

**INFORME FINAL**

NOMBRE DEL ESTUDIO	PEI-243612 Desarrollo de dispositivos con base en Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas: Prueba de citotoxicidad		
NÚMERO DE SOLICITUD	UNIPREC/17/044-1		
FECHA DE INICIO DE LA EJECUCIÓN DEL ESTUDIO	29/01/18	FECHA DE TÉRMINO DE LA EJECUCIÓN DEL ESTUDIO	20/02/18
DURACIÓN DEL ESTUDIO	73 días		
FECHA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	N/A		
FECHA DE RECEPCIÓN DEL PRODUCTO	05/12/17		
MEDICAMENTO DE REFERENCIA (cuando aplique)	N/A		
INVESTIGADOR PRINCIPAL/DIRECTOR DE ESTUDIO	Ana Rosa Muñoz Duarte		
DIRECTORA DE LA UNIPREC	MA. ISABEL GRACIA MORA		
DIRECCIÓN Y TELÉFONO	UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL, CONJUNTO "D-E", FACULTAD DE QUÍMICA. CIRCUITO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. CIUDAD UNIVERSITARIA. C.P. 04510. TEL. 5622-5375		
PATROCINADOR	Agustín Carrillo, Biograft de México, S.A. de C.V.		
DIRECCIÓN Y TELÉFONO	SAN FRANCISCO 1103, ANEXO A, PLANTA BAJA, COLONIA DEL VALLE, DELEGACIÓN BENITO JUÁREZ, CDMX, C.P. 03100		

	Nombre	Puesto	Fecha	Firma
Elaboró	Ana Rosa Muñoz Duarte Isabel Gracia Mora	Investigador principal/Director de estudio Directora de la UNIPREC	15/03/18	
Revisó	Isabel Gracia Mora Ruth Bustamante García Mabel Tinoco Méndez	Directora de la UNIPREC Responsable de diseño experimental y análisis estadístico Responsable de Aseguramiento de la Calidad	20/03/18	
Autorizó	Francisco Sánchez Bartéz	Responsable Sanitario/de Asuntos Regulatorios	23/03/18	



**PEI-243612 Desarrollo de dispositivos con base en Matriz Ósea
Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas: Prueba de
citotoxicidad**

➤ Índice

Contenido	Pagina
1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
3. Objetivo.....	4
4. Materiales y métodos.....	4
4.1 Producto de prueba.....	4
4.2 Preparación del producto de prueba.....	4
4.3 Sistema de prueba.....	4
4.4 Justificación del sistema de prueba.....	5
4.5 Diseño experimental.....	5
4.6 Análisis de base de datos.....	5
4.6.1 Gestión de datos.....	5
4.6.2 Análisis estadístico.....	5
4.7 Retención de registros, muestras y especímenes.....	7
5. Resultados.....	7
6. Discusión.....	11
7. Conclusiones.....	12
8. Referencias.....	12



1. Resumen

En este estudio se tuvo por objetivo evidenciar la presencia o ausencia de actividad citotóxica del dispositivo con base en Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas sobre una línea celular de fibroblastos. Para lo cual se utilizó como sistema de prueba la línea celular NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1). En este sistema se hizo la elución del producto de prueba con medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) con 10% de Suero Fetal Bovino. Posteriormente las células se plaquearon de 96 pozos con 20,000 células por pozo y se pusieron en contacto durante 24 horas con concentraciones porcentuales del 10 al 100% del medio de elución por triplicado en dos ensayos independientes.

Después de incubar las células con las diferentes eluciones se reveló el efecto de esta sobre las mismas con sulforrodamina B, posteriormente se leyeron las densidades ópticas de cada pozo de la placa, para finalmente realizar el análisis estadístico de las mismas.

En el análisis estadístico se realizaron pruebas de estadística descriptiva (medidas de tendencia central y de dispersión): promedio, desviación estándar (D.E.), valor máximo, mínimo y % del coeficiente de variación (%C.V.). Se calculó el % de respuesta Vs. Concentración (% de eluyente) para el producto. Se calculó el IC50 encontrándose que este no se alcanza en ninguno de los volúmenes de elución utilizados en este protocolo.

