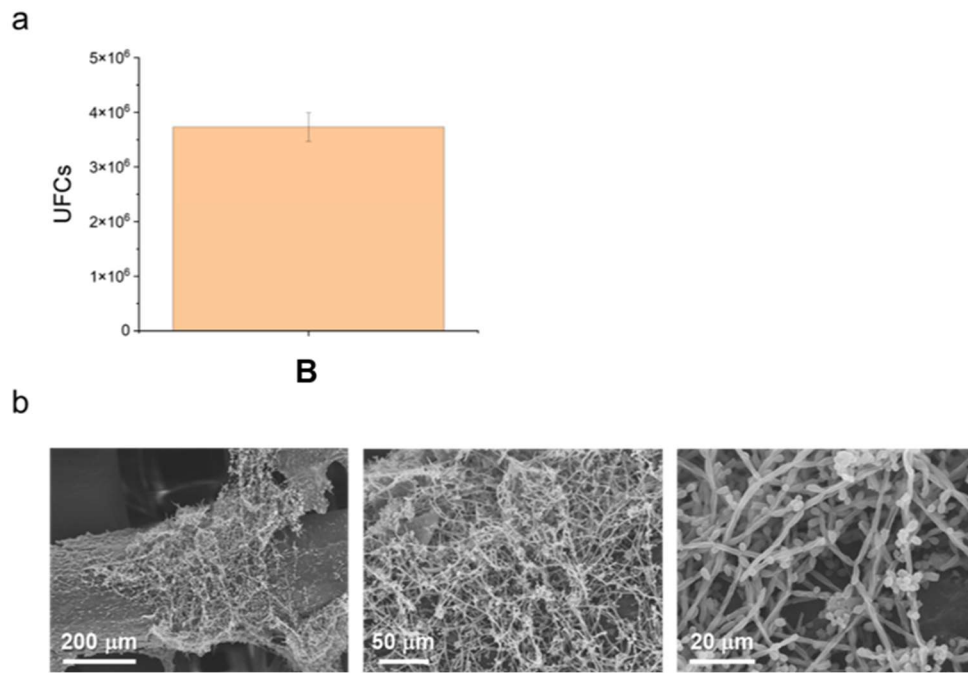


Figura 11

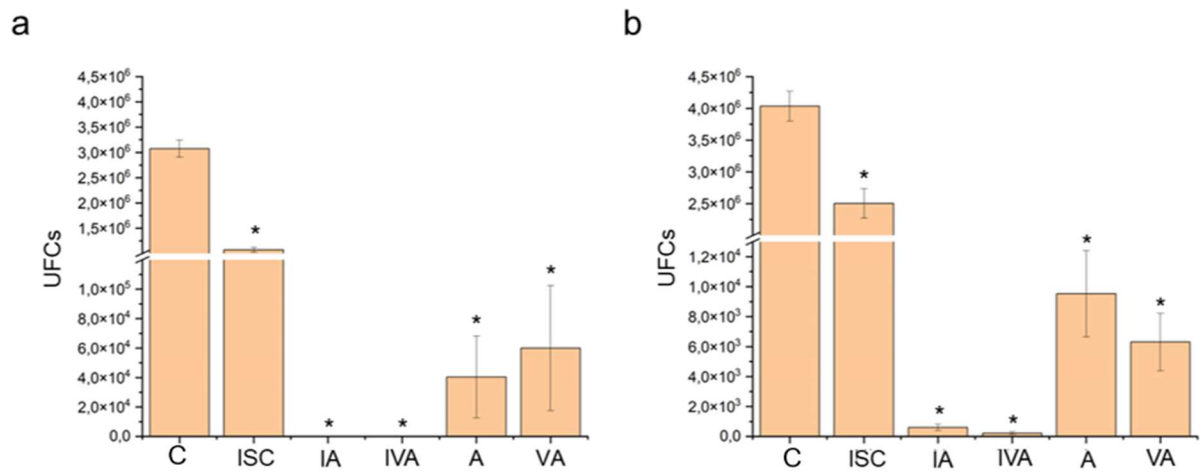


Figura 12

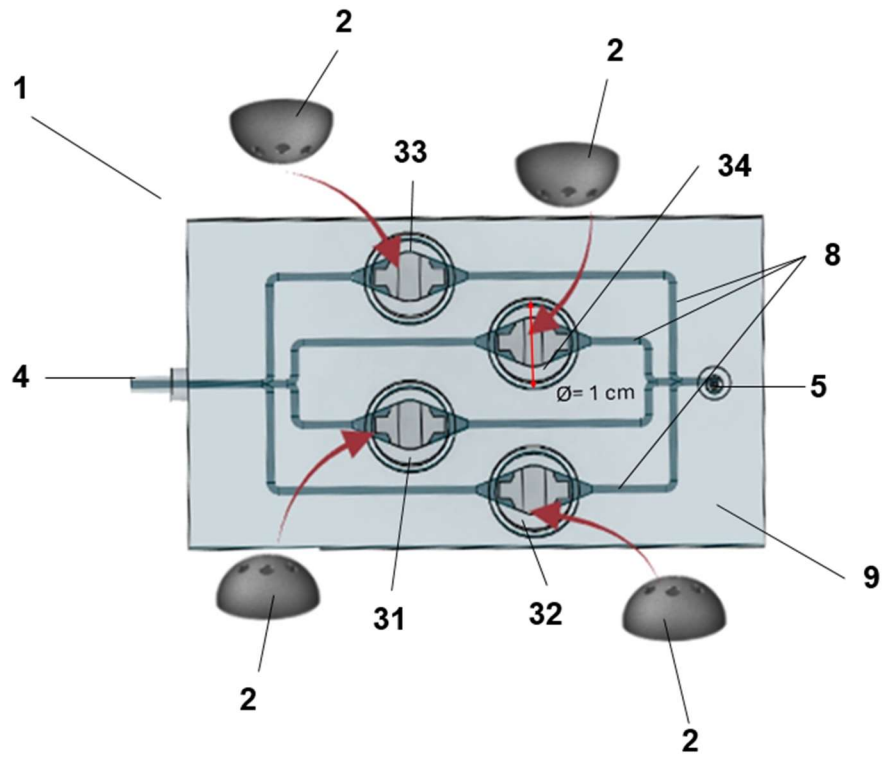


Figura 13

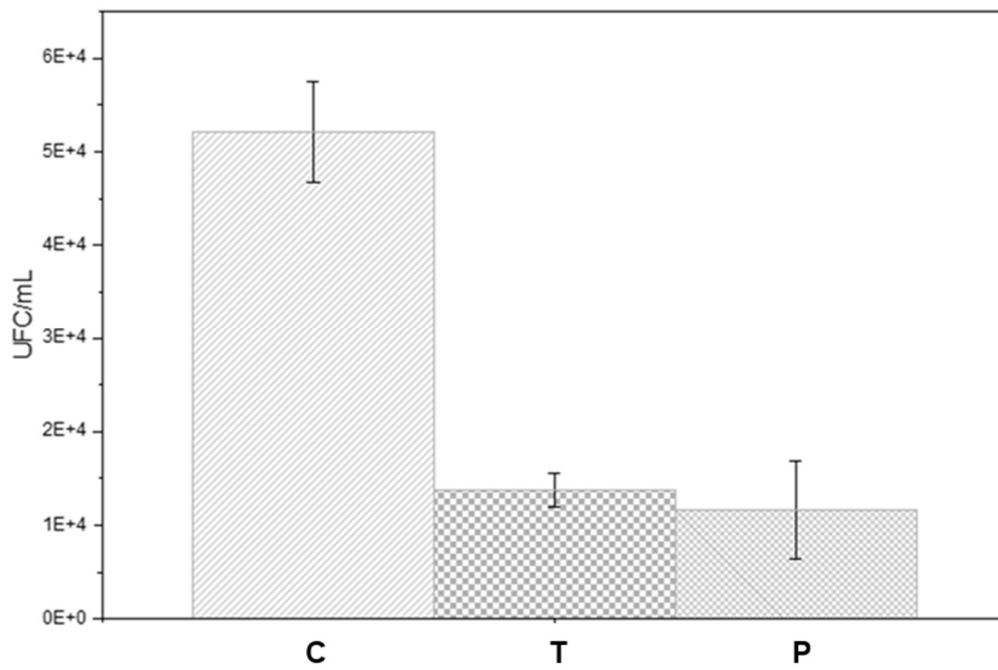


Figura 14

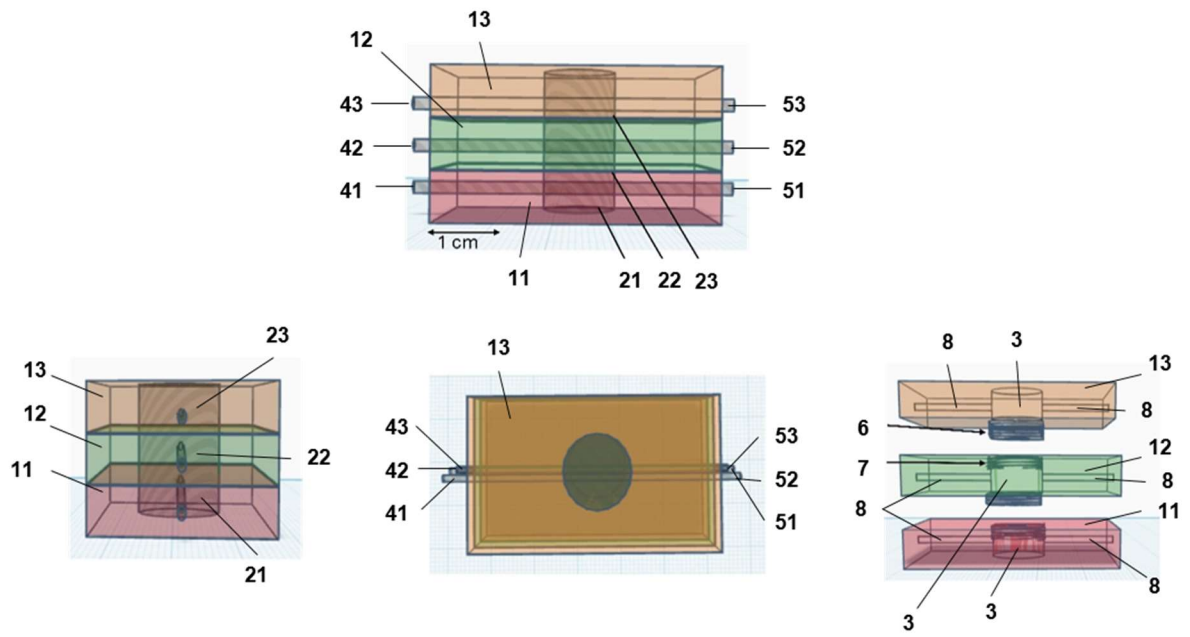


Figura 15



- ②① N.º solicitud: 202630211
②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.02.2026
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	HAN JINSUB et al. Development of a Scaffold-on-a-Chip Platform to Evaluate Cell Infiltration and Osteogenesis