2. Introducción

La industria de los dispositivos médicos se ha convertido en últimas décadas en una de las más productivas y con mayor crecimiento anual, su desarrollo se ha favorecido por un número importante de progresos científicos y tecnológicos recientes (mejora de los sistemas de adquisición, procesamiento, análisis y telecomunicaciones de señales fisiológicas, desarrollo de sistemas de interacción entre computadoras y el sistema nervioso de seres vivos, entre otros). Catapultándose como un mercado global altamente competitivo que impacta directamente en la salud de la población al ofrecer nuevas y en la mayoría de los casos mejores tratamientos para padecimientos diversos. La correcta regulación de los dispositivos médicos garantiza la calidad e inocuidad de estos, lo cual beneficia a la salud pública, los pacientes y trabajadores de la salud. Restringiendo también el uso de aquellos productos que no son seguros o que tienen uso clínico limitado.



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 4 De:13

Por lo que la Unidad de Investigación Preclínica oferta las pruebas necesarias para poder documentar la seguridad de los dispositivos médicos bajo las más estrictas condiciones de calidad científica y experimental, utilizando los lineamientos de la guía ISO 10993-1:1999 parte 5 para la realización de la prueba de citotoxicidad *in vitro*.

3. Objetivo

Conocer si la elución del dispositivo médico tiene efectos citotóxicos sobre la línea celular de fibroblastos NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1).

4. Materiales y métodos

4.1 Producto de prueba

El dispositivo médico fue provisto por el patrocinador identificándolo como DBM-NANO mismo que se recibió en jeringas prellenadas las cuales se almacenaron en la gaveta de productos de prueba a temperatura ambiente.

4.2 Preparación del producto de prueba

El producto de prueba fue pesado en la balanza BACC-UNIPREC-02 dentro de un tubo cónico estéril para posteriormente trabajar con él en condiciones de esterilidad dentro de la campana de flujo CFCC-UNIPREC-01 en donde se le agregó el medio de cultivo EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC, Lote 80405179) suplementado al 10% con suero fetal bovino (ATCC, Lote 63051336) necesario para tener 1mL de medio por cada 0.2gr del producto de prueba. El tubo se guardó dentro de la incubadora INCC-UNIPREC-01 durante 24h para obtener el líquido de la elución (ISO 10993-1:2006 parte 12).

4.3 Sistema de prueba

Para conocer los posibles efectos citotóxicos del producto de prueba se utilizó la línea celular NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1) la cual deriva de tejido conectivo subcutáneo misma que es ampliamente utilizada para este tipo de pruebas. El medio que se ocupó para proliferar a la línea celular fue el mismo con el que se obtuvo la elución, EMEM suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino. La proliferación se realizó bajo las condiciones estándares de cultivo (37°C, 5% CO₂) en la incubadora INCC-UIPREC-01 hasta que las células alcanzaron el 80-90



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 5 De:13

% de confluencia. Una vez alcanzado este porcentaje de confluencia se procedió a iniciar el ensayo de citotoxicidad colocando 20,000 células por pozo en placas de 96 pozos, para continuar como se describe en el procedimiento normalizado de operación para la prueba de actividad citotóxica (PNOAC-UNAM-UNIPREC-01). Las concentraciones utilizadas en el ensayo son concentraciones porcentuales del 10 al 100% del medio de elución.

4.4 Justificación del sistema de prueba

Al seguir las pautas que dicta la ISO 10993-5 y tomando como base la metodología de otros investigadores con exitosos resultados; el sistema de prueba que se estableció asegura la confiabilidad, reproducibilidad y el reconocimiento de esta prueba ante instancias Nacionales e Internacionales.

4.5 Diseño experimental

Para la evaluación de la toxicidad *in vitro* del dispositivo médico se utilizó el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B, el cual evalúa la densidad y proliferación celular; está basado en la comparación de la cantidad de colorante unido a las proteínas de la membrana de células adheridas tratadas, con respecto a células adheridas no tratadas.

La sulforrodamina B es un aminoxanteno de color rosa brillante con dos grupos sulfónicos que se enlazan a los residuos básicos de aminoácidos en condiciones ligeras de acidez y se disocia en condiciones de pH básico, las placas de 96 pozos se leyeron a una longitud de onda de 490nm en el lector de placas LECC-UNIPREC-01 de acuerdo con lo descrito en el PNOAC-UNAM-UNIPREC-01. La cantidad de sulforrodamina B enlazada a la membrana celular es directamente proporcional a la masa celular y por consiguiente con la viabilidad celular.

Una vez obtenidas las absorbancias de las placas, se realizó la determinación del porcentaje de células adheridas al final del experimento, el cual indica el porcentaje de células viables al momento de la fijación. Se considera la proliferación celular máxima (100%) de los pozos que no reciban tratamiento del compuesto de prueba (control negativo).

4.6 Análisis de base de datos.

4.6.1 Gestión de datos



Se determinaron las absorbancias en función de los μL de elución (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100) por triplicado por réplica (2) de la Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas. Teniendo una $n=3$ por réplica para cada elución.

4.6.2 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos de absorbancia por elución evaluada se realizaron las pruebas de estadística descriptiva (medidas de tendencia central y de dispersión): promedio, desviación estándar (D.E.), valor máximo, mínimo y % del coeficiente de variación (%C.V.). Se calculó el % de respuesta Vs. Concentración (% de eluyente) para el producto. Las pruebas antes mencionadas fueron calculadas mediante el programa Sigma plot versión 13.0[®] (1). El archivo se identificó como ESTADISTICA UNIPREC 17044-1 CITOTOXICIDAD.JBN, y contiene 4 carpetas tipificadas, el cual contiene la base de datos provenientes del archivo de Excel Formato de resultados de CC rev 0 (1).xls, así como gráficos y pruebas realizadas (Véase Figura 1).

Para el análisis de los datos de absorbancia por elución evaluada se realizaron las pruebas de estadística descriptiva (medidas de tendencia central y de dispersión): promedio, desviación estándar (D.E.), valor máximo, mínimo y % del coeficiente de variación (%C.V.). Se calculó el % de respuesta Vs. Concentración (% de eluyente) para el producto. Las pruebas antes mencionadas fueron calculadas mediante el programa Sigma plot versión 13.0[®] (1). El archivo se identificó como ESTADISTICA UNIPREC 17044-1 CITOTOXICIDAD.JBN, y contiene 4 carpetas tipificadas, el cual contiene la base de datos provenientes del archivo de Excel Formato de resultados de CC rev 0 (1).xls, así como gráficos y pruebas realizadas (Figura 1).

Según la guía ANSI/AAMI/ISO 10993-5:2009, se considerará que una disminución de la viabilidad mayor al 30% resulta en un producto citotóxico.