on the 3D-Printed Scaffold for Bone Regeneration.. ACS biomaterials science & engineering. 13 02 2023, 26/01/2023, Vol. 9, Nº 2, Páginas 968-977, ISSN 2373-9878 (electronic), DOI: 10.1021/acsbiomaterials.2c01367	1-27
Y	WO 2025110938 A1 (INITIO CELL BIYOTEKNOLOJI ANONIM SIRKETI) 30/05/2025, páginas 6 - 18; figuras 1 - 9.	1-27
A	CN 115651909 A (SHANGHAI 9TH PEOPLES HOSPITAL SHANGHAI JIAOTONG UNIV SCHOOL MEDICINE) 31/01/2023, todo el documento.	1-27
A	CN 113893387 B (UNIV DALIAN TECH) 03/02/2023, todo el documento.	1-27
A	CN 117511739 A (CHINA JAPAN FRIENDSHIP HOSPITAL CHINA JAPAN FRIENDSHIP INST OF CLINICAL MEDICINE) 06/02/2024, todo el documento	1-27
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 07.07.2026	Examinador C. Galdeano Villegas	Página 1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L27/56 (2006.01)

C12M1/00 (2006.01)

A61F2/28 (2006.01)

G01N33/50 (2006.01)

A61L27/54 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12M, A61L, A61C, A61F, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

Abs colección de Patentes