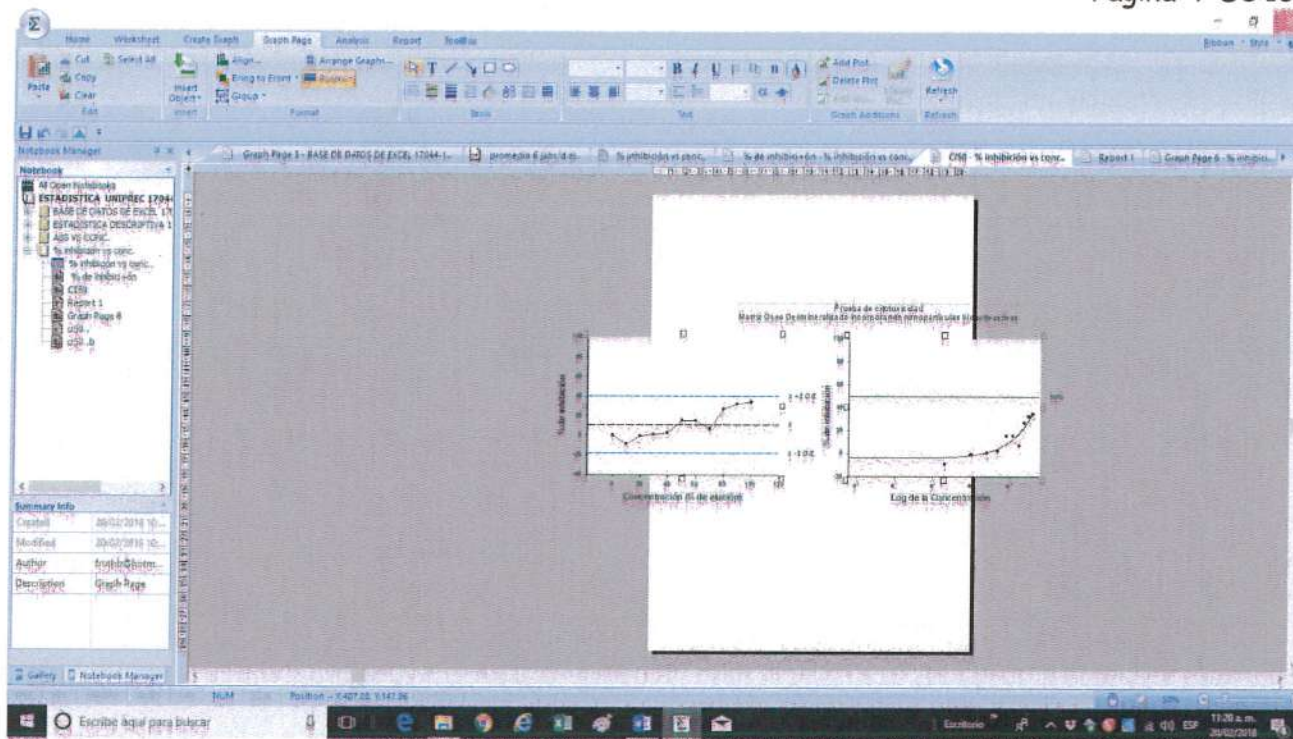


Figura 1. Plataforma del programa estadístico Sigma plot versión 13®. ESTADISTICA UNIPREC 17044-1 CITOTOXICIDAD.JBN, donde se muestran las carpetas que contiene el archivo.

4.7 Retención de registros, muestras y especímenes

El manejo de la documentación generada durante el estudio se llevó a cabo conforme lo indica el Manual de control de documentos y registros (MDR-UNAM-UNIPREC-01) y el Procedimiento para el manejo de la documentación de los protocolos preclínicos (PDP-UNAM-UNIPREC-01). La documentación se archivó en el expediente de análisis preclínico (EAP).

El EAP será resguardado por el archivista en el área de archivo de acuerdo con el Procedimiento para el manejo de archivo (PMA-UNAM-UNIPREC-01). Los documentos electrónicos quedarán resguardados en una nube virtual de uso exclusivo de la UNIPREC. El periodo de resguardo será por un periodo mínimo de cinco años. Al finalizar este tiempo el EAP y los materiales que apliquen serán entregados al Patrocinador quien lo conservará por el tiempo que juzgue pertinente.

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 8 De:13

5. Resultados

En el Cuadro 1 se indican las medidas de tendencia central y dispersión: promedio ($\bar{x}$), desviación estándar (D.E.), % del coeficiente de variación (% C.V.), máximos (Max) y mínimos (Min) del parámetro evaluado (absorbancias) en función de las eluciones evaluadas de la Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas, en donde se observa para la réplica 1 hubo mayor dispersión en función de la media para la concentración 50, 60, 80, 90 Y 100 no así para la segunda repetición donde los % C.V. fueron <20 %.

En la Figura 2 se muestra la absorbancia en función de los μL de elución para las dos réplicas donde se observan diferencias entre las réplicas (U-Mann-Whitney: 225, T=786, $p<0.001$).

En el cuadro 3, se muestran los valores promedio de absorbancia ($n=6$) $\pm$ D.E. de las dos réplicas, así como el % de respuesta y de inhibición en función de la Concentración (%) para el producto evaluado (la Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas).

Cuadro 1. Análisis descriptivo de las absorbancias por elución evaluada de la Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas, donde n =tamaño de muestra, $\bar{x}$ =promedio, D.E.=desviación estándar, % C.V.= porcentaje del coeficiente de variación, Max=máximo y Min=mínimo.

Repetición	Elución (μL)	n	$\bar{x}$	D.E.	% C.V.	Max	Min
1	0	3	0.424	0.021	5.000	0.440	0.400
	10	3	0.417	0.079	18.969	0.493	0.335
	20	3	0.345	0.006	1.771	0.352	0.340
	30	3	0.331	0.023	6.828	0.352	0.307
	40	3	0.358	0.017	4.832	0.378	0.347
	50	3	0.266	0.148	55.639	0.360	0.096
	60	3	0.254	0.082	32.087	0.313	0.161
	70	3	0.320	0.048	15.000	0.375	0.290
	80	3	0.213	0.139	65.258	0.373	0.120
	90	3	0.207	0.122	58.937	0.346	0.118
	100	3	0.215	0.090	41.767	0.318	0.155
2	0	3	0.375	0.009	2.445	0.385	0.367
	10	3	0.458	0.003	0.579	0.460	0.455
	20	3	0.460	0.061	13.239	0.496	0.390
	30	3	0.464	0.026	5.625	0.491	0.439
	40	3	0.424	0.077	18.255	0.478	0.335
	50	3	0.413	0.067	16.199	0.484	0.351
	60	3	0.426	0.039	9.155	0.471	0.399
	70	3	0.426	0.045	10.540	0.455	0.374
	80	3	0.372	0.068	18.145	0.439	0.304
	90	3	0.337	0.047	13.798	0.384	0.291
	100	3	0.312	0.026	8.462	0.341	0.290



En la Figura 3 se muestra el % de inhibición con respecto a las concentraciones evaluadas para el producto la Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas, así como el ajuste de la recta mediante la regresión no lineal de 4 parámetros $f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{-Hillslope})$; $f = \text{if}(x \leq 0, \text{if}(Hillslope > 0, \min, \max), f1)$, donde el coeficiente de correlación fue de 0.93 y el de determinación 0.88 y la concentración inhibitoria 50 (CI50) está por arriba del 100 %, ya que como se observa los valores máximos están por debajo del 40% del efecto inhibitorio. Así mismo se observa que el % de respuesta de inhibición está dentro de los límites del promedio ± 2 D.E.

Prueba de Citotoxicidad Uniprec 17044-1

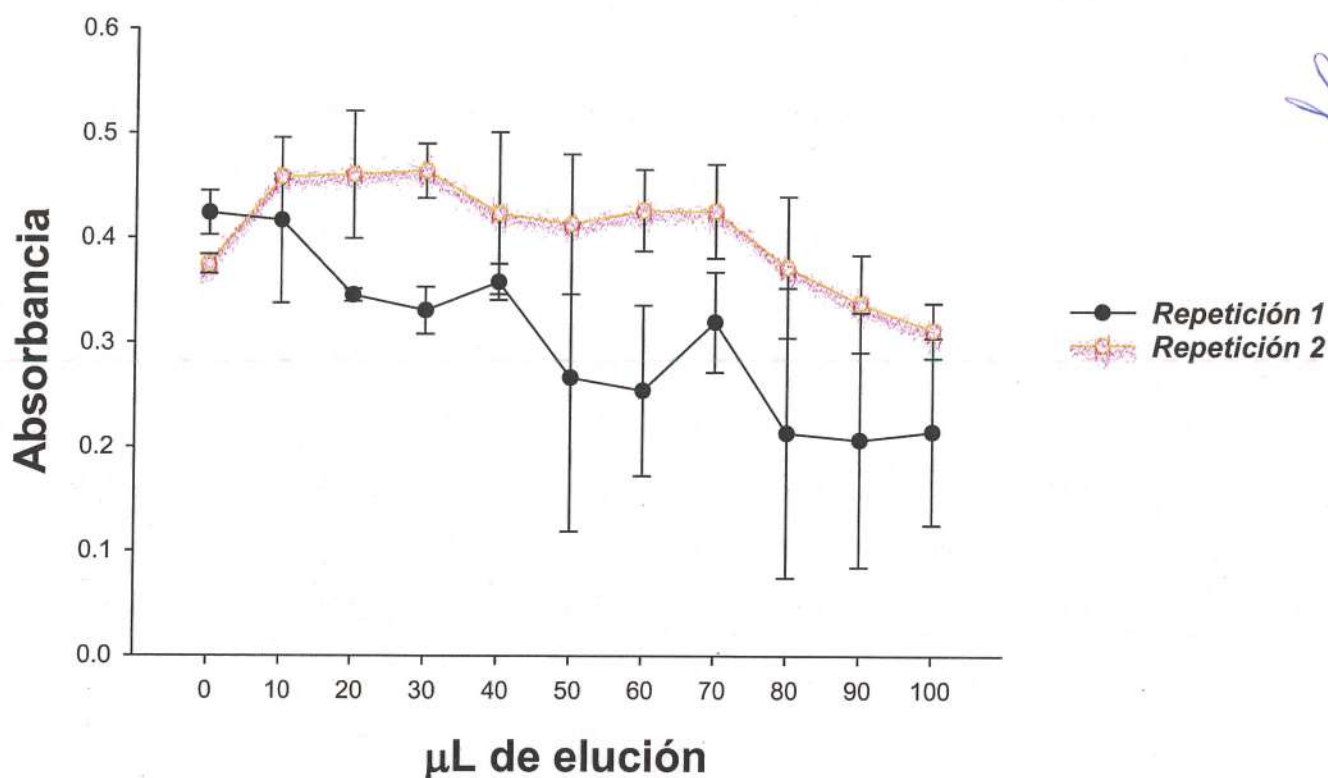


Figura 2. Prueba de citotoxicidad de la Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas. Absorbancia Vs. µL de elución, donde cada punto representa el promedio de la absorbancia $\pm$ D.E. por repetición para cada elución evaluada.

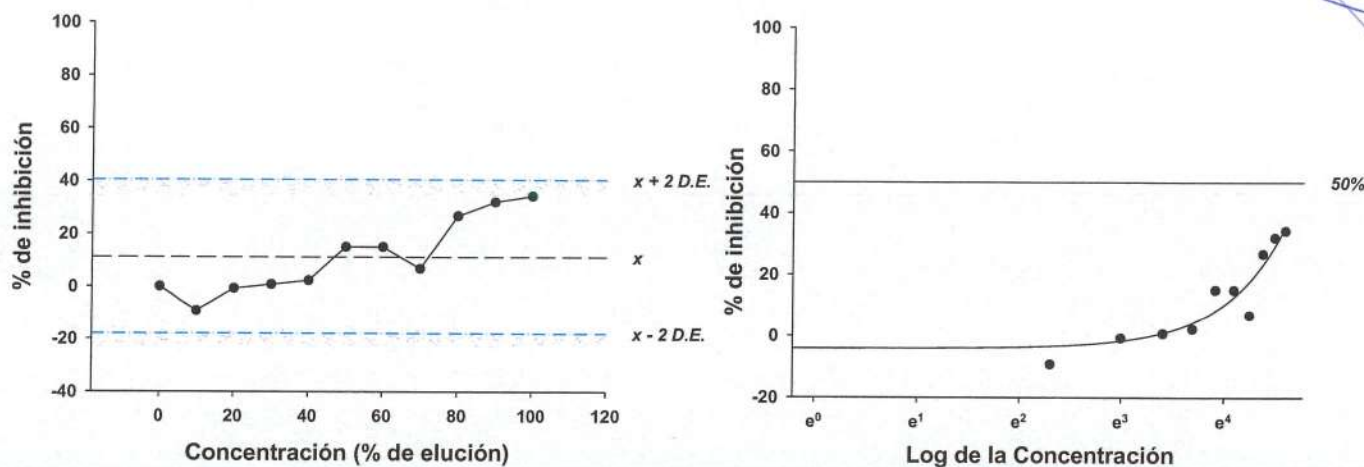
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 10 De:13

Cuadro 3: Promedio de absorbancia $\pm$ D.E. y % de respuesta y de inhibición en función de la concentración evaluada (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 %) del producto la Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas, donde $\bar{x}$ =promedio, D.E.=desviación estándar, Abs=absorbancia, Pba.=prueba; Ctr=control.

Concentración (%)	$\bar{x}$ (Absorbancias) $\pm$ D.E.	% Respuesta =(AbsPba/AbsCtr) *100)	% de Inhibición =100- (AbsPba/AbsCtr)*100)
0	0.400 $\pm$ 0.0305	100.00	0.00
10	0.437 $\pm$ 0.0550	109.25	-9.25
20	0.403 $\pm$ 0.0739	100.75	-0.75
30	0.397 $\pm$ 0.0762	99.25	0.75
40	0.391 $\pm$ 0.0617	97.75	2.25
50	0.340 $\pm$ 0.1300	85.00	15.00
60	0.340 $\pm$ 0.1100	85.00	15.00
70	0.373 $\pm$ 0.0714	93.25	6.750
80	0.293 $\pm$ 0.1310	73.25	26.75
90	0.272 $\pm$ 0.1090	68.00	32.00
100	0.263 $\pm$ 0.0796	65.75	34.25

Prueba de citotoxicidad
Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas



Parámetros de la regresión no lineal de 4 parámetros. $f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC50)^{-Hillslope})$; $f = \text{if}(x \leq 0, \text{if}(Hillslope > 0, \min, \max), f1)$							
CI ₅₀	Hillslope	Máximo	Mínimo	r	r ²	F	P
>100%	1.7629	100	-0.75	0.9394	0.8824	17.5114	0.0012

Figura 3. Prueba de citotoxicidad de la Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas). En el panel A se muestra el % de Elución Vs. Concentración de elución (%) y en el panel B el ajuste mediante la regresión no lineal de 4 parámetros, donde x = promedio; D.E.=desviación estándar, r =coeficiente de correlación y r^2 =coeficiente de determinación.

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 11 De:13

Los resultados obtenidos del IC50, corresponden a la reactividad leve según el cuadro de la guía ANSI/AAMI/ISO 10993-5:2009, Cuadro 4.

Cuadro: 4 Grado de citotoxicidad

Grado	Reactividad	Condiciones del cultivo
0	Ninguna	Discretos gránulos intracitoplasmáticos, no hay lisis celular, no existe reducción del crecimiento celular.
1	Insignificante	No más del 20% de las células son redondas, pérdida de anclaje y sin gránulos intracitoplasmáticos o cambios en la morfología; ocasionalmente se presenta lisis celular, ligera inhibición del crecimiento celular.
2	Leve	No más del 50% de las células son redondas y no más del 50% de inhibición del crecimiento celular.
3	Moderado	No más del 70% de las células son redonda o están lisadas y no se observa más del 50% de inhibición del crecimiento celular.
4	Severo	Casi completa o completa destrucción de las células.

6. Discusión

Los dispositivos médicos, como cualquier otro insumo para la salud deben de cumplir con los estándares nacionales e internacionales de eficacia y seguridad para poder ser probados y utilizados en humanos. Estas características se prueban *in vitro* e *in vivo*, siendo las pruebas *in vitro* las primeras en llevarse a cabo para reducir el número de animales de experimentación a utilizar, así como aminorar el sufrimiento que esto implica para dichos animales.

En este protocolo preclínico utilizamos un modelo *in vitro* que nos indica la actividad citotóxica de los materiales que componen el DBM-NANO sobre una línea celular de fibroblastos, consideramos la actividad citotóxica como la capacidad del dispositivo médico para modificar las funciones celulares básicas, lo que conlleva a que se produzca una alteración que pueda ser detectada.

En este caso utilizamos la elución del conjunto de materiales que conforman al DBM-NANO, encontrándose que su rango de seguridad es muy amplio pues aun en el volumen máximo de elución con el que estuvieron en contacto las células no se alcanzó la IC50.



7. Conclusiones

Los materiales con los que está fabricado el DBM-NANO no tienen efecto citotóxico sobre la línea celular NCTC clone 929 (ATCC: CCL-1) en ninguno de los volúmenes de elución utilizados en este protocolo, lo cual indica que tiene un amplio rango de seguridad para su uso previsto.

8. Referencias

- ISO 10993-1:2006 Biological evaluation of medical devices, Part 1. Evaluation and testing.
- ISO 10993-1:1999 Biological evaluation of medical devices, Part 5. Test for *in vitro* cytotoxicity.
- ISO 10993-1:2006 Biological evaluation of medical devices, Part 12. Sample preparation and reference.
- Guía ANSI/AAMI/ISO 10993-5:2009
- PNOAC-UNAM-UNIPREC-01 Procedimiento normalizado de operación para la prueba de actividad citotóxica.
- Voigt W. Sulforhodamine B assay an chemosensitivity. Methods Mol Med. 2005; 110:39-48.
- Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. Biomedical Reports. 2015;3(5):617-620. doi:10.3892/br.2015.481.
- Orellana EA, Kasinski AL. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. Bio-protocol. 2016;6(21): e1984. doi:10.21769/BioProtoc.1984.

Declaración del investigador principal/director de estudio

El estudio se realizó bajo un Sistema de Gestión de la Calidad que asegura las BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO registro BPL 02/15 (EMA/OCDE) y de acuerdo al protocolo aprobado y a los Procedimientos Normalizados de Operación de la UNIPREC.

Se detectaron desvíos durante la ejecución del estudio los cuales fueron analizados para medir su impacto y se determinaron las acciones a llevar a cabo (ver formato de registro de desviaciones (FRED-UNAM-UNIPREC-01).

Como investigador principal/director de estudio asumo la responsabilidad de que este estudio se realizó cumpliendo estrictamente los principios de las buenas prácticas de laboratorio.

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL / DIRECTOR DE ESTUDIO

Ana Rosa Muñoz Duarte

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 13 De:13

Declaración del responsable de aseguramiento de calidad

Durante la ejecución del estudio, UNIPREC/17/044-1 se llevaron a cabo diferentes inspecciones y los resultados de éstas fueron comunicadas a la Dirección de la UNIPREC así como al Investigador principal/director de estudio en las siguientes fechas:

Fecha de inspección	Etapas inspeccionadas	Fecha de reporte de hallazgos
12/12/17	Revisión del protocolo	12/12/17
14/12/17	Revisión del cronograma	14/12/17
01/02/18	Inspecciones al estudio - sistema de prueba (administración de las eluciones)	01/02/18
20-21/0/18	Revisión del informe final Inspecciones al estudio – datos crudos (Bitácora y expediente preclínico)	21/03/18

Por todo lo anterior se confirma que el informe final refleja fielmente los datos crudos obtenidos durante la ejecución del mismo.

NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Mabel C. Tinoco Méndez

FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO:

Ana Rosa Muñoz Duarte 23/03/18
(NOMBRE, FIRMA Y FECHA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL/DIRECTOR DE ESTUDIO)